



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALINE HOLANDA SILVA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE
***Erythrina velutina* PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA**
NEURODEGENERATIVA

FORTALEZA

2012

ALINE HOLANDA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE
Erythrina velutina PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA
NEURODEGENERATIVA**

Dissertação apresentada à Coordenação do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora:
Prof^ª. Dr^ª. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde
hyy

S578d

Silva, Aline Holanda

Desenvolvimento e caracterização do extrato de *Erythrina* velutina para o tratamento de doença neurodegenerativa / Aline Holanda Silva. – 2012.

113 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2012.

Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.

1. Erythrina 2. Compostos Fenólicos 3. Antioxidantes I. Título.

CDD 615.1

ALINE HOLANDA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE
Erythrina velutina PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA
NEURODEGENERATIVA**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 17/01/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof^ª. Dr^ª. Juvenia Bezerra Fontenele
Universidade Federal do Ceará

Prof^ª. Dr^ª. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará

*Aos meus pais, pela paciência, esforço e dedicação
despendidos à minha educação.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, provedor da minha existência.

Aos meus amados pais, Eudemberg e Magda, pelo grande esforço que fizeram para eu chegar aqui e por tanto se orgulharem do que eu faço. Também ao meu irmão, Alexandre, sobretudo por ter conseguido um ótimo emprego que me permite continuar nessa aventura.

Ao Emiliano, amigo, companheiro, confidente, namorado e certamente futuro marido. Pessoa muito importante na minha vida que me alegra a cada novo dia. Agradeço por seus ensinamentos e principalmente por sua gigantesca paciência e compreensão, características que fortalecem ainda mais nossa união.

A minha 2ª família que me adotou com muito carinho: Seu Ricardo (sogra), Dona Selma (sogra), Amanda (cunhada) e David (concunhado).

A minha família de quatro patas cuja existência é essencial: minha eterna Nenês (saudades sempre – gata); Pretinha (a irmã abusada – gata); Pequena (meu neném, meu miau-au-au; a gata mais maravilhosa do mundo); Bolota (o gato mais gordo, fofo e danado que existe); Pucca (a sobrinha sentimental - cadela); finado Telemar (boas lembranças de sua curta vida – hamster) e Tininha (meiga e adorável – cadela). Companheiros fiéis e sinceros.

A minha orientadora, Prof^{ra}. Dr^a. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal, não somente por ter me aceitado como sua aluna, mas por confiar no meu potencial e sempre me fazer acreditar que sou capaz. Sou grata por toda confiança e responsabilidade depositada sobre mim, o que me enriqueceu bastante e fez-me crescer não só como pesquisadora, mas também como pessoa.

Ao Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior e ao Dr. Hemerson Yuri Ferreira Magalhães pelo auxílio nos estudos com cultura de células.

À Dr^a Silésia, a Silezinha, pelos abraços, beijos e aperreios matinais.

À Raimundinha (pela sua paciência e pela sua disposição em ajudar, sempre descomplicando tudo).

Ao Jonas, pessoa com enorme potencial, cuja ajuda foi fundamental.

A todos os amigos de laboratório: Anderson (em quem eu sempre posso colocar a culpa de tudo que acontece de errado e por tanto me fazer rir), Nathália (por me fazer sentir que um dia orientarei alguém); Sandra (por seus ensinamentos e por compartilhar sua grande experiência; pessoa admirável e, sem dúvida, um exemplo a seguir); Amanda (pelos momentos de psicanálise, principalmente quando a bagunça do laboratório já ultrapassou o limite do suportável); Taiana e Suzana (momento “auto-ajuda”), Mariana, Talita, Luri, Tâmara, Tallysson, Bianca, Ângelo (pelas conversas e momentos de distração), Karla e Elaine (pelo apoio no laboratório e por compartilhar os momentos de estresse).

À família que eu escolhi e que me acolheu e aos amigos que aqui não foram pontuados, mas que nem por isso são menos importantes.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o cumprimento desta etapa...

MUITO OBRIGADA!!!

*Em vão buscaremos a felicidade
se não a cultivarmos dentro de nós.*

(Jean-Jacques Rousseau)

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E CARCTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE *Erythrina velutina* PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA NEURODEGENERATIVA. Aline Holanda Silva. Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Farmácia/Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Ceará, 2011.

Dentre as espécies do gênero *Erythrina* (Fabaceae), duas conhecidas popularmente como mulungu, *E. velutina* e *E. mulungu*, tem comprovado interesse social e econômico para o Brasil. *E. mulungu* ocorre no Sudeste, pertence à Relação Nacional de Plantas de Interesse para o SUS (RENISUS). Já *E. velutina* é uma árvore amplamente utilizada no Nordeste, cuja casca do caule é utilizada tradicionalmente no tratamento da ansiedade, agitação e insônia. Contudo, não existe um produto farmacêutico com qualidade agregada e estudos farmacológicos dessa espécie para justificar seu uso medicinal. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi realizar o desenvolvimento e o controle de qualidade do extrato de *Erythrina velutina* e investigar as atividades antioxidante e neuroprotetora, visando seu emprego no tratamento de doença neurodegenerativa, como a Doença de Parkinson (DP). Inicialmente, foi validado método espectrofotométrico para dosagem de fenóis totais (FT) em produtos derivados de *E. velutina*, sendo este específico, linear, preciso, exato e robusto. Foi estabelecido o método de preparação (estufa com circulação e renovação de ar – 80°C; 24h) e especificações para o controle da droga vegetal. O extrato etanólico de *E. velutina* (EEEV) produzido por percolação foi caracterizado quando ao teor de FT ($155,14 \pm 3,31 \mu\text{EAG/mg}$ de extrato) e perfil cromatográfico por CLAE-DAD (Fenóis: hesperidina - Tr: 18,8 min; abssinina - Tr: 22,9 min; homoesperidina - Tr: 31,2 min; ácido rizônico (AR) - Tr: 32,1 min e sigmoidina C - Tr: 38,6 min). O EEEV não mostrou citotoxicidade no teste do MTT, mas aumentou (EEEV: 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) a atividade da LDH em neutrófilo humano. Em células 9L/lacZ, o EEEV (100, 400, 1000 $\mu\text{g/mL}$) reduziu significativamente a viabilidade celular, teste MTT. EEEV (0,0025 – 1 $\mu\text{g/mL}$) e AR (0,0025 – 1 $\mu\text{g/mL}$) não foram citotóxicos e inibiram parcialmente a neurotoxicidade induzida por 6-OHDA em células SH-SY5Y, modelo experimental de DP, observada pela redução significativa dos níveis de nitrito/nitrato. Na avaliação do potencial antioxidante, testes DPPH e NBT, o EEEV (10 – 200 $\mu\text{g/mL}$) apresentou atividade sequestradora de radicais livres no teste DPPH. Os resultados obtidos no presente estudo permitiram definir as condições ideais de preparação da droga vegetal e do

extrato, os quais foram caracterizados, incluindo validação de método analítico e avaliação farmacológica, comprovando o potencial antioxidante e neuroprotetor do EEEV e AR.

Palavras-chave: *Erythrina velutina*. Compostos Fenólicos. Antioxidante. Neuroproteção.

ABSTRACT

DESENVOLVIMENTO E CARCTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE *Erythrina velutina* PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA NEURODEGENERATIVA. Aline Holanda Silva. Advisor: Prof^a. Dr^a. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Máster Degree. Program of Post-Graduation in Pharmaceutical Sciences. Department of Pharmacy/Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceará, 2011.

Among the species of the genus *Erythrina* (Fabaceae), popularly known as mulungu, *E. velutina* and *E. mulungu*, has proven social and economic interest to Brazil. *E. mulungu* occurs in the Southeast, belongs to the National List of Plants of Interest to the SUS (Rennisus). *E. velutina* is a tree widely used in the Northeast, whose stem bark is traditionally used to treat anxiety, agitation and insomnia. Studies have shown the chemical nature and pharmacological properties of this species, which has no pharmaceutical studies. Based on the above, the objective of this study was to realize the development and quality control of the *Erythrina velutina* extract, and to investigate the antioxidant and neuroprotective activities, aiming at their use in the treatment of neurodegenerative disease such as Parkinson's Disease (PD). Initially, was validated the spectrophotometric method for determination of total phenols (FT) in products derived from *E. velutina*, which was specific, linear, precise, accurate and robust. Was established the method of preparation (oven with air circulation and renewal of: 80°C, 24 h) and specifications for the control of the plant drug. The ethanol extract of *E. velutina* (EEEV) produced by percolation was featured as the content of FT (155.14 ± 3.31 µg EAG/mg) and chromatographic profile by HPLC-DAD (Phenols: Hesperidin (Tr: 18.6), Absinine (Tr: 22.9 min), Homoesperidin (Tr: 31.2 min), Rizonic acid (RA) (Tr: 32.1 min) and Sigmoidin C (Tr: 38.6 min). EEEV no showed cytotoxicity, in the MTT test, but increased (EEEV: 100 and 200 mg/mL) LDH activity in human neutrophil. In cells 9L/lacZ, the EEEV (100, 400, 1000 mg/mL) reduced cell viability, shown in the MTT test. EEEV (0.0025 - 1 mg/mL) and AR (0.0025 - 1 g/mL) were not cytotoxic and partially inhibited the neurotoxicity induced by 6-OHDA in SH-SY5Y cells, a PD-like *in vitro* model, observed by decreased on the amount of nitrite/nitrate. In evaluation the antioxidant potential, DPPH and NBT tests, EEEV (10 - 200 mg/mL) showed enhanced free radical scavenging in the DPPH test. Results obtained in this study allowed to define the ideal conditions for drug preparation and plant extract, which have been characterized, including validation of

analytical method and pharmacological evaluation, demonstrating the potential antioxidant and neuroprotective of EEEV and AR.

Keywords: *Erythrina velutina*. Phenolic Compounds. Antioxidant. Neuroprotective.

LISTA DE ABRAVIATURAS

±	Mais ou menos
%	Porcentagem
°C	Grau (s) Centígrado (s)
<	Menor que
µg	Micrograma
µL	Microlitro
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
Abs	Absorvância
AR	Ácido Rizônico
cels	Células
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
DAD	Detector de Arranjo de Diiodo
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
DPR	Desvio Padrão Relativo
EAG	Equivalentes em Ácido Gálico
EDTA	Etilenodiaminotetraacético
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EEEV	Extrato Etanólico de <i>Erythrina velutina</i>
EPM	Erro Padrão da Média
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN	Espécies Reativas do Nitrogênio
<i>et al.</i>	... e colaboradores
FT	Fenóis Totais
g	grama
h	Hora
HBSS	Solução salina tamponada de Hanks
IN	Instrução Normativa

Kg	Kilograma
LDH	Lactato Desidrogenase
M	Molar
m	Metro
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MTT	Brometo de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
N	Normal
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Desidrogenase
NBT	Azul de nitrotetrazólio
nm	Nanômetro
p/p	Peso por Peso
PVDF	Fluorido de Polivinilideno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
rpm	Rotações Por Minuto
SOD	Superóxido dismutase
Tr	Tempo de Retenção
Tx	Triton-X 100
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultra-Violeta
v/v	Volume por Volume
Vit. C	Vitamina C
Vit. E	Vitamina E
Vs	Versus
W	Watts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa brasileiro identificando os locais de ocorrência de <i>Erythrina velutina</i>	24
Figura 2. <i>Erythrina velutina</i> Willd	26
Figura 3. Substâncias obtidas a partir da casca do caule de <i>Erythrina velutina</i> Willd.....	28
Figura 4. Corte encefálico destacando as estruturas dos gânglios da base relacionadas à doença de Parkinson	32
Figura 5. Esquema da condução elétrica dos gânglios da base na doença de Parkinson	33
Figura 6. Alterações morfológicas na DP.....	34
Figura 7. Principais neurotoxinas utilizadas para induzir modelos de doença de Parkinson..	36
Figura 8. Oxidação da 6-hidroxidopamina (6-OHDA)	37
Figura 9. Fluxograma representativo das metodologias desenvolvidas no estudo.....	43
Figura 10. Fluxograma do estudo fitoquímico do extrato etanólico bruto (EEB) da casca do caule de <i>Erythrina velutina</i>	45
Figura 11. Varredura espectrofotométrica para determinação da especificidade do método..	64
Figura 12. Curvas de calibração obtidas pelo método espectrofotométrico (715 nm).....	66
Figura 13. Distribuição granulométrica da casca do caule de <i>Erythrina velutina</i> seca em estufa com renovação e circulação de ar	70
Figura 14. Perfil cromatográfico do extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> (EEEV) e de seus metabólitos	74
Figura 15. Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> (EEEV) em neutrófilos humano determinada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)	75
Figura 16. Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> (EEEV) em neutrófilos humano determinada através do teste do MTT	76
Figura 17. Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> (EEEV) em células gliais determinada através do teste do MTT.....	77
Figura 18. Efeito do extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> (EEEV) sobre a viabilidade de células SH-SY5Y na presença e na ausência da 6-OHDA: teste do MTT	78
Figura 19. Efeito do ácido rizônico (AR) sobre a viabilidade de células SH-SY5Y na presença e na ausência da 6-OHDA: teste do MTT	79
Figura 20. Efeito do extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> (EEEV) nos níveis de nitrito/nitrato na ausência e na presença de 6-OHDA em células SH-SY5Y	80

Figura 21. Efeito do ácido rizônico (AR) nos níveis de nitrito/nitrato na ausência e na presença de 6-OHDA em células SH-SY5Y	81
Figura 22. Avaliação do potencial sequestrador de radicais livres do extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> (EEEV), determinada pelo teste do DPPH.....	82
Figura 23. Avaliação da atividade da superóxido dismutase no efeito antioxidante do extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> (EEEV)	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações e volumes de ácido gálico empregados na construção de curva padrão de ácido gálico, por espectrofotometria.....	48
Tabela 2. Concentrações e volumes empregados na curva de calibração do extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> com adição de solução padrão de ácido gálico, por espectrofotometria.	48
Tabela 3. Preparo das soluções para o ensaio de exatidão/recuperação.	50
Tabela 4. Identificação de patógenos na casca do caule de <i>Erythrina velutina</i>	54
Tabela 5. Condições cromatográficas utilizadas no método para a identificação dos marcadores hesperidina, abssinina, homoesperidina, ácido rizônico e sigmoidina C no extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> por CLAE-DAD.	55
Tabela 6. Programação gradiente para eluição da fase móvel do método de análise dos marcadores hesperidina, abssinina, homoesperidina, ácido rizônico e sigmoidina C no extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> por CLAE-DAD.	56
Tabela 7. Testes de prospecção fitoquímica para a casca do caule de <i>Erythrina velutina</i>	63
Tabela 8. Valores de absorvâncias do ácido gálico obtidos por espectrofotometria (715 nm).	65
Tabela 9. Valores de absorvâncias do extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> com adição de ácido gálico obtidos por espectrofotometria (715 nm).....	65
Tabela 10. Avaliação da precisão intermediária do método para análise de fenóis totais no extrato etanólico de <i>E. velutina</i> por espectrofotometria.....	67
Tabela 11. Determinação da exatidão (recuperação) por adição de três diferentes concentrações de ácido gálico ao extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i>	68
Tabela 12. Avaliação estatística da robustez do método desenvolvido por espectrofotometria para quantificação de fenóis totais no extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> ($p < 0,05$).....	68
Tabela 13. Teor de umidade da droga vegetal de <i>Erythrina velutina</i> em diferentes tempos de secagem em estufas.	69
Tabela 14. Caracterização farmacognóstica da droga vegetal de <i>Erythrina velutina</i>	70
Tabela 15. Análises microbiológicas do pó das cascas da droga vegetal de <i>Erythrina velutina</i>	71
Tabela 16. Determinação do teor de fenóis totais e rendimento dos processos extrativos.....	72
Tabela 17. Resumo dos resultados obtidos na avaliação pré-clínica do extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i>	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Desenvolvimento de medicamentos a partir de plantas medicinais	21
1.2 <i>Erythrina velutina</i>	23
1.2.1 Aspectos Geográficos, Botânicos e Etnofarmacológicos	23
1.2.2 Aspectos Químicos	27
1.2.3 Aspectos Toxicológicos e Farmacológicos	29
1.3 Síndromes Degenerativas do Sistema Nervoso Central: Doença de Parkinson	31
1.4 Modelos experimentais da doença de Parkinson: 6-OHDA e células SH-SY5Y	36
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	40
3.1 Geral	40
3.2 Específicos	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Materiais	41
4.1.1 Material vegetal	41
4.1.2 Aspectos éticos	41
4.1.3 Material biológico	41
4.1.4 Drogas, reagentes e substâncias químicas de referência	41
4.1.5 Equipamentos	42
4.1.6 Outros materiais.....	42
4.2 Métodos	43
4.2.1 Estudo fitoquímico de <i>Erythrina velutina</i>	44
4.2.1.1 Prospecção fitoquímica.....	44
4.2.2.2 Obtenção de constituintes químicos a partir da casca do caule de <i>Erythrina velutina</i>	44
4.2.2 Validação de método analítico para quantificação, por espectrofotometria, de fenóis totais, marcador químico, no extrato de <i>Erythrina velutina</i>	46
4.2.2.1 Preparo da solução padrão de ácido gálico.....	46
4.2.2.2 Preparo do extrato de <i>Erythrina velutina</i> utilizado no processo de validação	46
4.2.2.3 Validação de metodologia analítica para determinação do teor de fenóis totais.....	47
▪ Especificidade.....	47

▪ Linearidade e intervalo.....	47
▪ Precisão.....	49
▪ Exatidão/Recuperação.....	49
▪ Robustez.....	49
4.2.3 Preparação e caracterização farmacognóstica da droga vegetal	50
4.2.3.1 Secagem e cominuição	50
4.2.3.2 Determinação do teor de umidade	50
4.2.3.3 Análise granulométrica.....	50
4.2.3.4 Determinação da densidade aparente	51
4.2.3.5 Determinação do teor de cinzas totais	52
4.2.3.6 Determinação de cinzas insolúveis em ácido	52
4.2.3.7 Determinação do teor de extrativos em etanol	52
4.2.3.8 Determinação do teor de extrativos em água.....	53
4.2.4 Controle microbiológico da droga vegetal.....	53
4.2.5 Desenvolvimento, avaliação e seleção do método de produção do extrato de <i>Erythrina velutina</i> monitorado pelo teor de fenóis totais	54
4.2.6 Perfil cromatográfico do extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> por CLAE-DAD.	55
4.2.7 Avaliação pré-clínica do extrato padronizado de <i>Erythrina velutina</i>	56
4.2.7.1 Avaliação da citotoxicidade em neutrófilos humano	56
▪ Atividade enzimática da Lactato Desidrogenase (LDH).....	57
▪ Teste do MTT.....	58
4.2.7.2 Avaliação da citotoxicidade em células da linhagem 9L/lacZ	58
4.2.7.3 Modelo experimental da Doença de Parkinson: efeito do EEEV e do ácido rizônico (AR) sobre a neurotoxicidade induzida por 6-OHDA em linhagem humana celular SH-SY5Y.	59
▪ Teste do MTT.....	59
▪ Determinação de Nitrito/Nitrato.....	60
4.2.7.4 Determinação da atividade antioxidante.....	60
▪ Teste do DPPH.....	60
▪ Determinação da atividade da Superóxido Dismutase.....	61
4.2.8 Análise Estatística.....	62
5 RESULTADOS	63
5.1 Prospecção fitoquímica	63

5.2 Validação de método analítico para quantificação, por espectrofotometria, de fenóis totais, marcador químico, no extrato de <i>Erythrina velutina</i>	64
5.2.1 Especificidade.....	64
5.2.2 Linearidade e faixa de trabalho	65
5.2.3 Precisão.....	67
5.2.4 Exatidão	67
5.2.5 Robustez	68
5.3 Preparação e caracterização do material vegetal: umidade residual, granulometria, cinzas, teor de extrativos e fenóis totais.....	69
5.4 Controle microbiológico da droga vegetal de <i>Erythrina velutina</i>	71
5.5 Desenvolvimento, avaliação e seleção do método de produção do extrato de <i>Erythrina velutina</i> monitorado pelo teor de fenóis totais.....	72
5.7 Perfil cromatográfico do extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> por CLAE-DAD... 	73
5.8 Avaliação pré-clínica do extrato etanólico de <i>Erythrina velutina</i> (EEEV)	75
5.8.1 Avaliação da citotoxicidade em neutrófilos humano	75
5.8.2 Avaliação da citotoxicidade em células da linhagem 9L/lacZ	77
5.8.3 Modelo experimental da Doença de Parkinson: efeito do EEEV e do ácido rizônico (AR) sobre a neurotoxicidade induzida por 6-OHDA em linhagem humana celular SH-SY5Y	78
▪ Teste do MTT.....	78
▪ Determinação de Nitrito/Nitrato.....	80
5.8.4 Determinação da atividade antioxidante.....	82
6 DISCUSSÃO	85
7 CONCLUSÕES.....	98
REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento de medicamentos a partir de plantas medicinais

A terapêutica moderna composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos não teria sido possível sem a contribuição dos produtos naturais, tais como as toxinas animais, os microrganismos e notadamente as plantas superiores (FARNSWORTH, 1993; CALIXTO, 2000).

As plantas são visivelmente uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos. A razão dessa afirmação é facilmente comprovada quando se analisa a quantidade de medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais (CRAGG *et al.*, 1997; PANDEY, 1998; HARVEY, 2000). Incluem-se nesta lista a digoxina, o paclitaxol, a pilocarpina, a artemisinina, a vinblastina dentre outras.

A Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (ABIFISA) relata que segundo a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 80% da população mundial utiliza-se de algum medicamento derivado de plantas medicinais. Pesquisas também demonstram que 91,9% da população brasileira já fez uso desses produtos, sendo que 46% cultivam em casa alguma espécie de planta medicinal. Atualmente, estima-se que o mercado brasileiro de fitoterápicos movimente cerca de R\$ 1 bilhão por ano (ABIFISA, 2011).

A transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização. Para atingir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios e multidisciplinares, relativos aos aspectos botânico, agrônomo, fitoquímico, farmacognóstico, farmacológico, toxicológico, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (MIGUEL; MIGUEL, 1999). O cumprimento dessas etapas é fundamental para obtenção de um produto final com qualidade e tecnologia agregadas (STROHL, 2000; TOLEDO *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, várias desvantagens relacionadas à busca de novos fármacos a partir de produtos naturais têm sido superadas através da aplicação de novas tecnologias úteis, desde a realização de estudos químicos, farmacêuticos a farmacológicos. Isso vem permitido o desenvolvimento de fitoterápicos com segurança, eficácia e qualidade comprovadas, como *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* e *Valeriana officinalis*, que se destacam no mercado farmacêutico internacional (SCKENKEL *et al.*, 2003; BLUMENTHAL, 2009). Por outro lado, embora exista uma grande variedade de produtos naturais no mercado nacional, como xarope de guaco (*Mikania glomerata*), de agrião (*Nasturtium officinale*) e de *Hedera helix*, tintura de agoniada (*Plumeria lancifolia*) e o Acheflan[®] creme (*Cordia verbenacea*), primeiro medicamento com pesquisa e desenvolvimento totalmente nacional, ainda há uma carência expressiva de produtos derivados de plantas que possuam estudos conclusivos, comprovando a segurança e a eficácia clínica de seu uso, além de um rigoroso controle de qualidade (SILVA *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2006).

A tendência observada para a fitoterapia no Brasil é que esta desempenha um papel cada vez mais importante na assistência à saúde da população. Em 2006, duas políticas foram publicadas para o setor de plantas medicinais e fitoterápicos. A primeira foi a Portaria Ministerial n^o 971, de 03 de maio de 2006, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) e a segunda foi o Decreto n^o 5.813, de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências (BRASIL, 2006a,b). Ambas apresentam em suas diretrizes o incentivo à pesquisa e o desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do país (CARVALHO *et al.*, 2008). Em 2008, por meio da Portaria Interministerial n^o 2.960, de 9 de dezembro de 2008, foi criado o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com a atribuição de monitorar e avaliar o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. E finalmente, em 2010, foi instituído o programa Farmácia Viva no âmbito do SUS, através da Portaria Ministerial n^o 886, de 20 de abril de 2010 (BRASIL, 2008a, 2010a).

A regulamentação nacional em vigor para o registro de medicamentos fitoterápicos é a RDC 14/2010 (BRASIL, 2010b), que contempla aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica, padrão de qualidade, identidade e provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas, sendo complementada pelas IN 5/2008, que determina a publicação da lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado, e IN

5/2010, que estabelece a lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia (BRASIL, 2008b; 2010c).

Percebendo os desafios inerentes ao desenvolvimento de fármacos e medicamentos a partir de plantas medicinais, os cientistas brasileiros têm se dedicado ao aproveitamento racional da biodiversidade brasileira, visando transformar o imenso patrimônio genético natural em riquezas, que poderão fomentar a criação de indústrias de base tecnológica. Esse objetivo tem sido aos poucos alcançado graças ao incentivo havido no Brasil para formar recursos humanos qualificados através de Programas de Pós-Graduação na área do medicamento. Entretanto, ainda persiste a carências de recursos humanos qualificados nas áreas relacionadas às etapas da cadeia produtiva do medicamento, como a toxicologia, farmacologia clínica, tecnologia farmacêutica, propriedade intelectual, entre outras.

Na região Nordeste, em particular no Ceará, pesquisadores têm investido no desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos a partir da flora nativa, que possuam vantagens em relação a farmacoterapia existente, aplicada no tratamento de patologias de impacto social e econômico. Dentre as espécies que estão sendo investigadas, podemos relacionar *Justicia pectoralis* (LINO *et al.*, 1997; LEAL *et al.*, 2000; FONSECA, 2009), *Myracrodruon urundeuva* (VIANA *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2007; NOBRE-JÚNIOR *et al.*, 2009), *Amburana cearensis* (LEAL *et al.*, 2000, 2003; ARARUNA, 2008), *Egletes viscosa* (RAO *et al.*, 2003; CALOU *et al.*, 2008) e *Erythrina velutina* (VASCONCELOS *et al.*, 2003; 2004; 2007; 2011).

1.2 *Erythrina velutina*

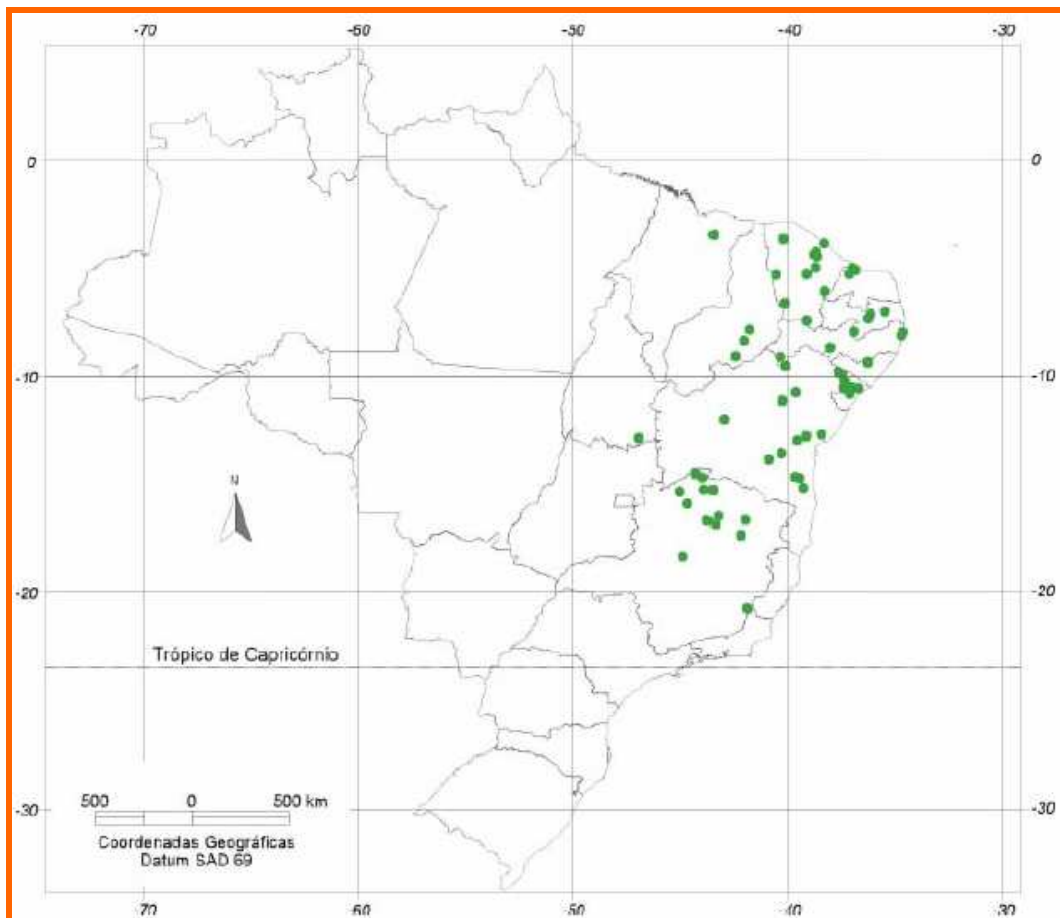
1.2.1 Aspectos Geográficos, Botânicos e Etnofarmacológicos

Ocorrendo mundialmente nas regiões tropicais e subtropicais, o gênero *Erythrina* (Fabaceae) possui cerca de 110 espécies catalogadas, sendo que 70 são naturais das Américas (VIRTUOSO, 2005), dentre as quais podemos citar *Erythrina verna*, *Erythrina piscidia*, *Erythrina americana*, *Erythrina crista-galli*, *Erythrina falcata*, *Erythrina mulungu* e *Erythrina velutina*. Na América do Sul, estas espécies são facilmente encontradas em países como Argentina, Bolívia, Paraguai, Guiana, Guiana Francesa, Colômbia, Panamá e Peru. No Brasil, estão amplamente disseminadas em diversos biomas como Mata Atlântica, Cerrado,

Floresta Amazônica e Caatinga nordestina. No entanto, duas espécies são consideradas como sendo as mais importantes devido ao seu potencial farmacológico, *Erythrina mulungu*, nativa da região Sudeste e pertencente à Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos de Interesse ao SUS (RENISUS) e, a sua semelhança, *Erythrina velutina*, proveniente da região Nordeste, sendo encontrada nos estados do Maranhão, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Minas Gerais e Ceará (**Figura 1**) (VIRTUOSO, 2005; EMBRAPA, 2008; CABRAL, 2009).

O termo *Erythrina* possui origem grega, *erythros*, que significa vermelho, em alusão à cor de suas flores e o epíteto específico *velutina*, origina-se do latim, referindo-se à presença de um conjunto de pêlos macios e delicados em suas folhas. Outras sinonímias científicas encontradas são: *Chirocalyx velutinus* Walp., *Corallodendron velutinum* (Willd.) Kuntze, *Erythrina aculeatissima* Desf., *Erythrina splendida* Diels (EMBRAPA, 2008).

Figura 1. Mapa brasileiro identificando os locais de ocorrência de *Erythrina velutina*.



Fonte: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Circular técnica, 2008.

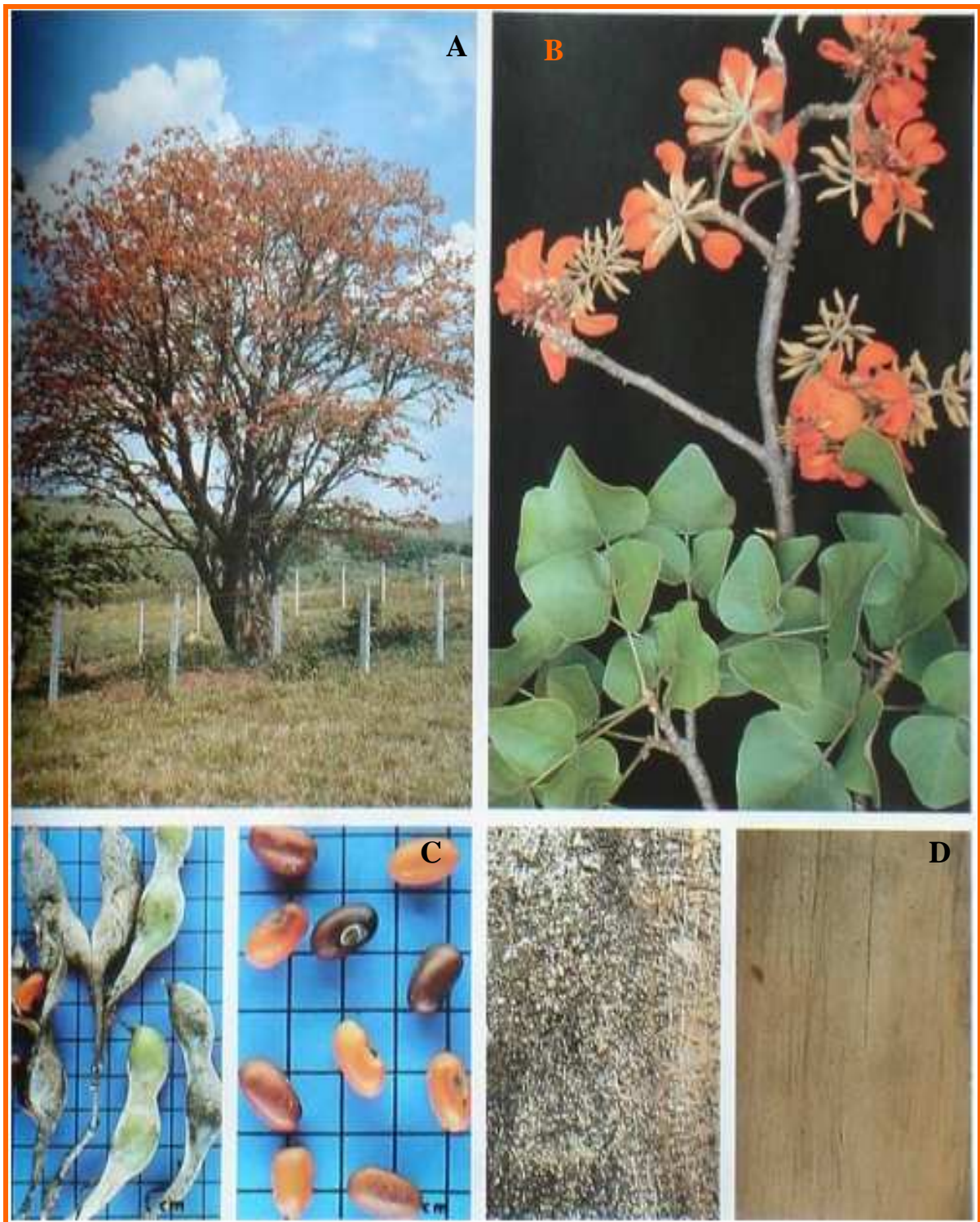
No Ceará, é vulgarmente chamada de mulungu, bucaré, mulungu-da-flor-vermelha e mulungu-da-flor-amarela; em Minas Gerais, é mais comumente conhecida por muchôco e mulungá; em estados como Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, São Paulo e Sergipe, simplesmente mulungu, nome este que se origina do tupi, *mussungú* ou *muzungú* e do africano *mulungu*, significando pandeiro, termo possivelmente alusivo ao som emitido pela batida em seu tronco oco (EMBRAPA, 2008).

Erythrina velutina (**Figura 2**) é uma árvore de copa arredondada, decídua, um pouco espinhenta, de caule levemente tortuoso, com a casca apresentando até 25 mm de espessura, sendo sua parte externa levemente áspera, podendo atingir a altura máxima entre 12 e 15 m. Suas folhas são trifoliadas, sustentadas por pecíolos, medindo de 6 a 12 cm de comprimento. As flores possuem coloração vermelho-alaranjada (EPAMIG, 1993), florescendo a partir do final do mês de agosto, estendendo-se até dezembro, com a planta totalmente despida de folhagem. No Ceará, entretanto, a floração ocorre mais tardiamente, entre os meses de janeiro e fevereiro. Seus frutos são do tipo legume (vagem), contendo de 1 a 3 sementes de coloração vermelho-escura ou vermelho-alaranjada. Ocorrem sob a forma de indivíduos isolados ou, em alguns casos, em grupos pouco densos (LORENZI, 1992; DACCUNHA *et al.*, 1996).

Sua madeira não muito resistente a agentes decompositores é leve e macia, podendo ser empregada com diversas finalidades como para a confecção de tamancos, caixotarias, jangadas e brinquedos. A árvore é extremamente ornamental, principalmente quando florada, o que estimula seu uso no paisagismo, tanto na arborização de ruas, jardins e alamedas como também em cercas vivas. Suas flores vistosas são constantemente frequentadas por pássaros que se alimentam de seu néctar (LORENZI, 1992).

Na medicina popular do nordeste brasileiro, embora não tenha ainda sido comprovada cientificamente a eficácia e a segurança de seu uso, as cascas do caule de *E. velutina* são consumidas na forma de infusos devido a suas propriedades sudorípara, emoliente, calmante e sedativa da tosse, além de auxiliar no tratamento contra verminoses, hemorróidas e bronquite. Os frutos secos e triturados, quando adicionados ao tabaco, são usados na forma de cigarros para combater a dor de dente, ato que se deve a sua ação anestésica local (MORS, 2000; AGRA *et al.*, 2007; AGRA *et al.*, 2008).

Figura 2. *Erythrina velutina* Willd. A. Árvore em período de floração; B. Partes aéreas; C. Vagens e sementes; D. Casca do caule.



Fonte: *Guía de la flora autoctona de la Argentina* (<http://www.infojardin.com/foro/showthread.php?t=29585&page=8>. Acesso em: 21 set. 2011).

1.2.2 Aspectos Químicos

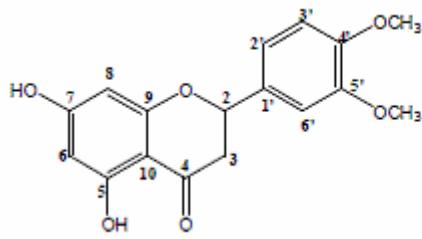
O gênero *Erythrina* é conhecido pela bioprodução significativa de alcalóides, sendo uma das principais fontes dos alcalóides tetracíclicos tipo eritrina, como a (+)-eritralina e a (+)-eritratina, que foram originalmente identificados em 1937 por Folkers & Major, além de flavonas preniladas, isoflavonas, pterocarpanos e saponinas triterpenóides (AMER; SHAMMA; FREYER, 1991; NKENGFACK *et al.*, 1994).

Das sementes de *E. velutina*, foi obtida uma lectina (STOJANOVIC *et al.*, 1994; MORAES *et al.*, 1996) e vários alcalóides, tais como a hipaforina, um alcalóide indólico (OSAWA *et al.*, 2008), além de outros como eritralina, 8-oxoeritralina, erisotrina, erisodina, erisovina, glicoesisodina (OZAWA *et al.*, 2009). Mais recentemente, foram isoladas cinco novas substâncias alcaloídicas, sendo elas: *Sodium Erysovin 15-O-Sulfate*, *Erysovine 15-O-Sulfate*, *16-O-b-D-Glucopyranosyl Coccoline* e *Sodium Erysovine N-Oxy-15-O-sulfate* e *erysodine* (OZAWA; KISHIDA; OHSAKI, 2011).

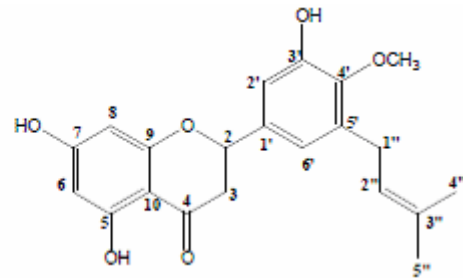
Nos estudos fitoquímicos realizados com as cascas do caule de *E. velutina*, destacam-se a identificação de um grande número de flavonóides: duas flavanonas, a 5,7-dihidroxi-4',5'-dimetoxi-flavanona (homoesperidina) e a 5, 7, 3'-trihidroxi-4'-*O*-metil-5'-prenilflavanona (4'-*O*-metilsigmoidina B); dois isoflavonóides, o 3,9-dihidroxi-10-prenilpterocarpano (faseolidina) e a 2'-4'-dihidroxi-6-prenil-7-metoxi-isoisoflavanona (erivelutinona) e um flavonóide glicosilado inédito no gênero, 7-*O*-[α -ramnopiranosil- β -glicopiranosídeo]-genisteína. Além do triterpeno 3 β -olean-12-ene-3,28-diol e do alcalóide 3 β -1,2,6,7-tetradehidro-3,16-dimetoxi-eritran-15-ol (erisovina), descrito pela primeira vez nas cascas do caule de *E. velutina* (DA-CUNHA *et al.*, 1996; RABELO *et al.*, 2001; CABRAL, 2009).

Ainda acerca da fitoquímica da casca do caule de *E. velutina*, Virtuoso (2005) descreveu o isolamento de uma mistura de dois fitoesteróis, o estigmasterol e o β -sitosterol, e do alcalóide eritralina. A análise por cromatografia gasosa (CG-EM) da fração hexânica mostrou a presença de ácido fênico, ácido cinâmico, α -amirina, estigmasterol, β -amirina, β -sitosterol e lupeol.

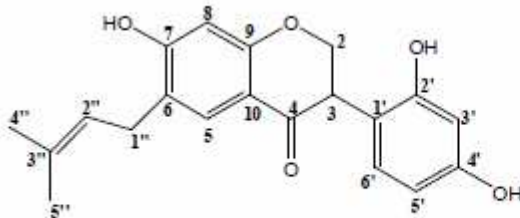
Figura 3. Substâncias obtidas a partir da casca do caule de *Erythrina velutina* Willd.



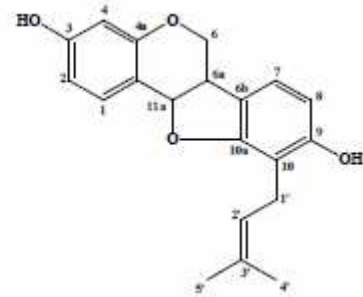
homoesperidina



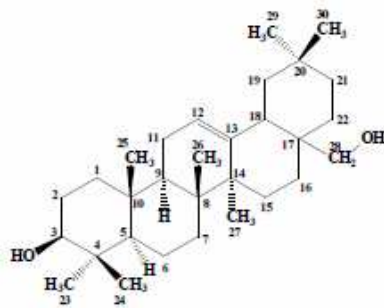
4'-O-metilsigmoidina B



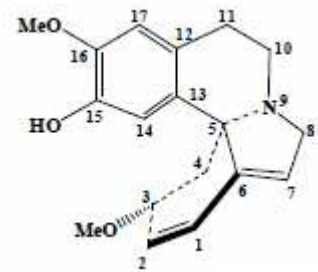
erivelutinona



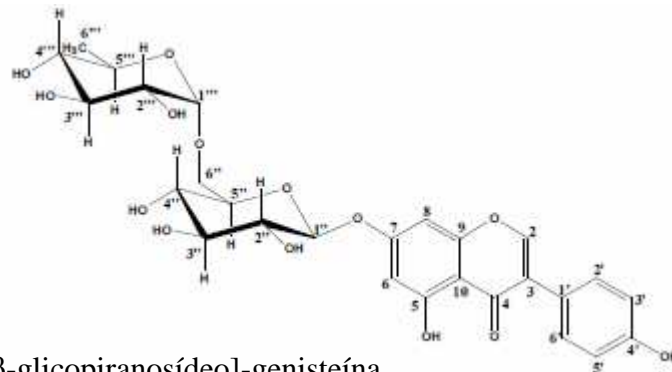
faseolidina



eritrodil



erisovina



7-O-[α -ramnopiranosil- β -glicopiranosídeo]-genisteína

1.2.3 Aspectos Toxicológicos e Farmacológicos

O extrato aquoso das folhas de *E. velutina*, obtido por infusão, mostrou sinais de baixa toxicidade, observada pela administração oral (5 g/kg) aguda em ratos de ambos os sexos. Não foram verificadas alterações comportamentais ou nos órgãos vitais e também não houve registro de mortes (CRAVEIRO *et al.*, 2008). Resultados semelhantes foram mostrados por Bonfim *et al.* (2001). Estudo toxicológico avaliou o potencial genotóxico do extrato alcoólico das folhas de *E. velutina*, por meio do teste do micronúcleo em células hematopoiéticas de ratos Wistar de ambos os sexos. Observou-se a ocorrência de alterações no DNA celular a partir da dose de 50 mg/kg (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Ozawa *et al.* (2009) demonstraram um aumento da citotoxicidade promovida por TRAIL (*tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing*), em células jurkat, linhagem derivada da leucemia/linfoma de linfócitos T do adulto, quando associado a alcalóides isolados das sementes de *E. velutina*. Outro alcalóide também isolado das sementes de *E. velutina*, a hipaforina, um derivado do L-triptofano, precursor da serotonina e da melatonina, foi capaz de induzir sono NREM (*non-rapid eye movement*) em ratos normais sem aparentemente apresentar efeitos adversos (OZAWA *et al.*, 2008).

Avaliando-se os efeitos farmacológicos do extrato aquoso das folhas de *E. velutina*, Marchioro *et al.* (2005) mostraram que este, nas doses de 300 e 600 mg/kg, não apresenta atividade antiedematogênica, mas foi confirmado seu potencial antinociceptivo. Dantas *et al.* (2004) mostraram que esse tipo de extrato provoca efeitos periféricos e centrais que são dependentes da dose utilizada, uma vez que em doses mais baixas, interfere com os mecanismos envolvidos na formação da memória, enquanto em doses mais altas, apresenta efeito sedativo e bloqueio neuromuscular. Carvalho *et al.* (2009) observaram que o extrato foi capaz de promover contratilidade em segmentos do íleo terminal de cobaia e que o mecanismo parece envolver a ativação do receptor GABA_A, a liberação da acetilcolina, a ativação de receptores muscarínicos, o aumento da entrada de Ca²⁺ através dos canais cálcio tipo L e sua liberação das reservas intracelulares. O plexo mientérico do íleo de cobaia contém receptores GABA_A ligados aos canais de íon cloreto que são farmacologicamente semelhantes aos do sistema nervoso central.

Virtuoso *et al.* (2005) avaliaram o potencial microbiológico das cascas do caule de *E. velutina* contra oito bactérias patogênicas por meio dos testes de difusão em disco e concentração inibitória mínima (CIM). O extrato etanólico e a fração hexano demonstraram atividade antibacteriana contra o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, com valor da CIM sendo 9,77 mg/mL para ambas as amostras.

Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa utilizando o extrato hidroalcoólico não padronizado da casca do caule de *E. velutina*, Vasconcelos *et al.* (2003) demonstraram, através dos testes de contorções abdominais, formalina e placa quente, que a administração por via intraperitoneal do extrato, nas doses de 200 e 400 mg/kg, em camundongos fêmeas, promove atividade antinociceptiva independente de receptores opioides. Mais recentemente, Vasconcelos *et al.* (2011) mostraram que esse extrato, também nas doses de 200 e 400 mg/kg, apresentou atividade antiedematogênica, em modelo de edema de pata induzido por dextrano, processo o qual a degranulação de mastócitos exerce um papel importante.

Ainda em nosso grupo de pesquisa e continuando os estudos com o extrato hidroalcoólico da casca de *E. velutina*, foram investigados seus efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC). Vasconcelos *et al.* (2007) demonstraram através do modelo de convulsões induzidas por estriquina que o extrato, administrado por duas diferentes vias, oral e intraperitoneal, nas doses de 200 e 400 mg/kg, apresenta efeito anticonvulsivante. Vasconcelos *et al.* (2004) avaliaram por meio dos testes do labirinto em cruz elevada, campo aberto e *rota rod* que o extrato possui ação depressora sobre o SNC. Raupp *et al.* (2008) mostraram que a administração crônica do extrato exerce um efeito ansiolítico em rato, em doses que não apresentaram efeitos amnésicos ou sedativos, corroborando com os dados descritos por Ribeiro *et al.* (2006). Todas estas observações apoiam o uso popular de extratos da planta como agentes tranquilizantes.

Considerando o potencial farmacológico de *E. velutina* sobre o SNC e a carência de estudos relacionados ao desenvolvimento de um fitoproduto a partir dessa espécie, *E. velutina* constitui uma matéria-prima com potencial para tornar-se um fitoterápico de interesse no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (DP).

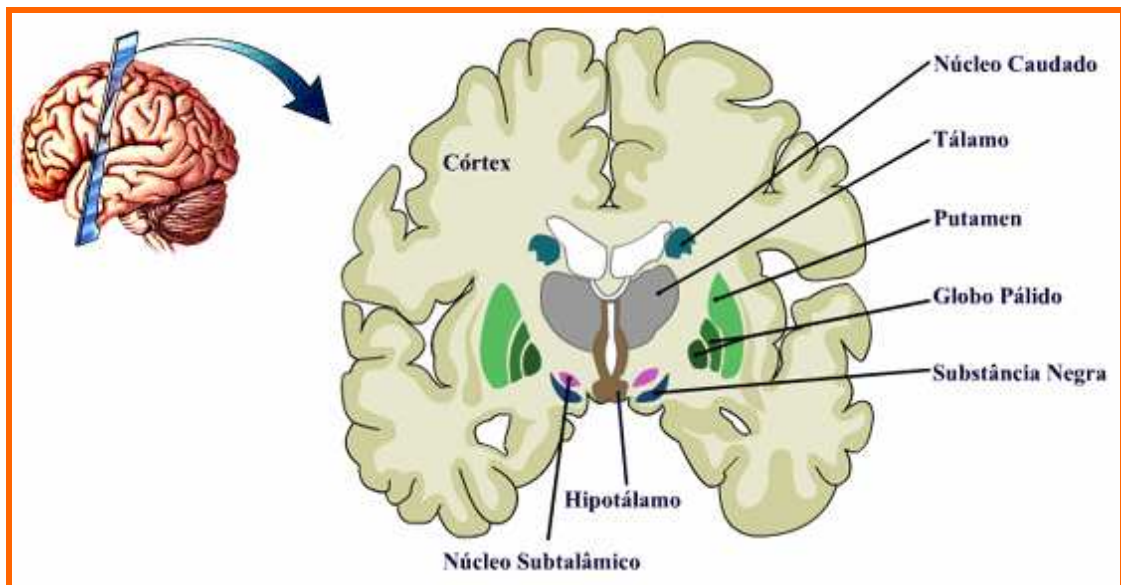
1.3 Síndromes Degenerativas do Sistema Nervoso Central: Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) foi descrita originalmente em 1877 por James Parkinson, médico inglês, em sua monografia intitulada *An essay on the shaking palsy*, onde a denominou de paralisia agitante. É uma das desordens neurodegenerativas mais comum, sendo crônica e progressiva, superada apenas pela doença de Alzheimer (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Apresenta-se em todos os países, grupos étnicos e classes sócio-econômicas. No entanto, acomete principalmente a população idosa, aproximadamente 1% da população com idade superior a 55 anos. O quadro clínico inicia-se comumente entre os 50 e 70 anos, sendo a idade média por volta dos 61 anos. Casos em indivíduos mais jovens, com menos de 40 anos ou mesmo de 21 anos, também são encontrados, mas esses ocorrem em menor frequência (DA ROCHA, 2007). No Brasil, a prevalência estimada para indivíduos acima de 65 anos é 3,3%, não sendo observada diferença significativa entre homens e mulheres, embora haja um maior predomínio da doença no sexo masculino (BARBOSA *et al.*, 2006).

Clinicamente, a DP manifesta-se por distúrbios motores, principalmente tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia, alterações da postura, do equilíbrio e da marcha. Além disso, os pacientes com DP podem apresentar outros sintomas não-motores, como demência, depressão e tendência ao isolamento, distúrbios do sono, déficits cognitivos e comprometimentos cardiorrespiratórios, gastrointestinais e sensoriais, os quais podem ocorrer nos estágios iniciais ou mesmo precederem o diagnóstico da doença. Interferem diretamente na performance funcional, independência e qualidade de vida destes indivíduos (GOULART *et al.*, 2004; ADLER, 2005; POEWE, 2008).

A DP afeta estruturas subcorticais do SNC, principalmente os gânglios ou núcleos da base (**Figura 4**), e caracteriza-se por morte neuronal na substância negra *pars compacta*, com conseqüente diminuição dos níveis de dopamina, levando a alterações motoras típicas e o surgimento de inclusões protéicas intraneuronais citoplasmáticas, denominadas corpúsculos ou corpos de Lewy (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; MELO *et al.*, 2007).

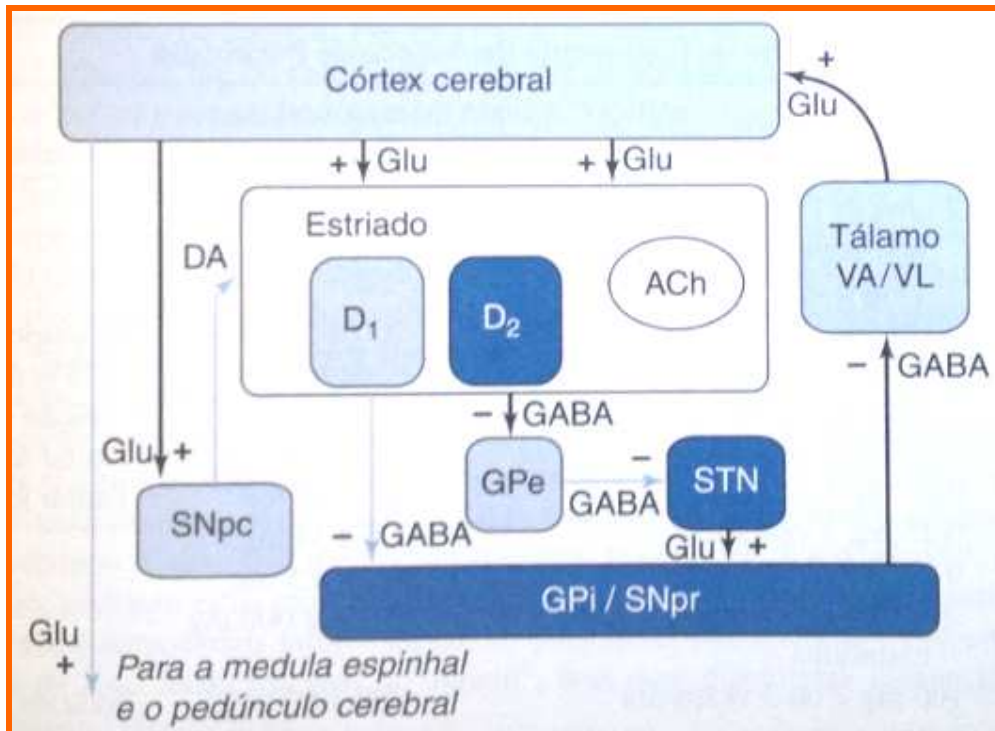
Figura 4. Corte encefálico destacando as estruturas dos gânglios da base relacionadas à doença de Parkinson.



Fonte: www.virtual.unifesp.br/unifesp/apoptose/restrito/parkinson.htm. Acesso em: 04 out. 2011.

O estriado, núcleo caudado e putamen, é a principal estrutura de influxo dos gânglios da base e recebe transmissão glutamatérgica excitante de muitas áreas do córtex cerebral. Também contém neurônios de projeção que expressam predominantemente receptores de dopamina D_1 (estimulador) e D_2 (inibidor), bem como interneurônios que usam a acetilcolina (ACh) como neurotransmissor. O efluxo do estriado segue ao longo de duas rotas. A via direta, do estriado para a substância negra *pars reticulata* (SNpr) e para o globo pálido interno (GPi), por meio do GABA, neurotransmissor inibitório. A via indireta, que parte do estriado, passando através do globo pálido externo (GPe) e do núcleo subtalâmico (STN) indo até a SNpr e GPi, consiste em duas ligações de inibição gabaérgica e uma projeção excitante glutamatérgica (Glu). A substância negra *pars compacta* (SNpc) fornece inervação dopaminérgica aos neurônios do estriado, originando ambas as vias e regulando a atividade das mesmas. A SNpr e GPi são estruturas de efluxo dos núcleos da base e fornecem retroalimentação ao córtex cerebral através dos núcleos ventroanterior e ventrolateral do tálamo (VA/VL) (GOODMAN; GILMAN, 2010). Na DP, existe uma perturbação do funcionamento normal da substância negra *pars compacta* e do estriado, fundamentais no controle e iniciação dos movimentos, aprendizado de habilidades motoras e o surgimento de hábitos (**Figura 5**) (MARS DEN; OBESO, 1994).

Figura 5. Esquema da condução elétrica dos gânglios da base na doença de Parkinson.



O defeito primário é a destruição dos neurônios dopaminérgicos da SNpc. Os neurônios do estriado, da via direta, expressam primariamente a proteína excitante receptora de dopamina, ao passo que os neurônios do estriado que formam a via indireta, expressam primariamente o tipo inibidor D₂. Assim, a dopamina liberada no estriado tende a aumentar a atividade da via direta e reduzir a atividade da via indireta. A redução do influxo dopaminérgico na DP aumenta acentuadamente o efluxo inibidor da SNpr e do GPi para o tálamo, bem como reduz a excitação do córtex motor.

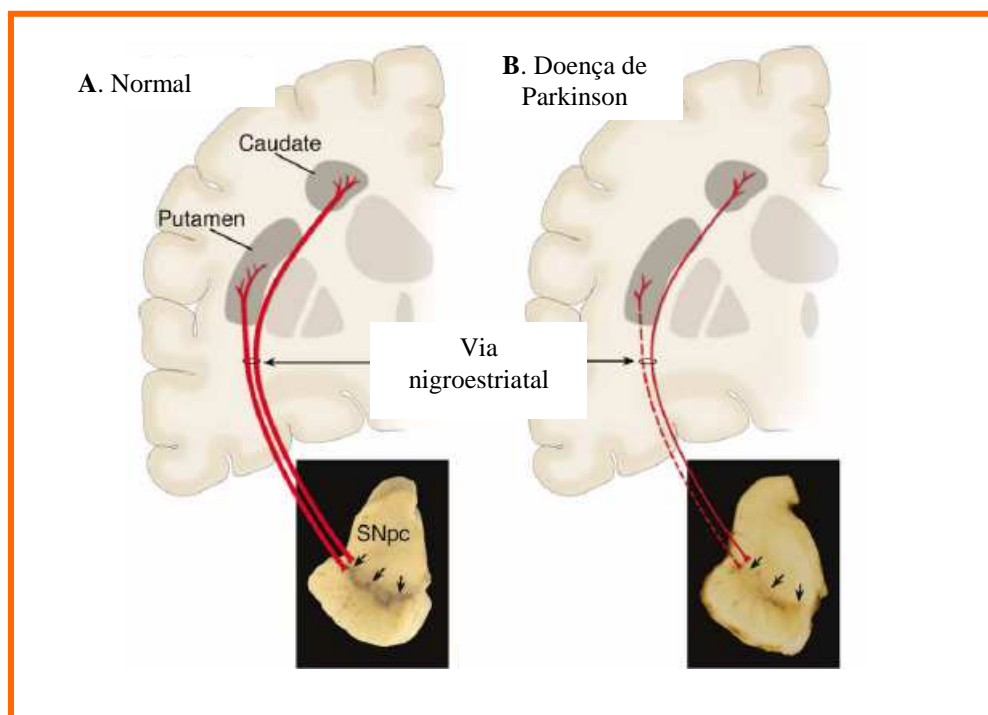
Fonte: Goodman e Gilman (2010).

Os neurônios colinérgicos intrínsecos da via nigroestriatal também estão envolvidos no surgimento dos sintomas da DP. Com a perda dos neurônios dopaminérgicos, há um descontrole do equilíbrio existente entre a dopamina, neurotransmissor inibitório, e a acetilcolina, neurotransmissor excitatório, ocorrendo uma excessiva atividade dos neurônios colinérgicos, embora os níveis de acetilcolina não se alterem. Sugere-se que a hiperatividade desses neurônios, associada com a falta de dopamina, conduza aos sintomas da DP (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2002; RANG *et al.*, 2004).

O quadro clínico torna-se evidente quando já ocorreu depleção de aproximadamente de 80% da dopamina presente no putamen e aproximadamente 60% dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta*. A perda desses neurônios, que normalmente contêm quantidades notáveis de neuromelanina (MARSDEN, 1983), produz

despigmentação clássica observada na substância negra (**Figura 6**). As causas envolvidas na morte dos neurônios dopaminérgicos não são bem compreendidas, no entanto, acredita-se que a lesão seja causada por fatores como o estresse oxidativo, processos inflamatórios e apoptose (RANG *et al.*, 2004; BATASSINI, 2010). Dessa forma, tanto fatores genéticos como ambientais, parecem contribuir. Recomenda-se que a doença seja entendida como sendo de origem multifatorial, possuindo na maioria dos casos vários fator etiológico (ANDRADE; AZEVEDO-SILVA, 2000). No entanto, os principais determinantes para o aparecimento da DP compreendem neurotoxinas ambientais, estresse oxidativo, influência do ferro, anormalidades mitocondriais, excitotoxicidade, envolvimento do óxido nítrico e do cálcio e fatores genéticos, principalmente nos indivíduos mais jovens (TEIVE, 2003).

Figura 6. Alterações morfológicas na DP.



Representação esquemática da via nigroestriatal em condição não patológica (A) e patológica (B) (em vermelho). A via é composta por neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares estão localizados na substância negra *pars compacta* (SNpc). Estes neurônios se projetam (espessas linhas vermelhas) para os gânglios basais fazendo sinapse no corpo estriado (putâmen e núcleo caudado). Na DP, esta via degenera, com uma acentuada perda dos neurônios que se projetam para o putâmen (linha pontilhada) e uma perda mais modesta dos que se projetam para o caudado (linha vermelha fina). A fotografia demonstra a pigmentação normal da SNpc, produzido pela neuromelanina (A) e a despigmentação devido à acentuada perda de neurônios dopaminérgicos (B).

Fonte: Dauer; Przedborski, 2003.

O envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da DP baseia-se na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio levando, conseqüentemente, a lesões na substância negra *pars compacta*. As evidências que dão suporte ao seu envolvimento na patogênese da DP incluem alterações na quantidade de ferro no cérebro, que medeia a formação de espécies reativas de oxigênio quando em uma forma reativa; deficiência no funcionamento mitocondrial, particularmente no complexo I da cadeia respiratória; alterações nos sistemas protetores antioxidantes do cérebro, notadamente nas enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutatona reduzida (GSH) e presença de danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA (FOLEY; RIEDERER, 2000; METODIEWA; KOSKA, 2000; HALBACH; SCHOBBER; KRIEGLSTEIN, 2004; MOORE *et al.*, 2005; RODRIGUES; CAMPOS, 2006; RYBAKOWSKA *et al.*, 2011). A natureza dos radicais livres responsáveis pela morte celular na DP permanece desconhecida, mas existem evidências da participação de radicais hidroxilas, peroxinitrito e óxido nítrico (NO) (JENNER, 2003; BARREIRO *et al.*, 2003).

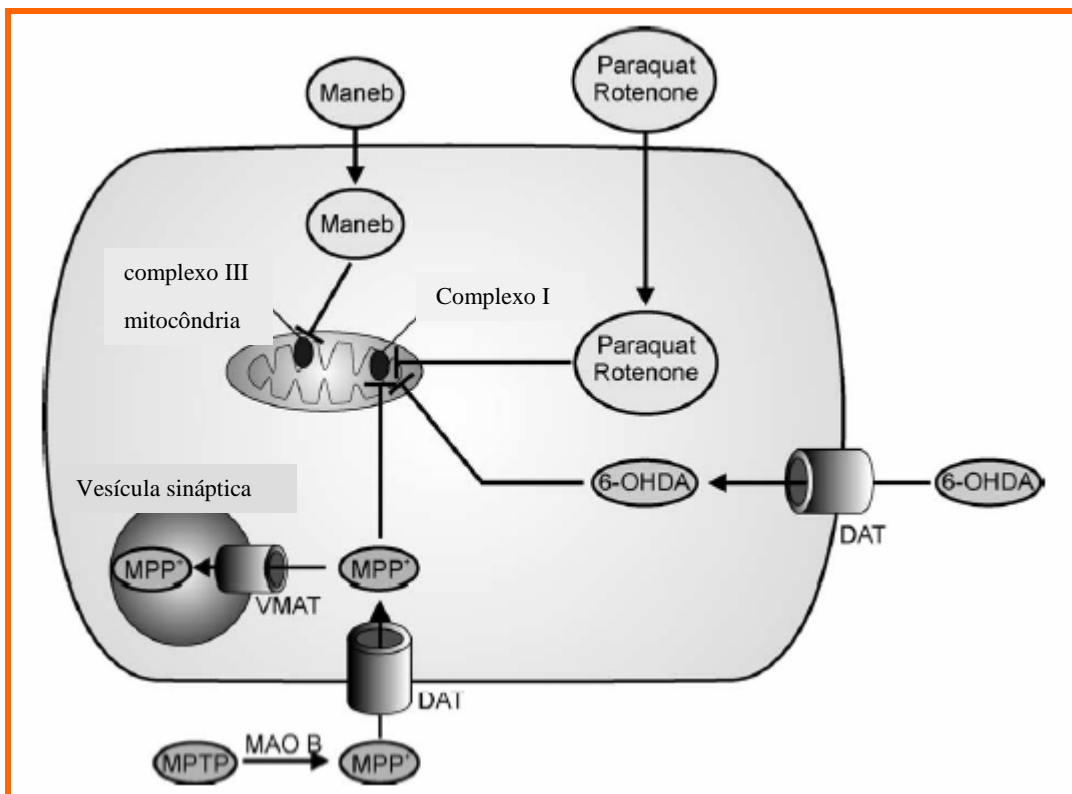
As várias formas de tratamento são utilizadas visando uma melhora dos sintomas, minimização do progresso da doença e restabelecimento, ao menos em parte, da transmissão dopaminérgica, uma vez que ainda não há cura. A levodopa ainda é o tratamento farmacológico utilizado mais eficaz, sendo uma das formas para se restaurar essa neurotransmissão. É capaz de penetrar no SNC onde, por ação da enzima dopa descarboxilase cerebral, é convertida em dopamina (FERRAZ, 1999). Infelizmente, a terapia com levodopa está associada a uma piora dos sintomas parkinsonianos e das discinesias, quando utilizada por longos períodos, podendo ser tão incapacitantes quanto a própria doença (PAHWA, 2006). Tal fato reforça a necessidade de serem obtidas novas alternativas terapêuticas para a DP.

Outras opções terapêuticas são compostas de agonistas e drogas que inibem enzimas responsáveis pela degradação da dopamina (monoaminoxidase-B, MAO-B, e catecol-O-metil-transferase, COMT), permitindo o controle de grande parte dos sintomas. Estes fármacos atuam como repositores do neurotransmissor deficiente, a dopamina. Diversas tentativas de neuroproteção, prevenção da morte celular, e de neuroresgate, recuperação de neurônios lesados, estão sendo buscadas à proporção que os conhecimentos sobre a DP avançam (DAWSON; DAWSON, 2002).

1.4 Modelos experimentais da doença de Parkinson: 6-OHDA e células SH-SY5Y

Os modelos experimentais, *in vivo* ou *in vitro*, são importantes ferramentas que auxiliam o estudo dos mecanismos patogênicos e dos princípios terapêuticos. As principais neurotoxinas utilizadas para induzir modelos de DP incluem a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) e vários pesticidas, incluindo o maneb, paraquat e rotenona (**Figura 7**). Todas estas neurotoxicinas mostraram capacidade de induzir a morte celular nigroestriatal em roedores e primatas não-humanos por meio de disfunção mitocondrial (DI MONTE, 2003; SCHÜLE *et al.*, 2009).

Figura 7. Principais neurotoxinas utilizadas nos modelos de doença de Parkinson.

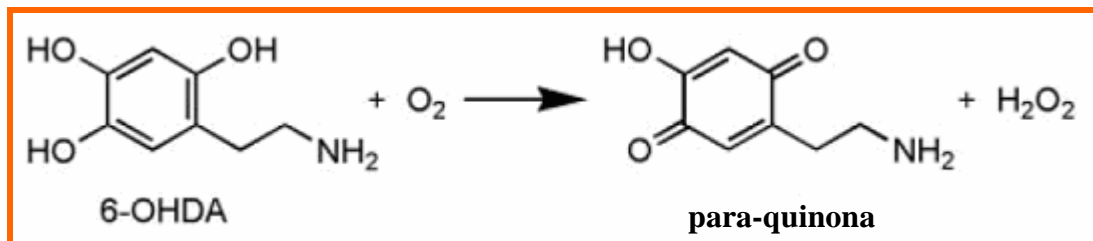


O MPTP é convertido pela monoamina oxidase B (MAO B) a MPP⁺. Como 6-OHDA, o MPP⁺ ocupa os transportadores de dopamina (DAT) sendo acumulado no interior das mitocôndrias, levando à inibição do complexo I. Em contraste com 6-OHDA, MPP⁺ pode ser englobado por transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT), o que reduz sua toxicidade. Paraquat e a rotenona também inibem complexo mitocondrial I, enquanto maneb inibe o complexo mitocondrial III.

Fonte: Halbach e Krieglstein (2004).

A 6-OHDA pode ser formada endogenamente a partir da dopamina por hidroxilação não enzimática na presença de Fe^{2+} e H_2O_2 (KIENZL *et al.*, 1995). Também foi detectada sua presença em amostras de urina de pacientes que sofrem da DP (ANDREW *et al.*, 1993), sugerindo que este composto possa estar envolvido na patogênese dessa doença. É uma neurotoxina, estruturalmente análoga à noradrenalina, sendo sua toxicidade relativamente seletiva a neurônios monoaminérgicos, uma vez que é captada preferencialmente por transportadores dopaminérgicos e noradrenérgicos. Seus efeitos neurotóxicos são baseados tanto no efeito inibitório sobre as enzimas da cadeia respiratória mitocondrial bem como na produção de radicais livres, causando a degeneração dos terminais nervosos (BATASSINI, 2010). Embora esse mecanismo não esteja totalmente compreendido, sugere-se a ocorrência de dano oxidativo, através da conversão da 6-OHDA em uma quinona com a formação de H_2O_2 (**Figura 8**), iniciando uma sinalização de morte celular específica por ativação de fatores de transcrição como caspase-3, $\text{NF}\kappa\beta$, P53 e C-Jun (DEL RIO; SILVESTRIN, 2008).

Figura 8. Oxidação da 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA).



A 6-OHDA após sofrer oxidação gera espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (quinona), os quais são potentes armas de destruição neuronal em modelos de doença de Parkinson.

Fonte: Bové *et al.* (2005).

Além da lesão do sistema dopaminérgico, a gliose também é uma notável característica do modelo envolvendo a 6-OHDA (YOKOYAMA *et al.*; 2011). Dados favorecem a idéia de que a ativação glial em modelos experimentais da DP, especialmente da microglia, exacerba a degeneração dos neurônios dopaminérgicos (PRZEDBORSKI; GOLDMAN, 2003). Entretanto, estudos indicam que, em circunstâncias específicas, a ativação de astrócitos de ratos, através da administração da interleucina-1 β antes da indução da lesão por 6-OHDA, diminui a toxicidade em neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (SAURA *et al.*, 2003).

Se confirmada, esta observação mostraria que a relação temporal entre o início da ativação glial e a morte neuronal dopaminérgica é fundamental na definição do papel dos diferentes tipos de células gliais no processo neurodegenerativo. Finalmente, a formação de corpos de lewy nunca foi convincentemente demonstrada em cérebros de ratos lesionados por 6-OHDA, lacuna esta que é considerada por alguns como a grande falha deste modelo. Contudo, apesar dessa ressalva, os dados mostram que a neurotoxicidade induzida por 6-OHDA provoca alterações comparáveis aos observados na DP em humanos, apoiando assim o significado deste modelo para explorar os mecanismos da neurodegeneração desta doença (BOVÉ *et al.*, 2005).

Tanto modelos de experimentação em animais quanto em culturas de células são importantes ferramentas que auxiliam o estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese de doenças. Embora os modelos *in vitro* tenham suas limitações, eles possuem algumas vantagens significativas sobre os modelos animais, particularmente por permitir a investigação direta das características fisiopatológicas com experimentos realizados mais rapidamente.

Uma das linhagens celulares mais utilizadas para o estudo de certos aspectos da neurodegeneração e neurotoxicidade em relação a DP é a SH-SY5Y, neuroblastoma humano (SCHÜLE *et al.*, 2009). É uma linhagem celular catecolaminérgica bem caracterizada, apresentando propriedades de neurônios dopaminérgicos, como a expressão de transportadores de dopamina (DAT) e de tirosina hidroxilase (TH), além de síntese de dopamina. Ainda que essas células geralmente passem por etapa de diferenciação com ácido retinóico ou éster de forbol, muitas são usadas na forma indiferenciada. As diferenças fenotípicas são obtidas dependendo das condições de diferenciação. Embora existam imposições para o uso de células indiferenciadas, devido aos menores níveis de dopamina por causa da baixa atividade da TH e menor expressão de DAT em comparação com células diferenciadas, células SH-SY5Y indiferenciadas são mais susceptíveis a neurotoxinas como 6-OHDA ou MPP⁺ que as células diferenciadas com ácido retinóico. Sugere-se, então, que essas células na forma indiferenciada se apresentem como um modelo celular mais vantajoso para o estudo de neurotoxicidade (CHEUNG *et al.*, 2009; PERES, 2011).

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Dentre as espécies do gênero *Erythrina*, duas conhecidas popularmente como mulungu, possuem comprovado interesse social e econômico para o Brasil: *E. velutina* e *E. mulungu*. A última ocorre na região Sudeste, pertence à Relação de Plantas de Interesse para o SUS (RENISUS), possuindo patente registrada quanto a sua exploração pela indústria farmacêutica no tratamento da ansiedade. A sua semelhança, *E. velutina* (nativa da região Nordeste) tem sido utilizada tradicionalmente sob a forma de chá no tratamento da ansiedade, agitação e insônia (RAUPP *et al.*, 2008). Estudos químicos da casca do caule de *E. velutina* levaram ao isolamento de inúmeras moléculas, como alcalóides e flavonóides (VIRTUOSO, 2005; CABRAL, 2009). Estudos anteriores (MARCHIORO *et al.*, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2007; 2011) com extratos não padronizados da casca do caule de *E. velutina* demonstraram suas atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, anticonvulsivante e ansiolítica em roedores.

Diante do potencial farmacológico da casca do caule de *E. velutina* sobre o SNC e a inflamação, é oportuno investir no desenvolvimento de produto farmacêutico a partir dessa matéria-prima, e ampliar sua avaliação farmacológica especialmente em doenças neuroinflamatórias como a doença de Parkinson (DP).

A DP é uma das desordens neurodegenerativas mais comum, acometendo principalmente idosos. Manifesta-se por tremor, rigidez, bradicinesia e alterações da postura, do equilíbrio e da marcha (RANG *et al.*, 2004) e caracteriza-se por morte neuronal na substância negra, com consequente diminuição dos níveis de dopamina, levando às alterações motoras típicas (MELO *et al.*, 2007). As causas da morte dos neurônios dopaminérgicos não são bem compreendidas, mas acredita-se que a lesão seja causada por fatores como a processos inflamatórios, apoptose e estresse oxidativo (RANG *et al.*, 2004; BATASSINI, 2010). Vale destacar que a farmacoterapia atual para a DP além de apresentar desvantagens, como a piora dos sintomas parkinsonianos, possui um número limitado de medicamentos.

Certamente, os resultados obtidos com a realização do presente estudo contribuirão para o desenvolvimento de um fitoterápico padronizado possivelmente útil social e economicamente para a região Nordeste.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar o desenvolvimento e o controle de qualidade do extrato padronizado de *Erythrina velutina*, bem como avaliar suas atividades antioxidante e neuroprotetora, visando seu uso no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson.

3.2 Específicos

- Desenvolver e validar método analítico espectrofotométrico para padronização do extrato de *E. velutina*, com determinação do teor de fenóis totais;
- Estabelecer método de preparação da droga vegetal, a partir da casca do caule de *E. velutina*, monitorado por parâmetros farmacognósticos;
- Estabelecer o método de produção do extrato etanólico de *E. velutina*;
- Determinar o perfil cromatográfico (CLAE – DAD) do extrato de *E. velutina*, incluindo análise de cinco marcadores;
- Pesquisar os possíveis efeitos tóxicos do extrato padronizado de *E. velutina* em neutrófilos humano e células da linhagem 9L/lacZ (glial);
- Investigar o efeito de neuroprotetor do extrato padronizado de *E. velutina* em modelo experimental da doença de Parkinson (morte neuronal induzida por 6-OHDA em linhagem celular SH-SY5Y): teste do MTT e dosagem de nitrito/nitrato;
- Investigar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato padronizado de *E. velutina*, através dos testes do DPPH e NBT;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Material vegetal

As cascas do caule de *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae) foram coletadas em agosto de 2010, no município de Mulungu, Ceará. Exsicata da espécie (nº 44802) encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

4.1.2 Aspectos éticos

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (COMEPE) da Universidade Federal do Ceará, sob o protocolo de nº 145/11.

4.1.3 Material biológico

No presente estudo, utilizou-se um subproduto rico em leucócitos polimorfonucleares, obtido durante o processo de fracionamento do *buffy coat*, gentilmente doado pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

4.1.4 Drogas, reagentes e substâncias químicas de referência

Acetonitrila grau CLAE (Tédia; JT Baker, EUA); álcool etílico comercial absoluto; 6-hidroxidopamina (6-OHDA), ácido gálico, radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), azul de nitrotetrazólio (NBT), Triton X-100, dimetilsulfóxido (DMSO), α -tocoferol, metionina, ácido ascórbico (Sigma, EUA); reagente Folin-Ciocalteau (Merck, Alemanha); riboflavina (Supelco, EUA); Kit LDH Liquirform (Labtest, Brasil); acetato de etila, diclorometano, etanol, hexano, metanol (Vetec, Brasil); acetato de amônio, carbonato de sódio (Dinâmica, Brasil).

4.1.5 Equipamentos

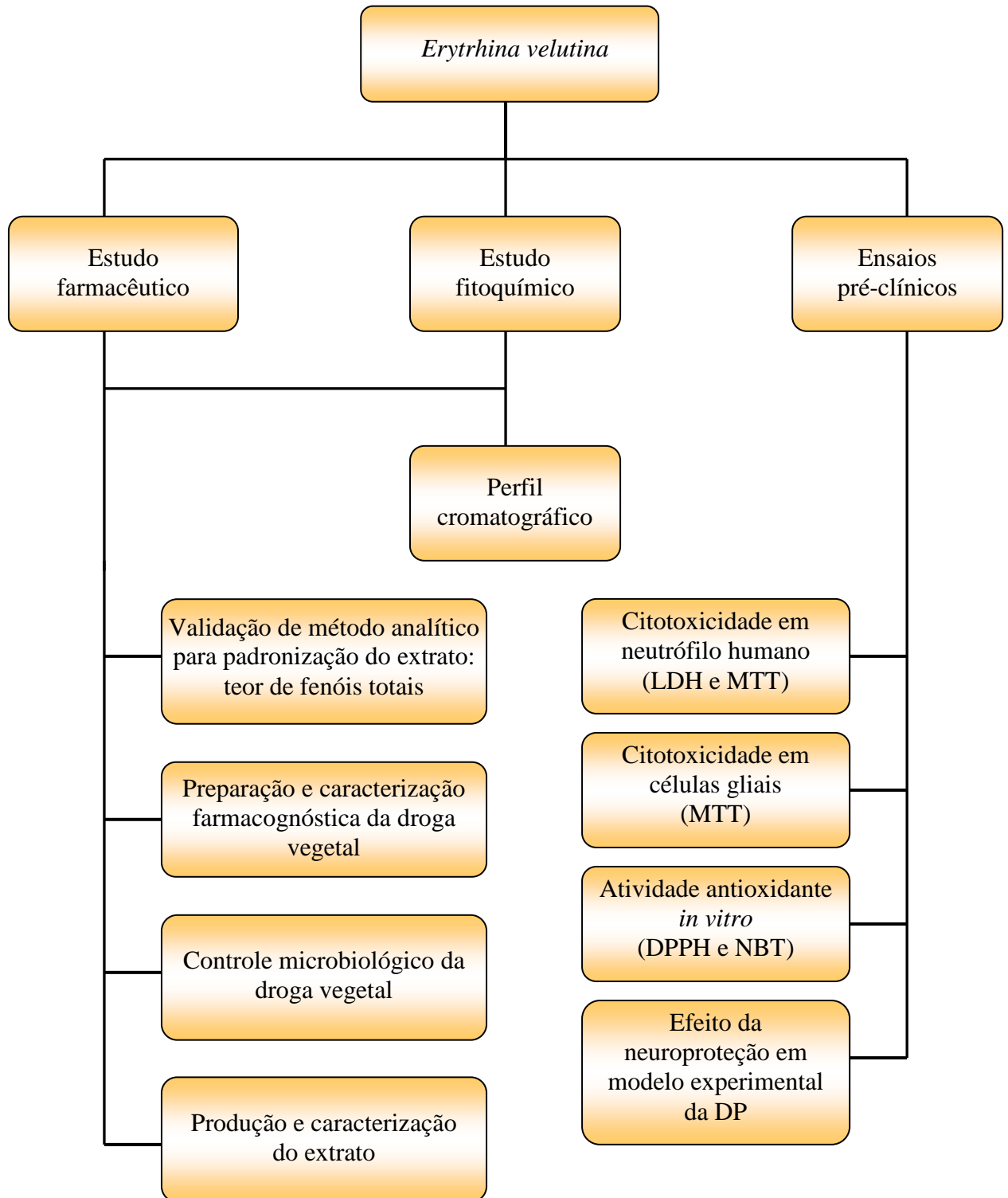
Balança acoplada a sistema de secagem por irradiação infravermelha (Marte, Brasil); balança analítica com precisão de 0,1 mg (A&D Company, Japão); banho maria (Quimis, Brasil); cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE (Waters 2695) acoplado a detector de arranjo de diodos - DAD (Waters 2996), injetor automático e forno para coluna (Waters, EUA) e software Empower (Waters, EUA); espectrofotômetro de absorção no ultravioleta-visível (Beckman Coulter DU 640, Alemanha); estufa com renovação e circulação de ar (Tecnal, Brasil); estufa de secagem e esterilização (Olidex cz, Línea, Brasil); evaporador rotatório (Heidolph, Laborota 4000, Alemanha); forno mufla (Quimis, Brasil); sistema esepctrofotométrico de microplacas (Synergy HT, Biosystems, Brasil); placa aquecedora (Quimis, Brasil); moinho de facas (MA 048, Marconi, Brasil); percolador (Permutation, Brasil); phmetro (HI 221, Hanna instruments, EUA); purificador de água milli-Q (Millipore, EUA); sistema de filtração a vácuo (Milipore, EUA); sonicador (Unique, Brasil); tamisador (Granulotest, Brasil); vortex (Phoenix, Brasil); microscópio óptico (Olympus Optical® CX41, Brasil).

4.1.6 Outros materiais

Coluna cromatográfica pinnacle DB C8 250 x 4,6 mm, 5 µm (Restek, EUA); pré-coluna C8, 5 µm com 4,0 x 3,0 mm de dimensões (Phenomenex, EUA); vidrarias volumétricas com certificado de calibração individual; vidrarias e reagentes de uso comum no laboratório; pipetadores automáticos de volume regulável (Gilson, França); filtro para seringa PVDF com 25 mm de diâmetro e porosidade 0,45µm (Millipore, EUA); filtro de membrana PVDF com 47 mm de diâmetro e porosidade 0,45µm (Millipore, EUA).

4.2 Métodos

Figura 9. Fluxograma representativo das metodologias desenvolvidas no estudo.



4.2.1 Estudo fitoquímico de *Erythrina velutina*

4.2.1.1 Prospecção fitoquímica

O estudo foi realizado segundo metodologias descritas por Matos e Matos (1989) e Matos (2009). Para determinação do perfil fitoquímico, foram preparados dois extratos das cascas do caule de *Erythrina velutina*, sendo um aquoso e outro hidroalcoólico (1:1; v/v), ambos a 20% (p/v). Após maceração por 24 h, os extratos foram filtrados em papel de filtro e armazenados em frasco de vidro âmbar. Em seguida, foram submetidos a uma triagem fitoquímica preliminar, através de métodos clássicos, para detecção das principais classes de metabólitos secundários. Com o extrato aquoso, procedeu-se determinação de alcalóides, taninos e heterósides saponínicos e a partir do extrato hidroalcoólico, cumarinas, heterósides flavônicos, antraquinônicos, digitálicos e antociânicos.

4.2.2.2 Obtenção de constituintes químicos a partir da casca do caule de *Erythrina velutina*

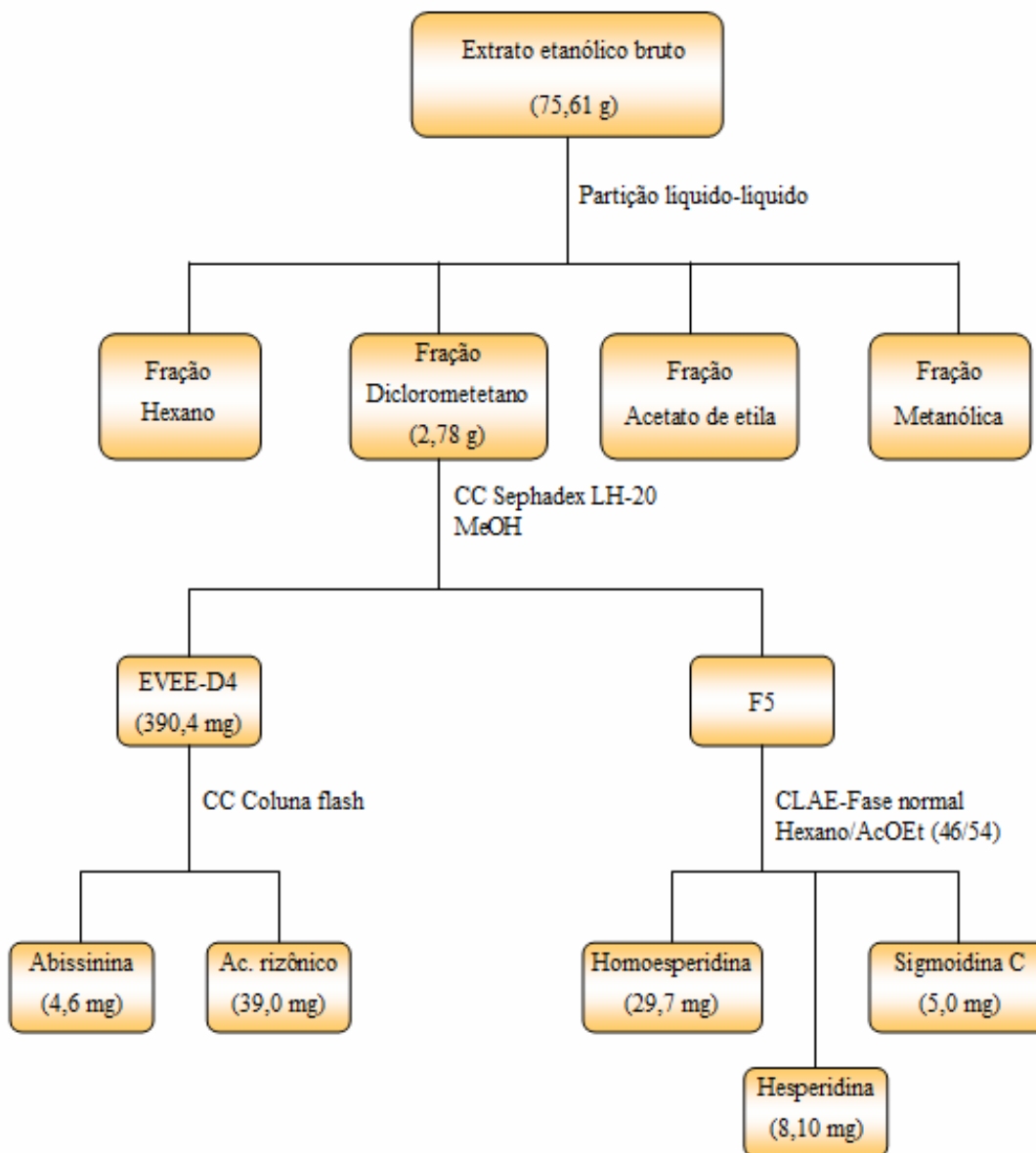
Realizado no intuito de isolar compostos fenólicos (flavonóides) a partir de extrato etanólico da casca do caule de *E. velutina*, devido a grande importância farmacológica dessas substâncias. O presente estudo foi desenvolvido sob a coordenação da Professora Mary Anne Sousa Lima, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará.

As cascas do caule de *E. velutina* (3,615 Kg) secas e trituradas foram submetidas à extração exaustiva com etanol, visando uma máxima extração dos constituintes químicos. A solução etanólica obtida foi filtrada e em seguida, o solvente foi evaporado com auxílio de rotaevaporador, resultando em uma massa de 136,29 g de extrato etanólico bruto (EEB).

A partição líquido-líquido de 75,61 g do EEB, utilizando hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, forneceu quatro diferentes frações. A fração diclorometano (2,78 g) foi cromatografada em Sephadex LH-20 e eluída com metanol, obtendo-se, então, cinco subfrações. A subfração denominada EVEE-D4 (390,4 mg) foi submetida a um novo processo cromatográfico em coluna flash, resultando no isolamento do ácido rizônico (39 mg) e abissinina (4,6 mg). A subfração F5 foi purificada em CLAE, utilizando a mistura de solventes hexano/acetato de etila (46/54), fluxo de 3,00 mL/min e coluna em fase normal, levando ao isolamento da sigmoidina C (5,0 mg), hesperidina (8,10 mg) e homoesperidina

(29,7 mg) (**Figura 10**). As substâncias obtidas foram empregadas como marcadores químicos para a identificação dos picos no perfil cromatográfico (*fingerprint*) do extrato de *E. velutina*.

Figura 10. Fluxograma do estudo fitoquímico do extrato etanólico bruto (EEB) da casca do caule de *Erythrina velutina*.



CC: cromatografia em coluna;

AcOEt: acetato de etila.

4.2.2 Validação de método analítico para quantificação, por espectrofotometria, de fenóis totais, marcador químico, no extrato de *Erythrina velutina*

A dosagem de fenóis totais deu-se com o emprego do reagente de Folin-Ciocalteu. É composto por dois ácidos, o fosfotungstístico e o fosfomolibdídico, cujo tungstênio e molibdênio apresentam estado de oxidação 6⁺. Na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, a média do estado de oxidação desses íons encontra-se entre 5 e 6, formando os chamados tungstênio e molibdênio de coloração azul, cuja intensidade é medida por espectrofotometria. Alíquotas (100 µL) das soluções amostra (extrato etanólico de *E. velutina*) e padrão de trabalho (ácido gálico) foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL onde foram adicionados 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1 N e 4 mL de água ultra-pura. Após alcalinizar o meio (1,25 mL de Na₂CO₃ a 20%), o volume foi completado com água ultra-pura. Decorrido 40 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, realizou-se leitura espectrofotométrica (715 nm) (MAKKAR, 2000; SOUSA *et al.*, 2007).

4.2.2.1 Preparo da solução padrão de ácido gálico

A solução padrão de ácido gálico (solução estoque) foi preparada dissolvendo-se o equivalente a 5 mg do padrão, pesado analiticamente, em 10 mL de água ultra-pura, obtendo-se uma solução de 0,5 mg/mL.

4.2.2.2 Preparo do extrato de *Erythrina velutina* utilizado no processo de validação

O extrato utilizado no processo de validação foi obtido a partir da droga vegetal previamente seca e pulverizada com granulometria adequada, a qual foi submetida à extração em extrator de Soxhlet, numa proporção 1:2 (p/p) entre droga vegetal e solvente. O solvente orgânico utilizado (etanol) foi evaporado ao final do processo extrativo em evaporador rotatório a 60°C. O extrato seco obtido, pó pardacento de odor característico, foi transferido para recipiente apropriado, identificado e armazenado. O rendimento da extração foi calculado em relação à massa de droga vegetal. Para análise do teor de fenóis totais no extrato da planta, foi utilizada a solução preparada a partir do extrato seco na concentração de 5 mg/mL. Os resultados foram expressos como µg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por mg de extrato.

4.2.2.3 Validação de metodologia analítica para determinação do teor de fenóis totais

Para assegurar que um método analítico forneça informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, este deve sofrer uma avaliação denominada validação. De acordo com a finalidade do ensaio analítico, o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (RE 899/03) estabelece quatro categorias e relaciona os respectivos parâmetros necessários para validação do método. Nesse contexto, o estudo de validação do presente método, que se enquadra na categoria I, deu-se com a determinação dos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade e faixa de trabalho, precisão por repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez (BRASIL, 2003). Os dados foram expressos como μg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por mg de extrato.

- Especificidade

Especificidade é a capacidade que o método possui para medir exatamente um composto na presença de outros componentes. É considerado específico quando produz resposta para uma única substância de interesse (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Para verificação de possíveis interferentes, foram traçados espectros de absorção da amostra na faixa compreendida entre 200 – 800 nm.

- Linearidade e intervalo

A linearidade é a capacidade de um método demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

A linearidade do presente método foi investigada com emprego da solução padrão de ácido gálico bem como da matriz com adição de padrão. Os dados para comprovação da linearidade foram obtidos empregando-se o cálculo de regressão linear pelo método dos quadrados mínimos. Também se determinou o coeficiente de correlação e o desvio padrão relativo. Segundo a RE nº899/03 (BRASIL, 2003), o coeficiente de correção linear deve ser no mínimo 0,99. Contudo, para extratos vegetais e fitoterápicos esse valor passa a ser aceito como sendo igual ou superior a 0,98.

A curva padrão foi construída com emprego de 7 (sete) concentrações de ácido gálico, com faixa de trabalho entre 4 e 16 $\mu\text{g/mL}$, preparadas por meio de diluições de alíquotas de uma solução estoque (500 $\mu\text{g/mL}$) (**Tabela 1**). Para cada ponto da curva, foram utilizadas três réplicas de cada solução.

A curva de calibração do extrato etanólico de *E. velutina* com adição de ácido gálico foi construída com emprego de 6 (seis) concentrações, sendo a faixa de trabalho compreendida entre 123,2 e 200,2 $\mu\text{g EAG/mg}$ de extrato, as quais foram preparadas por meio de diluições de alíquotas da solução estoque do padrão de ácido gálico e da solução preparada a partir do extrato seco da planta, conforme apresentado na **Tabela 2**. Para cada ponto da curva, foram utilizadas três réplicas de cada solução.

Tabela 1. Concentrações e volumes de ácido gálico empregados na construção da curva padrão, por espectrofotometria.

Nível	Volume (mL) de SEPAG (500 $\mu\text{g/mL}$)	Volume final (mL)	Concentração Final ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,08	10	4
2	0,12	10	6
3	0,16	10	8
4	0,20	10	10
5	0,24	10	12
6	0,28	10	14
7	0,32	10	16

SEPAG: solução estoque padrão de ácido gálico.

Tabela 2. Concentrações e volumes empregados na curva de calibração do extrato etenólico de *Erythrina velutina* com adição de solução padrão de ácido gálico, por espectrofotometria.

Nível	Volume (mL) de SAE (5 mg/mL)	Volume (mL) de SEPAG (500 $\mu\text{g/mL}$)	Volume final (mL)	Concentração Final ($\mu\text{g EAG/mg}$)
1	0,050	0,062	10	123,2
2	0,050	0,124	10	138,6
3	0,050	0,246	10	154,0
4	0,050	0,493	10	169,4
5	0,050	0,986	10	184,8
6	0,050	1,971	10	200,2

A faixa de trabalho foi de 80 a 130% da concentração teórica do analito (154 $\mu\text{g EAG/mg}$ de extrato).

SAE: solução amostra do extrato; SEPAG: solução estoque padrão de ácido gálico.

- Precisão

A precisão é avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). Os ensaios para a determinação da precisão do método analítico foram realizados pelo estudo da repetibilidade e da precisão intermediária.

Para a avaliação da repetibilidade, foram preparadas, sob as mesmas condições (mesmo analista e mesma instrumentação), seis soluções analíticas do extrato etanólico de *E. velutina* correspondente à concentração de fenóis totais a 100% da concentração de trabalho.

A precisão intermediária foi realizada de maneira semelhante ao ensaio de repetibilidade, mas em dois dias consecutivos por dois analistas diferentes, utilizando seis soluções analíticas do extrato etanólico de *E. velutina* correspondente à concentração de fenóis totais a 100% da concentração de trabalho.

- Exatidão/Recuperação

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Pode também se referir à taxa de recuperação do analito adicionado à matriz do produto (BRASIL, 2003).

Esta foi avaliada contemplando o intervalo linear do método, através da adição de quantidades conhecidas do padrão de ácido gálico na solução amostra do extrato, de forma a obter soluções com concentrações equivalentes a 80, 100 e 120% do valor esperado, as quais foram adicionadas do reagente de Folin-Ciocalteu conforme metodologia descrita anteriormente. As amostras foram preparadas sob as mesmas condições, em triplicata, conforme a **Tabela 3**. Os valores de absorvâncias foram usados para calcular o valor médio das concentrações, taxa de recuperação, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR).

- Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (BRASIL, 2003).

Os fatores considerados para analisar a robustez foram os diferentes fabricantes de solventes usados no preparo da solução amostra do extrato (Marca 1 e Marca 2) e comprimento de onda (705 e 715 nm). Os resultados foram avaliados mediante comparação feita através da análise de variância.

Tabela 3. Preparo das soluções para o ensaio de exatidão/recuperação.

Nível de Recuperação (%)	Volume (mL) de SAE (5 mg/mL)	Volume (mL) de SEPAG (500 µg/mL)	Volume final (mL)	Concentração Final (µg EAG/mg)
80	0,050	0,062	10	123,2
100	0,050	0,246	10	154,0
120	0,050	0,986	10	184,8

SAE: solução amostra do extrato; SEPAG: solução estoque padrão de ácido gálico.

4.2.3 Preparação e caracterização farmacognóstica da droga vegetal

4.2.3.1 Secagem e cominuição

Aa cascas do caule de *E. velutina* foram submetidas à desidratação em estufa de secagem e esterilização e em estufa com renovação e circulação de ar por períodos de 24, 48, 72, 96 e 105h , sob temperatura de $80^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$. A cada intervalo de tempo, amostras foram retiradas para caracterização quanto ao teor de fenóis totais. Após secagem, o material foi submetido à cominuição em moinho de facas.

4.2.3.2 Determinação do teor de umidade

A verificação da umidade residual foi realizada em balança acoplada a sistema de secagem por irradiação infravermelha (Marte, Brasil), onde 3 g da droga vegetal triturada foram submetidos a aquecimento sob temperatura de 105°C por 1h (FONSECA, 2009).

4.2.3.3 Análise granulométrica

A determinação granulométrica foi efetuada conforme metodologia descrita pela Farmacopeia Brasileira IV (1988), onde três amostras distintas da droga vegetal (100 g cada) foram submetidas à passagem forçada por vibração, através de tamises com abertura de

malhas correspondentes a 2000, 710, 355, 250, 180 e 125 μm , durante 20 min, com auxílio de um tamisador vibratório na escala máxima do aparelho. Terminado o processo, as frações foram retiradas dos tamises e do fundo coletor para quantificação quanto à proporção percentual de massa retida em cada tamis por meio da equação:

$$\text{Droga retida (\%)} = \frac{\text{M1 (g)}}{\text{M2 (g)}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: M1 = massa retida em cada tamis; M2 = massa de droga total pesada.

O pó foi classificado quanto ao seu grau de divisão de acordo com a Farmacopeia Brasileira IV (1988) em grosso, moderadamente grosso, semifino, fino ou finíssimo.

O tamanho médio das partículas foi determinado por meio de método aritmético (ALLEN *et al.*, 2007) conforme modelo matemático abaixo descrito:

$$d_{\text{médio}} = \frac{\sum (\text{AM} \times \text{Fr}\%)}{100\%} \quad (2)$$

Onde: $d_{\text{médio}}$ = diâmetro médio aritmético (mm), AM = abertura média da malha (mm) e Fr% = fração percentual retida em cada tamis.

4.2.3.4 Determinação da densidade aparente

A densidade aparente foi realizada com auxílio de uma proveta graduada (250 mL) de peso conhecido (peso inicial). Esta foi preenchida com as cascas trituradas do caule *E. velutina*, sendo em seguida, realizada nova pesagem (peso final). Através da diferença entre o peso inicial e final da proveta, calculou-se a densidade aparente não compactada por meio da relação massa/volume do pó (HUBINGER *et al.*, 2009). O procedimento foi executado em triplicata com três amostras distintas.

4.2.3.5 Determinação do teor de cinzas totais

A determinação do teor de cinzas totais foi realizada de acordo com metodologia estabelecida na Farmacopeia Brasileira IV (1988). Inicialmente, realizou-se a calcinação do cadinho de porcelana em forno mufla a 450°C por 30 min. Após arrefecimento, o peso foi determinado em balança analítica. Terminada esta etapa prévia, exatamente 3 g da droga vegetal pulverizada foram distribuídos uniformemente no cadinho, sendo submetidos à incineração, primeiramente em chama de bico de Bunsen e depois em forno mufla a 450°C até completa eliminação do carvão. Após resfriamento em dessecador, o resíduo foi pesado. A porcentagem de cinzas totais foi obtida pela relação entre a massa final obtida após incineração e a massa inicial da amostra:

$$\text{Teor de cinzas totais (\%)} = \frac{\text{M1 (g)}}{\text{M2 (g)}} \times 100 \quad (3)$$

Onde: M1 = massa final e M2 = massa inicial.

4.2.3.6 Determinação de cinzas insolúveis em ácido

Ao resíduo obtido na determinação de cinzas totais, foram adicionados 25 mL de ácido clorídrico 7% (p/v), e submetido à fervura durante 5 min em cadinho coberto com vidro de relógio. Em seguida, o vidro de relógio foi lavado com 5 mL de água quente, sendo a mesma recolhida no próprio cadinho. O material insolúvel em ácido foi filtrado em papel de filtro isento de cinzas (Quimis, 318.D21) e lavado com água quente até que o filtrado se mostrasse neutro. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original, sendo submetido à secagem sobre chapa aquecida com posterior incineração a 500°C até peso constante (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 1988). A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido foi calculada com referência ao material vegetal utilizado no início do ensaio de teor de cinzas totais anteriormente descrito.

4.2.3.7 Determinação do teor de extrativos em etanol

A determinação do teor de extrativos em etanol foi realizada seguindo-se metodologia constante na Farmacopeia Brasileira IV (1988). Cerca de 2 g da droga vegetal

foram transferidos para um cartucho feito com papel de filtro, previamente pesado, sendo este transferido para um extrator de Soxhlet. Foi adicionado ao sistema etanol suficiente para que ocorresse o sifonamento, juntamente com 0,2 g de hidróxido de sódio. Após 5h de extração, o cartucho contendo o resíduo foi submetido à secagem em estufa a 105°C por 30 min. O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de três determinações segundo a equação:

$$\text{Teor de extrativos em etanol (\%)} = \frac{M1 \text{ (g)} - M2 \text{ (g)}}{M1 \text{ (g)}} \times 100 \quad (4)$$

Onde: M1 = massa de droga antes do processo extrativo e M2 = massa de droga depois do processo extrativo.

4.2.3.8 Determinação do teor de extrativos em água

Seguindo a metodologia descrita pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998), cerca de 4 g da droga vegetal triturada foram submetidos a maceração com 100 mL de água destilada por 24h, sofrendo agitação constante durante as primeiras 6h. O macerado foi então filtrado, sendo transferidos 25 mL para um recipiente previamente tarado. Após secagem em estufa a 105°C por 6 h, o teor de extrativos foi determinado em função do peso do material vegetal:

$$\text{Teor de extrativos em água (\%)} = \frac{M1 \text{ (g)}}{M2 \text{ (g)}} \times \text{FD} \times 100 \quad (5)$$

Onde: M1 = massa residual do macerado, M2 = massa de droga antes da maceração e FD = fator de diluição.

4.2.4 Controle microbiológico da droga vegetal

A contagem total de microorganismos foi realizada segundo metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira V Edição (2010). No procedimento adotado, foram transferidos, assepticamente, 10 g das cascas do caule secas e trituradas para 90 mL de água peptonada tamponada. A amostra 1:10 foi submetida à agitação durante 10 min. Em seguida, foram realizadas mais duas diluições (1:100 e 1:1000), empregando o mesmo diluente. Após a

homogeneização, foi pipetado 1 mL de cada solução e depositado em placas esterilizadas, sendo adicionados 20 mL de ágar soja-caseína para bactérias e ágar Sabouraud-dextrose para fungos e leveduras, ambos esterilizados e fundidos a cerca de 45°C. Após a solidificação do meio de cultura, as placas foram incubadas a 35°C por 5 dias e a 25°C por 7 dias, para a pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente. Decorrido este período, foi realizada a contagem do número de colônias com o auxílio de contador, calculando-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC/g).

A identificação de patógenos, como *Salmonella* spp e *Escherichia coli*, foi realizada segundo condições descritas na **Tabela 4**. Os testes confirmatórios da presença dos microrganismos foram realizados conforme descrito na Farmacopeia Brasileira V (2010).

Tabela 4. Identificação de patógenos na casca do caule de *Erythrina velutina*.

Microorganismo	Meio de enriquecimento	Temperatura/ Tempo de incubação	Meio seletivo	Temperatura/ Tempo de incubação
<i>Escherichia coli</i>	Caldo Lactosado	35°C/24h	Ágar Mac Conkey	35°C/24-48h
<i>Salmonella</i> spp.	Caldo lactosado	35°C/24h	Ágar verde brilhante	35°C/24-48h

4.2.5 Desenvolvimento, avaliação e seleção do método de produção do extrato de *Erythrina velutina* monitorado pelo teor de fenóis totais

As condições de partida para a produção do extrato de *E. velutina* foram estabelecidas com intuito de obter, em um menor custo e tempo possível, um produto com o máximo teor de fenóis totais. Assim, na produção do extrato vegetal foram consideradas partes das condições experimentais empregadas em estudos químicos anteriores (VIRTUOSO, 2005; CABRAL, 2009). Nesse sentido, empregou-se como solvente extrator o etanol na proporção 1:2 entre droga e solvente, respectivamente.

Inicialmente, foram investigados três métodos extrativos: extração em extrator de Soxhlet (6h), maceração (24h) e percolação precedida por maceração (24h). O solvente orgânico foi completamente eliminado em evaporador rotatório a 60°C. O extrato seco obtido, pó pardacento de odor característico, foi transferido para recipiente apropriado, identificado e armazenado em condições adequadas. O rendimento percentual foi calculado pela relação:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{M1 (g)}}{\text{M2 (g)}} \times 100 \quad (7)$$

Onde: M1 = massa de extrato e M2 = massa de material vegetal.

4.2.6 Perfil cromatográfico do extrato etanólico de *Erythrina velutina* por CLAE-DAD

O perfil cromatográfico do extrato etanólico de *E. velutina* foi realizado utilizando sistema cromatográfico Waters (EUA) acoplado a detector de arranjo de foto diodos (CLAE-DAD), injetor automático e forno para coluna. Utilizou-se coluna analítica C8 (Restek) com 250 mm x 4,6 mm e tamanho da partícula interna de 5 µm. Por segurança, empregou-se pré-coluna (4,0 x 3,0 mm, Phenomenex) de constituição semelhante a da coluna. A fase móvel consistiu em duas soluções, tampão acetato de amônio 5mM, pH 3,4 (solução A) e acetonitrila grau CLAE (solução B). Estas foram filtradas em aparato de filtragem (Millipore, EUA) contendo membrana filtrante de 0,45 µm de poro (Millipore, EUA) e degaseificada em banho ultrassônico. As condições cromatográficas e o gradiente de eluição encontram-se descritos na **Tabela 5** e **Tabela 6**, respectivamente.

Tabela 5. Condições cromatográficas utilizadas no método para identificação dos marcadores hesperidina, abssinina, homoesperidina, ácido rizônico e sigmoidina C no extrato etanólico de *Erythrina velutina* por CLAE-DAD.

Parâmetro	Especificação
Coluna	Restek C8 (250 x 4,6 mm), 5 µm
Pré-coluna	Phenomenex (4,0 x 3,0 mm), 5 µm
Temperatura	30°C
Detecção	UV – DAD: 286 nm (0-21 min); 260 nm (21-28 min); 286 nm (28-30,7 min); 267 nm (30,7-35 min); 282 nm (35-45 min)
Volume de Injeção	10 µL
Tempo de corrida	45 min
Fase Móvel	Fase A: Tampão acetato de amônio 5 mM (pH 3,4) Fase B: Acetonitrila
Solução Diluente	Acetonitrila:Água (1:1)

Os compostos obtidos no estudo fitoquímico foram empregados como marcadores químicos na identificação de picos nos cromatogramas. Soluções de cada substância (abissinina, ácido rizônico, homoesperidina, hesperidina e sigmoidina C) foram preparadas

em concentrações apropriadas para injeção no sistema por dissolução com auxílio de solução diluente, acetonitrila e água, 1:1 (v/v).

Tabela 6. Programação gradiente para eluição da fase móvel no método de análise dos marcadores hesperidina, abssinina, homoesperidina, ácido rizônico e sigmoidina C no extrato etanólico de *Erythrina velutina* por CLAE-DAD.

Tempo (min)	Fluxo (min/mL)	%A	%B
0,0	1,0	73	27
25,0	1,0	73	27
26,0	0,8	60	40
34,0	0,8	60	40
35,0	1,0	60	40
36,5	1,5	73	27
38,0	1,0	73	27
45,0	1,0	73	27

Para análise por CLAE – DAD, pesou-se em papel vegetal, utilizando balança analítica, o equivalente a 25 mg do extrato etanólico de *E. velutina* o qual foi transferido para balão volumétrico de 5 mL. O volume foi completado com o diluente, sendo a solução submetida a banho ultrassônico para melhor homogeneização. Em seguida, esta foi submetida à etapa de *clean up* por extração em fase sólida, conforme descrito por Zeraik (2010), empregando-se cartucho de sílica C18, que foi inicialmente condicionado com 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de água ultra pura. Ao fim do processo, uma alíquota de 2 mL da solução do extrato de *E. velutina* (5 mg/mL) foi introduzido no cartucho e eluído com 2 mL de metanol 60% por vazão gravitacional. A solução resultante foi filtrada com auxílio de filtro para seringa PVDF com 25 mm de diâmetro e porosidade 0,45µm (Millipore, EUA).

As substâncias encontradas foram identificadas através do tempo de retenção, bem como pela co-injeção de padrões externos na amostra. Os dados foram obtidos e processados pelo programa Empower[®] (Waters, EUA) do próprio aparelho.

4.2.7 Avaliação pré-clínica do extrato padronizado de *Erythrina velutina*

4.2.7.1 Avaliação da citotoxicidade em neutrófilos humano

O potencial citotóxico *in vitro* do extrato etanólico de *Erythrina velutina* (EEEV) em neutrófilos humano foi investigado através da determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio extracelular e da produção do sal de formazan no teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio).

Para a realização dos ensaios, o isolamento de células polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos, foi realizado a partir de sangue humano conforme metodologia descrita por Lucisano e Mantovani (1984). O sangue foi centrifugado, o plasma desprezado e o soro lavado diversas vezes com solução salina, utilizando gelatina 2,5% (p/v) para formar um gradiente de separação dos compostos sanguíneos.

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán, corante que se incorpora às células não viáveis, devido à ocorrência de lesões na membrana plasmática. A população de células ($2,5 \times 10^6$ cels/mL), predominantemente neutrófilos ($85 \pm 5\%$), apresentou viabilidade celular média de 95%.

- Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH)

A LDH é uma enzima citosólica cuja detecção no fluido extracelular é indicativo de morte ou perda da integridade celular. Também é responsável pela conversão do piruvato a lactato na presença de NADH. O ensaio foi realizado utilizando-se o Kit LDH (Liquiform), que se baseia numa medida espectrofotométrica (340 nm) do consumo de NADH durante a ação catalítica da LDH que reduz o piruvato a lactato.

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 15 min a 37°C, com concentrações crescentes do EEEV (0,1; 1; 10; 100 e 200 µg/mL), DMSO (1%, controle), HBSS (células não tratadas) ou Triton X-100 (0,2%, padrão citotóxico). Logo após, todos os tubos reacionais foram centrifugados a 755 x g por 10 min, a temperatura de 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e mantidos em banho de gelo. Alíquotas de 250 µL de substrato foram pré-incubadas por 3 min a 37°C. Adicionou-se 25 µL da amostra de sobrenadante, homogeneizou-se a mistura e realizou-se a leitura da absorvância (340 nm) nos tempos 1 e 3 min, a 37° C, em espectrofotômetro. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos em três diferentes dias. A atividade da enzima LDH nas amostras foi calculada seguindo-se as especificações do fabricante:

$$A = \left[\frac{(A_1 - A_2)}{2} \right] \times 1746,03 \quad (8)$$

Onde: A = atividade da LDH na amostra, em U/mL; A_1 = absorvância inicial (1 min) em 340 nm; A_2 = absorvância final (3 min) em 340 nm e 1746,03 = fator estipulado pelo fabricante para volume de amostra de 25 μ L.

- Teste do MTT

O ensaio do MTT (MOSMANN, 1983) é um método colorimétrico que se baseia no fato deste sal (brometo de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), de coloração amarela, ser reduzido a outro sal, o Formazan, de coloração roxa. A redução do MTT é catalisada pelo sistema enzimático succinato-tetrazol redutase, integrante da cadeia respiratória mitocondrial. Desta forma, a atividade desta enzima reflete a funcionalidade metabólica das mitocôndrias, sendo a ausência da redução do MTT um indicativo de diminuição da viabilidade celular.

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados em placa de 96 poços em atmosfera de CO_2 , por 30 min a 37°C , com concentrações crescentes do EEEV (0,1; 1; 10; 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$), DMSO (1%, controle), HBSS (células não tratadas) ou Triton X-100 (0,2%, padrão citotóxico). Decorrido esse período, a placa foi centrifugada a 2000 rpm por 15 min a 25°C . O sobrenadante foi descartado e incubou-se uma nova solução (200 μL) contendo 10% de MTT, na concentração de 10 mg/mL, sendo novamente incubada por mais 3h. Por fim, a placa foi centrifugada nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e então adicionado 150 μL de DMSO para a lise das células e solubilização do formazan. A placa foi agitada por 15 min com o auxílio de um agitador de placas. A leitura da absorvância (540 nm) foi realizada em leitor de microplaca. Os experimentos foram realizados em triplicata e em três diferentes dias.

4.2.7.2 Avaliação da citotoxicidade em células da linhagem 9L/lacZ

A determinação da citotoxicidade do EEEV em células de *Rattus norvegicus* (células gliais) foi avaliada através do método do MTT, conforme princípio descrito no item anterior. As células foram cultivadas em cultura de monocamada, em meio

DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, sendo estas plaqueadas na concentração de $0,5 \times 10^5$ células/mL com adição de concentrações crescentes do EEEV (10; 100; 400 e 1000 $\mu\text{g/mL}$), tendo como controle negativo DMEM mais DMSO a 0,5% e Triton X-100 (0,2%) como controle positivo. A leitura da absorvância (560 nm) foi realizada em leitor de microplaca. Os experimentos foram realizados em triplicata e em três diferentes dias.

4.2.7.3 Modelo experimental da Doença de Parkinson: efeito do EEEV e do ácido rizônico (AR) sobre a neurotoxicidade induzida por 6-OHDA em linhagem humana celular SH-SY5Y.

- Teste do MTT

A neuroproteção do EEEV e AR, composto obtido a partir das cascas do caule de *E. velutina*, foi avaliada através do método do MTT (MOSMANN, 1983), conforme descrito anteriormente. As células SH-SY5Y foram cultivadas em monocamadas, em recipientes apropriados para cultura, utilizando o meio DMEM/F12 complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina), sendo mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24h.

Após crescimento, as células ($0,7 \times 10^5$ cels/mL) foram incubadas em placa de 96 poços e atmosfera de CO₂, por 30min a 37°C, com concentrações crescentes (0,0025; 0,025; 0,25; 0,5; 1 $\mu\text{g/mL}$) do EEEV e AR, adicionadas 1h antes da neurotoxina 6-OHDA (25 μM). Decorridas 24h de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), sendo uma alíquota do sobrenadante retirada para a dosagem dos níveis de nitrito/nitrato e descartado o restante. Em seguida, a cada poço foram adicionados 200 μL da solução de MTT (10%, v/v, em meio DMEM/F12), onde as células foram novamente incubadas por 3h a 37°C. Finalmente, as placas foram centrifugadas (3000 rpm por 10 min), sendo o sobrenadante descartado. O precipitado foi então dissolvido em 150 μL de DMSO, para a lise das células e solubilização do formazan, sendo agitado por cerca de 10 min em agitador de placas até sua completa dissolução. A leitura da absorvância (595 nm) foi realizada em leitor de microplaca. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos em três diferentes dias.

- Determinação de Nitrito/Nitrato

A concentração de nitrito/nitrato foi determinada conforme descrito por Green *et al.* (1981). O método baseia-se na utilização do reagente de Griess que é capaz de revelar a presença de nitrito/nitrato através de uma reação de diazotização, pela formação de um cromóforo de cor rósea, com pico de absorvância em 560 nm.

Após 24h de incubação da suspensão de células ($0,7 \times 10^5$ cels/mL) com o EEEV e o AR, as placas de 96 poços foram centrifugadas (1500 rpm/15 min) e 100µL do sobrenadante foram adicionados a outra placa, contendo uma alíquota de 100 µL do reativo de Griess (sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 1%, cloridrato de N-1-naftiletilenodiamina 0,1%, H₃PO₄ em 1% e água destilada, na proporção de 1:1:1:1). Em seguida, foi realizada a leitura espectrofotométrica em leitora de microplacas (560 nm). O branco foi preparado pela adição de 100 µL do reativo de Griess a 100 µL do meio DMEM/F12 [1:1] GIBCO. Para determinação do teor de nitrito/nitrato, construiu-se uma curva padrão com concentrações crescentes de NaNO₂ (0,75–100 µM). Os experimentos foram realizados em triplicata e em três diferentes dias.

4.2.7.4 Determinação da atividade antioxidante

- Teste do DPPH

Dentre os modelos experimentais *in vitro* que podem ser empregados na bioprospecção de produtos antioxidantes podemos relacionar o teste de redução do radical estável 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH^{*}), cuja técnica independe de qualquer atividade enzimática. O DPPH possui coloração púrpura capaz de ser detectada por espectrofotometria (517 nm). Quando é reduzido por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, transforma-se no composto difenil-picril-hidrazina, de cor amarela, assim causando uma redução na detecção de sua absorvância. A partir dos resultados, pode-se determinar a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres ou ainda, a porcentagem de DPPH que não foi consumida do meio reacional (ESPÍN *et al.*, 2000).

Seguindo metodologia descrita por Saint-Cricq Gaulejac *et al.* (1999), alíquotas de 0,1 mL de concentrações crescentes do EEEV (10; 25; 50; 100 e 200 µg/mL), vitamina E (α -

tocoferol, 50 µg/mL, droga padrão) ou veículo (metanol, controle) foram adicionadas a 3,9 mL de solução de DPPH (0,3 mM em metanol/etanol 1:1). As soluções foram agitadas com auxílio de vortex por 1 min e mantidas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após 30 min, as medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (517 nm). Os experimentos foram realizados em triplicata e em três diferentes dias. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ INIBIÇÃO} = \left(\frac{A_o - \left(\frac{A_c}{A_o} \right)}{A_o} \right) \times 100 \quad (9)$$

Onde: A_o = absorvância da solução controle e A_c = absorvância da solução na presença da droga teste.

- Determinação da atividade da Superóxido Dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada utilizando metodologia descrita por Osswald *et al.* (1992) com modificações. Nesse método, a riboflavina é reduzida fotoquimicamente, gerando radical superóxido como um dos produtos dessa reação. O ânion superóxido é capaz de reduzir o NBT (azul de nitrotetrazólio). Na presença da SOD, a redução do NBT é inibida, com conseqüente aumento dos seus níveis, que pode ser determinado espectrofotometricamente por meio do aumento dos valores de absorvância.

À mistura reacional, formada por EDTA (0,54 M), tampão fosfato de potássio (1M, pH 7), metionina (11,6 µg/mL), riboflavina (0,4 µg/mL) e NBT (367 µg/mL), foram adicionados 200 µL de concentrações crescentes de EEEV (10; 25; 50; 100 e 200 µg/mL) ou vitamina C (50 µg/mL, droga padrão). As soluções obtidas foram expostas à luz fluorescente (80 W) por 30 min. Outro grupo preparado seguindo o mesmo procedimento foi mantido no escuro. A absorvância das soluções em ambas condições, iluminado e não iluminado, foi medida em espectrofotômetro (560 nm) e a diferença entre as duas absorvâncias foi considerada para a determinação da atividade da SOD e expressão dos resultados, que consistiu na inibição da redução do NBT, pela dismutação enzimática do superóxido.

4.2.8 Análise Estatística

Os resultados relacionados ao preparo da droga vegetal e soluções extrativas e à validação do método analítico foram processadas utilizando o programa Excel[®] 2003 (EUA), adotando os valores de referência da legislação vigente, quando pertinente, sendo apresentados como média \pm desvio padrão e desvio padrão relativo. As análises estatísticas dos ensaios biológicos foram realizadas com auxílio do programa *Graph Pad Prism 5.0* (EUA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As médias foram comparadas utilizando o teste "t" de Student para comparação entre duas médias ou análise de variância (ANOVA), onde a significância dos contrastes entre as médias foi estudada pelo teste de Tukey. O critério de significância foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Prospecção fitoquímica

A triagem fitoquímica preliminar da casca de *E. velutina* revelou a presença de compostos fenólicos, principalmente flavonóides e alcalóides, e também taninos e saponinas (Tabela 7).

Tabela 7. Testes de prospecção fitoquímica para a casca do caule de *Erythrina velutina*.

Classe química	Indicativo de reação positiva	Reagente/Procedimento	Resultado
Flavonóides	Coloração rósea ou vermelha	HCl-R e fita de Mg	+
	Precipitado branco ou leve turvação branca	Mayer Bertrand	- +
Alcalóides	Precipitado laranja avermelhado	Dragendorff Bouchardat	+ -
	Precipitado amarelo	Hager	-
	Camada de espuma estável por mais de 30 min	Agitação vigorosa	+
Taninos	Mudança de coloração ou formação de precipitado	FeCl ₃ 1%	+
		Acetato de chumbo	+
		Solução alcaloídica K ₂ Cr ₂ O ₇	-
		Acetato de cobre 4%	+
Antociânicos	Mudanças de coloração	Alteração do pH	-
Cumarinas	Fluorescência verde sob luz UV (365 nm)	CCD em placa de sílica Hex:AcOEt:MeOH (6:13:1) revelada com KOH 5%	-
Antraquinônicos	Coloração rósea na fase amoniacal	Benzeno e solução aquosa de hidróxido de amônio 10%	-
Cianogenéticos	Fita corada de vermelho	Fita de papel absorvente embebida em solução de ác. pícrico e Na ₂ CO ₃ a 10%	-
Digitálicos	Coloração púrpura	Ác. 3,5-dinitrobenzoico e KOH 2N	-

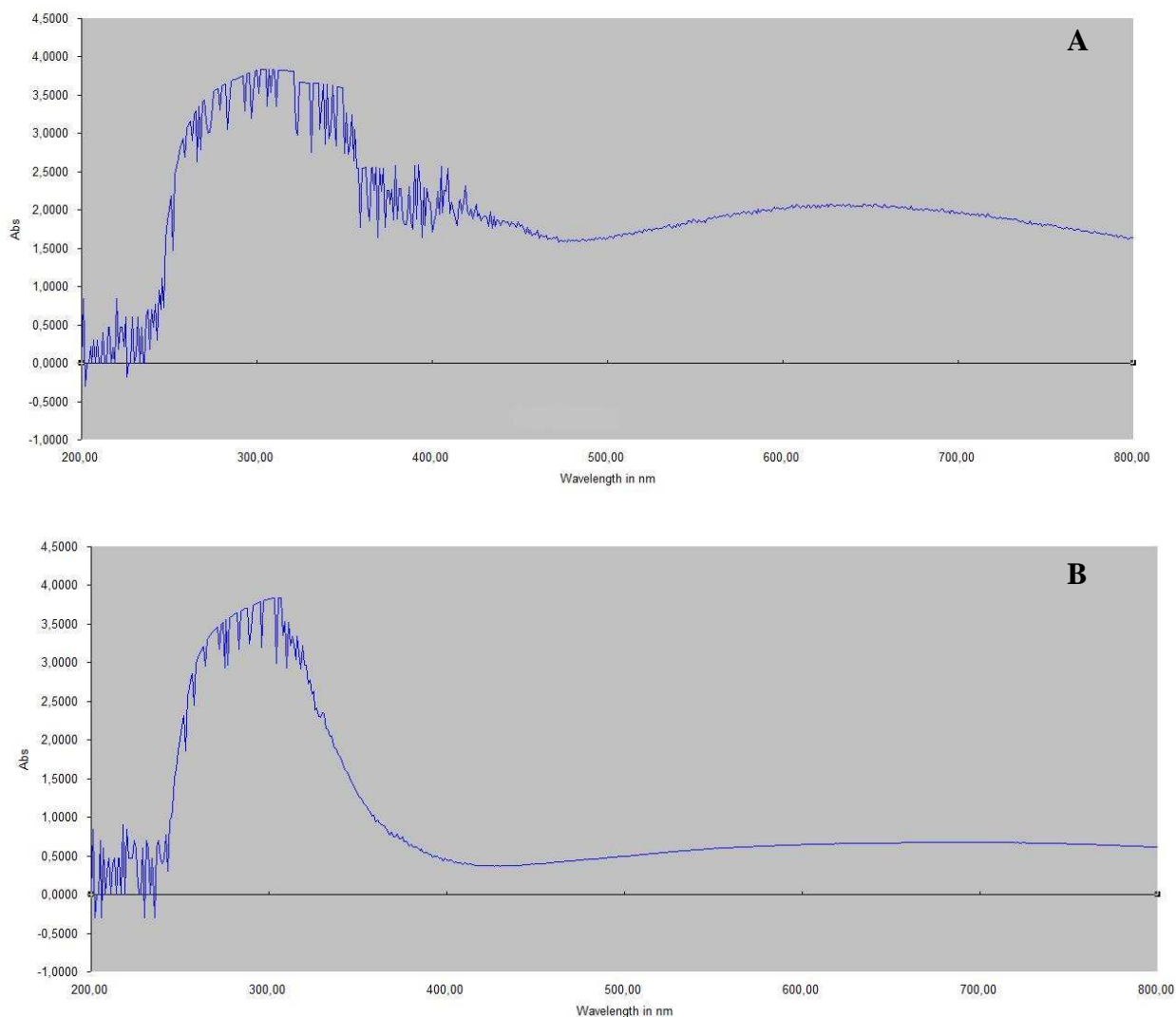
(-): ausente; (+): presente; HCl-R: ácido clorídrico concentrado; Mg: Magnésio; FeCl₃: cloreto férrico; K₂Cr₂O₇: dicromato de potássio; UV: ultravioleta; CCD: cromatografia em camada delgada; Hex: hexano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol; KOH: hidróxido de potássio; Na₂CO₃: carbonato de sódio.

5.2 Validação de método analítico para quantificação, por espectrofotometria, de fenóis totais, marcador químico, no extrato de *Erythrina velutina*

5.2.1 Especificidade

Os perfis espectrais (registro original) da solução padrão de ácido gálico e do extrato etanólico de *E. velutina* após reação com o reagente Folin-Ciocalteu estão representados na **Figura 11**.

Figura 11. Varredura espectrofotométrica para determinação da especificidade do método.



(A) Ácido gálico (154 $\mu\text{g/mL}$). (B) Extrato Etanólico de *Erythrina velutina* (154 $\mu\text{g EAG/mg}$) após reação com o reagente Folin-Ciocalteu. A análise foi realizada entre 200 e 800 nm. Eixo das abscissas (x) = concentração; Eixo das ordenadas (y) = abs. Abs = absorvância.

5.2.2 Linearidade e faixa de trabalho

A avaliação da linearidade do método foi investigada pelo uso de padrão externo, bem como pela adição de padrão à matriz. A **Tabela 8** e **Tabela 9** trazem as concentrações e os valores de absorvâncias do ácido gálico e do extrato etanólico de *E. velutina* com adição de ácido gálico, respectivamente. Os coeficientes de correlação encontrados para o ácido gálico e para o extrato etanólico de *E. velutina* com adição de ácido gálico foram de 0,9985 e 0,9928, respectivamente, com a dispersão dos resultados não ultrapassando a 5,13%. As representações gráficas das curvas de calibração, juntamente com as equações da reta, estão demonstrados na **Figura 12**.

Tabela 8. Valores de absorvâncias do ácido gálico obtidos por espectrofotometria (715 nm).

Concentração (µg/mL)	Absorvância ± DP	DPR
4	0,3301 ± 0,0031	0,94
6	0,5125 ± 0,0088	1,72
8	0,6710 ± 0,0141	2,10
10	0,8459 ± 0,0109	1,29
12	0,9749 ± 0,0152	1,56
14	1,1224 ± 0,0119	1,06
16	1,2590 ± 0,0199	1,58

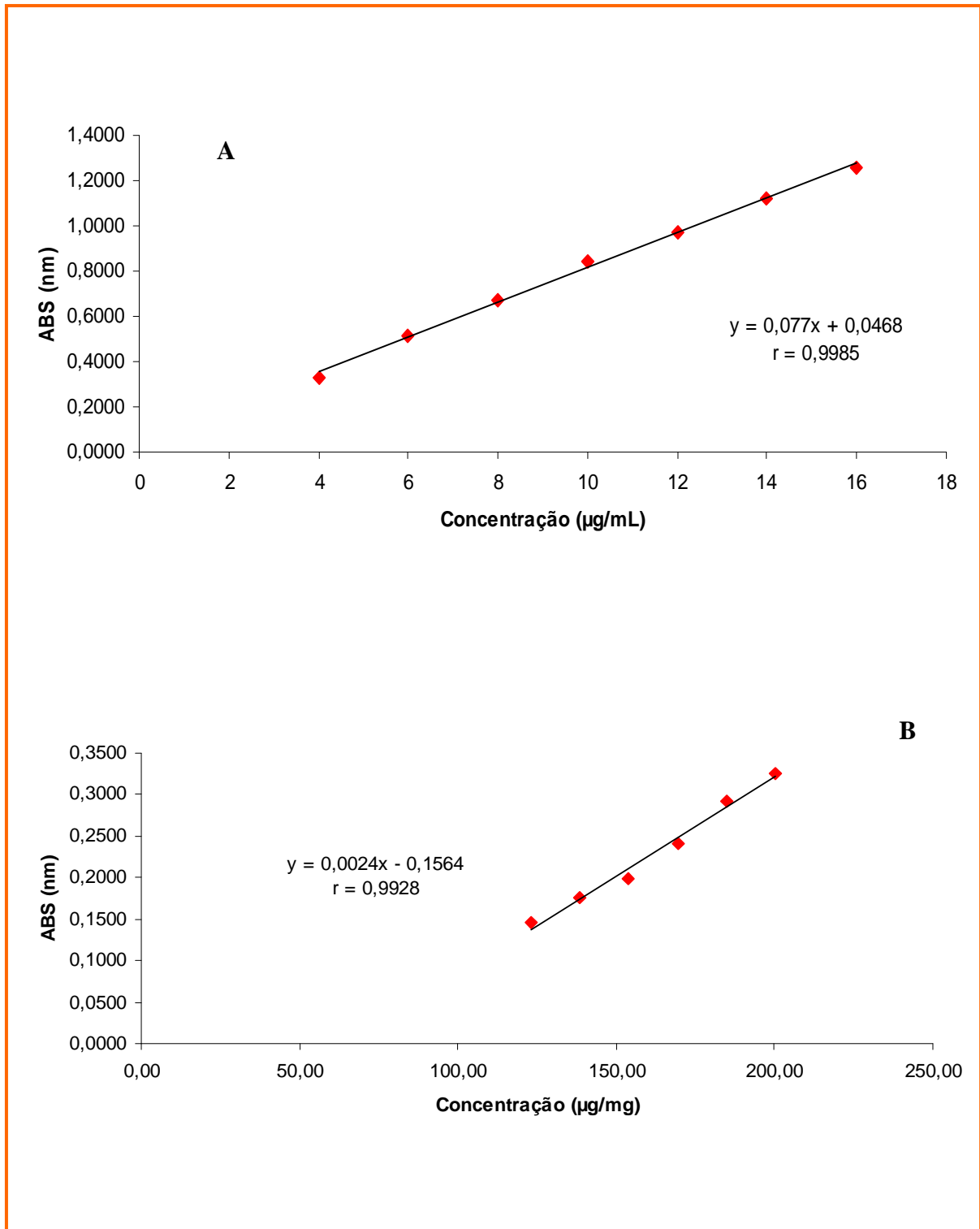
Os valores de absorvância estão expressos como média ± DP. As análises foram realizadas em triplicata. DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo.

Tabela 9. Valores de absorvâncias do extrato etanólico de *Erythrina velutina* com adição de ácido gálico obtidos por espectrofotometria (715 nm).

Concentração (µg EAG/mg)	Absorvância ± DP	DPR
123,20	0,1459 ± 0,0075	5,13
138,60	0,1762 ± 0,0088	2,36
154,00	0,1986 ± 0,0073	3,67
169,40	0,2416 ± 0,0063	2,60
184,80	0,2927 ± 0,0050	1,70
200,20	0,3250 ± 0,0090	2,78

Os valores de absorvância estão expressos como média ± DP. As análises foram realizadas em triplicata. DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo.

Figura 12. Curvas de calibração obtidas pelo método espectrofotométrico (715 nm).



(A) Ácido gálico; os resultados foram expressos como µg/mL. (B) Extrato etanólico de *Erythrina velutina* com adição de ácido gálico. A equação da reta foi obtida por regressão linear; os resultados foram expressos como µg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por mg de extrato.

5.2.3 Precisão

A precisão foi avaliada pelos estudos de repetibilidade e precisão intermediária. A precisão por repetibilidade foi avaliada por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho, em um único dia e com o mesmo analista. A precisão intermediária foi realizada em diferentes dias e com analistas diferentes, utilizando a mesma concentração.

Na avaliação da precisão do método por repetibilidade, o valor médio de fenóis totais no extrato etanólico de *E. velutina* foi de $169,48 \pm 1,06$ μg EAG/mg de extrato, com DPR de 0,63%. Se considerarmos o valor médio da absorvância, tem-se $0,6987 \pm 0,0041$ μg EAG/mg de extrato, com DPR de 0,59%.

Na **Tabela 10**, estão relacionados os resultados da avaliação da precisão intermediária. Os valores médios de fenóis totais determinados pelos analistas I e II ($170,91 \pm 2,14$ e $167,72 \pm 2,03$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extrato, respectivamente) não diferiram estatisticamente ($F_0 = 1,11$; $F_{\text{crítico}} = 5,05$) e apresentam um DPR em torno de 1,2%. Resultados semelhantes foram observados no estudo de precisão intermediária com mesmo analista em dias diferentes.

Tabela 10. Avaliação da precisão intermediária do método para análise de fenóis totais no extrato etanólico de *Erythrina velutina* por espectrofotometria.

Dia	Analista	Abs (nm)	Concentração (μg EAG/mg)
1	I	$0,7043 \pm 0,0083$ (1,17)	$170,91 \pm 2,14$ (1,25)
	II	$0,6919 \pm 0,0078$ (1,13)	$167,72 \pm 2,03$ (1,21)
2	I	$0,6375 \pm 0,0107$ (1,68)	$153,62 \pm 2,77$ (1,80)
	II	$0,6403 \pm 0,0053$ (0,83)	$154,33 \pm 1,37$ (0,89)

Os valores estão expressos como média \pm DP (DPR). Análises em triplicata. As concentrações foram expressas como μg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por mg de extrato.

5.2.4 Exatidão

A exatidão do presente método foi determinada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida de marcador adicionado à matriz. O ensaio de recuperação foi executado a partir de três amostras em três diferentes concentrações (baixa, média, alta) com três réplicas cada, ou melhor, as concentrações equivalentes a 80, 100% e 120% da solução de

trabalho, que correspondem a 123,2; 154,0 e 184,8 μg EAG/mg de extrato, respectivamente. As amostras foram preparadas a partir do extrato etanólico de *E. velutina* e através da adição de quantidade conhecida do padrão de trabalho.

A **Tabela 11** apresenta as absorvâncias e concentrações obtidas na determinação da exatidão do método. Os valores estão próximos a 100%, variando entre 96,60 e 103,09%, indicando que o método apresenta capacidade de recuperação satisfatória. Os baixos valores de DPR obtidos indicam precisão adequada das leituras, em termos de repetibilidade.

Tabela 11. Determinação da exatidão (recuperação) por adição de três diferentes concentrações de ácido gálico ao extrato etanólico de *Erythrina velutina*.

Concentração adicionada	Recuperação (%) (DP)	Média (DP)	DPR (%)
80%	103,09 (0,0061)		
100%	96,60 (0,0059)	100,26 (3,32)	3,31
120%	101,09 (0,0041)		

Média de três determinações. A concentração de padrão adicionado foi estabelecida em função do teor de fenóis totais no extrato. DP=desvio padrão; DPR=desvio padrão relativo.

5.2.5 Robustez

A mudança do fabricante do solvente usado na solução amostra do extrato resultou em concentrações médias de $154,12 \pm 8,86$ μg EAG/mg de extrato para o tipo A e $158,32 \pm 1,97$ μg EAG/mg para o tipo B. A modificação do comprimento de onda de 715 para 705 nm não apresentou variação significativa no valor da leitura de absorvância da amostra (concentrações médias de $154,12 \pm 8,86$ e $154,46 \pm 8,78$ μg EAG/mg de extrato, respectivamente). A análise de variância, com limite de aceitação de 0,05%, não indicou diferença significativa dos resultados obtidos para o teor de fenóis totais (**Tabela 12**).

Tabela 12. Avaliação estatística da robustez do método desenvolvido por espectrofotometria para quantificação de fenóis totais no extrato etanólico de *Erythrina velutina* ($p < 0,05$).

Fatores	p-valor
Marca do solvente	0,88
Comprimento de onda	0,28

5.3 Preparação e caracterização do material vegetal: umidade residual, granulometria, cinzas, teor de extrativos e fenóis totais

Na **Tabela 13**, pode ser observado que o teor de umidade das cascas do caule de *E. velutina*, determinado durante a secagem em estufa com ou sem circulação e renovação de ar, por diferentes períodos (24, 48, 72, 96 e 120 h), manteve-se entre 8 – 14 %. Além disso, as concentrações de fenóis totais não diferiram significativamente nos períodos investigados.

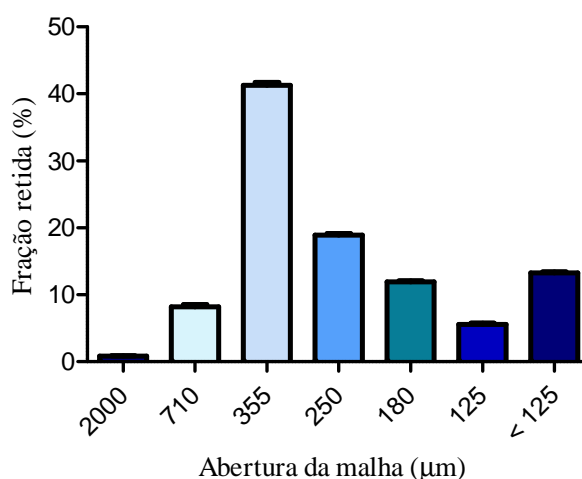
Tabela 13. Teor de umidade da droga vegetal de *Erythrina velutina* em diferentes tempos de secagem em estufas.

Tempo (h)	Teor de umidade (%)		Fenóis Totais (µg EAG/mg)	
	Estufa de secagem e esterilização	Estufa com circulação e renovação de ar	Estufa de secagem e esterilização	Estufa com circulação e renovação de ar
24	12,00 ± 0,22 (2,11)	3,34 ± 0,07 (1,82)	156,28±10,50 (6,72)	161,28±4,16 (2,57)
48	3,49 ± 0,06 (1,76)	4,30 ± 0,08 (1,73)	151,38±2,95 (1,95)	153,69±4,05 (2,63)
72	4,41 ± 0,13 (1,84)	5,18 ± 0,10 (2,84)	162,20±8,85 (5,46)	157,34±14,96 (9,51)
96	5,36 ± 0,14 (1,87)	6,01 ± 0,14 (2,63)	159,86±7,80 (4,88)	162,47±3,98 (2,45)
120	4,82 ± 0,10 (1,43)	5,72 ± 0,08 (2,16)	163,66±3,91 (2,39)	153,26±1,63 (2,39)

Os valores estão expressos como média ± DP (DPR). As análises foram realizadas em triplicata. A casca do caule foi submetida à secagem em estufa a 80 ± 5°C.

Na **Figura 13**, estão descritos os resultados obtidos na determinação granulométrica do pó da casca do caule de *E. velutina*. Dentre os tamises empregados no estudo (2000, 710, 355, 250, 180 e 125 μm), o tamis com abertura de malha de 355 μm foi o que reteve maior porcentagem de droga vegetal (42%).

Figura 13. Distribuição granulométrica da casca do caule de *Erythrina velutina* seca em estufa com renovação e circulação de ar.



Após secagem, a droga vegetal foi pulverizada em moinho de facas e determinada a granulometria. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

Prosseguindo a caracterização farmacognóstica de *E. velutina*, na **Tabela 14** estão descritos o diâmetro médio das partículas ($0,296 \pm 0,007$ mm), os teores de cinzas (totais: $7,54 \pm 0,04\%$; insolúveis em ácido: $0,22 \pm 0,01\%$), bem como a densidade aparente ($0,264 \pm 0,021$ g/mL) e os teores de extrativos em água ($10,69 \pm 0,31\%$) e etanol ($33,42 \pm 0,24\%$).

Tabela 14. Caracterização farmacognóstica da droga vegetal de *Erythrina velutina*.

Parâmetros	Resultados obtidos
Diâmetro médio das partículas (mm)	$0,296 \pm 0,007$ (2,56)
Densidade aparente não compactada (g/mL)	$0,264 \pm 0,021$ (1,75)
Teor de cinzas totais (%)	$7,54 \pm 0,04$ (0,54)
Teor de cinzas insolúveis em ácido (%)	$0,22 \pm 0,01$ (1,26)
Teor de extrativos em água (%)	$10,69 \pm 0,31$ (2,87)
Teor de extrativos em etanol (%)	$33,42 \pm 0,24$ (0,71)

Os valores estão expressos como média \pm DP (DPR). Análises foram realizadas em triplicata.

5.4 Controle microbiológico da droga vegetal de *Erythrina velutina*

Os resultados do controle microbiológico e os limites permitidos são apresentados na **Tabela 15**, onde pode ser observado que não houve crescimento microbiano de *Escherichia coli* e *Salmonella sp.*, os quais são considerados microrganismos patogênicos. Na contagem do número total de bactérias, houve crescimento de $2,25 \times 10^3$ UFC/g e para fungos e leveduras, ocorreu o crescimento de $1,75 \times 10^3$ UFC/g.

Tabela 15. Análises microbiológicas do pó das cascas da droga vegetal de *Erythrina velutina*.

Microorganismo	Resultados	Farmacopeia Brasileira	
		Extrato (a quente)	Extrato (a frio)
Bactérias aeróbias	$2,25 \times 10^3$ UFC/g	10^7 UFC/g	10^4 UFC/g
Fungos e leveduras	$1,75 \times 10^3$ UFC/g	10^5 UFC/g	10^3 UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	10^2 UFC/g	10^1 UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	Ausente	Ausência	Ausência

Fonte: Farmacopeia Brasileira V Ed. (2010).

5.5 Desenvolvimento, avaliação e seleção do método de produção do extrato de *Erythrina velutina* monitorado pelo teor de fenóis totais

Na **Tabela 16**, estão descritos os teores de fenóis totais encontrados nos extratos etanólicos de *E. velutina* obtidos com emprego de três diferentes métodos extrativos: soxhlet, maceração e percolação. Embora o extrato obtido por percolação ($153,2 \pm 3,3$ μg EAG/mg de extrato) tenha apresentado um teor superior em relação aos demais métodos (maceração e soxhlet: $149,8 \pm 2,8$; $147,7 \pm 3,3$ μg EAG/mg de extrato, respectivamente), não houve diferença significativa (ANOVA, Tukey) entre os teores de fenóis totais determinados. Em relação ao rendimento extrativo, o extrato obtido por soxhlet mostrou um rendimento superior ($8,83 \pm 0,49\%$) em relação aos demais, percolação ($5,63 \pm 0,23\%$) e maceração ($2,66 \pm 0,08\%$). Diante dos resultados obtidos e considerando o menor custo do processo extrativo, os estudos de *E. velutina* prosseguiram empregando o método da percolação para a produção de seu extrato etanólico, embora este tenha apresentado um rendimento menor em relação ao soxhlet.

Tabela 16. Determinação do teor de fenóis totais e rendimento dos processos extrativos.

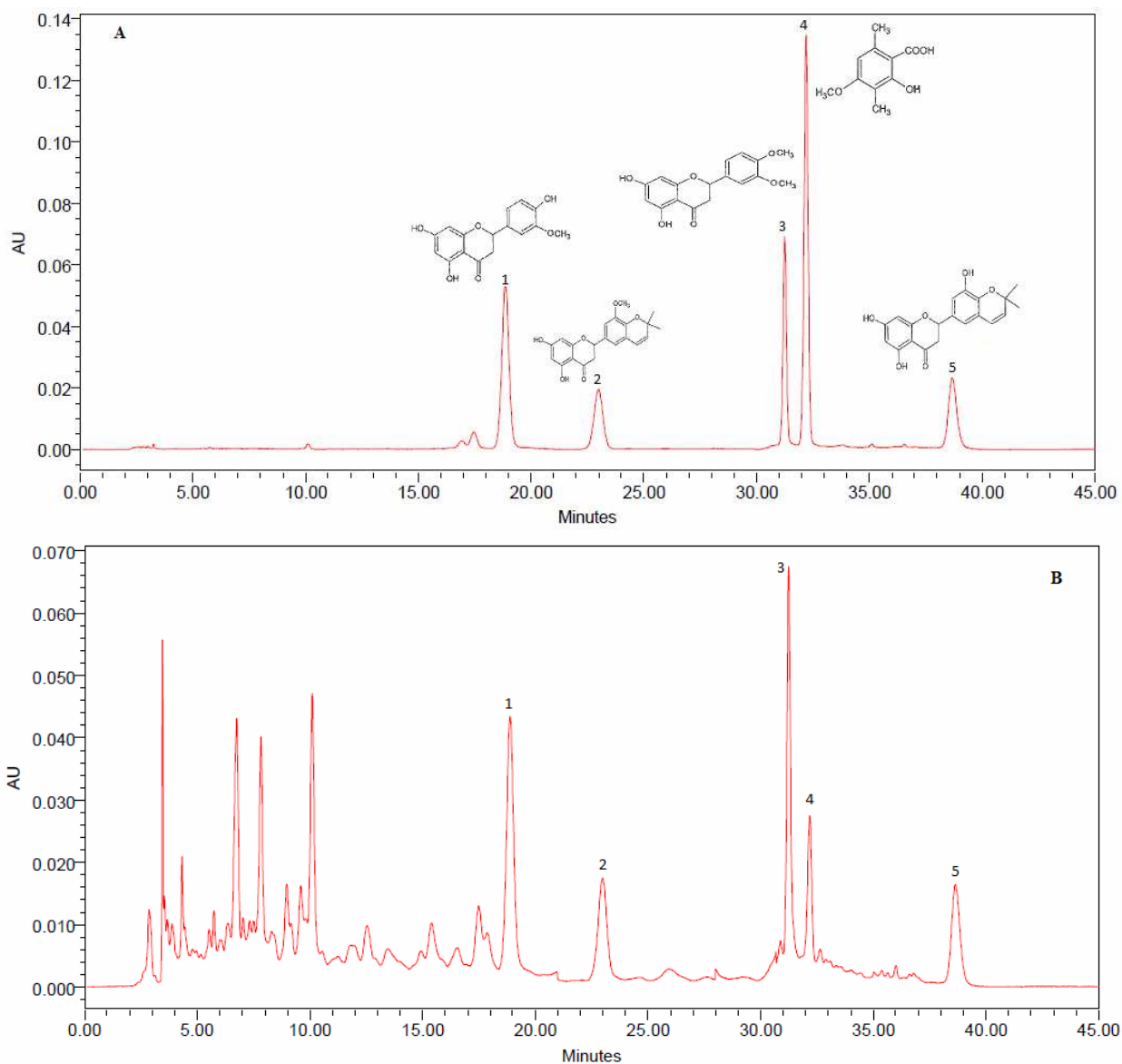
Processo extrativo	Fenóis Totais (μg EAG/mg)	Rendimento (%)
Soxhlet	$147,96 \pm 6,65$ (4,49)	$8,83 \pm 0,49$ (5,51) ^{a,b}
Percolação	$155,14 \pm 3,31$ (2,13)	$5,63 \pm 0,23$ (4,01) ^{b,c}
Maceração	$150,08 \pm 2,78$ (1,85)	$2,66 \pm 0,08$ (3,01) ^{a,c}

As análises foram realizadas em triplicata. Os valores estão expressos como média \pm DP (DPR). a vs percolação; b vs maceração; c vs soxhlet ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey, *post hoc*). DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo.

5.7 Perfil cromatográfico do extrato etanólico de *Erythrina velutina* por CLAE-DAD

A análise preliminar do extrato etanólico de *E. velutina* por CLAE-DAD permitiu a obtenção de seu perfil cromatográfico, *fingerprint*, onde foram identificados cinco metabólitos secundários, todos compostos fenólicos, tais como hesperidina (Tr: 18,8 min), abssinina (Tr: 22,9 min), homoesperidina (Tr: 31,2 min), ácido rizônico (Tr: 32,1 min) e sigmoidina C (Tr: 38,6 min) (**Figura 14**). As substâncias foram identificadas com auxílio dos dados espectroscópicos de UV, por comparação do tempo de retenção e, principalmente, por co-injeção de padrões de trabalho, compostos por soluções preparadas a partir de moléculas isoladas da casca de *E. velutina* durante seu estudo fitoquímico. Na amostra analisada, nota-se ainda a existência de outros componentes a serem definidos quimicamente em estudo posterior.

Figura 14. Perfil cromatográfico do extrato etanólico de *Erythrina velutina* (EEEV) e de seus metabólitos.



Os cromatogramas foram obtidos por CLAE-DAD a partir da injeção de soluções das cinco substância isoladas a partir das cascas do caule de *E. velutina* (1. hesperidina; 2. abissinina; 3. homohesperidina; 4. ácido rizônico; 5. sigmoidina C) (A) e do extrato etanólico (B). Condições cromatográficas: coluna C8, fase móvel (A, tampão acetato de amônio 5 mM, pH=3,4; B, Actonitrila), eluição gradiente, volume de injeção de 20 μ L e detecção: 0 – 21 min a 286 nm, 21 – 28 min a 260 nm, 28 – 30,7 min a 286 nm, 30,7 – 35 min a 267 nm e 35 – 45 min a 282 nm.

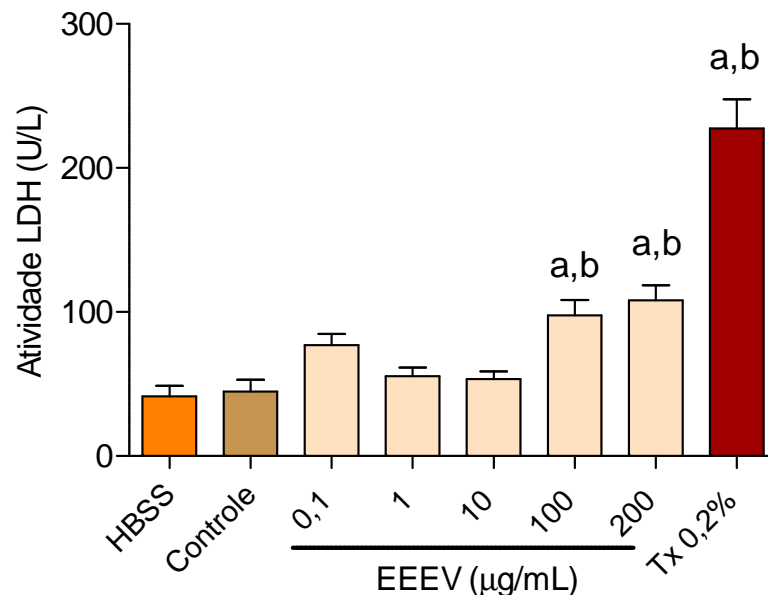
5.8 Avaliação pré-clínica do extrato etanólico de *Erythrina velutina* (EEEV)

Os ensaios toxicológicos e farmacológicos envolveram a avaliação da citotoxicidade e o potencial antioxidante, incluindo testes químicos e biológicos, como cultura de células SH-SY5Y expostas à ação da 6-OHDA.

5.8.1 Avaliação da citotoxicidade em neutrófilos humano

A **Figura 15** mostra o efeito do EEEV em cultura primária de neutrófilos, mensurada através da atividade da enzima LDH. Observou-se que o EEEV nas concentrações de 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ não promoveu aumento da atividade da LDH ($76,93 \pm 7,80$; $55,45 \pm 5,87$; $53,46 \pm 5,20$ U/L) quando comparado ao controle ($44,56 \pm 8,31$ U/L). No entanto, as duas maiores doses (100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) promoveram aumento significativo da atividade da LDH ($97,64 \pm 10,86$; $108,10 \pm 10,41$ U/L) quando comparado ao controle ($44,56 \pm 8,31$ U/L).

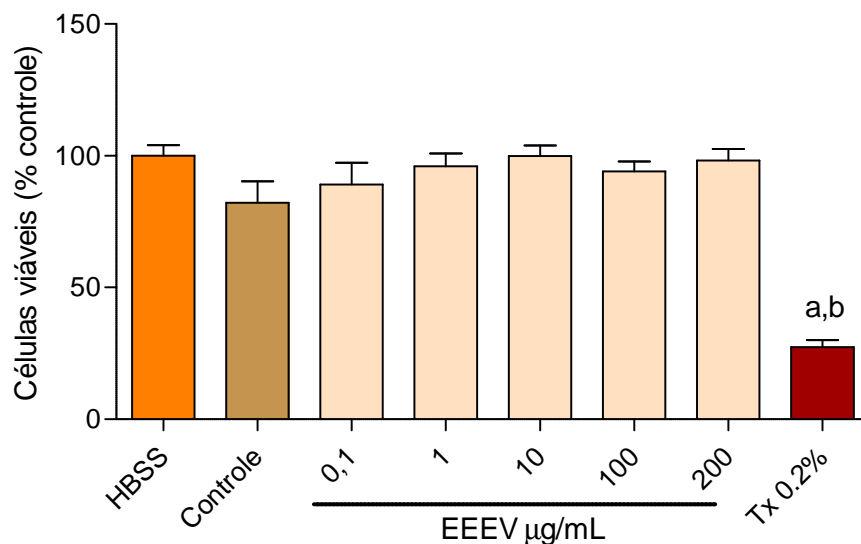
Figura 15. Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de *Erythrina velutina* (EEEV) em neutrófilos humano determinada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).



Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com EEEV (0,1; 1; 10; 100; 200 $\mu\text{g/mL}$) e 15 min depois foi avaliada a atividade da LDH. HBSS: células não tratadas; Tx 0,2%: Triton x-100 (0,2% v/v) – padrão citotóxico; Controle: veículo (DMSO 1%). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. a vs HBSS; b vs controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey, *post hoc*).

Na **Figura 16**, pode ser observado que a adição do EEEV aos neutrófilos humano em concentrações crescentes (0,1; 1; 10; 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não causou redução significativa da viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT ($89,08 \pm 8,18$; $96,01 \pm 4,94$; $99,98 \pm 4,00$; $94,12 \pm 3,63$; $98,16 \pm 4,41\%$, respectivamente) quando comparado ao controle ($82,16 \pm 8,31\%$). No entanto, o triton X-100, padrão citotóxico, reduziu a viabilidade celular para $27,26 \pm 2,19\%$.

Figura 16. Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de *Erythrina velutina* (EEEV) em neutrófilos determinada através do teste do MTT.

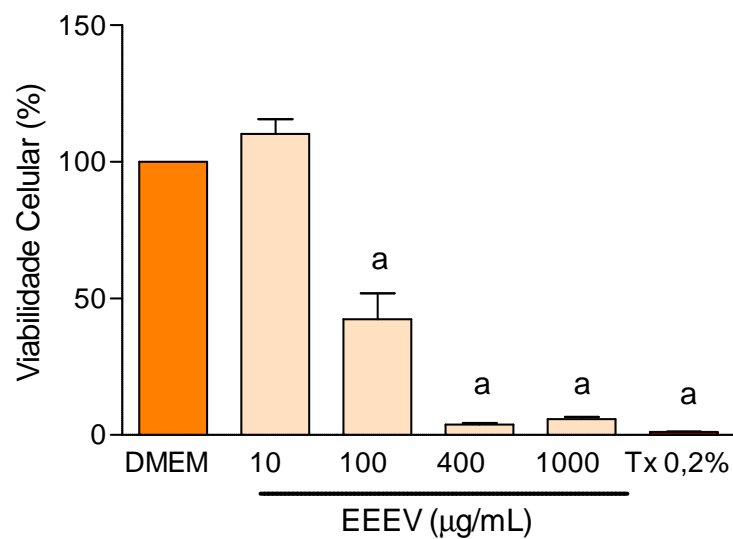


Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com EEEV (0,1; 1; 10; 100; 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 3h depois foi avaliada a viabilidade celular através do teste do MTT. HBSS: células não tratadas; Tx 0,2%: Triton x-100 (0,2% v/v) – padrão citotóxico; Controle: veículo (DMSO 1%). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. a vs HBSS; b vs controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey, *post hoc*).

5.8.2 Avaliação da citotoxicidade em células da linhagem 9L/lacZ

Na **Figura 17**, observa-se que a adição do EEEV às células da linhagem 9L/lacZ (células gliais), na menor concentração (10 $\mu\text{g/mL}$), não foi capaz de reduzir a viabilidade celular, avaliada pelo teste do MTT. Entretanto, as demais concentrações (100, 400, 1000 $\mu\text{g/mL}$) foram capazes de reduzir a viabilidade celular ($42,45 \pm 9,45$; $3,77 \pm 0,62$; $5,87 \pm 0,86\%$, respectivamente) quando comparado ao grupo controle (DMEM). Da mesma forma, o triton X-100, padrão citotóxico, também apresentou uma redução significativa da viabilidade celular, sendo esta equivalente a $1,17 \pm 0,13\%$.

Figura 17. Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de *Erythrina velutina* (EEEV) em células gliais determinada através do teste do MTT.



Células 9L/lacZ ($0,5 \times 10^5$ células/mL) foram incubadas com EEEV (10, 100, 400, 1000 $\mu\text{g/mL}$) e 3h depois foi avaliada a viabilidade celular através do teste do MTT. DMEM: células não tratadas; Tx 0,2%: Triton x-100 (0,2% v/v) – padrão citotóxico. Resultados foram expressos como média \pm EPM. a vs DMEM ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey, *post hoc*).

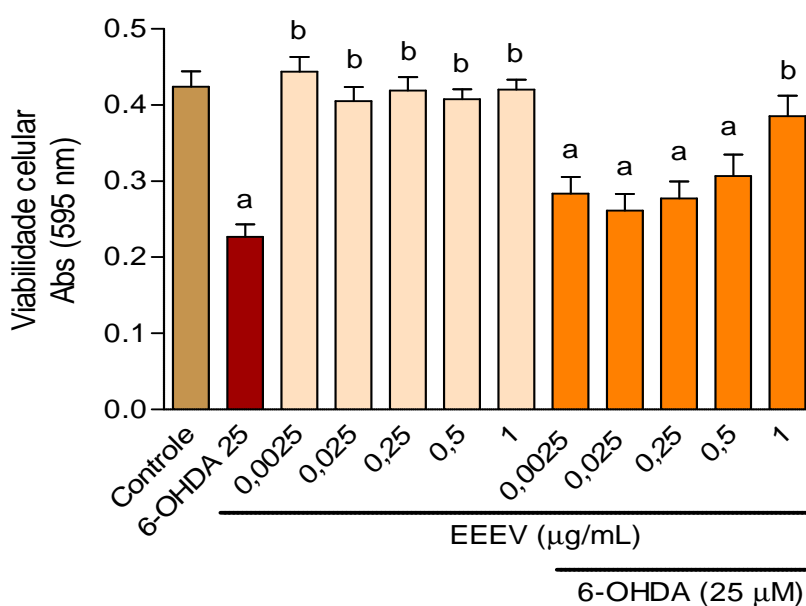
5.8.3 Modelo experimental da Doença de Parkinson: efeito do EEEV e do ácido rizônico (AR) sobre a neurotoxicidade induzida por 6-OHDA em linhagem humana celular SH-SY5Y

- Teste do MTT

As figuras 18 e 19 mostram o efeito protetor do EEEV e do AR, respectivamente, sobre a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA às células SH-SY5Y.

Na **Figura 18**, a adição de 6-OHDA (25 μ M) causou uma redução significativa na viabilidade celular (absorvância do MTT: $0,2268 \pm 0,0164$) quando comparado ao controle (absorvância do MTT: $0,4241 \pm 0,0204$). A adição de concentrações crescentes do EEEV (0,0025 – 1 μ g/mL) não produziu nenhum efeito sobre a viabilidade celular (absorvância do MTT: $0,4439 \pm 0,0191$; $0,4053 \pm 0,0184$; $0,4189 \pm 0,0177$; $0,4079 \pm 0,0129$; $0,4203 \pm 0,0127$, respectivamente), avaliada pelo teste do MTT. Na presença da neurotoxina 6-OHDA, EEEV na concentração de 1 μ g/mL reverteu parcialmente a sua citotoxicidade (absorvância do MTT: $0,3854 \pm 0,0268$) em relação a 6-OHDA (absorvância do MTT: $0,2268 \pm 0,0164$).

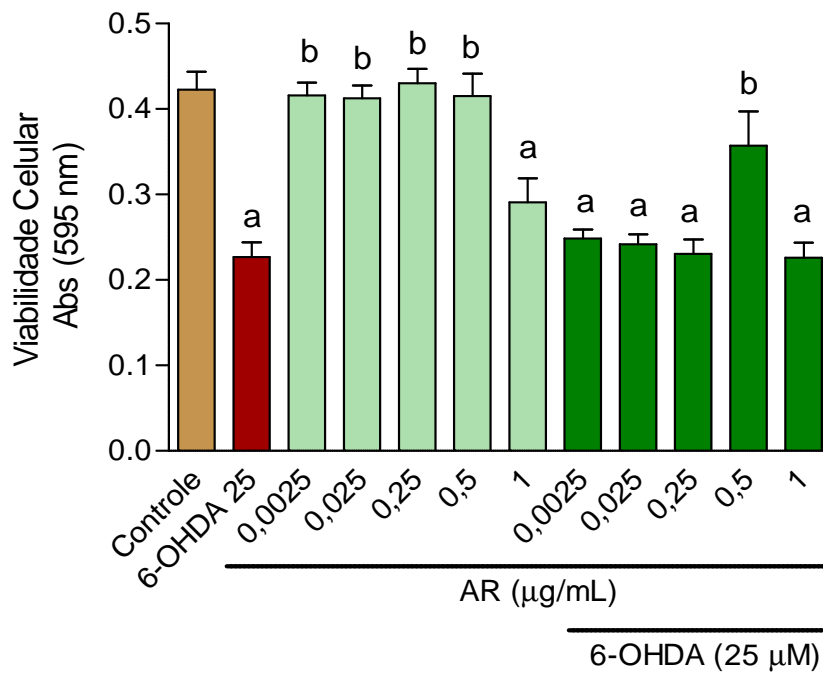
Figura 18. Efeito do extrato etanólico de *Erythrina velutina* (EEEV) sobre a viabilidade de células SH-SY5Y na presença e na ausência da 6-OHDA: teste do MTT.



EEEV (0,0025-1 μ g/mL) foi adicionado à cultura de células SH-SY5Y (neuroblastoma humano) 1h antes da adição da 6-OHDA (25 μ M). Os valores estão expressos como média \pm EPM. a vs controle, b vs 6-OHDA ($p < 0,05$ – ANOVA e Tukey, *post hoc*).

Na **Figura 19**, a adição de 6-OHDA (25 μ M) causou uma redução significativa na viabilidade celular (absorvância do MTT: $0,2268 \pm 0,0164$) quando comparado ao controle (absorvância do MTT: $0,4227 \pm 0,0214$). A adição de concentrações crescentes de AR (0,0025 – 1 μ g/mL) não produziu nenhum efeito sobre a viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT (absorvância do MTT: $0,4159 \pm 0,0154$; $0,4126 \pm 0,0150$; $0,4304 \pm 0,0169$; $0,4154 \pm 0,0263$, respectivamente), excetuando-se a maior concentração estudada, 1 μ g/mL (absorvância do MTT: $0,2911 \pm 0,0280$). Na presença da neurotoxina 6-OHDA (25 μ M), AR na concentração de 0,5 μ g/mL reverteu parcialmente sua citotoxicidade (absorvância do MTT: $0,3571 \pm 0,0401$) em relação à 6-OHDA (absorvância do MTT: $0,2268 \pm 0,0164$).

Figura 19. Efeito do ácido rizônico (AR) sobre a viabilidade de células SH-SY5Y na presença e na ausência da 6-OHDA: teste do MTT.



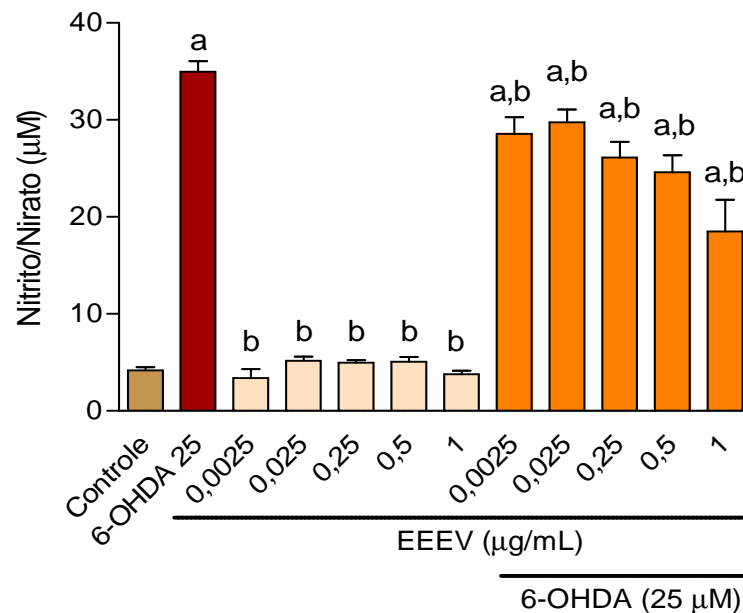
AR (0,0025-1 μ g/mL) foi adicionado à cultura de células SH-SY5Y (neuroblastoma humano) 1h antes da adição da 6-OHDA (25 μ M). Os valores estão expressos como média \pm EPM. a vs controle, b vs 6-OHDA ($p < 0,05$ – ANOVA e Tukey, *post hoc*).

- Determinação de Nitrito/Nitrato

As figuras 20 e 21 demonstram o efeito do EEEV e AR, respectivamente, sobre a formação de nitrito induzida pela 6-OHDA em células SH-SY5Y.

Na **Figura 20**, pode ser observado que a adição do EEEV, no intervalo de 0,0025 a 1 $\mu\text{g/mL}$, à cultura de células SH-SY5Y não produziu alterações sobre os níveis de nitrito/nitrato em relação ao controle. Após exposição dessas células à neurotoxina 6-OHDA (25 μM), foi detectado um aumento significativo ($34,99 \pm 1,09 \mu\text{g/mL}$) na concentração de nitrito/nitrato, quando comparado ao controle ($4,17 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$). Contudo, a adição de EEEV em concentrações crescentes (0,0025; 0,025; 0,25; 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$) 1h antes da exposição à 6-OHDA (25 μM) promoveu uma redução significativa nos níveis de nitrito/nitrato ($28,59 \pm 1,71$; $29,74 \pm 1,35$; $26,16 \pm 1,59$; $24,62 \pm 1,74$; $18,52 \pm 3,28 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) em relação ao grupo da 6-OHDA ($34,99 \pm 1,09 \mu\text{g/mL}$).

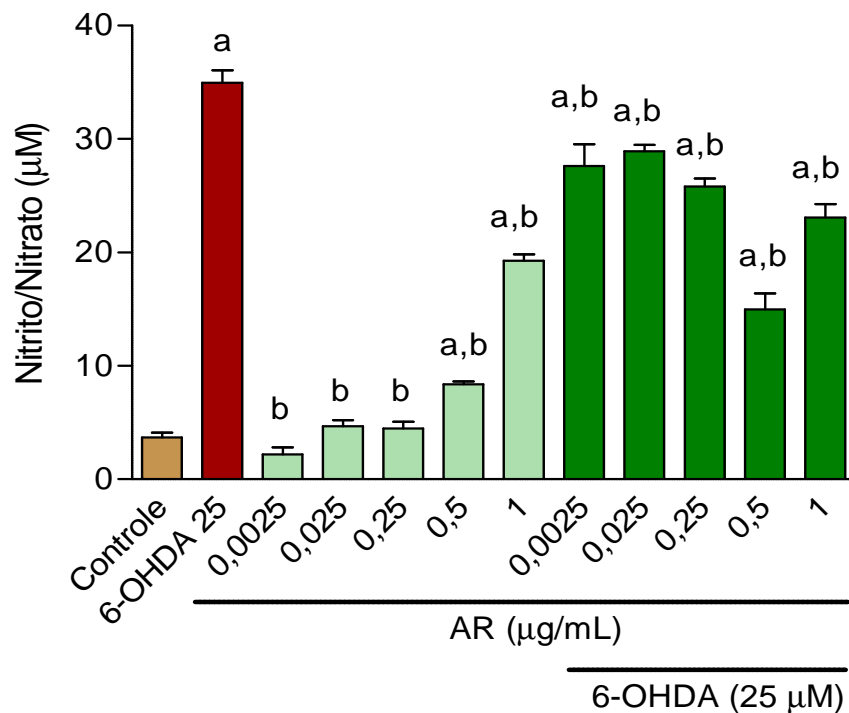
Figura 20. Efeito do extrato etanólico de *Erythrina velutina* (EEEV) nos níveis de nitrito/nitrato na ausência e na presença de 6-OHDA em células SH-SY5Y.



EEEV (0,0025-1 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado à suspensão de células SH-SY5Y (neuroblastoma humano) 1h antes da 6-OHDA (25 μM). Após 24h, foi avaliada a formação de nitrito/nitrato por espectrofotometria (560 nm). Os valores estão expressos como média \pm EPM, a vs controle, b vs 6-OHDA ($p < 0,05$ – ANOVA e Tukey, *post hoc*).

Na **Figura 21**, observa-se que a adição de AR (0,0025; 0,025 e 0,25 $\mu\text{g/mL}$) à cultura de células SH-SY5Y não produziu alterações sobre os níveis de nitrito/nitrato em relação ao controle. Entretanto, as duas maiores concentrações estudadas (0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$) promoveram alterações significativas sobre os níveis de nitrito/nitrato ($8,39 \pm 0,22$; $19,30 \pm 0,55$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) em comparação ao controle ($3,69 \pm 0,40$ $\mu\text{g/mL}$). Entretanto, a adição de AR em concentrações crescentes (0,0025; 0,025; 0,25; 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$) 1h antes da exposição à 6-OHDA (25 μM) promoveu uma redução significativa nos níveis de nitrito/nitrato ($27,62 \pm 1,93$; $28,90 \pm 0,58$; $25,82 \pm 0,68$; $15,00 \pm 1,40$; $23,09 \pm 1,20$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), quando comparado ao grupo da 6-OHDA ($34,99 \pm 1,09$ $\mu\text{g/mL}$).

Figura 21. Efeito do ácido rizônico (AR) nos níveis de nitrito/nitrato na ausência e na presença de 6-OHDA em células SH-SY5Y.



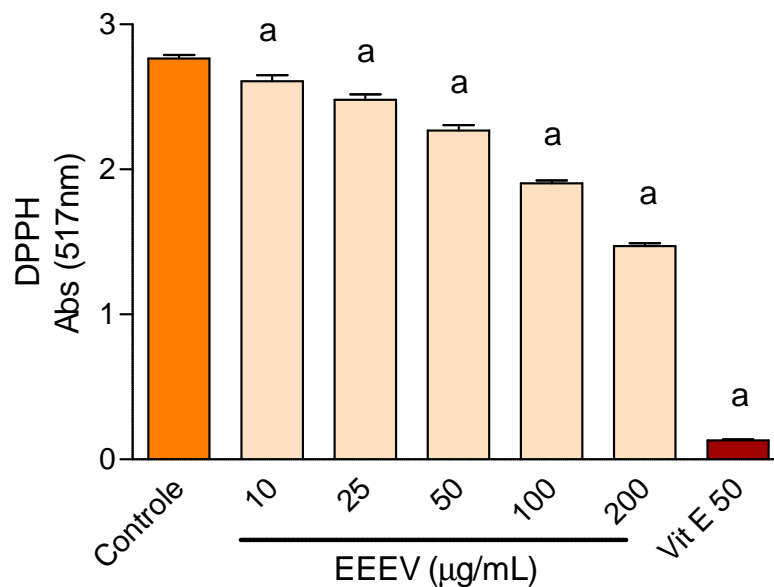
AR (0,0025-1 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado à suspensão de células SH-SY5Y (neuroblastoma humano) 1h antes da 6-OHDA (25 μM). Após 24h, foi avaliada a formação de nitrito/nitrato por espectrofotometria (560 nm). Os valores estão expressos como média \pm EPM. a vs controle, b vs 6-OHDA ($p < 0,05$ – ANOVA e Tukey, *post hoc*).

5.8.4 Determinação da atividade antioxidante

- Teste do DPPH

Pode ser observado na **Figura 22** que EEEV nas concentrações de 10; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ apresentou atividade antioxidante, com redução significativa das absorvâncias ($2,609 \pm 0,041$; $2,480 \pm 0,037$; $2,269 \pm 0,037$; $1,903 \pm 0,021$; $1,471 \pm 0,021$ nm) quando comparada ao controle ($2,765 \pm 0,023$), correspondendo a inibição de 3,73; 9,89; 18,10; 30,22 e 48,36%, respectivamente. A vitamina E (50 $\mu\text{g/mL}$), droga antioxidante, também mostrou redução significativa da absorvância ($0,131 \pm 0,007$) correspondendo a inibição de $94,02 \pm 1,1\%$. Ambos resultados indicam que houve um consumo do radical DPPH, indicando que o EEEV possui atividade antioxidante.

Figura 22. Avaliação do potencial sequestrador de radicais livres do extrato etanólico de *Erythrina velutina* (EEEV), determinada pelo teste do DPPH.

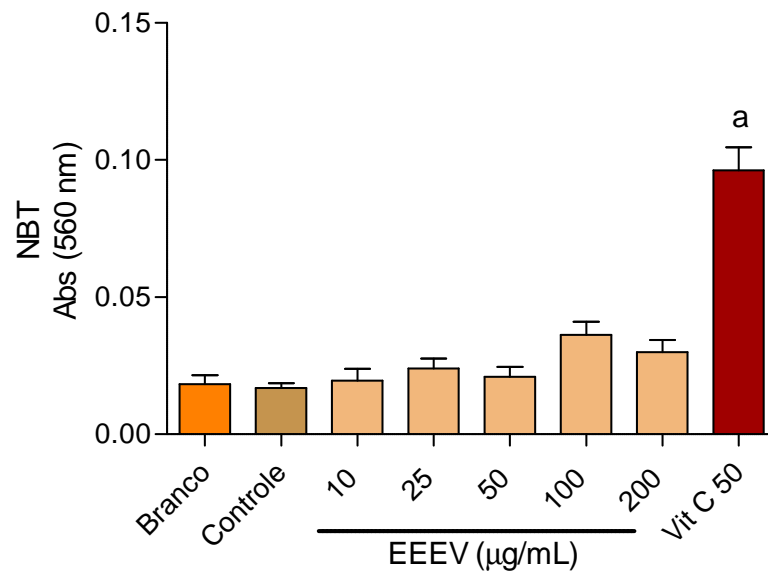


Vit E: vitamina E (50 $\mu\text{g/mL}$); Controle: veículo (etanol). Valores representam a média \pm EPM. a vs controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey, *post hoc*).

- Determinação da atividade da Superóxido Dismutase

Na **Figura 23**, pode ser observado que EEEV nas concentrações de 10; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou atividade antioxidante; não houve alteração significativo das absorvâncias ($0,0195 \pm 0,0044$; $0,0239 \pm 0,0037$; $0,0210 \pm 0,0035$; $0,0362 \pm 0,0048$; $0,0290 \pm 0,0045$) quando comparada ao controle ($0,0182 \pm 0,0032$). A vitamina C (50 $\mu\text{g/mL}$), droga antioxidante, mostrou um significativo aumento da absorvância ($0,0963 \pm 0,0084$). Esse aumento de absorvância se relaciona ao aumento da atividade da SOD, que dismuta o ânion superóxido a peróxido de hidrogênio, com consequente diminuição da redução do NBT. Os resultados indicam que o EEEV não possui atividade antioxidante atuando por esta via.

Figura 23. Avaliação da atividade da superóxido dismutase no efeito antioxidante do extrato etanólico de *Erythrina velutina* (EEEV).



Vitamina C. Vit C: vitamina C (50 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados apresentam a diferença entre as absorvâncias do grupo iluminado e não iluminado. Valores representam a média \pm E.P.M. a vs controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey, *post hoc*).

Tabela 17. Resumo dos resultados obtidos na avaliação pré-clínica do extrato etanólico de *Erythrina velutina*.

Tipo celular	Teste realizado	Concentrações avaliadas ($\mu\text{g/mL}$)	Resultados obtidos
Neutrófilo humano	LDH	0,1; 1; 10; 100; 200	100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ aumentaram a atividade da LDH - citotóxico
Neutrófilo humano	MTT	0,1; 1; 10; 100; 200	Não houve interferência na viabilidade celular
9L/lacZ	MTT	10; 100; 400; 1000	100; 400; 1000 $\mu\text{g/mL}$ reduziram a viabilidade celular
SH-S5SY	MTT	0,0025; 0,025; 0,25; 0,5; 1	Não houve interferência na viabilidade celular
SH-S5SY	MTT + (6-OHDA)	0,0025; 0,025; 0,25; 0,5; 1	1 $\mu\text{g/mL}$ reverteu parcialmente a citotoxicidade induzida pela 6-OHDA
SH-S5SY	Nitrito/nitrato	0,0025; 0,025; 0,25; 0,5; 1	0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$ aumentaram os níveis de nitrito/nitrato
SH-S5SY	Nitrito/nitrato + (6-OHDA)	0,0025; 0,025; 0,25; 0,5; 1	Todas as concentrações promoveram redução significativa nos níveis de nitrito/nitrato
-	DPPH	10; 25; 50; 100; 200	Todas as concentrações apresentaram atividade antioxidante
-	NBT	10; 25; 50; 100; 200	Ausência de atividade antioxidante

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram investigados métodos relacionados ao controle de qualidade e produção da droga vegetal e extrato de *E. velutina*, além da realização de ensaios toxicológicos e farmacológicos *in vitro* do extrato etanólico padronizado da planta, visando avaliar seu potencial antioxidante e neuroprotetor.

A qualidade de um produto final pode ser assegurada, em grande parte, a partir do estabelecimento de parâmetros para a matéria-prima e de um planejamento adequado de controle em processo durante a fabricação do medicamento. Assim, a busca pela qualidade de um medicamento fitoterápico inicia-se principalmente com a determinação de especificações de qualidade da matéria-prima ativa e do produto acabado (SIMÕES *et al.*, 2003).

Droga vegetal corresponde à planta medicinal, ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada (BRASIL, 2010b). Sua identificação e caracterização, bem como a avaliação de seus princípios ativos, são tarefas indispensáveis àqueles que buscam obter produtos de boa qualidade (ZARONI *et al.*, 2004). E para a garantia desta, devem ser considerados diversos parâmetros como os aspectos físico-químicos e microbiológicos (MIGLIATO *et al.*, 2007). Com a avaliação da qualidade da droga vegetal, objetiva-se a garantia da autenticidade do material, pureza e a caracterização dos constituintes químicos da espécie, além da determinação do teor dos marcadores químicos (SIMÕES *et al.*, 2003).

O gênero *Erythrina* é conhecido pela bioprodução significativa de alcalóides, sendo que estudos mais recentes revelaram também a presença de compostos fenólicos, incluindo flavanóides como flavononas, isoflavonóides e pterocarpanos (DA-CUNHA *et al.*, 1996; RABELO *et al.*, 2001; VIRTUOSO, 2005; CABRAL, 2009). Considerando o potencial farmacológico destes fenólicos, os quais possuem inúmeras atividades descritas, sendo as principais a antioxidante e anti-inflamatória (ORTEGA *et al.*, 2008), prosseguiram-se os estudos de *E. velutina* com a investigação do teor de fenóis totais na planta. Para tanto, foram realizados estudos para validar um método espectrofotométrico (Folin-Ciocalteu) capaz de quantificar os estes compostos presentes na casca do caule de *E. velutina*.

O desenvolvimento, a adaptação ou implementação de um de um método analítico envolve um processo de avaliação denominado validação, que estima sua eficiência na rotina do laboratório (BRITO *et al.*, 2003). A validação confere ao processo maior confiabilidade e aceitação dos resultados, sendo realizada com a finalidade de assegurar que a metodologia analítica seja específica, reprodutível, exata e robusta em um intervalo especificado no qual o analito será analisado (SHABIR, 2003).

A espectroscopia UV-visível do espectro eletromagnético é uma técnica simples, rápida e de baixo custo se comparada a outras como CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) ou LC/MS (Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa). É um dos métodos analíticos mais empregados em função de sua robustez e grande aplicabilidade (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

Existem variados métodos espectrofotométricos para quantificação de compostos fenólicos, baseados em diferentes princípios, usados para quantificar fenólicos totais ou uma classe dessas substâncias. Entretanto, um dos processos mais amplamente empregados é o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu, formado pelos ácidos fosfotúngstico e o fosfomolibdídico. Na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, ambos os ácidos sofrem redução, produzindo os chamados tungstênio azul e molibdênio azul, complexo que absorve entre 620 e 740 nm, permitindo uma mensuração dessas substâncias redutoras por meio da alteração da coloração. Para que os ânions molibdo e tungstofosfato possam promover a oxidação, é necessário que ambos estejam na forma de fenolato, obtido através da alcalinização do meio com solução saturada de carbonato de sódio, a base mais indicada. Quanto maior a quantidade de hidroxilas ou grupos potencialmente oxidáveis, maior será a intensidade da reação (ANGELO; JORGE, 2007; SOUSA *et al.*, 2007).

O método para quantificação de compostos fenólicos em soluções extrativas da casca do caule de *E. velutina* enquadra-se na categoria I, conforme descrito na RE 899/03 (BRASIL, 2003). Os testes para essa categoria objetivam a determinação de princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas. Dessa forma, no presente estudo, o método espectrofotométrico para a determinação de fenóis totais no extrato de *E. velutina* foi validado pela avaliação dos parâmetros especificidade, linearidade e intervalo, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

A especificidade de um método instrumental refere-se à sua capacidade em medir o analito de interesse com exatidão mesmo na presença dos demais componentes da amostra (matriz) (BRASIL, 2003; BERTOL, 2010). Os espectros de absorção (200 - 800 nm) obtidos para o extrato de *E. velutina* (154,0 µg EAG /mg extrato) e para o ácido gálico (154,0 µg/mL; padrão de trabalho) mostraram ser possível quantificar fenóis na matriz (extrato), mesmo na presença de outros constituintes da planta.

A linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). Se há uma relação linear, a curva analítica deverá ser investigada por métodos estatísticos apropriados, como o cálculo da regressão linear cujo coeficiente de correlação linear (r) é frequentemente usado para indicar a confiabilidade da reta como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é usualmente requerido. Quanto mais se aproximar de 1, menor será a dispersão dos pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004; PIANTAVINI, 2010).

No universo do controle de qualidade de medicamentos, certamente a melhor forma para se realizar a avaliação da linearidade de um método é através da análise da amostra no seu ambiente químico. Em produtos de origem vegetal, os diferentes componentes da matriz podem causar interferências que não são detectadas quando a avaliação se faz com o padrão analítico (BERTOL, 2010). Dessa forma, no presente estudo, a linearidade do método para dosagens de fenóis totais foi investigada pelo emprego de concentrações crescentes tanto do padrão de trabalho, ácido gálico (4–16 µg/mL), quanto da matriz, extrato etanólico de *E. velutina* com adição de padrão (123,20 – 200,20 µg EAG /mg de extrato). A escolha da faixa de 80 a 130% da concentração de trabalho visou abranger amplamente uma possível variabilidade do teor de compostos fenólicos no extrato. Os valores dos coeficientes de correlação encontrados foram de 0,9985 e 0,9928, padrão e matriz adicionada de padrão, respectivamente, atendendo, portanto, as recomendações da RE 899/03 (BRASIL, 2003).

A precisão de um procedimento analítico expressa a proximidade de concordância (grau de dispersão) entre a série de leituras obtidas de múltiplas réplicas da mesma amostra homogênea sob condições prescritas (INMETRO, 2007). O método demonstrou ser preciso tanto na avaliação da repetibilidade, DPR de 0,63%, quanto na precisão intermediária, DPR

variando entre 0,89 e 1,80%, ambas menor que 5% e atendendo portanto ao critério mínimo aceitável pela ANVISA (BRASIL, 2003).

A exatidão descreve a relação entre o valor encontrado pelo método e o valor aceito como verdadeiro ou de referência. A indisponibilidade de obtenção da matriz sem os analitos de interesse, compostos fenólicos, levou à necessidade de executar o teste de exatidão pelo procedimento da adição de padrão à amostra. Os resultados obtidos provaram que o método analítico é preciso e exato, uma vez que o percentual de recuperação obtido manteve-se entre 96,60 e 103,09%, superior aos 95 % exigidos pela legislação vigente e apresentando DPR menor que 5% (BRASIL, 2003).

A robustez avalia a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiabilidade durante seu uso na rotina normal. Deve ser testada geralmente durante o desenvolvimento do método e quando constatada sua susceptibilidade a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções deverão ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003). As mudanças devem refletir as alterações que possam ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (RIBANI *et al.*, 2004). No presente estudo, o método apresentou-se robusto quanto aos parâmetros avaliados: marca do solvente utilizado no preparo das soluções amostras e comprimento de onda de leitura (nm).

Dentre as etapas necessárias para propiciar ou manter a qualidade de matérias-primas oriundas de material vegetal, a secagem é um dos processos mais comumente realizado, pois além de diminuir o teor de água, facilita sua conservação, uma vez que a presença excessiva de umidade em drogas vegetais permite a ação de enzimas que podem promover a degradação de constituintes químicos e também favorecer ao desenvolvimento de insetos e microrganismos como bactérias e fungos (CARDOSO, 2009; FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2010).

O teor de umidade das cascas do caule de *E. velutina*, determinado durante a secagem em estufa sem ou com circulação e renovação de ar, por diferentes períodos (24, 48, 72, 96 e 120h), manteve-se dentro ou abaixo do limite recomendado pela Farmacopeia Brasileira IV (2010), que é de 8 a 14%. Desta forma, os resultados obtidos mostram que as duas condições de secagem podem ser empregadas satisfatoriamente na preparação da droga

vegetal no período de 24h. Entretanto, a escolha pela secagem em estufa com circulação e renovação de ar deu-se devido a inconvenientes observados durante o estudo. As análises realizadas para a quantificação de compostos fenólicos totais em soluções extrativas preparadas a partir das amostras coletadas nos diferentes intervalos de secagem, em ambos os métodos, tiveram por objetivo avaliar a melhor condição a ser empregada, visando à padronização desse processo.

Após secagem, a moagem possibilitou reduzir mecanicamente o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões. Para determinação do tamanho das partículas do pó das cascas do caule de *E. velutina*, realizou-se sua análise granulométrica. A granulometria da droga vegetal constitui um parâmetro imprescindível a ser estabelecido, considerando sua influência direta no processo extrativo. Quando se possui um grande diâmetro médio de partículas, maiores que 800 μm , a extração pode ser prejudicada por não permitir a completa penetração do líquido extrator no interior das células. Por outro lado, quando apresenta um diâmetro médio inferior a 200 μm , também pode interferir negativamente por ocasionar compactação do pó, dificultando a passagem do solvente no caso da percolação ou mesmo a passagem de partículas mais finas para o extrato, conferindo-lhe uma aparência turva (ALBERTON *et al.*, 2001).

A análise estatística dos resultados obtidos na avaliação granulométrica do pó das cascas do caule de *E. velutina* demonstrou que 42% da droga vegetal ficou retida no tamis com abertura de malha de 355 μm , detectando-se um diâmetro médio de partículas de 296 μm , caracterizando-se este pó como sendo moderadamente grosso (WHO, 1998). A utilização dessa classificação de pó é recomendada para a grande maioria das drogas vegetais com perspectivas ao emprego na produção de fitoterápicos (SHARAPIN *et al.*, 2000). A densidade aparente não compactada do pó da casca do caule de *E. velutina* também foi avaliada, apresentando um valor de 0,263 g/mL.

A determinação das cinzas totais estabelece a quantidade de impurezas inorgânicas não-voláteis, subdividindo-se em cinzas fisiológicas, que derivam dos tecidos da planta, e as não fisiológicas, compostas por partículas estranhas aderidas ao material, como areia. O conhecimento do teor de cinzas insolúveis em ácido proporciona um indicativo de sílica e constituintes silicosos presentes na droga vegetal (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 1988; WHO, 1998). No presente estudo, os teores de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido

foram de 7,54% e 0,22%, respectivamente. Como não foram encontrados na literatura outros dados que pudessem ser confrontados com valores encontrados, não é possível inferir se estes são alto, médio ou baixo. Assim, os resultados obtidos fornecem um indicativo da possível composição não orgânica do material vegetal.

A determinação do teor de extrativos é importante para avaliar a capacidade que determinado solvente possui em extrair compostos ativos presentes no material vegetal (ALBERTON *et al.*, 2001). No entanto, é importante levar em consideração a substância que se deseja extrair. Em relação a *E. velutina*, observou-se que o teor de extrativos em etanol (33,42%) foi cerca de três vezes superior ao do teor de extrativos em água (10,69%). Para substâncias com alta polaridade, como compostos fenólicos, o etanol pode ser facilmente empregado como solvente extrator, já os flavonóides são eficientemente extraídos com uma mistura etanol/água (SIMÕES *et al.*, 2003; HUBINGER *et al.*, 2009).

Além dos aspectos físico-químicos, o controle microbiológico é indispensável para garantir a qualidade do material botânico, considerando-se que a contaminação pode ser intensificada com o tempo e não somente comprometer o material em si, mas também o usuário (SIMÕES *et al.*, 2003). As análises visam assegurar o consumo de produtos com boa qualidade com um limite aceitável de microrganismos e a isenção dos patogênicos ou potencialmente prejudiciais (MIGLIATO, 2007).

O controle microbiológico realizado a partir das cascas do caule de *E. velutina* permitiu observar que não houve crescimento de *Escherichia coli* nem de *Salmonella* sp., ambas consideradas bactérias patogênicas. Na contagem do número total de bactérias, houve crescimento de $2,25 \times 10^3$ UFC/g e para fungos, ocorreu o crescimento de $1,75 \times 10^3$ UFC/g. O resultado da contagem bacteriana permanece dentro dos limites indicados para processos extrativos tanto a quente quanto a frio. Contudo, o número total de fungos e leveduras encontra-se um pouco acima do limite estipulado, se considerarmos que a droga vegetal possa ser submetida a processo extrativo a frio. A grande quantidade de microrganismos na amostra analisada pode ser pertencente a sua microflora natural ou mesmo ter sido introduzida durante sua manipulação (FARMACOPEIA BRASILEIRA V, 2010).

Dentre as matérias-primas empregadas na produção de medicamentos, os extratos vegetais constituem uma das fontes mais ricas, seja para obtenção de fármacos, pró-fármacos

ou fitoterápicos constituídos de fitocomplexos. Os extratos vegetais são preparações farmacêuticas obtidas a partir de matérias-primas vegetais, onde podem ser empregados diversos métodos, incluindo variações na natureza do solvente e na sua proporção em relação à droga vegetal (SIMÕES *et al.*, 2003; FONSECA, 2008). Em linhas gerais, objetiva-se no desenvolvimento de um método extrativo obter-se um produto com padrão de qualidade satisfatório com o menor tempo e custo possível. Nesse sentido, vários estudos têm sido realizados em nosso laboratório (ARARUNA, 2008; FONSECA, 2009), resultando na otimização do processo de produção de extratos de *Amburana cearensis* (cumaru) e *Justicia pectoralis* (chambá).

Na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade dos meios e o custo do processo, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar. Como a composição química das plantas é extremamente complexa, frequentemente ocorre extração concomitante de vários compostos, farmacologicamente ativos ou não. Por isso, deve-se primeiramente definir, com a maior precisão possível, o que se deseja obter. De acordo com essa definição e levando-se em consideração os fatores envolvidos no processo extrativo, pode-se escolher o método e o solvente que serão empregados (COSTA, 1994; SIMÕES *et al.*, 2003).

Os compostos fenólicos de origem vegetal têm sido alvo de inúmeras pesquisas principalmente em função do seu potencial farmacológico que envolve diversas atividades, como anticancerígena, anti-mutagênica, anti-aterogênicas, antioxidante e anti-inflamatória (VINUESA; FARIA; CÉSAR, 2008).

Uma vez que os compostos fenólicos podem ser obtidos a partir de um extrato etanólico do material fresco ou seco, na produção do extrato vegetal envolvido no presente estudo, foi empregado como solvente extrator o etanol (VIRTUOSO, 2005; CABRAL, 2009). Dentre os métodos extrativos (percolação, maceração, soxhlet) investigados para a produção do extrato etanólico de *E. velutina*, a percolação foi escolhida ao se considerar o teor de fenóis totais, rendimento e menor custo em relação aos demais métodos (SIMÕES *et al.*, 2003). Os teores de fenóis totais obtidos pelo emprego dos três métodos na preparação do EEEV não diferiram significativamente, contudo, em relação ao rendimento, foi observada a seguinte ordem: soxhlet > percolação > maceração. Assim, a seleção do método extrativo percolação deu-se considerando, especialmente, que o soxhlet requer um maior investimento

em infra-estrutura e material de custeio em relação à percolação. Além disso, esse método envolve o emprego de temperatura elevada, que pode favorecer o processo extrativo, mas também causar degradação de metabólitos secundários.

O controle de qualidade é considerado uma das etapas mais importante no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. Dentre as ferramentas empregadas para caracterizar esses produtos, pode ser relacionada a prospecção fitoquímica, teor de marcador(es) e o *fingerprint* ou perfil cromatográfico (BRASIL, 2010b). Esse último foi introduzido pela OMS e vem sendo cada vez mais aceito como ferramenta para avaliação e controle de qualidade de materiais à base de plantas e de seus produtos acabados, permitindo inclusive a distinção entre espécies. Dentre os métodos cromatográficos mais utilizados com essa finalidade, destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ZHAO *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2007).

Em um sistema CLAE, a detecção de substâncias pode dar-se pela medida de absorção por ultravioleta com emprego, por exemplo, um detector de arranjo de fotodiodo. Uma apropriada seleção do comprimento de onda (no máximo de absorção) pode possibilitar que moléculas de interesse possam ser detectadas com maior sensibilidade, particularmente quando diferentes grupos polifenólicos estão presentes em uma mesma amostra (PEREIRA, 2010). A verificação do tempo de retenção e a co-injeção de padrões externos na amostra são úteis nesse processo.

Um dos métodos empregados na análise de ácidos fenólicos e flavonóides envolve o emprego de CLAE utilizando coluna de fase reversa C18 ou C8. A eluição com gradiente é normalmente usada em virtude da complexidade das amostras. Numerosas fases móveis têm sido empregadas, mas um sistema binário compreendendo um componente aquoso e um solvente orgânico menos polar (acetonitrila ou metanol) tem sido o mais comum. A adição de ácido (fórmico, acético ou fosfórico) à fase aquosa ou o uso de tampões tem sido utilizado para manter o pH apropriado durante a execução do gradiente (SOCHA *et al.*, 2009; TSIAPARA *et al.*, 2009). No presente estudo, foi determinado de maneira inédita o perfil cromatográfico do EEEV com a identificação de quatro derivados flavônicos, hesperidina, homoesperidina, abissinina e sigmoidina C, e um ácido fenólico, o ácido rizônico, identificados pela primeira vez na planta, excetuando-se a homoesperidina.

Vários estudos (ROSE LISIEUX; JÁCOMO; OLIVEIRA, 2004; ZHAO *et al.*, 2005; CARDOSO; HONDA; DIAS, 2006; LIU *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2010; BAKRI *et al.*, 2011) têm utilizado a determinação do *fingerprint* como ferramenta útil na padronização de extratos vegetais e/ou produtos acabados, incluindo espécies como *Aspidosperma parvifolium*, *Psoralea corylifolia*, espécies de *Polygonum*, *Salvia miltiorrhiza*, *Rosae Rugosae*, *Ginkgo biloba*.

A identificação no EEEV de um ácido fenólico e de flavonóides corrobora com dados da literatura (DA-CUNHA *et al.*, 1996; RABELO *et al.*, 2001; VIRTUOSO, 2005; CABRAL, 2009), que relata a presença de uma grande variedade desses compostos na espécie. A homoesperidina, uma flavanona, já foi anteriormente isolada por Rabelo *et al.* (2001) e as demais foram encontradas pela primeira vez na espécie. A semelhança da 4'-*O*-metilsigmoidina B, identificada por Cabral (2009), a sigmoidina C também é uma flavanona prenilada. Ambas substâncias foram obtidas por meio do extrato etanólico a partir das cascas do caule de *E. velutina*. A hesperidina, também uma flavanona, é amplamente difundida em frutas cítricas (NOGATA *et al.*, 2006), sendo bastante investigada.

Estudos anteriores (RIBEIRO *et al.*, 2006; VINCETINO; MENEZES, 2007; RAUPP *et al.*, 2008), incluindo nosso grupo de pesquisa (VASCONCELOS *et al.*, 2003, 2004, 2007, 2011), determinaram várias atividades farmacológicas, como ansiolítica, sedativa, anticonvulsivante, analgésica, anti-inflamatória e antioxidante, para extratos da casca do caule de *E. velutina*. Contudo, considerando a inexistência de dados farmacológicos acerca do EEEV, cujo processo de produção e controle não foram empregados anteriormente, é necessário a realização de estudos biológicos no intuito de determinar de maneira preliminar sua segurança e eficácia *in vitro*.

Nesse sentido, foram investigados os possíveis efeitos tóxicos do EEEV em cultura de células, neutrófilo humano, células gliais e SH-5Y5Y, bem como a atividade antioxidante, incluindo modelo experimental da doença de Parkinson *in vitro*. Isso, considerando os efeitos no sistema nervoso central (SNC) de extratos de *E. velutina* determinados anteriormente (DANTAS *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2004, 2007; VINCETINO; MENEZES, 2007; RAUPP *et al.*, 2008; CHOI, 2008; HWANG; YEN, 2008).

A avaliação da citotoxicidade do EEEV foi realizada inicialmente em neutrófilos humanos e em células gliais através da determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH) e/ou do teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio), que atuam como indicativo dos possíveis efeitos tóxicos de uma droga teste sobre a membrana plasmática e metabolismo celular, respectivamente.

A LDH é uma enzima da classe das oxirredutases. Cataliza a redução reversível do piruvato a lactato na presença da coenzima NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo), que atua como doador e receptor de hidrogênio. Está presente em todas as células do organismo, sendo mais abundante no músculo esquelético, miocárdio, fígado, eritócitos, rins, ossos e pulmões. Em ensaios biológicos, auxilia na pesquisa de viabilidade celular, pois como faz parte da membrana celular, de organelas e dos conteúdos citosólicos, sua detecção no fluido extracelular é indicativo de morte ou perda da integridade celular (SOARES *et al.*, 2002; MACHADO, 2010). EEEV nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ aumentou significativamente a atividade da LDH em neutrófilos humanos, quando comparado ao grupo controle, sugerindo, portanto, uma relativa citotoxicidade do produto por alteração na permeabilidade da membrana plasmática.

O teste do MTT é um método de avaliação da citotoxicidade rápido, sensível e barato. Consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal de MTT, de cor amarela, para o sal de formazan, de cor púrpura, que só ocorre em células metabolicamente ativas e que estejam viáveis, através da ação da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias, assim permitindo a quantificação indireta do percentual de células vivas (MOSMANN, 1983). No presente estudo, as concentrações de EEEV investigadas (0,1; 1; 10; 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) não interferiram na viabilidade celular de neutrófilos humanos quando comparado ao grupo controle, sugerindo uma ausência de citotoxicidade sobre o metabolismo celular, particularmente relacionado à atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Entretanto, quando se procedeu a avaliação da citotoxicidade sobre células da linhagem 9L/lacZ (células gliais), foi observada uma redução significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao grupo controle.

O teste do DPPH $^{\bullet}$ (radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazila) é baseado na redução, por ação de um antioxidante ou de uma espécie radicalar, de soluções alcoólicas desse radical, que possui coloração púrpura, transformando-se no composto difenil-picril-hidrazina, de

coloração amarela, causando uma diminuição dos valores de absorvância. EEEV apresentou atividade antioxidante significativa, corroborando com os resultados obtidos por Vicentino e Menezes (2007). Baseado no mecanismo de redução da molécula de DPPH e no conhecimento prévio da constituição química de *E. velutina*, possivelmente, parte da ação antioxidante observada pode estar relacionada à presença de substâncias com grupamentos hidroxila disponíveis na planta (MENSOR *et al.*, 2001). Além disso, a hesperidina, uma isoflavanona identificada no EEEV, é bastante conhecida por apresentar atividade sequestradora de radicais livres (CHOI, 2008a, 2008b; HWANG; YEN, 2008).

A avaliação da atividade da SOD baseou-se em metodologia que promove a redução fotoquímica da riboflavina para geração de $O_2^{\bullet-}$ (radical superóxido), que por sua vez reduz o NBT (azul de nitro tetrazólio). Na presença da SOD, esta redução é inibida (OSSWALD *et al.*, 1992). EEEV não apresentou atividade antioxidante por essa via, ao contrário da vitamina C (ácido ascórbico - droga padrão), que mostrou uma atividade antioxidante que pode estar possivelmente relacionada a sua habilidade de remover $O_2^{\bullet-}$, além de outros oxidantes como OH^{\bullet} (radical hidroxila), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e 1O_2 (oxigênio singlete) (MUGGLI, 1993). Assim, os resultados obtidos mostraram que o EEEV tem potencial sequestrador de radicais livres, mas não parece estar relacionada à remoção do radical superóxido.

O dano celular originado por EROs e ERNs (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, respectivamente) tem sido relacionado à patologia de várias desordens do SNC, como doença de Parkinson e Alzheimer, acidentes vasculares cerebrais, demência, choque, edema cerebral, entre outros (RESNICK; PARKER, 1993; GILGUN-SHERKI *et al.*, 2001). As EROs e ERNs são produzidas normalmente nos seres vivos como consequência de diversos processos metabólicos que envolvem reações de transferência de elétrons (BARREIROS *et al.*, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 2007). Quando a produção de espécies reativas é maior que a capacidade de degradação destas pelas defesas antioxidantes, produz-se um desequilíbrio no organismo denominando de estresse oxidativo que pode lesionar diferentes tecidos, dependendo da extensão, duração e tipo de oxidante envolvido (SIES; STAHL; SEVANI; 2005). Na verdade, existe um balanço constante entre fatores pró e antioxidantes e o estresse oxidativo pode ocorrer tanto pela diminuição das defesas antioxidantes como pelo aumento dos fatores pró-oxidantes (KAUL *et al.*, 1993).

O cérebro é particularmente vulnerável a espécies oxidantes por apresentar uma elevada taxa de atividade metabólica oxidativa e elevado consumo de oxigênio em relação ao demais tecidos, além disso, apresenta um nível relativamente baixo de enzimas antioxidantes, níveis elevados de metais de transição e ainda é rico em ácidos graxos insaturados, propiciando a ocorrência de peroxidação lipídica (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; PEREIRA, 2009). Neurotoxinas são capazes de induzir a produção e liberação de óxido nítrico (NO), que pode ser indiretamente observado por medições das concentrações de nitrito. Na presença de radicais superóxido, o NO pode formar espécies altamente reativas, como o peroxinitrito, contribuindo ainda mais para os danos celulares (BLUM *et al.*, 2001).

O potencial antioxidante dos flavonóides deve-se à capacidade destes em quelar metais e sequestrar radicais livres, bem como de impedir a atuação das oxigenases, como a lipoxigenase, a cicloxigenase, a mieloperoxidase, a NADPH oxidase e a xantina oxidase. Outros mecanismos podem compreender a inibição de enzimas envolvidas diretamente em processos oxidativos e na estimulação de outras com propriedades antioxidantes, destacando-se a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (TRUEBA; SÁNCHEZ, 2001).

Na doença de Parkinson (DP), admite-se como marco central a formação de oxidantes, que são capazes de instalar o estresse oxidativo e, conseqüentemente, causar danos à substância negra. O esclarecimento parcial do processo de morte celular é comumente estudado em protocolos experimentais que utilizam neurotoxinas, como a 6-OHDA (NOBRE-JÚNIOR *et al.*, 2003), derivado hidroxilado da dopamina, que é formado de maneira endógena em pacientes com DP (ANDREW *et al.*, 1993). Essa neurotoxina, *in vitro*, é capaz de induzir estresse oxidativo (TIFANY-CASTIGLIONI *et al.*, 1982), apoptose de várias linhagens celulares (OH *et al.*, 1998), além de ser um potente ativador do fator nuclear-kappaB (NF-κB) (BLUM *et al.*, 2001). Atualmente, uma das linhagens celulares mais utilizadas para o estudo de eventos relacionados a DP é a SH-SY5Y, que apresenta características de neurônios dopaminérgicos.

No presente estudo, observou-se que tanto o EEEV quanto o ácido rizônico (AR), um ácido fenólico isolado da casca do caule de *E. velutina*, presente no extrato da planta, não foram citotóxicos para células SH-SY5Y, mensurado através do teste do MTT. Além disso, tanto EEEV quanto AR, preveniram parcialmente a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA em células SH-SY5Y, também mensurado pelo teste do MTT.

A produção endógena em níveis satisfatórios de NO pode ser benéfica para o organismo. No entanto, sua produção excessiva pode estar relacionada com a fisiopatologia de inúmeras doenças dos sistemas cardiovascular, imune e nervoso. Recentemente, tem-se relatado o envolvimento do sistema nitrérgico no controle do movimento e em alterações patológicas dos gânglios basais. Essas áreas do cérebro contêm uma alta expressão de óxido nítrico sintase. O nitrito é um produto do metabolismo oxidativo do NO, que pode ser mensurado por espectrofotometria com o emprego do reagente de Griess (RAMOS *et al.* 2006; PIERUCCI *et al.*, 2011). No presente estudo, partes das concentrações investigadas do EEEV e do AR reduziram significativamente o aumento dos níveis de nitrito/nitrato induzido por 6-OHDA em células SH-5YSY.

Estudos (LEAL *et al.*, 2005; KÄÄRIÄINEN *et al.*, 2008; GUITIERREZ-MERINO *et al.*, 2011) têm demonstrado o potencial de compostos fenólicos, incluindo flavonóides, como neuroprotetores. Choi e Ahn (2008) mostraram o potencial antioxidante da hesperetina, metabólito ativo da hesperidina, um flavonóide (flavanona) capaz de inibir a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, além de favorecer a ação antioxidante de sistemas enzimáticos (catalase, superóxido dismutase) e não enzimáticos (glutathione e glutathione oxidada). Outros compostos fenólicos, como o amburosídeo A, um glicosídeo isolado de *Amburana cearensis*, também apresentou atividade antioxidante, protegendo os neurônios contra a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA por redução da peroxidação lipídica e dos níveis de nitrito/nitrato (LEAL *et al.*, 2005).

Diante dos resultados obtidos, EEEV e/ou AR mostraram uma baixa citotoxicidade nas culturas de células investigadas (neutrófilos, glial e neuroblastoma humano). Em relação ao potencial farmacológico, EEEV e/ou AR mostraram um potencial neuroprotetor que está possivelmente relacionado à atividade antioxidante, contudo estudos adicionais são necessários. No futuro, a confirmação dessa neuroproteção poderá implicar no desenvolvimento, a partir de *E. velutina*, de um fitoterápico padronizado como uma opção terapêutica no tratamento de distúrbios neurodegenerativos, como a DP.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo farmacêutico e farmacológico de *E. velutina* permitiram as seguintes conclusões:

- O método analítico desenvolvido para a determinação quantitativa de fenóis totais em soluções extrativas obtidas a partir da casca do caule de *E. velutina*, por espectrofotometria, foi específico, linear, preciso, exato e robusto, podendo ser utilizado no controle de qualidade de produtos derivados da planta.
- A droga vegetal pode ser preparada adequadamente em estufa com circulação e renovação de ar por 24h a 80°C. Nessa condição, foram determinados parâmetros de qualidade da droga vegetal, como percentual de umidade, teor de cinzas (totais e insolúveis em ácido), teor de extrativos em água e etanol, teor de fenóis totais (marcador químico) e controle microbiológico.
- O método extrativo empregado para a produção do extrato etanólico de *E. velutina* (EEEV), a partir da droga vegetal (pó moderadamente grosso), foi a percolação. O EEEV foi caracterizado quanto ao teor de fenóis totais, por espectrofotometria e perfil cromatográfico por CLAE-DAD, este último resultando na identificação de cinco compostos fenólicos, sendo quatro derivados flavônicos, abssinina, hesperidina, homoesperidina e sigmoidina C e um ácido fenólico, o ácido rizônico.
- Na avaliação dos possíveis efeitos tóxicos de EEEV e/ou AR em células, como neutrófilo humano, linhagens SH-5YSY (neuroblastoma humano) e 9L/lacZ (glial), foi observada uma relativa citotoxicidade em neutrófilo (atividade LDH) e células gliais (teste do MTT) a partir da concentração de 100 µg/mL.
- EEEV mostrou atividade antioxidante, sequestradora de radicais livre, que parece não estar relacionada à remoção do ânion superóxido. Pelo menos parte da atividade neuroprotetora do EEEV sobre a neurotoxicidade induzida por 6-OHDA em células SH-5YSY parece está relacionada à presença de compostos fenólicos na planta, como o ácido rizônico.

Dessa forma, os dados obtidos no presente estudo estabeleceram métodos e especificações de interesse para a produção e controle de qualidade de um fitoterápico empregando como matéria-prima ativa o extrato etanólico de *E. velutina*, que mostrou potencial neuroprotetor *in vitro*. Contudo, estudos adicionais são ainda necessários.

REFERÊNCIAS

- ADLER, C. N. Nonmotor complications in Parkinson's Disease. **Movement Disorder**, v. 20, n. 11, supl., p. S23-S29, 2005.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 18, p. 472-508, 2008.
- AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.17, p.114-140, 2007.
- ALBERTON, J. R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L. V. S.; FRANCO, S. L.; LIMA, M. A. P. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Res. Bras. Farmacogn.**, v. 1, p. 37-50, 2001.
- ALLEN, L.V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- AMER, M. A., SHAMMA, M., FREYER, A. J. The tetracyclic *Erythrina* alkaloids. **J. Nat. Prod.**, v. 54, n. 2, p. 329-363, 1991.
- ANDRADE, L. A. F.; AZEVEDO-SILVA, S. M. O que é que causa a doença de Parkinson? In: TEIVE, H.A.G. **Doença de Parkinson: um guia prático para pacientes e familiares**. São Paulo: Lemos, 2000. p. 35-38.
- ANDREW, R.; WATSON, D. G.; BEST, S. A.; MIDGEY, H.; WENLONG, H.; PETTY, R. K.H. The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of Parkinsonian patients and normal controls. **Neurochem. Res.**, v. 18, p. 1175-1177, 1993.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breva revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
- ARARUNA, S. M. **Desenvolvimento e padronização do extrato seco por spray dryer de *Amburana cearensis* A. C. Smith (cumarú)**. 2008. 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DO SETOR FITOTERÁPICO - ABIFISA. **Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde**. Disponível em: <<http://abifisa.org.br/faq.asp#29>>. Acesso em: 21 jul. 2011.
- BAKRI, M.; CHEN, J.; ZHONG, J. AISA, H. A. Fingerprints of *Rosae Rugosae* Flos by HPLC. **Zhong Yao Cai.**, v. 34, n. 7, p. 1043-1046, 2011.
- BARBOSA, M. T.; CARAMELLI, P.; MAIA, D. P.; CUNNINGHAM, M. C. Q; GUERRA, H. L.; LIMA-COSTA, M. F.; CARDOSO, F. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil: (the Bambuí study). **Mov. Disord.**, v. 21, n. 6, p. 800-808, 2006.

BARREIRO, E.; GEA, J.; COROMINAS, J. M.; HUSSAIN, S. N. Nitric oxide synthases and protein oxidation in the quadriceps femoris of COPD patients. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 29, p. 771-778, 2003.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BATASSINI, C. **Avaliação do potencial terapêutico da guanosina em um modelo animal da doença de Parkinson induzido por 6-OHDA**. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BERTOL, G. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade de matérias-primas e produto contendo *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. – Rubiaceae**. 2010. 141 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Insumos, Medicamentos e Correlatos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BLUM, D.; TORCH, S.; NISSOU, M. F.; VERNA, J. M. 6-hydroxydopamine-induced nuclear factor-kappaB activation in PC12 cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 62, p. 473-481, 2001.

BLUMENTHAL, M. Systematic reviews and meta-analyses support the efficacy of numerous popular herbs and phytomedicines. **Altern. Ther. Health Med.**, v. 15, n. 2, p. 14-15, 2009.

BONFIM, K. B. R. **Farmacologia de Planta Mediciniais Analgésicas de uso Popular da Caatinga**. 2001. 153 p. Dissertação (Mestrado - Núcleo de Pós Graduação em desenvolvimento e meio ambiente) - Universidade Federal de Sergipe, Aracajú, 2001.

BOVÉ, J.; PROU, D.; PERIER, C.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease. **NeuroRx**, v. 2, p. 484-494, 2005.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2006a.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº. 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Interministerial nº 2.960 de 9 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e Cria o Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2008a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 05 de 11 de dezembro de 2008. Determina a publicação da lista de medicamentos

fitoterápicos de registro simplificado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2008b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 886, de 20 de abril de 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 14 de 31 de março de 2010. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 05 de 31 de março de 2010. Estabelece a lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010c.

BRITO, N. M.; AMARANTE JÚNIOR, O. P. de; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Rev. Ecotoxicol. Meio Ambiente**, v. 13, n., p.129-146, 2003.

CABRAL, A. G. F. **Constituintes químicos de *Erythrina velutina* Will (Fabaceae)**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALOU, I. B. *et al.* Topically applied diterpenoids from *Egletes viscosa* (Asteraceae) attenuate the dermal inflammation in mouse ear induced by tetradecanoylphorbol 13-acetate and oxazolone. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 8, p. 1511-1516, 2008.

CARDOSO, C. A. L.; HONDA, N. K.; DIAS, E. S. Avaliação do perfil cromatográfico em espécies de *Polygonum* e amostras comercializadas como “erva-de-bicho”. **Braz. J. Pharm.**, v. 16, n. 2, p. 236-245, 2006.

CARDOSO, C. M. Z. **Manual de controle de qualidade de matérias-primas vegetais para farmácia magistral**. 1. ed. [S.l.]: Pharmabooks, 2009.

CARVALHO, A. C. C. S.; ALMEIDA, D. S.; MELO, M. G. D.; CAVALCANTI, S. C. H.; MARÇAL, R. M. Evidence of the mechanism of action of *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae) leaves aqueous extract. **J. Ethnopharmacol.**, v. 122, n. 2, p. 374-378, 2009.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CHEUNG, Y. T.; LAU, W. K. W.; YU, M. S.; LAI, C. S. W.; YEUNG, SC.; SO, K. F.; CHANG, R. C. C. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as *in vitro* model in neurotoxicity research. **NeuroToxicology**, v. 30, p. 127-135, 2009.

CHOI, E. J. Antioxidative effects of hesperetin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced oxidative stress in mice. **Life Sci.**, v. 82, p. 1059–1064, 2008a.

CHOI, E. J.; AHN, W. S. Neuroprotective effects of chronic hesperetin administration in mice. **Arch. Pharm. Res.**, v. 31, n. 11, p. 1457-1462, 2008b.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4. ed. Lisboa: Fund. Calouste Gulbenkian, v. II, 1994.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.**, v. 60, n. 1, p. 52-60, 1997.

CRAVEIRO, A. C. S.; CARVALHO, D. M. M.; NUNES, R. S.; FAKHOURI, R.; RODRIGUES, S. A.; TEXEIRA-SILVA, F. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentas. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, p. 739-743, 2008.

DA-CUNHA, E. V. L.; DIAS, C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GRAY, A. I. Eryvellutinone, an isoflavanone from the stem bark of *Erythrina velutina*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1371-1373, 1996.

DANTAS, M. C.; OLIVEIRA, F. S.; BANDEIRA, S. M.; BATISTA, J. S.; SILVA JR, C. D.; ALVES, P. B.; MARCHIORO, A. R. M. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 129-133, 2004.

DA ROCHA, G. M. A. **Fatores psicológicos e qualidade de vida de pessoas com doença de Parkinson**. Tese (Doutorado) - Pontifícia Universidade Católica, Campinas, 2007.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, 2003.

DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. **Nat. Neurosci.**, v. 5, p. 1058-1061, 2002.

DEL RIO, M. J.; VELEZ-PARDO, C. Monoamine neurotoxins-induced apoptosis in lymphocytes by a common oxidative stress mechanism: involvement of hydrogen peroxide (H₂O₂), caspase-3, and nuclear factor kappa-B (NF-kappaB), p53, c-Jun transcription factors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 63, n. 4, p. 677-688, 2002.

DI MONTE, D. A. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? **Lancet Neurol.**, v. 2, p. 531–538, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. *Erythrina velutina* – Mulungu; Circular técnica n° 160. Carvalho, P. E. Colombo, PR. 2008.

EPAMIG. O Gênero *Erythrina* L. no PAMG - Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Belo Horizonte. **Daphne**, v. 3, n. 1, p. 20-25, 1993.

ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 648-656, 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FARNSWORTH, N. R. Ethnopharmacology and future drug development: the North American experience. **J. Ethnopharmacol.**, v. 38, n. 2-3, p. 145-152, 1993.

FERRAZ, H. B. Tratamento da doença de Parkinson. **Rev. Neurociências**, v. 7, n. 1, p. 06-12, 1999.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 43, 2007.

FOLEY, P.; RIEDERER, P. Influence of neurotoxins and oxidative stress on the onset and progression of Parkinson's disease. **J. Neurol.**, v. 247, supl. 2, p. II/82-II/94, 2000.

FONSECA, F. N. **Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis* – chambá: obtenção do extrato seco padronizado (CLAE – DAD) e avaliação farmacológica.** 2009. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 8, p. 959-975, 2001.

BRUNTON, L. L.; PARKER, K. L.; BLUMENTHAL, D. K.; BUXTON, I. L. O. **Goodman & Gilman: manual de farmacologia e terapêutica.** Porto Alegre: AMGH, 2010.

GOULART, F.; dos SANTOS, C. C.; TEXEIRA-SALMELA, L. F.; CARDOSO, F. Análise do desempenho funcional em pacientes portadores de doença de Parkinson. **Acta Fisiátrica**, v. 11, n. 1, p. 12-16, 2004.

GREEN, L. C.; TANNENBAUN, S. R., GOLDMAN, P. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 78, p. 7764-7768, 1981.

GUITIERREZ-MERINO, C.; LOPEZ-SANCHEZ, C.; LAGOA, R.; SAMHAN-ARIAS, A. K.; BUENO, C.; GARCIA-MARTINEZ, V. Neuroprotective actions of flavonoids. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, n. 8, p. 1195-1212, 2011.

HALBACH, O.V.B.; SCHOBBER, A.; KRIEGLSTEIN, K. Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson's disease. **Progr. Neurobiol.**, v. 73, p. 151-177, 2004.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discov. Today**, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.

HUBINGER, S. Z.; SALGADO, H. R. N.; MOREIRA, R. R. D. Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 19, n. 3, p. 690-696, 2009.

HWANG, S. L.; YEN, G. C. Neuroprotective effects of the citrus flavanones against H₂O₂-induced cytotoxicity in PC12 cells. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 56, p. 859–864, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**: DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2010.

JENNER, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. **Ann. Neurol. Suppl.**, v. 53, p. 26-36, 2003.

KÄÄRIÄINEN, T. M.; PILTONEN, M.; OSSOLA, B.; KEKKI, H.; LEHTONEN, S.; NENONEM, T.; LECKLIN, A.; RAASMAJA, A.; MÄNNISTÖ. Lack of robust protective effect of quercetin in two types of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian models in rats and dopaminergic cells cultures. **Brain Res.**, v. 1203, p. 149-159, 2008.

KAUL, N.; SIVESKI-ILISKOVIC, N.; HILL, M.; SLEZAK, J.; SINGAL, P. K. Free radicals and the heart. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v. 30, n. 2, p. 55-67, 1993.

KIENZL, E.; PUCHINGER, L.; JELLINGER, K.; LINERT, W.; STACHELBERGER, H.; JAMESON, R. F. The role of the transition metals in the pathogenesis of Parkinson's disease. **J. Neurol. Sci.**, v. 134, Suppl., p. 69–78, 1995.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. Depressores do Sistema Nervoso Central. In: **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.1.20-1.25.

LEAL, L. K. A. M.; FERREIRA, A. A. G.; BEZERRA, G. A.; MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **J. Ethnopharmacol.**, v. 70, n. 2, p. 151-150, 2000.

LEAL, L. K. A. M.; NECHIO, M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; FONTENELE, J. B.; RIBEIRO, R.A.; VIANA, G. S. B. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A C Smith. **Phytother. Res.**, v. 17, n. 4, p. 335-440, 2003.

LEAL, L.K.A.M.; NOBRE-JÚNIOR, H.V.; CUNHA, G.M.A.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; OLIVEIRA, R.A.; SILVEIRA, E.R.; CANUTO, K.M.; VIANA, G.S.B. Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neurosci. Lett.**, v. 388, p. 86-90, 2005.

LINO, C. S.; TAVEIRA, M. L.; VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. **Phytother. Res.**, v. 11, p. 211-215, 1997.

LIU, A. H.; LIN, Y. H.; YANG, M.; GUO, H.; GUAN, S. H.; GUO, D. A. Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC-MSn. **J. Chromatography B**, v. 846, p. 32-41, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo. Editora Plantarum, 1992.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **J. Immunol.**, v. 132, p. 2015-2020, 1984.

MACHADO, D. I. **Avaliação do efeito de brometos de fenacila, norfloxacin e adultos destes sobre a proliferação de células mononucleares humanas *in vitro***. 2010. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2010.

MAKKAR, H. P. S. **Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual**. Vienna: FAO/IAEA Working Document. IAEA, 2000.

MARCHIORO, M.; BLANK, M. F. A.; MOURÃO, R. H. V.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive activity of the aqueous extract of *Erythrina velutina* leaves. **Fitoterapia**, v. 76, p. 637-642, 2005.

MARSDEN, C.D. Neuromelanin and Parkinson's disease. **J. Neural Transm.**, v. 19, Suppl., p. 121-141, 1983.

MARSDEN, C.D.; OBESO, J.A. The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease. **Brain**, v. 117, n. 4, p. 877-897, 1994.

MATOS, F. J. A. M. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MELO, L. M.; BARBOSA, E. R.; CARAMELLI, P. Declínio cognitivo e demência associados à doença de Parkinson: características clínicas e tratamento. **Rev. Psiq. Clín.**, v 34, n. 4, p. 176-183, 2007.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; dos SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother. Res.**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

METODIEWA, D.; KOSKA, C. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto(neuro)toxic events and neurologic disorders. An overview. **Neurotox. Res.**, v. 1, p. 197-233, 2000.

MIGLIATO, K. F.; MOREIRA, R. D.; MELLO, J. C. P.; SACRAMENTO, L. V. S.; SALGADO, H. R. N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.17, n.1, p.94-101, 2007.

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

MOORE, D. J.; WEST, A. B.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 28, p. 57-87, 2005.

MORAES, S. M. D.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; PINTO, V. P. T.; OLIVEIRA, J. T. A. Purification, physicochemical characterization and biological properties of a lectin from *Erythrina velutina* forma aurantiaca seeds. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, p. 977-985, 1996.

MORS, W. B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. [S.l.]: Inc. Algonac, 2000.

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

MUGGLI, R. Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In: CORONGIU *et al.* **Free radicals and antioxidants in nutrition**. London: Richelieu Press, 1993. p.189-250.

NKENGFAK, A. E.; VOUFFO, T. W.; MEYER, M.; BERGENDORFF, O.; STERNER, O. Prenylated isoflavanone from the roots of *Erythrina sigmoidea*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1047-1051, 1994.

NOBRE-JÚNIOR, H. V.; OLIVEIRA, R. A.; MAIA, F. D.; NOGUEIRA, M. A. S.; MORAES, M. O.; BANDEIRA, M. A. M.; ANDRADE, G. M.; VIANA, G. S. B. Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. **Neurochem. Res.**, v. 34, n. 6, p. 1066-1075, 2009.

NOBRE-JUNIOR, H.V.; CUNHA, G. A. M.; MAIA, F. D.; OLIVEIRA, R. A.; MORAES, M. O.; RAO, V. S. N. Catechin attenuates 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced cell death in primary cultures of mesencephalic cells. **Comp. Biochem. Physiol. Part C**, v. 136, p. 175-180, 2003.

NOGATA, Y.; SAKAMOTO, K.; SHIRATSUCHI, H.; ISHII, T.; YANO, M.; OHTA, H. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 70, p. 178-192, 2006.

OH, J. H.; CHOI, W. S.; KIM, J. E.; SEO, J. W.; O'MALLEY, K.; OH, Y. J. Overexpression of HA-Bax but not Bel-2 attenuates 6-hydroxydopamine-induced neuronal apoptosis. **Exp. Neurol.**, v. 154, p. 193-198, 1998.

OLIVEIRA, B.; MATOS, F. S.; SANTANA, W.; COELHO, G. G.; SCHER, R.; SILVA, F. T.; NUNES, R. S.; PANTALEÃO, S. M. Efeito genotóxico de *Erythrina velutina* em células

hematopoiéticas de ratos Wistar. In: 55º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 55., 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** São Paulo, 2009. p. 73.

ORTEGA, N.; ROMERO, M. P.; MACIÀ, A.; REGUANT, J.; ANGLÈS, N.; MORELLÓ, J. R.; MOTILVA, M. J. Obtention and Characterization of Phenolic Extracts from Different Cocoa Sources. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 9621–9627, 2008.

OSSWALD, W. F.; KRAUS, R.; HIPELLI, S.; BENS, B.; VOLPERT, R.; ELSTNER, E. F. Comparison of the enzymatic activities of dehydroascorbic acid reductase, glutathione reductase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damage spruce needles (*Picea abies* (L.) Karst). **Plant Physiol.**, v. 139, 742-748, 1992.

OZAWA, M.; HONDA, K.; NAKAI, I.; KISHIDA, A.; OHSAKI, A. Hypaphorine, an indole alkaloid from *Erythrina velutina*, induced sleep on normal mice. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 18, p. 3992-3994, 2008.

OZAWA, M.; ETOH, T.; HAYASHI, M.; KOMIYAMA, K.; KISHIDA, A.; OHSAKI, A. TRAIL-enhancing activity of *Erythrinan* alkaloids from *Erythrina velutina*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 19, p. 234-236, 2009.

OZAWA, M.; KISHIDA, A.; OHSAKI, A. *Erythrinan* Alkaloids from Seeds of *Erythrina velutina*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 59, n. 5, p. 564-567, 2011.

PAHWA, R. Understanding Parkinson's disease: an update on current diagnostic and treatment strategies. **J. Am. Med. Dir. Assoc.**, v. 7, Suppl. 2, p. 4-10, 2006.

PANDEY, R. C. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources. **Med. Res. Rev.**, v. 18, n. 5, p. 333-346, 1998.

PEREIRA, M. A. **Perfil cromatográfico das substâncias fenólicas presentes em extratos de mel de assa peixe e avaliação de seu poder antioxidante.** Monografia (Licenciatura em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

PEREIRA, R. P. **Ingestão da tintura de *Valeriana officinalis* protege da discinesia orofacial induzida por reserpina em ratos.** 100p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

PERES, T. V. **Avaliação da neurotoxicidade do manganês em modelos *in vitro* de fatias estriatais e hipocámpais de ratos e células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.** Dissertação (Programa de Pós-graduação em Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

PIANTAVINI, M. S. **Desenvolvimento e validação de um método espectrofotométrico para a quantificação de ácido kójico por complexação com alumínio e caracterização do complexo.** 149p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

PIERUCCI, M.; GALATI, S.; VALENTINO, M.; DI MATTEO, V.; BENIGNO, A.; PITRUZZELLA, A.; MUSCAT, R.; DI GIOVANNI, G. Nitric oxide modulation of the basal

ganglia circuitry: therapeutic implication for Parkinson's disease and other motor disorders. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets**, v. 10, n. 7, p. 777-791, 2011.

POEWE, W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Eur. J. Neurol.**, v. 15, Suppl., p. 14-20, 2008.

PRZEDBORSKI, S.; GOLDMAN, J. E. Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. **Adv. Mol. Cell Biol.**, v. 31, p. 967-982, 2003.

RABELO, L. A.; AGRA, M. F.; da-CUNHA, E. V.; da SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Homohesperetin and phaseollidin from *Erythrina velutina*. **Biochem. System. Ecol.**, v. 29, n. 5, p. 543-544, 2001.

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Quim. Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114-1120, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RAO, V. S.; PAIVA, L. A.; SOUZA, M. F., CAMPOS, RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A.; TEXEIRA, M. J.; SILVEIRA, E. R. Ternatin, an anti-inflammatory flavonoid, inhibits thioglycolate-elicited rat peritoneal neutrophil accumulation and LPS-activated nitric oxide production in murine macrophages. **Planta Med.**, v. 69, n. 9, p. 851-853, 2003.

RAUPP, I. M.; SERENIKI, A.; VIRTUOSO, S.; GHISLANDI, C.; CAVALCANTI, E. S. E. L.; TREBIEN, H. A.; MIGUEL, O G.; ANDREATINI, R. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. **Ethnopharmacology**, v. 118, p. 295-299, 2008.

RESNICK, A. Z.; PARKER, L. Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: POLI, G.; ALBANO, E.; DIANZANI, M. U. (Ed.) **Free Radicals: From Basic Science to Medicine**. Basel: Birkhäuser, 1993.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, M. D.; ONUSIC, G. M.; POLTRONIERI, S. C.; VIANA, M. B. Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, p. 263-270, 2006.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria. **Quím. Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

RODRIGUES, M.; CAMPOS, L. C. Estratégia para o tratamento com levodopa na doença de Parkinson. **Revista Analytica**, n. 23, p. 44-51, 2006.

ROSE LISIEUX, R.; JÁCOME, P.; de OLIVEIRA, A. B. Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("PAUPEREIRA"). **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 897-900, 2004.

RYBAKOWSKA, I.; SZREDER, G.; KALETHA, K.; BARWINA, M.; WALDMAN, W.; SEIN, A.J. Reactive oxygen species and 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde in pathogenesis of Parkinson disease. **Przegl. Lek.**, v. 68, n. 8, p. 486-487, 2011.

SAINT-CRICQ de GAULEJAC, N. S.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 425-431, 1999.

SAURA, J.; MIREIA, P.; BOVÉ, J.; PEZZI, S.; ALBERCH, J.; MARIN, C.; TOLOSA, E.; MARTÍ, M.J. Intranigral infusion of interleukin-1b activates astrocytes and protects from subsequent 6-hydroxydopamine neurotoxicity. **J. Neurochem.**, v. 85, p. 651-661, 2003.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. p. 371-400.

SCHÜLE, B.; PERA, R.A.; LANGSTON, J. W. Can cellular models revolutionize drug discovery in Parkinson's disease? **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1792, p. 1043-1051, 2009.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US food and drug administration, the US pharmacopeia and the international conference on harmonization. **J. Chromatogr. A**, v. 987, p.57-66, 2003.

SHARAPIN, N.; ROCHA, L. M.; CARVALHO, E. S.; LÚCIO, E. M. R. DE A.; SANTOS, E.V.M. dos; ALMEIDA, J. M. L. DE. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Merck e Co, 2000.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **J. Nutr.**, v. 135, n. 5, p. 969-972, 2005.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. A.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 16, n. 4, p. 447-454, 2006.

SILVESTRIN, R. B. **O teste da motricidade sobre grade como ferramenta de triagem no modelo de parkinsonismo induzido por 6-hidroxidopamina em ratos**. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003.

SOARES, A. K. A.; CARMO, G. C.; QUENTAL, D. P.; NASCIMENTO, D. F.; BEZERRA, F.A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinales*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários sadios. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 4, p. 455-462, 2006.

SOARES, K. C.; PASQUALOTTO, A. C.; ROSA, D. D.; LEITE, V. R. S. **Métodos Diagnósticos**. São Paulo: Artmed, 2002.

SOCHA, R.; JUSZCZAK, L.; PIETRZYK, S.; FORTUNA, T. Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys. **Food Chem.**, v. 113, n. 2, p. 568-574, 2009.

SONG, J.; FANG., G.; ZHANG, Y.; DENG, Q.; WANG, S. Fingerprint analysis of *Ginkgo biloba* leaves and related health foods by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. **J. AOAC Int.**, v. 93, n. 6, p. 1798-1805, 2010.

SOUSA, C. M. M.; ROCHA e SILVA, H.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; da COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, S. M.; MILACH JR, A. C.; BANDEIRA, M. A. M.; NOBREE, M. E. P.; VIANA, G. S. B. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in rodents. **Phytother. Res.**, v. 21, n. 3, p. 220-225, 2007.

STOJANOVIC, D.; FERNANDEZ, M.; CASALE, I.; TRUJILLO, D.; CASTES, M. Characterization and mitogenicity of a lectin from *Erythrina velutina* seeds. **Phytochemistry**. v. 37, n. 4, p. 1069-1074, 1994.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug. [Editorial]. **Drug Discov. Today**, v. 5, n.2, p. 39-41, 2000.

TEIVE, H. A. G. Etiopatogenia da doença de Parkinson. In: MENESES, M. S.; TEIVE, H. A. G. **Doença de Parkinson**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 33-37.

TIFANY-CASTIGLIONI, E.; SANETO, R. P.; PROCTOR, P. H.; PERZ-POLO, J. R. Participation of active oxygen species in 6-hydroxydopamine toxicity to a human neuroblastoma cell line. **Biochem. Pharmacol.**, v. 31, p. 181-188, 1982.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Rev. Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TRUEBA, G. P.; SÁNCHEZ, G. M. Los flavonóides como antixodantes naturales. **Acta Farm. Bonaerens.**, v. 20, p. 297-306, 2001.

TSIAPARA, A. V.; JAAKKOLA, M.; CHINO, I.; GRAIKOU, K.; TOLONEN, T.; VIRTANEN, V.; MOUTSATSOU, P. Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. **Food Chem.**, v. 116, p. 702-708, 2009.

VASCONCELOS, S. M. M.; LIMA, N. M.; SALES, G. T. M.; CUNHA, L. M. V. A.; SILVEIRA, E. R.; RODRIGUES, A. C. P.; MACÊDO, D. S.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 10, n. 2, p. 271-274, 2007.

VASCONCELOS, S. M. M.; MACEDO, D. S.; de MELO, C. T.; PAIVA MONTEIRO, A.; RODRIGUES, A. C.; SILVEIRA, E. R.; CUNHA, G. M.; SOUSA, F. C., VIANA, G. S. B. Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* e *Erythrina mulungu* in mice. **J. Pharm.. Pharmacol.**, v. 56, n. 3, p. 389-393, 2004.

VASCONCELOS, S. M. M.; OLIVEIRA, G. R.; CARVALHO, M. M.; RODRIGUES, A. C. P.; SILVEIRA, E. R.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Antinociceptive activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Biol. Pharmacol. Bull.**, v. 26, n. 7, p. 946-949, 2003.

VASCONCELOS, S. M. M.; SALES, G. T. M.; LIMA, N. M.; LOBATO, R. F. G.; MACÊDO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LEAL, L. K. A. M.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, F. C. F.; OLIVEIRA, J. L.; VIANA, G. S. B. Anti-inflammatory activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 21, n. 6, p. 11155-11158, 2011.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* allemão. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2/3, p. 189-195, 2003.

VINCENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 3, p. 384-387, 2007.

VINUESA, J. C.; FARIA, J. B.; CÉSAR, T. B. Hesperidina diminui o colesterol de ratos alimentados com gordura saturada. **Alim. Nutr.**, v. 19, n. 4, p. 473-479, 2008.

VIRTUOSO, S. **Estudo fitoquímico e biológico das cascas de *Erythrina velutina* Willd. – Fabaceae (Leguminosae - Papilionoide)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

WHO. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva, 1998.

YOKOYAMA, H.; UCHIDA, H.; KUROIWA, H.; KASAHARA, J.; ARAKAI, T. Role of glial cells in neurotoxin-induced animal models of Parkinson's disease. **Neurol. Sci.**, v. 32, p. 1-7, 2011.

ZARONI, M.; PONTAROLO, R.; ABRAHÃO, W. S. M.; FÁVERO, M. L. D.; CORREA JÚNIOR, C.; STREMEL, D. P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.14, n.1, p. 29-39, 2004.

ZERAIK, M. L. **Estudo analítico dos flavonóides dos frutos do maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener)**. 2010. 191 p. Tese (Doutorado em Ciências, Programa de Pós-graduação em Química, área Química Analítica). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

ZHANG, J. L.; CUI, M.; HE, Y.; YU, H. L.; GUO, D. A. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC–UV and HPLC–MS methods. **Journal of Pharm. Biomed. Anal.**, v. 36, p. 1029–1035, 2005.

ZHAO, L.; HUANG, C.; SHAN, C.; XIANG, B.; MAI, L. Fingerprint analysis of *Psoralea corylifolia* L. by HPLC and LC-MS. **J. Chromatogr. B**, v. 821, p. 67–74, 2005.