

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Solidago chilensis Meyer: desenvolvimento de métodos analíticos, extratos secos qualificados, avaliação farmacológica *in vivo* e produção de comprimidos.

RAFAELA MARIN

Porto Alegre, 2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Solidago chilensis Meyer: desenvolvimento de métodos analíticos, extratos secos qualificados, avaliação farmacológica *in vivo* e produção de comprimidos.

Tese apresentada por Rafaela
Marin para obtenção do Título
DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Amélia Teresinha Henriques
Co-orientador: Prof Dr. Pedro Ros Petrovick

Porto Alegre, 2014

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 03 de outubro de 2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Cid Aimbire de Moraes Santos

Universidade de Federal do Paraná

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Valquíria Linck Bassani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Marin, Rafaela

Solidago chilensis Meyer: desenvolvimento de métodos analíticos, extratos secos qualificados, avaliação farmacológica in vivo e produção de comprimidos / Rafaela Marin. -- 2014.

216 f.

Orientadora: Amélia Teresinha Henriques.

Coorientador: Pedro Rosa Petrovick.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Solidago chilensis. 2. Controle de qualidade. 3. Extrato seco padronizado. 4. Óleos voláteis. 5. Gastroproteção. I. Henriques, Amélia Teresinha, orient. II. Rosa Petrovick, Pedro, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof^a. Dra. Amélia Henriques e co-orientação do Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick nos laboratórios de Farmacognosia e de Tecnologia Farmacêutica, ambos situados na Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A atividade antifúngica foi ensaiada no Laboratório de Micologia, Faculdade de Farmácia, UFRGS, em colaboração pelo Prof. Dr Alexandre M. Fuentefria. Os ensaios de citotoxicidades foram realizados Universidade Federal do Pampa, Uruguiana, em colaboração e orientação do Prof. Dr. Luiz Flavio Oliveira. A ação gastroprotetora foi avaliada na Universidade do Vale do Itajaí em colaboração do Prof. Dr. Sérgio Faloni de Andrade.

As análises quantitativas do marcador químico do extrato seco por aspersão foram realizadas no Laboratório de Química Forense da Polícia Federal, Porto Alegre, RS com a colaboração do PCF Bruno Henrique Todeschini.

A pesquisa foi financiada pelo CNPq e CAPES.

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz e Dianete,
meus exemplos de determinação, amor e bondade.

Agradecimentos

À Profa Amélia, pela orientação, pela confiança depositada em mim e pelos estímulos constantes.

Ao Prof. Petrovick, pelos ensinamentos e pela disponibilidade em orientar, sempre com muita gentileza e cordialidade.

Aos meus pais, Luiz e Dianete por serem tão dedicados e por se doarem completamente para oportunizar o melhor dos valores a seus filhos. Obrigada por todo amor e carinho e compreensão, especialmente nos vários momentos em que estive ausente no convívio familiar.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Rudinei e às cunhadas Cláudia e Fabiane, pelo companheirismo, apoio e bons momentos familiares.

Aos meus sobrinhos, Enzo, Lauren e Ana por tornarem meus dias mais especiais. Não consigo descrever com palavras a sensação proporcionada pelo sorriso, pela alegria e carinho de vocês.

Ao Adriano, por tornar minha a vida plena, pelo companheirismo, cumplicidade e amor que encontrei o teu lado.

Um agradecimento especial aos meus queridos amigos e colegas: Carolina Passos, Eduardo Konrath, Guilherme Pizzoli, Marcelo Arbo, Luiz Carlos Klein-Junior, Fabiane Moreira, Jean Paulo Andrade, Tiago Souza pelos momentos de descontração, incentivo, companheirismo e pelas discussões científicas com as quais muito aprendi.

Aos colegas e amigos do laboratório de farmacognosia: Renata, Douglas, Juliana, Melissa, Marina, Grazielle pelos momentos agradáveis de convívio e aprendizado.

À Angélica Rocha Joaquim e Débora Vian, alunas de iniciação científica que tive a honra de acompanhá-las em suas formações. Meu eterno agradecimento pela dedicação e responsabilidade de cada uma.

Ao Bruno H. Todeschini, pela oportunidade, disponibilidade em me receber na DPF e por viabilizar parte do trabalho de modo colaborativo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Faloni, pelos ensinamentos, pela recepção amistosa e agradável em seu laboratório. Agradeço também a sua equipe e, em especial, a Thaise Boeing por toda gentileza e empenho nos experimentos de gastroproteção.

Aos Professores Alexandre Fuentefria e Miriam Apel, pela sua gentil colaboração e por estarem sempre dispostos a me auxiliar nesse processo de aprendizado.

Ao professor Luiz Flávio Oliveira e sua equipe, que me oportunizaram excelente aprendizado nos ensaios de citotoxicidade, juntamente com o convívio indescritivelmente agradável.

A todos que, de alguma forma, contribuíam com ensinamentos e momentos felizes.

Resumo

Infusos e decoctos preparados com as partes aéreas de *Solidago chilensis* são utilizados na medicina popular para tratar distúrbios gástricos, úlceras intestinais, inflamações, reumatismo, além de outros empregos tais como diurético e analgésico. Diversos estudos têm sustentado conhecimento popular, como por exemplo, a atividade anti-inflamatória e gastroprotetora das partes aéreas de *Solidago chilensis*. Em modelos *in vitro*, *in vivo* e estudo clínico realizados com extratos obtidos com diversos solventes, foi observada tanto a resposta aguda quanto a crônica à inflamação. O mesmo ocorre para a ação gastroprotetora evidenciada para extratos aquosos em modelos *in vivo*. Com ampla e abundante ocorrência, essa espécie nativa do Brasil integra a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (Renuis), inserindo-se na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC). No entanto, não há relatos na literatura sobre a avaliação química e obtenção de produtos tecnológicos padronizados e ativos, o que constitui uma importante limitação para a produção de medicamento fitoterápico. Neste sentido, este trabalho objetivou, primeiramente, avaliar parâmetros de controle de qualidade e estabelecer critérios químicos que permitam identificar e caracterizar a espécie bem como compará-la a outras do gênero, que possuem amplo uso terapêutico na Europa. Análises comparativas destas amostras foram realizadas por CCD, CLAE e teor de flavonoides totais. Análises por CCD e CLAE dos extratos metanólicos demonstraram diferenças químicas interespecie e constância química qualitativa da *S. chilensis* em diversos locais e anos de coleta. A determinação quantitativa de flavonoides totais envolveu a otimização das condições de hidrólise ácida (concentração de HCl e do tempo de reação) e validação de método analítico por CLAE. O teor de flavonóides totais, assim obtido, foi 154% maior do que o observado por ensaio colorimétrico com cloreto de alumínio a 425 nm. Análises por CLAE-DAD e CLAE-EM/EM também foram realizadas e revelaram a presença de rutina, quercetrina e dos ácidos 3,4-O-dicafeoilquinico e 4,5-O-dicafeoilquinico. Além desses ensaios, ainda como parte da caracterização da droga vegetal, foi avaliado o teor e composição do óleo volátil presente nas folhas e inflorescências. Esses produtos demonstraram potente ação antifúngica frente a leveduras emergentes e multirresistentes, sem evidências de citotoxicidade. Em relação à obtenção do extrato seco por aspersão (PSA) a partir do extrato etanol:éter (1:1), o processo mostrou-se viável, com alto rendimento e para a sua qualificação química foram empregadas duas técnicas cromatográficas. Por CLAE foi determinada a presença dos mesmos componentes descritos para a droga. Adicionalmente, foi realizada a padronização química quantitativa da droga vegetal pela determinação dos flavonoides totais na qual foi evidenciando o teor de 82,73 mg/g expressos em quercetina. A quantificação da solidagenona foi realizada por HPTLC-densitometria e o teor médio encontrado foi de 8 mg/g. A avaliação da

atividade gastroprotetora do PSA e do marcador solidagenona utilizou-se os modelos de lesão gástrica induzida por etanol e indometacina em camundongos. Nesses modelos, o PSA apresentou um índice de gastroproteção, nas doses de 50, 125 e 250 mg/kg respectivamente, de $85 \pm 15\%$, $77 \pm 3\%$; $83 \pm 9\%$; $64 \pm 16\%$ quando utilizado etanol como agente lesivo e de $63 \pm 23\%$ e $79 \pm 12\%$ quando utilizado a indometacina. A solidagenona testada na dose de 30 mg/kg, apresentou índices os índices de gastroproteção próximos aos dos padrões positivos ranitidina e carbenoloxona em doses de 100 e 200 mg/kg respectivamente. O PSA, produto intermediário com ação gastroprotetora, foi caracterizado como um pó fino com baixa densidade e baixa fluidez, tornando necessários processos de granulação por via seca para possibilitar a sua incorporação em forma farmacêutica sólida. Foram obtidos comprimidos de 700 mg e estes foram caracterizados em relação aos ensaios de resistência mecânica e uniformidade de conteúdo.

Os resultados obtidos neste trabalho representam as primeiras contribuições para o estabelecimento de parâmetros e métodos para a caracterização que auxiliem no controle de qualidade da droga vegetal de *S. chilensis*. A viabilidade de produção, qualificação química e verificação de ação farmacológica do extrato seco obtido e o estudo da viabilidade tecnológica de obtenção de comprimidos contribuem enormemente para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos a partir de *S. chilensis*. Este trabalho pode ser considerado inovador por tratar-se da associação de uma matriz complexa, rica em constituintes terpênicos e flavonoides cuja caracterização química quali e quantitativa foi estabelecida e demonstrada a viabilidade de inserção desta matriz em forma farmacêutica sólida.

Palavras-chave: *Solidago chilensis*, controle de qualidade, ação antifúngica, qualificação de extrato seco por aspersão, gastroproteção, obtenção de comprimidos.

Abstract

Infusions and decoctions prepared with aerial parts of *Solidago chilensis* are used in folk medicine to treat gastric disorders, intestinal ulcers, inflammatory conditions, rheumatism, and as a diuretic and analgesic agent. The anti-inflammatory and gastroprotective activities attributed to the aerial parts have been observed in pharmacological studies, thus supporting the popular use for this species. Studies have demonstrated the inhibition of the chronic and acute inflammatory responses by extracts obtained with different solvents, through *in vitro* and *in vivo* models and also by a clinical trial. The same occurs to the gastroprotective action, evidenced for aqueous extracts *in vivo*. This species, native to Brazil and widespread throughout our country, is inserted in the RENISUS, which is part of the National Politics of Integrative and Complementary Practices. However, there are no reports in the literature concerning the chemical profile and the obtention of standardized technological products and their active principle, which may be an important limitation to the production of a phytomedicine. Following this line, the current work aims to add knowledge to the utilization for the species and also adds scientific evidences to the possibility of *Solidago chilensis* to follow into a phytotherapeutic productive chain. The objectives of this work are the evaluation of quality control parameters and the establishment of chemical conditions which may enable the identification and characterization of this species, as well as its comparison with other species belonging to the same genus, that share a wide therapeutic use in Europe. Comparative analyses for these samples were made by TLC, HPLC and also by the flavonoid total content profile. The analyses of methanolic extracts made by TLC and HPLC evidenced interspecies chemical differences and the qualitative uniformity for *Solidago chilensis*, observed in different places and years of collection. The quantitative total flavonoid determination involved the optimization of acid hydrolysis conditions (HCl concentration and time of reaction) and the validation of an analytic method by HPLC. The total flavonoid content thus obtained was 154% higher than the observed by the colorimetric assay using aluminum chloride, at 425 nm. Analyses by HPLC-PDA and HPLC-MS-MS were also conducted and revealed the presence of rutin, quercetrin, 3,4-*O*-cafeoyl quinic and 4,5-*O*-dicafeoyl quinic acids. Moreover, the vegetal drug characterization involved also the content and composition of volatile oil present in leaves and inflorescences. These products showed a potent antifungal action towards emerging and multiresistant yeast strains, without cytotoxicity evidences. The obtention of the spray-dried ethanol: ether (1:1) extracts demonstrated to be viable, with high yield, and their chemical standardization was achieved using two techniques. By HPLC, the presence of the same compounds

described for the vegetal drug was determined. The quantitative content of total flavonoids was 82.73 mg/g, expressed as quercetin. Solidagenone content was assessed by HPTLC-densitometry, and was determined to be 8.0 mg/g. The gastroprotective activities of solidagenone and the *Solidago chilensis* spray-dried extract (SDE) were assayed using the ethanol and indomethacin-induced ulcer models. The index of ulceration induced by ethanol was reduced in the presence of SDE at the doses of 50, 125 and 250 mg/kg ($85 \pm 15 \%$, $77 \pm 3 \%$; $83 \pm 9 \%$; $64 \pm 16 \%$, respectively); $64 \pm 16 \%$, $63 \pm 23 \%$ e $79 \pm 12 \%$ in the presence of indomethacin. Solidagenone presented at the dose of 30 mg/kg an index of gastroprotection close to the reference standards ranitidine and carbenoxolone (100 and 200 mg/kg, respectively). SDE, the intermediary product with gastroprotective action, was characterized as a fine powder with a low density and a low flowability, making necessary the development of dry granulation processes to achieve its incorporation into solid dosages. This way, 700 mg tablets were obtained and characterized using the parameters mechanical resistance and uniformity of content.

The results obtained in this work represent the first contributions to establish methods and parameters to the characterization and for the quality control of the vegetal drug *Solidago chilensis*. The viability of production, chemical standardization, assessment of the biological activity for the SPE and the technological feasibility to obtain tablets contribute to the development of new pharmaceutical products from *Solidago chilensis*. Considering that this complex plant matrix, enriched in terpenic and flavonoid constituents, has its qualitative and quantitative characterization already established, and that its insertion into a solid dosage has a viability of production, this can be considered innovator.

Keywords: *Solidago chilensis*, quality control, antifungal activity, spray-dry extract standardization, gastroprotection, tablets obtention.

Lista de tabelas

Tabela 2.1 Distribuição granulométrica do pó e dos conteúdos de extraíveis por álcool e flavonoides totais.	81
Tabela 2.2 Planejamento experimental das condições de hidrólise.	105
Tabela 2.3 Análise de variância (ANOVA) fator único para o parâmetro de linearidade.	108
Tabela 2.4 Resultados do parâmetro precisão intermediária - quantificação do teor de flavonoides totais de <i>S. chilensis</i> por CLAE.	109
Tabela 2.5 Resultados do parâmetro repetibilidade - quantificação do teor de flavonoides totais de <i>S. chilensis</i> por CLAE.	110
Tabela 2.6 Resultados do parâmetro exatidão (recuperação) - quantificação do teor de flavonoides totais de <i>S. chilensis</i> por CLAE.	110
Tabela 2.7 Resultados do parâmetro robustez - quantificação do teor de flavonoides totais de <i>S. chilensis</i> por CLAE	111
Tabela 3.1 Resultados do ensaio de precisão intermediária - quantificação de solidagenona por cromatografia em camada delgada de alta eficiência - densitometria.	156
Tabela 3.2 Resultados do ensaio de repetibilidade - quantificação de solidagenona por cromatografia em camada delgada de alta eficiência - densitometria.	156
Tabela 3.3 Resultados do ensaio de exatidão (recuperação) - quantificação de solidagenona por cromatografia em camada delgada de alta eficiência - densitometria.	157
Tabela 3.4 Dados do parâmetro de robustez - quantificação de solidagenona por cromatografia em camada delgada de alta eficiência - densitometria.	157
Tabela 5.1 Resultados das análises densitométricas do produto seco por aspersão e do granulado.	190
Tabela 5.2 Resultados da análise densitométrica do complexo farmacêutico.	192
Tabela 5.3 Avaliação do peso médio, densidade aparente, espessura, dureza e perda por dessecação dos comprimidos.	192

Lista de quadros

Quadro 1.1 Espécies de <i>Solidago</i> , sinónímias e região de ocorrência.	45
Quadro 1.2 Principais compostos di e triterpênicos identificados no gênero <i>Solidago</i> .	54
Quadro 1.3 Principais saponinas identificadas no gênero <i>Solidago</i> .	57
Quadro 1.4 Principais flavonoides e ácidos fenólicos identificados no gênero <i>Solidago</i> .	57
Quadro 2.1 Listagem das amostras de <i>Solidago chilensis</i> utilizadas para avaliação do perfil químico.	82
Quadro 2.2 Parâmetros cromatográficos empregados para o estabelecimento do perfil químico de <i>S. chilensis</i> por UPLC/UV-PDA.	84
Quadro 2.3 Sistema gradiente linear utilizado nas o estabelecimento do perfil químico de <i>S. chilensis</i> por UPLC/UV-PDA.	84

Lista de figuras

Figura 2.1 Perfil cromatografico de <i>S. chilensis</i> por cromatografia em camada delgada- observação em 365 nm.	86
Figura 2.2 Perfil cromatográfico de <i>S. chilensis</i> - revelação com reagente natural- observação em 365 nm.	87
Figura 2.3 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Guaporé (2011) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	88
Figura 2.4 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Pinhal (2011) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	89
Figura 2.5 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Itati (2011) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	89
Figura 2.6 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Eldorado (2012) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	89
Figura 2.7 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Guaporé (2012)- obtido por UPLC-UV em 300 nm.	90
Figura 2.8 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Eldorado (2012) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	90
Figura 2.9 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Pelotas (2012) - obtido por UPLC-UV a 300 nm.	90
Figura 2.10 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta São Valentim (2012) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	91
Figura 2.11 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Caxias do Sul (2012) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	91
Figura 2.12 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Eldorado (2013) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	92
Figura 2.13 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Ibraquera (2013) - obtido por UPLC-UV a 300 nm.	92
Figura 2.14 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Guaporé (2013) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	92
Figura 2.15 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Bento Gonçalves (2014) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	93
Figura 2.16 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Carlos Barbosa (2014) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	94

Figura 2.17 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Cotiporã (2014) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	93
Figura 3.18 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta São Valentim (2014) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	94
Figura 3.19 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Dois Lageados (2014) - obtido por UPLC-UV a 300 nm.	94
Figura 2.20 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Guaporé (2014) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	94
Figura 2.21 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta Santa Clara (2014) - obtido por UPLC-UV a 300 nm.	95
Figura 2.22 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - coleta União da Serra (2014) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	95
Figura 2.23 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - Biotae® (2012) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	96
Figura 2.24 Cromatograma de <i>S. chilensis</i> - Edka® (2012) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	96
Figura 2.25 Cromatograma de <i>Solidaginis herba</i> (Alemanha) - obtido por UPLC-UV em 300 nm.	97
Figura 2.26 Superfície de resposta gerada a partir do planejamento fatorial 3 ² para a determinação do teor de quercetina em <i>S. chilensis</i> .	105
Figura 2.27 Cromatograma característico obtido de extrato hidrolisado de <i>S. chilensis</i> , em 371 nm.	106
Figura 2.28 Parâmetro de especificidade e seletividade obtido por varredura de 210 a 400 nm.	107
Figura 2.29 Gráficos das curvas analíticas de quercetina - Linearidade do método por CLAE.	108
Figura 2.30 Gráfico correspondente à curva analítica média de quercetina - Linearidade do método por CLAE.	108
Figura 3.1 Cromatograma obtido por CG/MS para a solidagenona após a recristalização.	147
Figura 3.2 Perfil de fragmentação da solidagenona.	147
Figura 3.3 Cromatograma do extrato etanol e éter (1:1), obtido por UPLC-UV em 300 nm.	151

Figura 3.4 Cromatograma do produto seco por aspersão, obtido por UPLC-UV em 300 nm.	151
Figura 3.5 Densitograma do produto seco por aspersão por CCDAP - densitometria, em 254 nm.	153
Figura 3.6 Espectros de UV obtidos por varredura de 200 a 400 nm.	153
Figura 3.7 Gráfico da curva analítica média de solidagenona, em 254 nm - Linearidade do método obtida por cromatografia em camada delgada de alta eficiência - densitometria.	154
Figura 3.8 Desitograma - curva analítica construída com o padrão solidagenona em 254 nm - Linearidade do método obtida por cromatografia em camada delgada de alta eficiência - densitometria.	154
Figura 3.9 Desitograma - curva analítica de solidagenona, em 254 nm.	155
Figura 4.1 Índice de gastroproteção promovido pela carbenoloxona (200 mg/kg; v.o.) e pelo extrato <i>S. chilensis</i> (50-250 mg/kg; v.o.) em lesões induzidas por etanol 96 %; v.o.) em ratos.	171
Figura 4.2 Índice de gastroproteção promovido pelo ranitidina (100 mg/kg; v.o.) e pelo extrato de <i>S. chilensis</i> (50-250 mg/kg; v.o.) em lesões induzidas por etanol 96 % v.o. em ratos.	172
Figura 4.6 Índice de gastroproteção promovido pela carnenoxolona (200 mg/kg; v.o.) e pela solidagenona (30 mg/kg; v.o.) em lesões induzidas por etanol 96 %; v.o.) em camundongos.	172
Figura 4.7 Índice de gastroproteção promovido pela ranitidina (100 mg/kg; v.o.) e pela solidagenona (30 mg/kg; v.o.) em lesões induzidas por indometacina (100 mg/kg v.o.) em camundongos.	173
Figura 5.1 Densitogramas - mistura de pós e granulado do produto seco por aspersão, em 254 nm.	191

Lista de abreviaturas

CCD – cromatografia em camada delgada
CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIM – concentração inibitória mínima
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
UPLC-PDA-EM/EM – cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas sequencial no espaço
CLAE-UV – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta
col. – colaboradores
C18 – sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano
EM – espectrometria de massas
GF₂₅₄ – cromatoplaça de gel de sílica com indicador fluorescente com comprimento de onda de excitação de 254 nm
HPTLC - cromatografia em camada delgada de alta eficiência
i.p. – via de administração intraperitoneal
MeOH – metanol
m/m – massa / massa
m/v – massa / volume
m/z – relação massa / carga elétrica
OMS – Organização Mundial de Saúde
PVDF – membrana filtrante de fluoreto de polivinilideno
Rf – fator de retenção (do inglês *retention factor*)
spp. – espécies do gênero
TR – tempo de retenção
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV – ultravioleta
UV_{máx.} – comprimento de onda com máximo de absorvância no ultravioleta

Apresentação

O presente trabalho teve como objetivo geral a caracterização e avaliação de parâmetros de controle de qualidade para a droga vegetal *Solidago chilensis* Meyer; a obtenção e qualificação química do produto intermediário extrato seco bem como a avaliação da atividade gastroprotetora deste e o estudo de viabilidade de obtenção de forma farmacêutica sólida. A fim de organizar a exposição do tema e facilitar a compreensão, o trabalho foi dividido em cinco capítulos com a seguinte estrutura:

Capítulo 1 - Revisão da literatura com a finalidade de contextualizar o tema do trabalho e a espécie de interesse.

Capítulo 2 - Caracterização da matéria-prima vegetal e avaliação de parâmetros de controle de qualidade para a matéria-prima vegetal. Parte do capítulo é apresentada sob a forma de manuscrito: “*Solidago chilensis* essential oil as a potential new drug against resistant *Candida* isolates, without human blood cell damage and genotoxicity”.

Capítulo 3 - Obtenção de produto intermediário extrato seco e qualificação química.

Capítulo 4 - Avaliação da atividade gastroprotetora de extrato seco padronizado obtido das inflorescências de *Solidago chilensis* Meyer.

Capítulo 5 - Obtenção da forma farmacêutica acabada a partir granulados de extrato seco padronizado.

Ao final, os resultados obtidos são discutidos em conjunto e as conclusões gerais do trabalho apresentadas.

Sumário

Introdução	31
Objetivos	37
CAPÍTULO 1 - Revisão	41
1.1 Gênero <i>Solidago</i>	43
1.1.2 Ocorrência	44
1.1.3 Usos tradicionais	52
1.1.4 Composição química	52
1.1.5 Propriedades farmacológicas	59
1.1.5.1 Atividade antiinflamatória	59
1.1.5.2 Ação gastroprotetora	62
1.1.5.3 Ação diurética	64
1.1.5.4 Ação hepatoprotetora e antioxidante	64
1.1.5.5 Outros efeitos	65
1.1.5.5 Toxicidade	66
1.1.5.6 Conclusões	66
1.1.5.7 Referências	67
CAPÍTULO 2 - Caracterização físico-química e química das inflorescências de <i>S. chilensis</i>	73
2.1 Introdução	75
2.2 Caracterização físico-química e química	76
2.2.1 Materiais e métodos	76
2.2.1.1 Material vegetal	76
2.2.1.2 Perda por dessecação	77
2.2.1.3 Determinação de cinzas totais	77
2.2.1.4 Análise granulométrica	77
2.2.1.5 Determinação de substâncias extraíveis por álcool	77
2.2.1.6 Determinação da relação entre teor de substâncias extraíveis por álcool e o conteúdo de flavonoides totais	78
2.2.2 Resultados e discussão	78
2.3 Caracterização química qualitativa <i>S. chilensis</i>	80
2.3.1 Materiais e métodos	80
2.3.1.1 Material vegetal	80
2.3.1.2 Determinação do perfil químico de <i>S. chilensis</i> por cromatografia em camada delgada	82
2.3.1.3 Determinação do perfil químico de <i>S. chilensis</i> por	82
2.3.1.4 Caracterização química dos principais constituintes de <i>S.</i> <i>chilensis</i> por UPLC/PDA/MS	84
2.3.2 Resultados e discussão - caracterização química qualitativa	84
2.3.2.1 Determinação do perfil químico por cromatografia em	84
2.3.2.2 Determinação do perfil químico por UPLC/PDA	86
2.3.2.3 Identificação dos principais constituintes de <i>S. chilensis</i> por UPLC/PDA/MS	96
2.4 Caracterização química quantitativa de <i>S. chilensis</i>	98
2.4.1 Materiais e métodos	98
2.4.1.1 Desenvolvimento e validação de método analítico pra quantificação de flavonoides totais	98

2.4.1.2 Desenho experimental e análise fatorial superfície de	100
2.4.1.3 Análise estatística	101
2.4.1.4 Teor de flavonoides totais por espectrofotometria	101
2.4.2 Resultados e discussão	101
2.5 Procedimentos para tratamento dos resíduos	111
2.6 Referências	111
2.7 Caracterização química quali e quantitativa dos óleos voláteis e atividade - Manuscrito: <i>Solidago chilensis</i> essential oil as a potential new drug against resistant <i>Candida</i> isolates, without human blood cell damage and genotoxicity	114
CAPITULO 3 - Obtenção de produto intermediário extrato seco e qualificação química	133
3.1 Introdução	135
3.2 Materiais e métodos	136
3.2.1 Obtenção do extrato mole e isolamento do marcador	136
3.2.2 Obtenção de extrato seco por aspersão	138
3.2.3 Determinação da perda por dessecação	139
3.2.4 Caracterização química qualitativa do extrato seco	139
3.2.5 Caracterização química quantitativa do extrato seco	141
3.2.5.1 Determinação dos flavonoides totais	141
3.2.6 Determinação do teor de solidagenona - desenvolvimento e validação de método analítico por densitometria	142
3.2.6.1 Preparo de amostra	142
3.2.6.2 Condições cromatográficas e aquisição de dados	143
3.2.6.3 Validação do método analítico por HPTC- densitometria	143
3.3 Resultados e discussão	144
3.3.1 Obtenção do extrato mole e isolamento do marcador	145
3.3.2 Obtenção de extrato seco por aspersão	147
3.3.3 Qualificação química qualitativa do extrato seco	149
3.3.4 Qualificação química quantitativa do extrato seco	150
3.3.4.1 Determinação dos flavonoides totais	150
3.3.4.2 Determinação do teor de solidagenona - desenvolvimento e validação de método analítico por densitometria	151
3.4 Conclusões	157
3.5 Referências	157
CAPITULO 4 - Avaliação da atividade gastroprotetora de extrato seco padronizado obtido das inflorescências de <i>Solidago chilensis</i> Meyer	161
4.1 Introdução	163
4.2 Materiais e métodos	165
4.2.1 Animais	165
4.2.2 Avaliação da atividade gastroprotetora	166
4.2.3 Modelo de úlcera aguda induzida por etanol	166
4.2.4 Modelo de úlcera aguda induzida por antiinflamatório não-	167
4.2.5 Aspectos éticos	167
4.2.6 Análise estatística	167
4.3 Resultados e discussão	168
4.4 Conclusões	173

4.5 Referências	173
Capítulo 5 - Obtenção da forma farmacêutica acabada a partir de extrato seco padronizado	177
5.1 Introdução	179
5.2 Materiais e Métodos	180
5.2.1 Obtenção de granulados de extrato seco por aspersão	182
5.2.1.1 Caracterização dos compactos	183
5.2.1.2 Granulação dos compactos de PSA	184
5.2.1.3 Caracterização do GRPSA	184
5.2.2 Obtenção dos granulados de adjuvantes	185
5.2.3 Produção do complexo farmacêutico	186
5.2.3.1 Caracterização do complexo farmacêutico	186
5.3 Produção de comprimidos	186
5.3.1 Caracterização dos comprimidos	187
5.4 Resultados e discussão	188
5.5 Conclusões	192
5.5 Referências	193
6 Discussão geral	197
7 Conclusões	209
8 Referências	214

A comercialização de plantas medicinais tanto na forma de droga vegetal quanto na composição de produtos industrializados - suplementos alimentares, nutracêuticos, medicamentos fitoterápicos - ou mesmo em preparações descritas em códigos oficiais - Farmacopeias Chinesa e Indiana, Formulário de Fitoterápicos, por exemplo - tem apresentado expressivas taxas anuais de crescimento, com uma movimentação global de US\$ 21,7 bilhões/ano (Carvalho et al., 2008; Khan et al., 2012.). Dados divulgados pelo Banco Mundial demonstraram que mercado de plantas medicinais cresce de 5-15% ao ano (Cravotto et al., 2010; Khan et al., 2012). Da mesma forma, o setor de medicamentos fitoterápicos registra aumento anual de cerca de 15%, enquanto o de medicamentos sintéticos não ultrapassa de 4% (Carvalho et al., 2008). Nos EUA, por exemplo, onde os produtos derivados de plantas são comercializados principalmente como suplementos dietéticos, o mercado cresceu de US\$ 2,9 bilhões em 1995 para US\$ 4,8 bilhões em 2008 (Khan et al., 2012). No Brasil é estimado que esse comércio movimente cerca de US\$ 160 milhões/ano (Carvalho et al., 2008).

Esse panorama está associado a diversos fatores que vão desde o estímulo ao uso de plantas medicinais para os cuidados primários de saúde (Samy et al., 2010) à maior credibilidade aos produtos, possibilitada pela regulamentação e fiscalização realizada por órgãos competentes. Entretanto, esta tendência à maior procura por estes produtos representa um desafio técnico-científico considerável na área de controle de qualidade de plantas medicinais e derivados, uma vez que a qualidade destes é diretamente relacionada à segurança e à eficácia (Kahn et al. 2008). O fato pode ser agravado, e torna-se um fator limitante para utilização de plantas como matéria-prima pelas indústrias, quando não há descrição em códigos oficiais (Formulários e Farmacopeias) e/ou ausência de estudos científicos adequados sobre muitas delas.

Comparativamente com os medicamentos alopáticos, a avaliação da qualidade e segurança dos produtos vegetais é mais complexa. No caso dos fármacos, as propriedades físico-químicas são totalmente caracterizadas antes mesmo do desenvolvimento tecnológico e dos ensaios clínicos. Adicionalmente, o medicamento é produzido sob rigorosas diretrizes com mínimas possibilidades de desvio de qualidade.

Em contraponto, para os fitoterápicos, as matérias-primas muitas vezes são cultivadas em condições diversas, em diferentes localizações geográficas, colhidas em diferentes épocas e, muitas vezes, processadas com espécies ou variedades usadas erroneamente (Kahn et al., 2008). Essas inconstâncias têm influência direta sobre a composição química e qualidade da matéria-prima.

O amplo conhecimento fitoquímico do produto deve ser o primeiro passo para garantir a qualidade e segurança das matérias-primas vegetais (Kahn et al., 2008). Nesse sentido, no ano de 2006 foram publicadas duas políticas para o setor de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). Ambas apresentam dentre as suas diretrizes o incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento relacionado ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos, com o objetivo de disponibilizar à população produtos com qualidade, segurança e eficácia priorizando a biodiversidade e ao desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional (Brasil, 2006).

Como ação integrante dessas políticas públicas de saúde, soma-se a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus), a qual apresenta uma lista com 71 espécies que possuem potencial para gerar produtos de interesse ao SUS. Nesta seleção, foram priorizadas plantas nativas ou exóticas adaptadas, amplamente utilizadas pela população brasileira e que já têm algumas evidências para indicação de uso na atenção básica à saúde. O objetivo deste documento é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a utilização segura e eficaz de plantas medicinais e fitoterápicos na Assistência Farmacêutica Básica (BRASIL, 2009, 2010).

Todavia, estudos sobre composição química e avaliação de atividades biológicas que justifiquem a utilização de uma variedade de insumos vegetais são necessários, uma vez que são escassos ou inexistentes para muitas dessas espécies vegetais. Além disso, é indispensável o estabelecimento de parâmetros de qualidade e estabilidade de matérias-primas vegetais para que a segurança e eficácia sejam assegurados.

Neste contexto, é possível destacar a espécie *Solidago chilensis* Meyer que, no Brasil, é popularmente conhecida como arnica-brasileira, erva-lanceta, arnica-do-mato, arnica-silvestre, espiga-ouro, lanceta, macela-miúda e

marcela-miúda. A espécie cresce abundantemente nos domínios geográficos da Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (Teles et al., 2010) e sua relevância na medicina popular é reconhecida pelo uso no tratamento de distúrbios gástricos, úlceras intestinais, inflamações, reumatismo, além do emprego como diurético e analgésico (Russo et al., 2008 ; Goulart et al., 2007). Estudos farmacológicos realizados com diversos extratos evidenciaram o grande potencial para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos e necessidade de aprofundamento nos estudos químicos, farmacológicos e clínicos.

Desta forma, este trabalho teve como alvo o desenvolvimento de metodologias validadas que permitiram a identificação e quantificação de marcadores químicos, além de estudos de estabilidade e desenvolvimento tecnológico de extratos padronizados, essenciais para a garantia da qualidade e para permitir na sequência, estudos de segurança e eficácia. Posteriormente, a ação gastroprotetora do extrato padronizado foi experimentada *in vivo*. Adicionalmente, foi realizado o estudo de viabilidade de obtenção de forma farmacêutica comprimidos.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Esta tese teve como escopo a investigação, caracterização química e o estabelecimento de parâmetros de controle de qualidade para as inflorescências de *Solidago chilensis*, bem como desenvolvimento de extratos secos padronizados, com posterior avaliação de ação gastroprotetora e estudo de viabilidade tecnológica de obtenção de comprimidos a partir extrato seco.

2. Objetivos específicos

- Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de extratos obtidos de inflorescências de *S. chilensis*.
- Estabelecimento de *fingerprint* ótimo.
- Identificação dos constituintes químicos presentes nas inflorescências.
- Estabelecer marcador químico para a espécie identificando-o por métodos espectroscópicos e/ou comparação com amostras referência.
- Determinar parâmetros físico-químicos para a droga vegetal.
- Realizar análise quantitativa do marcador químico utilizando método analítico validado.
- Desenvolver e caracterizar extratos secos por aspensão (*spray drying*).
- Determinar quantitativamente o teor do marcador químico nos extratos secos.
- Avaliar a atividade gastroprotetora do extrato padronizado.
- Avaliar a viabilidade de obtenção de comprimidos a partir de extrato seco padronizado.

1.1 Gênero *Solidago*

O gênero *Solidago*, família Asteraceae, agrupa cerca de 100 espécies que crescem naturalmente nos continentes americano, europeu, asiático e no norte da África. Fenotipicamente, em especial na época de floração, as espécies são muito semelhantes e genericamente denominadas de “*Golden rod*” (vara de ouro) (Centeno 2003; Russo et al., 2008).

Considerando-se os dados científicos atuais, podem ser destacadas as espécies *Solidago virgaurea* L. (nativa da Europa e Ásia), *Solidago gigantea* L., *Solidago odora* Aint e *Solidago canadensis* L. (nativas da América do Norte) como os exemplares mais importantes por possuírem aplicações terapêuticas reconhecidas e serem aceitas em importantes órgãos europeus como a ESCOP e Comissão E (Centeno, 2003; Melzing, 2004; Choi et al., 2005; Russo et al., 2008).

Inicialmente as sumidades de *S. gigantea* e *S. canadensis* eram consideradas adulteração de *S. virgaurea*, uma vez que esta possui disponibilidade limitada. Posteriormente, a Comissão E considerou que as três espécies e híbridos são drogas vegetais terapeuticamente intercambiáveis pela presença dos mesmos grupos químicos (saponinas, flavonoides, terpenos). Desta forma, no comércio europeu, a mistura das três espécies passou a ser disponibilizada com a licença germânica. No entanto, essa indistinção não foi consensual entre as autoridades sanitárias de países europeus, o que resultou em diferentes formas de apresentação comercial para a droga. Apesar do uso indistinto, atualmente, é possível adquirir no comércio europeu a *Solidaginis virgaurea herba*= *European goldenrod herba* (*S. virgaurea*) e a *Solidaginis herba* = *Goldenrod herba* (mistura de *S. canadensis*, *S. gigantea* e híbridos ou mistura das espécies) (Blumenthal, 2000; Centeno, 2003). Tanto a *S. virgaurea*, a *S. canadensis* bem como a mistura de *S. canadensis* e *S. gigantea*, possuem critérios químicos de diferenciação definidos por monografias farmacopeicas (Farmacopeia Britânica, 2009). No Brasil, é relatada somente a ocorrência de *Solidago chilensis*, que também pode ser encontrada no Chile e na Argentina (Russo et al., 2008; Teles et al., 2010).

Recentemente, diversos estudos químicos e farmacológicos têm sido realizados com espécies de *Solidago*. Mais de 190 compostos pertencentes

aos grupos: fenóis, saponinas, flavonoides, terpenos e esteroides foram identificados. Além disso, experimentos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado diversas atividades tais como imunomodulação, antitumoral, analgésica, anti-inflamatória e efeito de gastroproteção. Estes estudos serão avaliados detalhadamente nesta revisão.

Considerando-se a importância do gênero e da necessidade de literatura que inclua informações completas e agrupadas, na atual revisão, realizou-se análise abrangente sobre a ocorrência das espécies, etnofarmacologia, fitoquímica, atividades farmacológicas e toxicologia das espécies de *Solidago*.

1.1.2 Ocorrência

O gênero *Solidago*, família Asteraceae, possui cerca de 100 espécies que crescem naturalmente nas Américas, Europa, Ásia e norte da África. Na Tabela 1 são descritas as espécies aceitas, de acordo com o *site* The Plant List (<http://www.theplantlist.org>), acessado em 24/05/2014, além das sinonímias reconhecidas e locais de ocorrência. Ainda, de acordo com o The Plant List, existem mais 53 subespécies e híbridos aceitos para o gênero.

Quadro 1.1: Espécies de *Solidago*, sinonímias aceitas e região de ocorrência de acordo com o *The Plant List* (<http://www.theplantlist.org>).

Espécie	Sinônimo	Ocorrência
<i>Solidago albopilosa</i> E.L.Braun; <i>Solidago altiplanities</i> C.E.S.Taylor & R.John Taylor		USA
<i>Solidago altissima</i> L.	<i>Solidago altissima</i> var. <i>altissima</i> ; <i>Solidago altissima</i> subsp. <i>Altissima</i> ; <i>Solidago altissima</i> var. <i>pluricephala</i> M.C.Johnst.; <i>Solidago altissima</i> var. <i>procera</i> (Aiton) Fernald; <i>Solidago hirsutissima</i> Mill.; <i>Solidago lunellii</i> Rydb.; <i>Solidago scabra</i> Muhl. ex Willd.	Asia-Temperate, Taiwan, North-Central Pacific, Hawaii, Canada, U.S.A , Mexico
<i>Solidago amplexicaulis</i> Torr. & A.Gray	<i>Aster amplexicaulis</i> (Torr. & A.Gray) Kuntze	-
<i>Solidago arenicola</i> B.R.Keener & Kral		USA
<i>Solidago argentinensis</i> López Laphitz, Rita María & Semple		Argentina
<i>Solidago arguta</i> Aiton	<i>Aster arguta</i> (Aiton) Kuntze; <i>Solidago arguta</i> var. <i>arguta</i> ; <i>Solidago arguta</i> subsp. <i>Arguta</i> ; <i>Solidago arguta</i>	USA, Canadá, Asia
<i>Solidago aurea</i> Spreng.	<i>Aster aureus</i> D.Don	

<i>Solidago auriculata</i> Shuttlew. ex S.F.Blake	<i>Solidago amplexicaulis</i> Torr. & A.Gray ex Chapm.; <i>Solidago amplexicaulis</i> Torr. & A.Gray ex A.Gray; <i>Solidago notabilis</i> Mack. ex Small; <i>Solidago notabilis</i> Mack.	USA
<i>Solidago bartramiana</i> Fernald	<i>Solidago canadensis</i> var. <i>bartramiana</i> Beaudry	Canadá
<i>Solidago bicolor</i> L.	<i>Aster bicolor</i> (L.) Nees; <i>Aster bicolor</i> var. <i>bicolor</i> ; <i>Aster pubens</i> (M.A.Curtis ex Torr. & A.Gray) Kuntze; <i>Solidago alba</i> Mill.; <i>Solidago bicolor</i> var. <i>bicolor</i> ; <i>Solidago bicolor</i> f. <i>bicolor</i> ; <i>Solidago curtisii</i> var. <i>pubens</i> (M.A.Curtis ex Torr. & A.Gray) A.Gray; <i>Solidago pubens</i> M.A.Curtis; <i>Solidago pubens</i> M.A.Curtis ex Torr. & A.Gray	USA, Canadá
<i>Solidago brachyphylla</i> Chapm. ex Torr. & A.Gray	<i>Solidago pallescens</i> Mohr; <i>Solidago boottii</i> var. <i>brachyphylla</i> (Chapm. ex Torr. & A.Gray) A.Gray	USA
<i>Solidago buckleyi</i> Torr. & A.Gray	<i>Aster buckleyi</i> (Torr. & A.Gray) Kuntze	USA
<i>Solidago caesia</i> L.	<i>Aster caesius</i> (L.) Kuntze; <i>Solidago axillaris herb.banks</i> ex Pursh; <i>Solidago caesia</i> var. <i>axillaris</i> (Pursh) A.Gray; <i>Solidago caesia</i> var. <i>caesia</i> ; <i>Solidago caesia</i> f. <i>caesia</i> ; <i>Solidago caesia</i> var. <i>paniculata</i> A.Gray; <i>Solidago gracilis</i> hort.par. ex Poir.; <i>Solidago lateriflora</i> Raf. ex DC.	USA, Canadá
<i>Solidago calcicola</i> (Fernald) Fernald	<i>Solidago virgaurea</i> var. <i>calcicola</i> Fernald	USA, Canadá
<i>Solidago californica</i> Nutt.	<i>Solidago californica</i> var. <i>californica</i>	USA
<i>Solidago canadensis</i> L.	<i>Aster canadensis</i> (L.) Kuntze; <i>Doria canadensis</i> (L.) Lunell; <i>Solidago canadensis</i> subsp. <i>altissima</i> (L.) O.Bolòs & Vigo; <i>Solidago canadensis</i> f. <i>canadensis</i> ; <i>Solidago canadensis</i> subsp. <i>Canadensis</i> ; <i>Solidago canadensis</i> var. <i>canadensis</i> ; <i>Solidago hirsutissima</i> var. <i>hirsutissima</i>	Oceania, Europe, Moldavia, U.S.A
<i>Solidago chilensis</i> Meyen	<i>Aster polyglossa</i> Kuntze; <i>Aster polyglossa</i> Kuntze; <i>Solidago bonariensis</i> D.Don ex Baker; <i>Solidago chilensis</i> var. <i>chilensis</i> ; <i>Solidago coquimba</i> Phil.; <i>Solidago linearifolia</i> DC.; <i>Solidago linearifolia</i> var. <i>brachypoda</i> Speg.; <i>Solidago linearifolia</i> var. <i>linearifolia</i> ; <i>Solidago marginella</i> DC.; <i>Solidago marginella</i> var. <i>marginella</i> ; <i>Solidago marginella</i> var. <i>sublanceolata</i> DC.; <i>Solidago microglossa</i> DC.; <i>Solidago microglossa</i> var. <i>linearifolia</i> (DC.) Baker; <i>Solidago microglossa</i> var. <i>megapotamica</i> DC.; <i>Solidago microglossa</i> var. <i>microglossa</i> ; <i>Solidago nitidula</i> Mart. ex Baker; <i>Solidago odora</i> Hook. & Arn.; <i>Solidago odora</i> var. <i>odora</i> ; <i>Solidago polyglossa</i> DC. ; <i>Solidago repens</i> D.Don ex Baker; <i>Solidago vulneraria</i> Mart. ex Baker	Brasil, Bolívia, Chile, Argentina
<i>Solidago compacta</i> Turcz.		Russia, Alaska
<i>Solidago confinis</i> A.Gray	<i>Aster confinis</i> (A.Gray) Kuntze, <i>Solidago confinis</i> f. <i>confinis</i> ; <i>Solidago confinis</i> var. <i>confinis</i> ; <i>Solidago confinis</i> var. <i>luxurians</i> (H.M.Hall) Jeps.; <i>Solidago confinis</i> f. <i>luxurians</i> H.M.Hall; <i>Solidago spectabilis</i> var. <i>confinis</i> (A.Gray) Cronquist	USA

<i>Solidago curtisii</i> Torr. & A.Gray	<i>Solidago ambigua</i> var. <i>curtisii</i> (Torr. & A.Gray) Alph.Wood; <i>Solidago caesia</i> var. <i>curtisii</i> (Torr. & A.Gray) C.E.S.Taylor & R.John Taylor; <i>Solidago caesia</i> var. <i>hispidula</i> Alph.Wood; <i>Solidago curtisii</i> var. <i>curtisii</i>	USA
<i>Solidago decurrens</i> Lour	<i>Solidago decurrens</i> f. <i>decurrens</i> ; <i>Solidago decurrens</i> f. <i>paludosa</i> (Honda) Kitam; <i>Solidago pacifica</i> Juz.; <i>Solidago pubescens</i> Wall.; <i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>coreana</i> (Nakai) Kitag.; <i>Solidago virgaurea</i> var. <i>glabriuscula</i> C.B.Clarke; <i>Solidago virgaurea</i> var. <i>paludosa</i> Honda; <i>Solidago virgaurea</i> var. <i>pubescens</i> C.B.Clarke	China, India, Japan, Laos, Nepal, North Korea, Philippines, South Korea, Vietnam, Himalaya.
<i>Solidago delicatula</i> Small	<i>Solidago helleri</i> Small; <i>Solidago microphylla</i> (A.Gray) Engelm. ex Small; <i>Solidago ulmifolia</i> var. <i>microphylla</i> A.Gray	USA
<i>Solidago durangensis</i> G.L.Nesom		Mexico
<i>Solidago erecta</i> Pursh	<i>Solidago porteri</i> Small; <i>Solidago speciosa</i> var. <i>erecta</i> (Banks ex Pursh) MacMill.	USA
<i>Solidago ericamerioides</i> G.L.Nesom		Mexico
<i>Solidago fistulosa</i> Mill.	<i>Solidago aspericaulis</i> A.H.Moore; <i>Solidago fistulosa</i> f. <i>fistulosa</i>	-
<i>Solidago flexicaulis</i> L.	<i>Solidago flexicaulis</i> var. <i>ciliata</i> DC.; <i>Solidago flexicaulis</i> f. <i>flexicaulis</i> ; <i>Solidago flexicaulis</i> var. <i>flexicaulis</i> ; <i>Solidago flexicaulis</i> var. <i>latifolia</i> (L.) Pursh; <i>Solidago latifolia</i> L.; <i>Solidago scrophulariifolia</i> Mill.	USA
<i>Solidago gattingeri</i> Chapm. ex A.Gray	<i>Solidago missouriensis</i> var. <i>pumila</i> Chapm.	USA
<i>Solidago gigantea</i> Aiton	<i>Solidago cleliae</i> DC.; <i>Solidago dumetorum</i> Lunell; <i>Solidago gigantea</i> subsp. <i>Gigantea</i> ; <i>Solidago gigantea</i> var. <i>gigantea</i> ; <i>Solidago gigantea</i> var. <i>pitcheri</i> (Nutt.) Shinnery; <i>Solidago gigantea</i> subsp. <i>serotina</i> (Kuntze) McNeill; <i>Solidago gigantea</i> var. <i>serotina</i> (Kuntze) Cronquist; <i>Solidago gigantea</i> var. <i>shinneryi</i> Beaudry; <i>Solidago</i> × <i>leiophallax</i> Friesner; <i>Solidago pitcheri</i> Nutt.; <i>Solidago serotina</i> Aiton; <i>Solidago serotina</i> var. <i>gigantea</i> (Aiton) A.Gray; <i>Solidago serotina</i> var. <i>minor</i> Hook.; <i>Solidago serotina</i> var. <i>serotina</i> ; <i>Solidago serotina</i> f. <i>serotina</i> ; <i>Solidago serotinoidea</i> Á.Löve & D.Löve; <i>Solidago shinneryi</i> (Beaudry) Beaudry; <i>Solidago somesii</i> Rydb.	Canada; Europe; New Zealand; USA
<i>Solidago glabra</i> Desf.		Colombia
<i>Solidago glomerata</i> Michx.	<i>Actipasis glomerata</i> Raf.; <i>Actipasis squamosa</i> Raf.; <i>Aster glomeratus</i> (Michx.) Kuntze	USA
<i>Solidago hintoniorum</i> G.L.Nesom		Mexico

<i>Solidago hispida</i> Muhl. ex Willd.	<i>Aster bicolor</i> var. <i>lanatus</i> (Hook.) Kuntze; <i>Solidago bicolor</i> var. <i>concolor</i> Torr. & A.Gray; <i>Solidago bicolor</i> var. <i>hispida</i> (Muhl. ex Willd.) "Britton, Sterns & Poggenb.; <i>Solidago bicolor</i> var. <i>lanata</i> (Hook.) A.Gray; <i>Solidago bicolor</i> var. <i>luteola</i> Farw.; <i>Solidago bicolor</i> var. <i>ovalis</i> Farw.; <i>Solidago bicolor</i> var. <i>spathulata</i> Farw.; <i>Solidago bicolor</i> var. <i>tonsa</i> (Fernald) B.Boivin; <i>Solidago earlei</i> Small; <i>Solidago hirsuta</i> Nutt.; <i>Solidago hispida</i> var. <i>arnoglossa</i> Fernald; <i>Solidago hispida</i> var. <i>disjuncta</i> Fernald; <i>Solidago hispida</i> var. <i>hispida</i> ; <i>Solidago hispida</i> var. <i>huronensis</i> Semple; <i>Solidago hispida</i> var. <i>lanata</i> (Hook.) Fernald; <i>Solidago hispida</i> var. <i>tonsa</i> Fernald; <i>Solidago lanata</i> Hook.	Canada, USA
<i>Solidago houghtonii</i> Torr. & A.Gray	<i>Aster houghtonii</i> (Torr. & A.Gray) Kuntze; <i>Oligoneuron houghtonii</i> (Torr. & A.Gray ex A.Gray) G.L.Nesom	USA
<i>Solidago humilis</i> Mill.	<i>Solidago humilis</i> var. <i>humilis</i>	
<i>Solidago inornata</i> Lunell	<i>Doria inornata</i> (Lunell) Lunell	USA
<i>Solidago juliae</i> G.L.Nesom	<i>Solidago altissima</i> var. <i>canescens</i> (A.Gray) M.C.Johnst.; <i>Solidago canadensis</i> var. <i>canescens</i> A.Gray	Mexico, USA
<i>Solidago juncea</i> Aiton	<i>Aster ciliaris</i> Kuntze; <i>Solidago arguta</i> var. <i>juncea</i> (Aiton) Torr. & A.Gray; <i>Solidago arguta</i> var. <i>scabrella</i> Torr. & A.Gray; <i>Solidago juncea</i> var. <i>juncea</i> ; <i>Solidago juncea</i> f. <i>juncea</i> ; <i>Solidago juncea</i> var. <i>neobohemica</i> Fernald; <i>Solidago juncea</i> var. <i>ramosa</i> Porter & Britton; <i>Solidago juncea</i> var. <i>scabrella</i> (Torr. & A.Gray) A.Gray	Canada, USA
<i>Solidago kralii</i> Semple		USA
<i>Solidago kuhistanica</i> Juz.		Europe
<i>Solidago kurilensis</i> Juz.	<i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>kurilensis</i> (Juz.) Vorosch.	Altay; West Siberia.
<i>Solidago lancifolia</i> (Torr. & A.Gray) Cham.	<i>Solidago ambigua</i> var. <i>lancifolia</i> Torr. & A.Gray	-
<i>Solidago latissimifolia</i> Mill.	<i>Aster latissimifolius</i> (Mill.) Kuntze; <i>Aster latissimifolius</i> var. <i>confertiflorus</i> Kuntze; <i>Aster latissimifolius</i> var. <i>latissimifolius</i> ; <i>Aster sublitoralis</i> (Torr. & A.Gray) Kuntze; <i>Dasiorima elliotii</i> Raf.; <i>Solidago edisoniana</i> Mack.; <i>Solidago elliotii</i> Torr. & A.Gray; <i>Solidago elliotii</i> var. <i>ascendens</i> Fernald; <i>Solidago elliotii</i> var. <i>divaricata</i> Fernald; <i>Solidago elliotii</i> var. <i>edisoniana</i> (Mack.) Fernald; <i>Solidago elliotii</i> var. <i>elliotii</i> ; <i>Solidago elliotii</i> var. <i>pedicellata</i> Fernald <i>Solidago elliptica</i> Elliott; <i>Solidago elliptica</i> Aiton; <i>Solidago mirabilis</i> Small	Canada, USA
<i>Solidago leavenworthii</i> Torr. & A.Gray	<i>Aster leavenworthii</i> (Torr. & A.Gray) Kuntze	USA
<i>Solidago leiocarpa</i> DC.	<i>Solidago cutleri</i> Fernald / <i>Solidago virgaurea</i> var. <i>alpina</i> Bigelow	USA
<i>Solidago ludoviciana</i> (A.Gray) Small	<i>Solidago arguta</i> var. <i>strigosa</i> (Small) Steyerm.; <i>Solidago boottii</i> var. <i>ludoviciana</i> A.Gray; <i>Solidago strigosa</i> Small	USA

<i>Solidago macrophylla</i> Banks ex Pursh	<i>Solidago macrophylla</i> var. <i>macrophylla</i> ; <i>Solidago macrophylla</i> f. <i>macrophylla</i> ; <i>Solidago macrophylla</i> var. <i>thyrsoidea</i> (E.Mey.) Fernald; <i>Solidago mensalis</i> Fernald; <i>Solidago thyrsoidea</i> E.Mey.	Canada, USA
<i>Solidago macvaughii</i> G.L.Nesom		Mexico
<i>Solidago minutissima</i> (Makino) Kitam.	<i>Solidago virgaurea</i> var. <i>minutissima</i> Makino <i>Solidago virgaurea</i> var. <i>yakusimensis</i> Nakai <i>Solidago yakusimensis</i> (Nakai) Masam.	Japão
<i>Solidago missouriensis</i> Nutt.	<i>Solidago duriuscula</i> Greene; <i>Solidago glaberrima</i> M.Martens; <i>Solidago glaberrima</i> var. <i>glaberrima</i> ; <i>Solidago glaberrima</i> var. <i>montana</i> (A.Gray) Lunell; <i>Solidago glaberrima</i> var. <i>moritura</i> (E.S.Steele) E.J.Palmer & Steyerf.; <i>Solidago glaucophylla</i> Rydb. <i>Solidago hapemaniana</i> Rydb.; <i>Solidago marshallii</i> Rothr.; <i>Solidago missouriensis</i> var. <i>extraria</i> A.Gray; <i>Solidago missouriensis</i> var. <i>fasciculata</i> Holz.; <i>Solidago missouriensis</i> var. <i>glaberrima</i> (M.Martens) Rosend. & Cronquist; <i>Solidago missouriensis</i> var. <i>missouriensis</i> ; <i>Solidago missouriensis</i> var. <i>montana</i> A.Gray; <i>Solidago missouriensis</i> var. <i>tenuissima</i> (Wooton & Standl.) C.E.S.Taylor & R.John Taylor; <i>Solidago missouriensis</i> var. <i>tolmieana</i> (A.Gray) Cronquist; <i>Solidago moritura</i> E.S.Steele; <i>Solidago tenuissima</i> Wooton & Standl.; <i>Solidago tolmieana</i> A.Gray	Canada, Vietnam, USA
<i>Solidago mollis</i> Bartl.	<i>Solidago incana</i> Torr. & A.Gray; <i>Solidago mollis</i> var. <i>angustata</i> Shinnery; <i>Solidago mollis</i> var. <i>mollis</i> ; <i>Solidago nemoralis</i> var. <i>incana</i> (Torr. & A.Gray) A.Gray; <i>Solidago nemoralis</i> var. <i>mollis</i> (Bartl.) A.Gray	Canada, USA
<i>Solidago moseleyi</i> Fernald	<i>Euthamia graminifolia</i> (L.) Nutt..	USA
<i>Solidago multiradiata</i> Aiton.	<i>Solidago algida</i> Piper; <i>Solidago ciliosa</i> Greene; <i>Solidago cusickii</i> Piper; <i>Solidago dilatata</i> A.Nelson; <i>Solidago multiradiata</i> var. <i>arctica</i> (DC.) Fernald; <i>Solidago multiradiata</i> subsp. <i>multiradiata</i> ; <i>Solidago multiradiata</i> var. <i>multiradiata</i> ; <i>Solidago multiradiata</i> subsp. <i>scopulorum</i> (A.Gray) W.A.Weber; <i>Solidago multiradiata</i> var. <i>scopulorum</i> A.Gray; <i>Solidago rubra</i> Rydb.; <i>Solidago scopulorum</i> (A.Gray) A.Nelson Synonym L; <i>Solidago virgaurea</i> var. <i>arctica</i> DC.; <i>Solidago virgaurea</i> var. <i>multiradiata</i> (Aiton) Torr. & A.Gray	-
<i>Solidago nana</i> Nutt.	<i>Aster nanus</i> (Nutt.) Kuntze / <i>Solidago nivea</i> Rydb.	USA
<i>Solidago nemoralis</i> Aiton	<i>Aster hispidus</i> (Muhl. ex Willd.) Kuntze; <i>Solidago nemoralis</i> var. <i>arenicola</i> E.S.Burgess; <i>Solidago nemoralis</i> var. <i>elongata</i> Peck; <i>Solidago nemoralis</i> var. <i>haleana</i> Fernald; <i>Solidago nemoralis</i> f. <i>nemoralis</i> ; <i>Solidago nemoralis</i> var. <i>nemoralis</i> ; <i>Solidago nemoralis</i> subsp. <i>nemoralis</i>	Canadá, U.S.A
<i>Solidago nitida</i> Torr. & A.Gray	<i>Oligoneuron nitidum</i> (Torr. & A.Gray) Small	USA

<i>Solidago odora</i> Aiton	<i>Aster odoratus</i> (Aiton) Kuntze; <i>Solidago odora</i> var. <i>inodora</i> A.Gray; <i>Solidago odora</i> subsp. <i>Odora</i> ; <i>Solidago odora</i> var. <i>odora</i> ; <i>Solidago odora</i> f. <i>odora</i> ; <i>Solidago suaveolens</i> Schöpf	USA
<i>Solidago orientalis</i> G.L.Nesom	<i>Solidago wrightii</i> var. <i>orientalis</i> G.L.Nesom	Mexico
<i>Solidago ouachitensis</i> C.E.S.Taylor & R.John Taylor		USA
<i>Solidago ovata</i> Friesner		USA
<i>Solidago paniculata</i> DC.	<i>Aster hemsleyi</i> Kuntze	Mexico
<i>Solidago patagonica</i> Phil.		Argentina, Chile
<i>Solidago patula</i> Muhl. ex Willd.	<i>Aster asperatus</i> Kuntze; <i>Solidago patula</i> var. <i>macra</i> Farw.; <i>Solidago patula</i> var. <i>patula</i> ; <i>Solidago patula</i> subsp. <i>Patula</i>	USA, China
<i>Solidago perornata</i> Lunell	<i>Doria perornata</i> (Lunell) Lunell	USA
<i>Solidago petiolaris</i> Aiton	<i>Aster lindheimeranus</i> (Scheele) Kuntze; <i>Aster petiolaris</i> (Aiton) Kuntze; <i>Solidago angusta</i> Torr. & A.Gray; <i>Solidago lindheimeriana</i> Scheele; <i>Solidago milleriana</i> Mack. ex Small; <i>Solidago milleriana</i> Mack.; <i>Solidago petiolaris</i> var. <i>angusta</i> (Torr. & A.Gray) A.Gray; <i>Solidago petiolaris</i> var. <i>petiolaris</i> ; <i>Solidago petiolaris</i> var. <i>squarrosa</i> Torr. & A.Gray; <i>Solidago petiolaris</i> var. <i>wardii</i> (Britton) Fernald; <i>Solidago squarrosa</i> (Torr. & A.Gray) Alph.Wood; <i>Solidago wardii</i> Britton	USA
<i>Solidago pinetorum</i> Small; <i>Solidago plumosa</i> Small		USA
<i>Solidago pringlei</i> Fernald		Mexico
<i>Solidago puberula</i> Nutt.	<i>Solidago puberula</i> var. <i>borealis</i> Vict.; <i>Solidago puberula</i> var. <i>expansa</i> Vict.; <i>Solidago puberula</i> var. <i>puberula</i> ; <i>Solidago puberula</i> subsp. <i>Puberula</i> ; <i>Solidago puberula</i> f. <i>puberula</i>	Canadá, U.S.A
<i>Solidago pulchra</i> Small		USA
<i>Solidago radula</i> Nutt.	<i>Aster decemflora</i> Nutt.; <i>Aster decemflorus</i> Kuntze; <i>Solidago decemflora</i> A.Gray; <i>Solidago laeta</i> Greene; <i>Solidago pendula</i> Small; <i>Solidago radula</i> var. <i>laeta</i> (Greene) Fernald; <i>Solidago radula</i> var. <i>radula</i> ; <i>Solidago radula</i> var. <i>rotundifolia</i> (DC.) A.Gray; <i>Solidago radula</i> var. <i>stenolepis</i> Fernald; <i>Solidago rotundifolia</i> DC., <i>Solidago scaberrima</i> Torr. & A.Gray	Canadá, U.S.A
<i>Solidago riddellii</i> Frank ex Riddell	<i>Aster riddellii</i> (Frank ex Frank) Kuntze; <i>Oligoneuron riddellii</i> Rydb.; <i>Solidago amplexicaulis</i> M.Martens	Canadá, U.S.A
<i>Solidago rigida</i> L.	<i>Aster rigidus</i> (L.) Kuntze; <i>Aster rigidus</i> subsp. <i>rigidus</i> ; <i>Oligoneuron grandiflorum</i> (Raf.) Small; <i>Oligoneuron rigidum</i> (L.) Small; <i>Oligoneuron rigidum</i> var. <i>rigidum</i> ; <i>Solidago grandiflora</i> Raf.; <i>Solidago rigida</i> var. <i>magna</i> Clute; <i>Solidago rigida</i> var. <i>microcephala</i> DC.; <i>Solidago rigida</i> subsp. <i>rigida</i> ; <i>Solidago rigida</i> var. <i>rigida</i>	Canadá, U.S.A

<i>Solidago roanensis</i> Porter	<i>Aster monticolus</i> (Torr. & A.Gray) Kuntze; <i>Solidago alleghaniensis</i> (House) House; <i>Solidago curtisii</i> var. <i>monticola</i> Torr. & A.Gray; <i>Solidago maxonii</i> Pollard; <i>Solidago monticola</i> Jord. ex Boreau; <i>Solidago monticola</i> (Torr. & A.Gray) Chapm.; <i>Solidago roanensis</i> var. <i>monticola</i> (Torr. & A.Gray) Fernald; <i>Solidago roanensis</i> var. <i>roanensis</i> ; <i>Solidago sciaphila</i> E.S.Steele	U.S.A
<i>Solidago rugosa</i> Mill.	<i>Aster archerianus</i> Kuntze; <i>Aster rugosus</i> (Mill.) Kuntze; <i>Solidago rugosa</i> f. <i>rugosa</i>	Canadá, U.S.A
<i>Solidago rupestris</i> Raf.	<i>Aster rupestris</i> (Raf.) Kuntze/ <i>Solidago canadensis</i> var. <i>rupestris</i> (Raf.) Porter	USA
<i>Solidago sempervirens</i> Michx.	<i>Solidago sempervirens</i> var. <i>sempervirens</i> ; <i>Solidago sempervirens</i> f. <i>sempervirens</i>	-
<i>Solidago serotina</i> Retz.	<i>Solidago serotina</i> subsp. <i>Serotina</i>	-
<i>Solidago shortii</i> Torr. & A.Gray	<i>Aster rafinesquii</i> Kuntze	USA
<i>Solidago simplex</i> Kunth	<i>Solidago simplex</i> subsp. <i>Simplex</i>	Canadá, U.S.A
<i>Solidago spathulata</i> DC.	<i>Aster candollei</i> Kuntze; <i>Homopappus spathulatus</i> (DC.) Nutt.; <i>Solidago simplex</i> var. <i>spathulata</i> (DC.) Cronquist; <i>Solidago spathulata</i> subsp. <i>Spathulata</i> ; <i>Solidago spathulata</i> var. <i>spathulata</i> ; <i>Solidago spiciformis</i> Torr. & A.Gray	Canadá, U.S.A
<i>Solidago speciosa</i> A.Gray	<i>Solidago speciosa</i> subsp. <i>pallida</i> (Porter) Semple; <i>Solidago speciosa</i> var. <i>rigidiuscula</i> Torr. & A.Gray; <i>Solidago speciosa</i> var. <i>speciosa</i>]	USA
<i>Solidago spectabilis</i> (D.C.Eaton) A.Gray	<i>Aster rothrockii</i> Kuntze <i>Solidago guiradonis</i> var. <i>spectabilis</i> D.C.Eaton <i>Solidago spectabilis</i> var. <i>spectabilis</i>	USA
<i>Solidago sphacelata</i> Raf.	<i>Brachychaeta cordata</i> (Short & R.Peter) Torr. & A.Gray; <i>Brachychaeta sphacelata</i> (Raf.) Britton; <i>Brachychaeta sphacelata</i> (Raf.) Britton ex Kearney; <i>Brachyris ovatifolia</i> DC.; <i>Solidago cordata</i> Short & Peter; <i>Solidago cordata</i> Short & R. Peter	USA
<i>Solidago spiraeifolia</i> Fisch. ex Herder	<i>Solidago cuprea</i> Juz.; <i>Solidago spiraeifolia</i> var. <i>spiraeifolia</i>	Russian
<i>Solidago spithamaea</i> M.A.Curtis ex A.Gray	<i>Aster spithamaeus</i> (M.A.Curtis ex A.Gray) Kuntze	USA
<i>Solidago squarrosa</i> Muhl..	<i>Solidago squamosa</i> Nutt. ex Hook; <i>Solidago squarrosa</i> var. <i>ramosa</i> Peck; <i>Solidago squarrosa</i> var. <i>squarrosa</i> ; <i>Solidago squarrosa</i> f. <i>squarrosa</i>	Canadá, U.S.A
<i>Solidago stricta</i> Aiton	<i>Aster flavovirens</i> (Chapm.) Kuntze; <i>Aster strictus</i> (Aiton) Kuntze; <i>Solidago chrysopsis</i> Small; <i>Solidago flavovirens</i> Chapm.; <i>Solidago stricta</i> var. <i>angustifolia</i> (Elliott) A.Gray; <i>Solidago stricta</i> var. <i>stricta</i> ; <i>Solidago stricta</i> subsp. <i>stricta</i>	USA, México
<i>Solidago tarda</i> Mackenzie		USA
<i>Solidago tortifolia</i> Elliott	<i>Aster purschianus</i> Kuntze	USA

<i>Solidago uliginosa</i> Nutt.	<i>Solidago chrysolepis</i> Fernald; <i>Solidago farwellii</i> Fernald; <i>Solidago humilis</i> var. <i>abbei</i> B.Boivin; <i>Solidago humilis</i> var. <i>microcephala</i> Porter; <i>Solidago humilis</i> var. <i>peracuta</i> Fernald; <i>Solidago humilis</i> var. <i>reducta</i> Farw.; <i>Solidago klughii</i> Fernald; <i>Solidago linooides</i> Torr. & A.Gray; <i>Solidago neglecta</i> Torr. & A.Gray; <i>Solidago neglecta</i> var. <i>linooides</i> (Torr. & A.Gray) A.Gray; <i>Solidago neglecta</i> var. <i>neglecta</i> ; <i>Solidago neglecta</i> var. <i>simulata</i> Farw.; <i>Solidago neglecta</i> var. <i>uniligulata</i> (DC.); <i>Solidago purshii</i> Porter; <i>Solidago purshii</i> f. <i>purshii</i> ; <i>Solidago purshii</i> var. <i>purshii</i> ; <i>Solidago simulans</i> Fernald; <i>Solidago terrae-novae</i> Torr. & A.Gray; <i>Solidago uliginosa</i> var. <i>levipes</i> (Fernald) Fernald; <i>Solidago uliginosa</i> var. <i>linooides</i> (Torr. & A.Gray) Fernald; <i>Solidago uliginosa</i> var. <i>neglecta</i> (Torr. & A.Gray) Fernald; <i>Solidago uliginosa</i> var. <i>peracuta</i> (Fernald) Friesner; <i>Solidago uliginosa</i> var. <i>terrae-novae</i> (Torr. & A.Gray) Fernald; <i>Solidago uliginosa</i> var. <i>uliginosa</i> ; <i>Solidago uniligulata</i> (DC.) Porter; <i>Solidago uniligulata</i> var. <i>levipes</i> Fernald; <i>Solidago uniligulata</i> var. <i>neglecta</i> (Torr. & A.Gray) Fernald; <i>Solidago uniligulata</i> var. <i>terrae-novae</i> (Torr. & A.Gray) Fernald; <i>Solidago uniligulata</i> var. <i>uniligulata</i> ; <i>Solidago virgaurea</i> var. <i>humilis</i> (Banks ex Pursh) A.Gray	Canadá, U.S.A
<i>Solidago velutina</i> DC.	<i>Aster alamani</i> Kuntze; <i>Aster velutinus</i> (DC.) Kuntze; <i>Solidago arizonica</i> (A.Gray) Wooton & Standl.; <i>Solidago canadensis</i> var. <i>arizonica</i> A.Gray; <i>Solidago scabrida</i> DC.; <i>Solidago trinervata</i> Greene; <i>Solidago velutina</i> subsp. <i>velutina</i> ; <i>Solidago velutina</i> var. <i>velutina</i>	USA
<i>Solidago verna</i> M.A.Curtis ex Torr. & A.Gray	<i>Aster vernus</i> (M.A.Curtis ex Torr. & A.Gray) Kuntze	USA
<i>Solidago villosicarpa</i> LeBlond		USA
<i>Solidago virgaurea</i> L.	<i>Aster virgaurea</i> (L.) Kuntze; <i>Dectis decurrens</i> Raf.; <i>Doria virgaurea</i> Scop.; <i>Solidago cantoniensis</i> Lour.; <i>Solidago corsica</i> (Rouy) A.W.Hill; <i>Solidago minor</i> Mill.; <i>Solidago nudiflora</i> Viv.; <i>Solidago pygmaea</i> Bertol.; <i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>leiocarpa</i> (Benth.) Hultén; <i>Solidago virgaurea</i> var. <i>leiocarpa</i> (Benth.) A.Gray; <i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>nudiflora</i> (Viv.) Nyman; <i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>virgaurea</i> ; <i>Solidago virgaurea</i> var. <i>virgaurea</i> ; <i>Solidago vulgaris</i> Lam.	Europa; Japão; Vietnã; China; Nova Zelandia; Malasia;
<i>Solidago wrightii</i> A.Gray	<i>Solidago bigelovii</i> A.Gray; <i>Solidago bigelovii</i> var. <i>bigelovii</i> ; <i>Solidago bigelovii</i> var. <i>wrightii</i> (A.Gray) A.Gray; <i>Solidago wrightii</i> var. <i>adenophora</i> S.F.Blake; <i>Solidago wrightii</i> var. <i>wrightii</i>	USA
<i>Solidago yokusaiana</i> Makino		Japão

Legenda: (-) região de ocorrência não descrita.

1.1.3 Usos tradicionais

Solidago virgaurea - Uso como diurético e modulador de processos inflamatórios (Abascal et al., 2008), além do emprego em desordens do trato urinário (Sutovská et al., 2013) e como estomáquico na medicina chinesa (Choi et al., 2005).

Solidago canadensis - uso no tratamento da nefrite crônica, cistite, litíase, reumatismo (Centeno, 2003).

Solidago chilensis - Na medicina popular brasileira, infusos e decoctos preparados com as partes aéreas da planta são utilizados para tratar distúrbios gástricos, úlceras intestinais, inflamações, reumatismo, além do emprego como diurético e analgésico e cicatrizante. Já as raízes são consumidas *in natura* pela ação diurética (Morel et al., 2006; Goulart et al., 2007; Russo et al., 2008; Bieski et al., 2012) e, na Amazônia, as folhas são empregadas na preparação de soluções e pomadas usadas para tratar ferimentos de pele e furúnculos (Coelho et al., 1995). Também é utilizada como substituta da *Arnica montana* L., no tratamento de inflamações na pele (Goulart et al., 2007).

1.1.4 Composição química

a) Mono and sesquiterpenos (óleos essenciais)

Solidago chilensis - no óleo essencial obtido das folhas foi identificada a presença de diversos mono e sesquiterpenos tais como; α -pineno, β -pineno, mirceno, α -felandreno, δ -3-careno, limoneno, β -ocimeno, acetofenona, α -pineno, α -camfolenal, sesamol, isolongifoleno, α -1,7-di-*epi*-cedreno, cariofileno, α -humuleno, β -cubebeno, biciclogermacreno, α -farneseno, δ -cadineno, espatulenol, 1,10-di-*epi*-cubenol, 5- α -*epi*-cadinol, cubenol, α -eudesmol, diidroeuodesmol, zizanal, foram relatados. Também, sabineno, linalol, terpin-4-ol, acetato de bornila, *p*-cimen-8-ol, β -bourboneno, α -gurjuneno, β -elemeno, β -gurjuneno, γ -gurjuneno, germacreno D, β -lonono, óxido de cariofileno, nerolidol foram identificados em extratos da espécie (Vila et al., 2002; Morel et al., 2006).

Solidago canadensis - no óleo essencial obtido das folhas foi identificada a presença de 6-*epi*- α -cubebeno (1,5 %) e 6-*epi*- α -cubebeno (20,5 %) (Kasali et al., 2002).

Solidago virgaurea - partes aéreas - α -pineno, mirceno, β -pineno, limoneno, sabineno and germacreno-D (Kalemba et al., 1999).

Solidago gigantea - partes aéreas - α -pineno (7,0/4,1 %), mirceno (2,5/2,6 %), *p*-cimeno (2,2/0,6%), (-)-bornil acetato (4,4/2,9 %), α - (6,1/4,0%) e γ -gurjuneno (2,5/2,1 %) (-)-germacreno D (21,6/23,5 %), (-)-ledol (1,2/2,1 %), eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol (1,9/2,5 %) e (-)-ciclocolorenona (8,1/32,4 %) (Kalemba et al., 2001).

b) Diterpenos e triterpenos

Quadro 1.2: Principais compostos di e triterpenicos identificados no gênero *Solidago*.

Espécie	Composto	Parte	Solvente	Referencia
<i>S. chilensis</i>	Solidagenona (0,83 mg/g); deoxisolidagenona (0,008 mg/g); baurenol (0,25 mg/g);espinasterol (0,36 mg/g)	Rizomas secos	Etanol - Maceração	Torres et al., 1989
	Solidagenona (0,53 mg/g); 6-oxo-9 α , 16diidroxilabda-7,13-dieno-16,15-olideo (0,06 mg/g)	Rizomas secos	Etanol: éter etílico (1:1) - Maceração	Schmeda-Hirschmann et al., 1987
	Solidagenona (3,25 mg/g)	Inflorescências	Etanol: éter etílico (1:1) - Maceração	Valverde-Soares et al., 2009
	α -amirina	Rizomas	Etanol: éter etílico (1:1) - Maceração	Schmeda-Hirschman, 1987
	Pumiloxide	Folhas e inflorescências	Óleo essencial - hidrodestilação	Vila et al., 2002

S. <i>virgaurea</i>	Ácidos solidagoicos C, D, E, F, G, H, I; cleroda-3,13-dien-16,15:18,19-diolideo; cleroda-3,13(14)-dien-15,16:18,19-diolidio	Partes aéreas	Etanol: éter etílico (1:1) - Maceração	Starks et al., 2010
	<i>Trans</i> -fitol; ent-germacra-(15),5,10(14)-trien-1 α -ol; acetato de 13-amirina; ent-germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol, J3-dictiopterol, ácido oleanólico	Partes aéreas	Metanol - Maceração	Choi et al., 2004
S. <i>canadensis</i>	9 alfa-16 Oxi-diidroxi-6-oxo-7,13-labdadien-15,16-olideo (solicanolideo)	Inflorescencias	Metanol	Bradette-Hébert et al., 2008
	9,13,15,16-bisepoxi-labdano-7-eno-6,15-diono/ 13-epi-9,13,15,16-bisepoxi-labdano-7-eno-6,15-diono/ 15,16-epoxi-labdano-7,13-dieno-6,16-dion/ 15-etoxi-9,13,15,16-bisepoxi-labdano-7-eno-6-ono/ 13-epi-15-etoxi-9,13,15,16-bisepoxi-labdane-7-eno-6-ono/ deoxisolidagenona/ solidagenona/ 5,16-epoxi-labdano-7,13-dieno-6,15-diona	Rizomas	Etanol	Wangensten et al., 2012
	Solidagenona	Rizomas	-	Anthonsen et al. (1970)
	Ácidos 6 β -angeloiloxicolavênico e 6 β -tigloiloxicolavênico	Inflorescencias	acetato de etila	Wu et al. 2008
	Lupeol, acetato de lupeila, ácido ursólico, cicloartenol, cicloartenil palmitato, α -amirina acetato, estigmasterol, 3 β -(3R-acetóxi-hexadecanoilóxi)-lup-20(29)-eno, 3 β -(3-cetohexadecanoiloxi)-lup-20(29)-eno, 3 β -(3-cetohexadecanoiloxi)-29-norlupan-20-ona	Rizomas	Metil-etilcetona- Maceração	Chaturvedula et al., 2004

	solidagocaninas A e B, melleina	Partes aéreas	Etanol 80%	Zeng et al 2012
	(9,13,15,16-bisepoxi-labdano-7-ene-6,15-diona; 13-epi-9,13,15,16-bisepoxi-labdano-7-en-6,15-diona; 15,16-epoxi-labdano-7,13-dien-6,16-diona; 15-etoxi-9,13,15,16-bisepoxi-labdano-7-eno-6-ono; 13-epi-15-etoxi-9,13,15,16-bisepoxi-labdano-7-eno-6-ona	Raízes	Etanol	Wangensten et al., 2012
<i>S. arguta</i>	marrubiasideo, ácido (-)-hardwickiico e ácido colavenico	-	-	Andeson et al., 1974; Ferguso et al., 1975.
<i>S. altissima</i>	Triciclosolidagolactona	Folhas	Benzeno	Yamamura et al, 1980.
	Baurenol	Raízes	Metanol	Okano et al., 1983
	Solidagonal e metil esterres; ácido 2oxo-colavenico	Raízes	Éter de petróleo	Bohlmann et al., 1985
	Solidagolactonas IV, V, VII and VIII (1~4, -clerodano diterpenos)	-	-	Manabe et al., 1985
<i>S. rugosa</i>	Ácidos colavenol, hardwickiico; ácido (-)-kaur-16-en-19-oico, (+)-manool, (+)-3 beta-hidroximanool, manoil oxido e ácido <i>ent</i> -abietico, (+)-18-tigloiloximanool.	Raízes e partes aéreas	Diclorometano	Lu et al., 1995

c) Saponinas

Quadro 1.3: Principais saponinas identificadas no gênero *Solidago*

Espécie	Composto	Parte	Solvente	Referencia
<i>S. virgaurea</i>	Saponinas triterpenicas com núcleo oleanano - virgaureossaponinas 1, 2, 3,4,5, 6	Partes aereas	Água	Laurençon et al., 2013; Hiller et at., 1985; Bader et al., 1992; Bader 1995
<i>S. canadensis</i>	Saponinas com núcleo Baiogenina - Canadensissaponinas: 1-4	-	-	Murach et al 1975; Hiller et al., 1983; Reznicek et al., 1991; Reznicek et al., 1992;

Quadro 1.4: Principais flavonoides e ácidos fenólicos identificados no gênero *Solidago*

Espécie	Composto	Parte	Solvente	Referencia
<i>S. chilensis</i>	Rutina	Inflorescências frescas	Etanol - maceração	Tamura et al., 2009
	Quercetrina, rutina, quercetina	Folhas	Etanol - maceração	Torres et al., 1987; Sabir et al., 2012
	Ácidos 5-O-E-,3,4- e 4,5-di-O-E-cafeoilquinicos.	Inflorescências frescas	Etanol - maceração	Tamura et al., 2009
	Ácido gálico	Folhas	Etanol - maceração	Sabir et al., 2012
<i>S. virgaurea</i>	Ácido clorogênico, rutina, hiperosideo, isoquercetrina, quercetrina, afzelina	Partes aéreas	Metanol- soxhlet Infuso - 5 min Decocto - 5 min Tintura (40, 60, 96% v/v) - 6h	Apati et al., 2002; Kristó et al., 2002;

	Ácido gálico	Partes aéreas	Metanol e etanol 96%	Apati et al., 2002; Apati et al., 2006
	Canferol, canferol-3-O-rutinosídeo, metil 3,5-di-O-cafeoilquinato e ácido 3,5-di-O-cafeoilquinico.	Partes aéreas	Metanol - maceração	Choi et al., 2004
	Rutina, canferol-3-O-rutinosídeo, canferol-3-O-robinobiosídeo e isoramnetin-3-O-rutinosídeo	Partes aéreas	Etanol 50%	Pietta et al., 1991
	Astragalina, nicotilorina, leiocarposídeo, virgaureosídeo, ácido cafeico	Partes aéreas	-	Blumenthal, 2000
	Ácidos 5-cafeoilquinico, <i>cis</i> -5-5-cafeoilquinico, 5- <i>p</i> -coumaroilquinico, <i>cis</i> -5- <i>p</i> -coumaroilquinico, 3,5-dicafeiolquinico, <i>cis</i> -3,5-5- <i>p</i> -dicafeiolquinico	Folhas	Metanol	Jaiswall et al., 2011
	Virgaureosídeo A	-	-	Hiller et al., 1985
<i>S. canadensis</i>	Ácidos 3-O-cafeoilquinico, neoclorogênico, 5-O-cafeoilquinico, clorogênico, 4,5-di-O-cafeoilquinico, 3,5-di-O-cafeoilquinico e 3,4-di-O-cafeoilquinico	Inflorescências	Metanol	Bradette-Hébert et al., 2008
	2'-hidroxi-4',6'-di-O-β-D-glicopiranosil-butirrofeno	Partes aéreas	-	Zhang et al., 2007
<i>S. gigantea</i>	quercetina, quercitrina, isoquercitrina e rutina	Folhas	Etil acetato	Kuštrak et al., 1993
<i>S. altissima</i>	canferol 3-O-β-D-	Folhas	Metanol	Wu et al.,

	apiofuranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosideo, quercetina 3-O-D-β-piofuranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosideo, 3-O-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosideo de canferol, astragalina, isoquercitrina, nicotiflorina, rutina			2007
	canferol 3-O-rutinosideo 7-O-β-d-apiofuranosideo, trans-tilirosideo, ácidos cafeico, clorogênico, 3-O-cafeoilquinico, 4-O-cafeoilquinico, -O-coumaroilquinico, 4-O-coumaroilquinico, 3,5-di-O-cafeoilquinico, 4,5-dicafeoilquinico	Folhas	Metanol	Jin et al., 2008
<i>S. altissima</i> L.	acilfloroglucinol glicosideo	Folhas	Metanol	(Wu et al., 2007).

Legenda: (-) Dado não descrito no artigo.

d) Outros metabolitos secundários

Poliacetilenos - Dois poliacetilenos: metil 10-(2-metil-2-butenoiloxi)-*cis*-2, *cis*-8-decadien-4,6-diinoato e desidromatricaria ester foram isolados das raízes de *Solidago altissima* L. (Ichihara et al., 1976).

1.1.5 Propriedades farmacológicas

1.1.5.1 Atividade Anti-inflamatória

Dentre as atividades descritas para o gênero *Solidago*, a ação anti-inflamatória é a que possui maior número de evidências científicas consistentes, pois além de demonstrada em modelos *in vivo* e em estudos clínicos, os mecanismos de ação envolvidos também foram investigados.

Ensaio *in vivo*

Para a *Solidago chilensis*, Goulart e colaboradores (2007) avaliaram a ação anti-inflamatória de infusos preparados a partir dos rizomas, inflorescências e folhas. Os ensaios, com o infuso liofilizado (IL) e as respectivas frações butanólicas (FR ButOH) e aquosa residual, foram realizados em modelo de pleurisia induzida por carragenina. A administração i.p. de doses (10, 25, 50, 100 e 200 mg/kg) evidenciou que os IL das folhas e inflorescências inibiram a migração de leucócitos e neutrófilos e a exsudação ($p < 0,05$) na inflamação induzida por carragenina. Os IL das inflorescências e rizomas e frações butanólicas foram os mais ativos e, em dose de 25 mg/kg, as inibições observadas foram comparáveis ao controle positivo (indometacina 5 mg/kg).

Os IL dos rizomas, FR ButOH e a aquosa residual também inibiram a migração de leucócitos, neutrófilos e a liberação de mieloperoxidase, adenosina-desaminase, TNF α ($p < 0,05$), sendo que o IL e Fr ButOH agiram sobre a exsudação e os níveis de óxido nítrico e interleucina-1 ($p < 0,05$). Estatisticamente, o infuso dos rizomas, fração butanólica e aquosa residual apresentaram atividade mais pronunciada devido à inibição tanto da liberação de mediadores pró-inflamatórios quanto da infiltração de leucócitos e neutrófilos para o sítio da inflamação (Goulart et al., 2007).

Posteriormente, devido aos resultados promissores observados com o extrato dos rizomas, Liz et al., (2008) deram continuidade aos estudos utilizando o modelo de indução de inflamação por bolsa de ar. O extrato, frações butanólica e aquosa residual bem como a posologia seguiram o mesmo protocolo de Goulart et al., (2007). Os resultados demonstraram novamente

que extrato aquoso dos rizomas e suas frações inibiram significativamente a migração de leucócitos e de neutrófilos, a exsudação, a atividade da mieloperoxidase e da adenosina desaminase, bem como os níveis de óxido nítrico, a interleucina-1 beta (IL-1B), quimiocinas (KC) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) ($p < 0,05$). Foram observadas atividades superiores a da indometacina (5 mg/kg) e dexametasona (0,5 g/kg) nas doses de 100 mg/kg de extrato aquoso e de 10 mg/kg na fração butanólica, com inibição de todos os parâmetros inflamatórios estudados ($p < 0,01$). Ao contrário, a indometacina não inibiu os níveis de TNF- α e a dexametasona não inibiu os níveis de KC ($p > 0,05$). Desta forma, os resultados evidenciaram que *Solidago chilensis* tem ação anti-inflamatória com resposta aguda e que a sua atividade está relacionada à inibição de liberação de mediadores pró-inflamatórios e também à redução da infiltração de leucócitos (Liz et al., 2008).

Os efeitos anti-inflamatórios locais e sistêmicos do extrato hidroalcoólico (93 %), obtido por maceração das partes aéreas frescas, foram avaliados por Tamura e colaboradores (2009). As administrações tópicas (12,5-50 mg/kg) e intraperitoneais (25 ou 50 mg/kg) do extrato em ratos demonstraram redução (> 25 %) no edema de orelha. Na dose de 25 mg/kg (i.p.) houve a inibição da migração de células polimorfonucleares em cerca de 50 %, além da redução da aderência dos leucócitos circulantes aos capilares em 50 %. A atividade foi atribuída à presença de derivados do ácido cafeoilquínico e rutina no extrato e os resultados sugerem que o mecanismo de ação esteja relacionado à inibição da interação leucócitos-endotélio vascular.

Espécies que constam em compêndios internacionais são recomendadas para uso interno no tratamento de algumas patologias relacionadas a processos inflamatórios. A ESCOP (2003) recomenda o emprego de infusões das partes aéreas de *S. virgaurea* (*Solidaginis virgaurea herba*) (3-4 g/150 mL) em casos de inflamação e infecção no trato urinário, litíase e como agente diurético. Já a Comissão E aceita o uso das formas comerciais: *Solidaginis virgaureae herba* e *Solidaginis herba* na preparação de infuso (4 g/150 mL) para o tratamento das mesmas patologias, além de reconhecer a ação espasmolítica.

Ensaio realizado com o extrato hidroalcoólico (46 %) de *S. virgaurea*, contendo 0,52 mg/mL de rutina evidenciaram atividades antioxidante e anti-

inflamatória em modelos experimentais de reações bioquímicas (xantina oxidase, lipoxigenase, diidrofolato redutase) (Meyer et al., 1995). *In vivo*, o extrato hidroalcoólico (46 %) foi administrado por via oral (5 ml/kg) nos dias 15 e 21 após a indução de inflamação (artrite em pata de rato). Os resultados indicaram que houve 40 % de inibição no edema em relação ao observado para o controle ($p < 0,05$) (El-Ghazaly et al., 1992; ESCOP, 2003). Também, em modelo de edema em pata de rato induzido por carragenina, o extrato etanólico de *S. gigantea* apresentou ação anti-inflamatória semelhante ao diclofenaco em doses de 3 mg/kg (Leuschner, 1995).

O efeito AI de *S. virgaurea* tem sido associado à presença de flavonoides (Li et al., 2014). O leiocarposídeo, fenol bidesmosídico isolado das inflorescências, apresentou atividade anti-inflamatória e analgésica após a administração subcutânea em roedores. A redução do edema de pata induzido por carragenina, após 5 horas, foi de 20 % para a dose de 100 mg/kg e 27 % para 200 mg/kg ($p < 0,05$), enquanto o padrão positivo fenilbutazona, na dose de 50 mg/kg, reduziu o edema em 54 %. A ação analgésica, verificada no modelo placa quente, demonstrou na dose de 200 mg/kg, efeito similar ao da aminofenazona a 50 mg/kg (Metzner et al., 1984; ESCOP, 2003).

Li e colaboradores (2014) avaliaram a ação dos compostos 2'-metoxibenzil-2 e 6-dimetoxibenzoato, sugerindo uma possível relação destes com a ação AI, uma vez que ambos inibiram os fatores TNF- α e IL-6.

Ensaio clínico

Em estudo clínico realizado com 745 pacientes que apresentavam irritação na bexiga, o tratamento com posologia diária de 3x380 mg de extrato seco de *S. virgaurea* (5:1) demonstrou supressão dos sintomas em taxas de 69 a 85 % após duas semanas do início. A eficácia do extrato seco (5-7:1, etanol 30 %) na posologia diária de 3x425 mg por 4 semanas, também foi avaliada em estudo clínico realizado com 1487 pacientes. Os voluntários foram divididos em 3 subgrupos: portadores de infecção urinária, portadores irritação na bexiga e portadores de cálculo renal (32 % também possuía infecção urinária e 11 % irritação na bexiga). Para o grupo com infecção urinária ($n=555$), o extrato demonstrou atividade somente com o uso simultâneo de antibiótico. O grupo com sintoma de bexiga irritada ($n=512$) não demonstrou melhoras relevantes.

Entretanto, o grupo portador de cálculo renal teve redução de 81 a 98 % dos sintomas (Bauer et al., 2003; ESCOP, 2003).

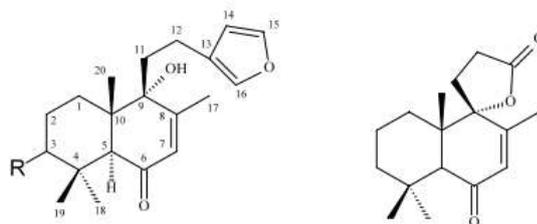
Ensaio clínico duplo-cego placebo-controlado (n=10), realizado com *S. chilensis*, a aplicação tópica do gel a 5 % de extrato etanólico, 2 vezes ao dia, durante 15 dias demonstrou redução significativa da lombalgia e aumento na flexibilidade do grupo tratado em relação ao placebo, o que sugere ação analgésica e anti-inflamatória, além do indicativo de uma possível permeação cutânea dos componentes do extrato (Da Silva et al., 2010).

1.1.5.2 Ação gastroprotetora

O extrato aquoso obtido por infusão das inflorescências de *S. chilensis* demonstrou ação gastroprotetora quando as doses de 125, 250, 400, 800, 1200, e 2000 mg/kg foram administradas, por via oral, a camundongos submetidos ao modelo de úlcera gástrica induzida por etanol. Os resultados evidenciaram atividade gastroprotetora nas doses de 125-2000 mg/kg quando comparadas ao grupo não tratado ($p < 0,05$). Os estudos de toxicidade aguda conduzidos com a dose de 2000 mg/kg não evidenciaram alterações nos parâmetros comportamentais e funcionais da atividade motora (Bucciarelli et al., 2010).

Schmeda-Hirschmann e colaboradores (2002) avaliaram o efeito gastroprotetor da solidagenona, diterpeno labdano isolado dos rizomas e inflorescências de *S. chilensis* (Figura 2). Para tal, os animais foram randomizados em grupos de oito indivíduos e privados de água 24 horas antes do experimento. Cinquenta minutos após a administração oral de solidagenona (50, 100 e 200 mg/kg) ou lansoprazol (20 mg/kg) ou 12% de polissorbato 80 (10 mL/kg), todos os grupos receberam, por via oral, 0,2 ml de solução a 0,3 M de HCl em Etanol a 60 % (HCl/Etanol) para a indução da lesão. Num segundo momento, com o objetivo de avaliar o efeito das modificações estruturais, a solidagenona e derivados semissintéticos foram testados em doses de 100 mg/kg. Desta forma, observou-se efeito gastroprotetor, para a solidagenona e os derivados 2 e 7, comparável ao lansoprazol a 20 mg/kg ($p < 0,05$). Concluiu-se experimentalmente que a presença do anel furano é necessária para a atividade da solidagenona, enquanto a hidroxilação de C6 e C3 resulta em

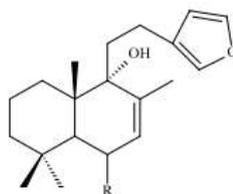
compostos com atividade diferentes e associadas à estereoquímica. Enquanto os derivados 2 e 7 apresentaram atividades superiores a solidagenona, seus epímeros foram inativos.



R

- 1 H
- 2 α OH
- 3 β OH

4



R

- 5 α OH
- 6 α OAc
- 7 β OH

Estrutura química da solidagenona (1) e derivados semissintéticos (2-7) - Schmeda-Hirschmann e colaboradores (2002).

Rodriguez e colaboradores (2002) investigaram o mecanismo de ação gastroprotetor da solidagenona testando-a em doses de 50, 100 e 200 mg/kg nos modelos de indução de lesão por ligadura de piloro e por administração de ácido acetilsalicílico e etanol. Em experimento agudo, a dose de 50 mg/kg de solidagenona apresentou atividade comparável à ranitidina (50 mg/kg) no modelo de ligadura de piloro. Já no segundo modelo, as doses de 100 e 200 mg/kg foram comparáveis à atividade da ranitidina a 50 mg/kg. A lesão causada por etanol é mais ampla do que a induzida por ligadura de piloro, uma vez que envolve mecanismos de destruição de defesas, geração de radicais livres, dissolução do muco protetor e necrose celular, enquanto a segunda ocasiona acúmulo de suco gástrico.

1.1.5.3 Ação diurética

A atividade diurética observada quando administrado o infuso preparado com as partes aéreas de *S. virgaurea* (0,3% flavonoides), nas doses de 10 mL/kg em modelo *in vivo* foi atribuída ao aumento da excreção de sódio, potássio e cloro ($p < 0,01$), (Leuschner, 1995 e ESCOP, 2003). Entretanto, o efeito da tintura preparada com partes aéreas frescas de *S. virgaurea* (65% EtOH) parece não implicar na perda de eletrólitos. Em estudo duplo-cego realizado com 22 voluntários saudáveis, a administração oral de 100 gotas da tintura em dose única provocou acréscimo de 30% no volume de urina do grupo tratado em relação ao grupo placebo (Bauer et al., 2003; ESCOP, 2003). O extrato obtido por maceração com etanol 30% inibiu os receptores muscarínicos relacionados à contração muscular na bexiga de ratos (Borchert, 2004).

O leiocarposideo, produto isolado, nas doses de 25 mg/kg por via i.p, apresentou 20% da atividade diurética observada para a furosemida 6 mg/kg, porém sem provocar a perda de eletrólitos. Além disso, o composto impediu a progressão da litíase quando implantados cálculos na bexiga de ratos (Chodera et al, 1988; ESCOP, 2003).

1.1.5.4 Ação hepatoprotetora e antioxidante

O extrato etanólico das folhas de *S. chilensis* (1:20) apresentou potente ação antioxidante em ensaio de inibição de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de captura de radicais - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (IC₅₀: $3,8 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$); radical hidroxila (IC₅₀: $32,3 \pm 1,3 \mu\text{g/ml}$) e deoxirribose (IC₅₀: $39,1 \pm 2,4 \mu\text{g/ml}$). Além disso, foi verificada ação hepatoprotetora dose-dependente (100 e 200 mg/kg) desse extrato em camundongos com dano hepático induzido por paracetamol (250 mg/kg) (Sabir et al., 2012).

1.1.5.5 Outros efeitos

Efeito hipotensor

Efeito hipotensor e sedativo foi observado na administração i.v. de extrato aquoso das partes aéreas de *S. virgaurea* nas doses de 180 e 360 mg/kg em ratos. A mesma atividade foi observada em cachorros, nas doses de 150 mg/kg de extrato de folhas com preparação ou qualificação especificados (Racz-Kotilla et al., 1978; ESCOP, 2003).

Efeito espasmolítico

Experimentos *in vitro* demonstraram atividade do extrato hidroetanólico (60 %) de *S. virgaurea* na inibição de espasmos induzidos por acetilcolina em fragmentos teciduais isolados de íleo de suíno e de bexiga de ratos (Bauer, et al., 2003).

Diabetes

A contribuição do extrato hidroalcoólico na manutenção da homeostase glicêmica foi avaliada em camundongos portadores de obesidade induzida por dieta rica em lipídios. Distribuídos aleatoriamente em três grupos: grupo controle alimentado com ração padrão de laboratório; grupo tratado com dieta rica em gordura; grupo alimentado com uma dieta rica em gordura (45 % kcal de gordura) e submetidos a tratamento com extrato, por via intraperitoneal, na dose de 3 mg/kg), os animais foram tratados por oito semanas. Posteriormente, a expressão e fosforilação de proteínas relacionadas a mecanismos resistência à insulina e presentes no fígado, hipotálamo e músculo esquelético foram avaliadas por método *Western blot*. A massa corporal, massa gorda e teor de triacilglicerídeos foram menores no grupo tratado com o extrato. Esse grupo também apresentou maior fosforilação da AKT, que é estimulada pela insulina e menor expressão de fosfoenolpiruvato carboxiquinase e de ácido graxo sintetase. Esses efeitos observados em conjunto indicaram redução na liberação de mediadores pró-inflamatórios no fígado e hipotálamo podendo ter efeito positivo sobre a fisiopatologia da obesidade associada à insulino-dependência (Melo et al. 2011).

Anticancer

Foi relatada ação antitumoral para as saponinas triterpênicas presentes nos rizomas de *S. virgaurea* (Plohmann et al., 1997; ESCOP, 2003). Os diterpenos, ácidos 6 β -angeloiloxicolavênico, 6 β -tigloiloxicolavenico, presentes nas inflorescências de *S. canadensis* também apresentaram citotoxicidade em linhagens de células tumorais (mama, cérvix, leucemia, cólon e hepatoma) (Wu et al. 2008).

1.1.5.6 Toxicidade

Os estudos de toxicidade aguda conduzidos, por via oral, com a dose de 2000 mg/kg de extrato aquoso de *S. chilensis* não evidenciaram alterações nos parâmetros comportamentais e funcionais da atividade motora de camundongos (Bucciarelli et al., 2010). As espécies comercializadas na Europa são consideradas seguras, porém é desaconselhado o uso concomitante com lítio, pois o efeito diurético da espécie pode causar desidratação, com consequente aumento da concentração plasmática do medicamento e toxicidade associada (Blumenthal, 2000).

1.1.5.7 Conclusões

Nesta revisão foram documentados usos tradicionais relatados para as espécies do gênero *Solidago*, bem como trabalhos na área da fitoquímica, farmacologia e toxicologia. Tradicionalmente, diversas espécies têm sido utilizadas no tratamento de doenças inflamatórias, cistites, reumatismos e asma. Alguns destes usos tradicionais têm sido validados por estudos farmacológicos e fitoquímicos. Também, extratos e compostos isolados demonstraram diversas atividades como antiinflamatória, gastroprotetora e hepatoprotetora associadas à aparente ausência de toxicidade.

Embora seja percebido aumento do interesse no gênero, que pode ser expresso pelo acréscimo de trabalhos recentes, observa-se que estudos sobre a fitoquímica, farmacologia e toxicologia de *Solidago* ainda expõem muitas áreas onde o conhecimento atual necessita complementação.

Assim, investigações detalhadas sobre os componentes que possuem potencial tóxico, como as saponinas, por exemplo, merecem atenção. Além disso, observa-se que a fitoquímica é mais explorada do que a farmacologia *in vivo* e estes estudos já deram evidências de que a composição química intragenero, apesar da aparente presença dos mesmos grupos químicos, possui variabilidade. Isso implicaria em maior atenção na farmacologia das espécies que são utilizadas como intercambiáveis, como é o caso da *S. virgaurea*, *S. canadensis*, *S. gigantea* e híbridos.

Observados em conjunto, os estudos sobre o gênero *Solidago* evidenciaram potencial terapêutico, pois a eficácia de alguns extratos e compostos isolados foi demonstrada *in vivo*. Esses estudos norteiam perspectivas de evolução às etapas complementares sejam estes trabalhos químicos mais definidos nos extratos testados, farmacologia clínica ou estudos tecnológicos e toxicológicos. Neste contexto, considera-se que existe, primeiramente, a necessidade de estudos focando atividades realizadas com extratos padronizados para posteriormente evoluir nas etapas necessárias até o emprego com segurança em terapêutica.

1.1.5.8 Referências

Anthonsen, T.; McCabe, P. H.; McCrindle, R.; Murray, R. D. H.; Young, G. A. R. Constituents of *Solidago* species: Reactions of solidagenone, the major diterpenoid from *Solidago canadensis* L. **Tetrahedron**, v.26 (13), p. 3091-3097, 1970.

Aulton ME 2002. **Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design**. 2 ed. Edinburg: Churchill Livingstone, p. 388-390.

Apáti, P.; Szentmihályib, K.; Kristóá, T.; Pappa, I.; Vinklerb, P.; Szokea, É.; Ké, Á.; Herbal remedies of *Solidago*-correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.32 (4-5), p.1045-1053, 2002.

Apáti, P.; Houghton, P.J.; Kite, G.; Steventon, G.B.; Kéry, A. In-vitro effect of flavonoids from *Solidago canadensis* extract on glutathione S-transferase, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.58 (2), p. 251-256, 2006.

Bader, G.; Wray, V.; Hiller, K. Virgaureasaponin, a 3,28-bisdesmosidic triterpenoid saponin from *Solidago virgaurea*, **Phytochemistry**, v.31(2), p. 621-623, 1992.

Bauer, H.W.; Wiedemann, A. Diuretic, anti-inflammatory, spasmolytic and immune-modulation therapy of golden rod | [Diuretische, antiinflammatorische, spasmolytische und immunmodulatorische therapie mit goldrutenkraut], **Zeitschrift fur Phytotherapie**, v.24 (5), p. 218-221, 2003.

Bieski, I.G.C.; Rios Santos, F.; De Oliveira, R.M.; Espinosa, M.M.; MacEdo, M.; Albuquerque, U.P.; De Oliveira Martins, D.T.; Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012, p.1-36, 2012.

Blumenthal M.; Goldberg A.; Brinckmann J. 2000. **Herbal Medicine, Expanded Commission E Monographs**, Austin, American Botanical Council.

Borchert, V.E.; Czyborra, P.; Fetscher, C.; Goepel, M.; Michel, M.C. Extracts from *Rhois aromatica* and *Solidaginis virgaurea* inhibit rat and human bladder contraction, **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology**, v.369, p. 281–286, 2004.

Bradette-Hébert, ME.; Legault, J.; Lavoie, S.; Pichette, A. A New Labdane Diterpene from the Flowers of *Solidago Canadensis*, **Chemical Pharma Bulletin**, v.56(1), p.82-84, 2008.

Bucciarelli, A.; Minetti, A.; Milczakowskyg, C.; Skliar M. Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Pharmaceutical Biology**, v.48(9), p. 1025-30, 2010.

Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Science**, v.74, p. 2157-2184, 2004.

Carvalho, A.C.B.; Balbino, E.E.; Maciel A.; Perfeito, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.314-319, 2008.

Centeno, L.M.M. Vara de oro (*Solidago virgaurea* L). Aspectos botánicos y terapéuticos. **Revista de Fitoterapia**, v.3(1), p. 35-42.

Chaturvedula, V.S.; Zhou, B.N.; Gao, Z.; Thomas, S.J.; Hecht, S.M.; Kingston, D.G. New lupane triterpenoids from *Solidago canadensis* that inhibit the lyase activity of DNA polymerase beta. **Bioorganic Medicine Chemical letters**, v.12(23), p. 6271-5, 2004.

Choi, S.Z.; Choi, S.U.; Bae, S.Y.; Pyo, S.; Lee, K.R.. Immunobiological activity of a new benzyl benzoate from the aerial parts of *Solidago virgaurea* var. gigantea. **Archives Pharmaceutical Research**. v.28, p. 49-54, 2005.

Coelho, M.F.B.; Silva, A.C. In: "Pontes e Lacerda" and "Comodoro". **Agricultura Tropical**, UFMT/FAMEV. Mato Grosso, 1995.

Da Silva, A.G.; De Sousa, C.P.G.; Koehler, J.; Fontana, J.; Christo, A.G.; Guedes-Bruni, R.R. Evaluation of an extract of Brazilian arnica (*Solidago chilensis* Meyen, Asteraceae) in treating lumbago. **Phytotherapy Research**, v.4(2), p. 283-287, 2010.

El-Ghazaly, M.; Khayyal, M.T.; Okpanyi, S.N.; Arens-Corell, M.; Study of the anti-inflammatory activity of *Populus tremula*, *Solidago virgaurea* and *Fraxinus excelsior*, **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v.42(3), p.333-336, 1992.

Goulart, S.; Moritz, M.I.G.; Lang, K.L.; Liz, R.; Schenkel, E.P.; Fröde, T.S. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113(2), p.346-353, 2007.

Ichihara, K.; Kawai, T.; Noda, M.; Polyacetylenes of *Solidago altissima* L.; **Agricultural and Biological Chemistry**, 42(2), p.427-431,1978.

Jaiswal, R.; Kiprotich, J.; Kuhnert, N. Deteremination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. **Phytochemistry**, v. 72, p. 781-790, 2011.

Jin, H.; Ogino, K.; Fujioka, T.; Yoshida, M.; Ishimaru, K. A new acylphloroglucinol glycoside from *Solidago altissima* L. **Journal Natural Medicine**, v.62, p.199–201, 2008.

Yakovlev, A.I.; Pychenkova, P.A. Polysaccharides of *Solidago virgaurea*. **Chemistry of Natural Compounds**, v.17(6), p. 580-581, 1982.

Kalemba, D.,Constituents of the essential oil of *Solidago virgaurea* L. **Flavour and Fragrance Journal**,v.3 (6), p.373-376, 1999.

Kasali, A.A.; Ekundayob, O.; Paul, C.; Koniga, W.A. Epi-Cubebanes from *Solidago Canadensis*. **Phytochemistry**, v.59, p.805–810, 2002.

Laurençon, L.; Sarrazin, E.; Chevalier, M.; Prêcheur, I.; Herbet, G.; Fernandez, X.Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Solidago virgaurea* alpestris with inhibiting activity of *Candida albicans* yeast-hyphal conversion. **Phytochemistry**, v.86, p.103-11, 2013.

Leuschner, J. Anti-inflammatory, spasmolytic and diuretic effects of a commercially available *Solidago gigantea* Herb. extract, **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v.45 (2), p.165-168, 1995.

Li, T.; Bai, H.; Zhong, H.; Deng, Z.-P.; Du, Y.; Yao, Q.-Q.; Chemical constituents of *Solidago virgaurea* and their anti-inflammatory activities. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, v.45 (6), p.749- 754, 2014

Liz, R.; Vigil, S.V.; Goulart, S.; Moritz, M.I.; Schenkel, E.P.; Fröde, T.S. The anti-inflammatory modulatory role of *Solidago chilensis* Meyen in the murine

model of the air pouch, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.60(4), p. 515-21, 2008.

Racz-Kotilla, E.; Racz, G. Hypotensive and sedative effect of extracts obtained from *Solidago virgaurea* L. **Planta Medica**, v.33 (3), p. 300, 1978.

Reznicek, G.; Jurenitsch, J.; Plasun, M.; Korhammer, S.; Haslinger, E.; Hiller, K.; Kubelka, W. Four major saponins from *Solidago canadensis*. **Phytochemistry**, v.30(5), p.1629-33, 1991.

Reznicek, G.; Jurenitsch, J.; Plasun, M.; Korhammer, S.; Haslinger, E.; Hiller, K.; Kubelka, W. Isolation and structure elucidation of further new saponins from *Solidago canadensis*. **Phytochemistry**, v.58(1), p.94-98, 1992.

Rodríguez, J.A.; Theoduloz, C.; Sánchez, M.; Yáñez, T.; Razmilic, I.; Schmeda-Hirschmann, G.; Gastroprotective activity of a new semi-synthetic solidagenone derivative in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.57 (2), p.265-271, 2005.

Melo, A.M.; Bittencourt, P.; Nakutis, F.S.; Silva, A.P.; Cursino, J.; Santos, G.A.; Ashino, N.G.; Velloso, L.A.; Torsoni, A.S.; Torsoni, M.A. *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract reduces JNK/I κ B pathway activation and ameliorates insulin resistance in diet-induced obesity mice. **Experimental Biology Medicine** (Maywood), v.236(10), p.1147-55, 2011.

Melzig, M. F. Goldenrod - a classical exponent in the urological phytotherapy. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v.154, p. 523-527, 2004.

Meyer, B.; Schneider, W.; Elstner, E.F.; Antioxidative properties of alcoholic extracts from *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula* and *Solidago virgaurea*, **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v.45(2), p.174-176, 1995.

Metzner, J.; Hirschelmann, R.; Hiller, K. Antiphlogistic and analgesic effects of leiocarposide - A phenolic bisglucoside from *Solidago virgaurea* L. **Pharmazie**, v.39(12), p. 869-870, 1984.

Morel, A.F.; Dias, G.O.; Porto, C.; Simionatto, E.; Stuker, C.Z.; Dalcol, I.I. Antimicrobial activity of extractives of *Solidago microglossa*. **Fitoterapia**, v.77, p. 453-455, 2006.

Oliveira, O.W.; Petrovick, P.R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20(4), p. 641-650, 2010.

Pietta, P.; Mauri C.G. P.; Zecca, L. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonol glycosides of *Solidago virgaurea*, **Journal of Chromatography A**, v.558 (1), p. 296-301, 1991.

Plohmann, B.; Bader, G.; Hiller, K.; Franz, G. Immunomodulatory and antitumor effects of triterpenoid saponins, **Pharmazie**, v.52(12), p. 953-957, 1997.

Russo, A.; Garbarino, J. *Solidago chilensis* Meyen et *Kageneckia oblonga* Ruiz & Pav.: petite revue de leur profil antioxydant. **Phytothérapie**, v.6, p. 333–341, 2008.

Sabir, S.M.; Ahmad, S.D.; Hamid, A.; Khan, M.Q.; Athayde, M.L.; Santos, D.B.; Boligon, A.A.; Rocha, J.B.T. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. **Food Chemistry**, v.131(3), p. 741-747, 2012.

Saluk-Juszczak, J.; Pawlaczyk, I.; Olas, B.; Kołodziejczyk, J.; Ponczek, M.; Nowak, P.; Tsigotis-Wołoszczak, M.; Wachowicz, B.; Gancarz, R. The effect of polyphenolic-polysaccharide conjugates from selected medicinal plants of Asteraceae family on the peroxynitrite-induced changes in blood platelet proteins. **International Journal Biology Macromolecules**, v.47(5), p. 700-5, 2010.

Samy, R.P.; Gopalakrishnakone, P. Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.7, n.3, p. 283-294, 2010.

Schmeda-Hirschmann, G. A Labdan Diterpene from *Solidago chilensis* Roots. **Planta Medica**, v.54(2), p.179-80, 1988.

Schmeda-Hirschmann, G.; Rodriguez, J.; Astudillo, L. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.8, p. 111-115, 2002.

Starks, C.; Williams, R.B.; Goering, M.G.; O'Neil-Johnson, M.; HuV.J.; Garo, E.; Hough, G.W.; Rice, S.M.; Eldridge, G.R. Antibacterial clerodane diterpenes from Goldenrod (*Solidago virgaurea*). **Phytochemistry**, v.71, p.104–109, 2010.

Tamura, E.K.; Jimenez, R.S.; Waisman, K.; Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P.; Malpezzi-Marinho, E.A.L.; Marinho, E.A.V.; Farsky, S.H.P. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.478-485, 2009.

Teles, A.M.; Borges, R.A.X. 2010. *Solidago* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB005502>).

Torres L.M.B.; Akisue, M.K.; Roque, N.F. Quercitrin from *Solidago Microglossa* Dc the Arnica of Brazil. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de Sao Paulo**, v.23, p.33-40, 1987.

Valverde-Soares, S.S.; Azevedo-Silva, R.C.; Tomassini, T.C.B. Utilização de CLAE, como paradigma na obtenção e controle do diterpeno solidagenona a partir de inflorescências de *Solidago chilensis* Meyen (arnica brasileira). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90(3), p. 196-199, 2009.

Vila, R.; Mundina, M.; Tomi, F.; Furlán, R.; Zacchino, S.; Casanova, J.; Cañigüeral, S. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. **Planta Medica**, v.68(2), p.164-167, 2002.

Zhang, J.; Zhang, X.; Lei, G.; Chen, J.; Zhou, T. A new phenolic glycoside from the aerial parts of *Solidago canadensis*. **Fitoterapia**, v.78, p.69–71, 2007.

Zeng, Z.-X.; Ma, W.-H.; Li, Y.-L., Han, T.; Zheng, C.-J.; Qin, L.-P. "Two new diterpenes from *Solidago Canadensis*. **Helvetica Chimica Acta**, v.95, n.7, p.1112-1125, 2012.

Wangensteen, H.; Phan, T.T.; Rise, F.; Halvorsen, T.G.; Malterud, K.E. New labdane diterpenes from *Solidago canadensis*. **Natural Products Research**, v.26(14), p.1348-54, 2012.

Wu, S.; Yang, L.; Gao, Y.; Liu, X.; Liu, F. Multi-channel counter-current chromatography for high-throughput fractionation of natural products for drug discovery. **Journal of Chromatography A**, v.1180 (1-2), p.99-107, 2008.

Wu, B.; Takahashi, T.; Kashiwagi, T.; Tebayashi, S.; Kim, C. New Flavonoid Glycosides from the Leaves of *Solidago altissima*. **Chemica Pharmacy Bulletin**, v.55, n.5, p.815-816, 2007.

CAPÍTULO 2

Caracterização físico-química e química das inflorescências de *S. chilensis*

2.1 Introdução

Solidago chilensis é uma espécie de amplo uso na medicina tradicional e integra a RENISUS (Relação de Nacional de Plantas de Interesse ao Sistema Único de Saúde). Alguns dos usos populares, como a utilização em substituição à *Arnica montana* devido à ação anti-inflamatória, por exemplo, possuem comprovação científica (Goulart et al., 2007). Entretanto, as evidências terapêuticas descritas no Capítulo 1 e o interesse econômico-governamental de inserção desta espécie em políticas públicas de saúde, requerem estudos mais aprofundados para a comprovação de eficácia clínica e segurança de utilização.

No escopo da qualidade de plantas medicinais e derivados, tem-se a relação direta da qualificação físico-química e química com a constância da eficácia e a segurança desses produtos. Portanto, é primordial que haja preocupação por parte dos fabricantes e fornecedores, não só com relação à responsabilidade com os pacientes, mas também com a garantia da conformidade com os requisitos legais do setor (Ruparel & Lockwood, 2011).

Ao contrário dos produtos quimicamente definidos, os constituintes responsáveis pela eficácia terapêutica de plantas medicinais e de seus derivados podem não ser totalmente conhecidos ou, ainda, ter a atividade relacionada ao conjunto de substâncias presentes, o fitocomplexo. Considerando-se que os diferentes grupos de metabólitos secundários podem ter a biossíntese influenciada por características genéticas e fatores edafoclimáticos, é difícil de ser observada a constância de concentrações dessas substâncias ativas nas matérias-primas vegetais (Gobbo-Neto et al., 2007; Klein et al., 2009). Desta forma, a seleção dos marcadores fitoquímicos, adequados para fins de controle de qualidade é etapa imprescindível para produtos à base de plantas (Reif et al, 2004;. Helliwell, 2006; Veit & Wissel, 2007).

Algumas espécies do gênero que ocorrem naturalmente na Europa e América do Norte possuem monografias analíticas (*Solidaginis virgaurea* e *Solidaginis herba*) inseridas em diversas Farmacopeias de países europeus. Basicamente, para ambas, são preconizados os testes de identificação

botânica, matérias estranhas, perfil cromatográfico por CCD e determinação de flavonoides totais por espectrofotometria.

Considerando-se que a espécie *S. chilensis* é a equivalente sul-americana das citadas anteriormente (Russo et al., 2008), neste capítulo, inicialmente, foram realizados ensaios farmacopeicos com a finalidade de comparar as características da espécie brasileira com as comercializadas na Europa de maneira a verificar se há equivalência química intragênero. Adicionalmente, foram realizadas a caracterização química por UPLC-MS, o estabelecimento de perfil químico por UPLC-PDA e a otimização de condições de hidrólise, bem como a validação de método analítico de quantificação de flavonoides totais por CLAE-PDA. Ainda nas avaliações químicas do material vegetal, os metabólitos voláteis foram quantificados e foram realizados ensaios de atividade biológica *in vitro*. Os resultados deste capítulo foram agrupados em sub-capítulos a fim de facilitar a compreensão textual.

2.2 Caracterização físico-química e química

2.2.1 Materiais e métodos

2.2.1.1 Material vegetal

As inflorescências de *Solidago chilensis* Meyer foram coletadas em Guaporé, RS (04/2011 e 03/2012); Pinhal, RS (03/2011) e Eldorado, RS (03/2011). O material vegetal foi seco à temperatura de 30 °C e protegido da luz. A identificação botânica foi realizada pelo Dr. Sérgio Bordignon e a exsiccata depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (número 176766). Amostras comerciais de *Solidaginis herba* foram adquiridas no comércio de Portugal e Alemanha.

2.2.1.2 Perda por dessecação

A porcentagem de água em relação à droga seca foi determinada por método gravimétrico (Farmacopeia Brasileira, 2010). Para tal, cerca de 1 g de amostra foi dessecado em estufa a 100-105 °C até peso constante.

2.2.1.3 Determinação de cinzas totais

O total de cinzas fisiológicas e cinzas não fisiológicas foi determinado de acordo com a Farmacopeia Britânica (2011). Em cadinhos previamente calcinados e tarados, foram pesados cerca de 2 g da amostra pulverizada (0,355 mm). O material foi distribuído uniformemente no cadinho e incinerado com aumento gradativo de temperatura (30 min a 200 °C, 60 min a 400 °C e 90 min a 600 °C) até, no máximo, 600 ± 25 °C, para eliminação de todo o carvão. A porcentagem de cinzas foi calculada em relação ao peso inicial da droga.

2.2.1.4 Análise granulométrica

As inflorescências foram cominuidas em moinho de facas e, posteriormente, procedeu-se a análise granulométrica em tamisador Restch Retac 3D® utilizando-se malhas com aberturas de 710, 355, 250, 180, 125 µm, em intensidade vibracional estabelecida em 55 unidades de escala. Cerca de 20 g de amostra foram submetidas à agitação durante 10 min.

O material recolhido em cada tamis foi pesado e a porcentagem calculada em relação à quantidade adicionada inicialmente (WHO, 1998; FB 5, 2010). O experimento foi realizado em duplicata. Para cada faixa granulométrica de pó, determinaram-se o teor de substâncias extraíveis por álcool e, posteriormente, o teor de flavonoides totais neste resíduo. O resultado foi expresso em mg% de quercetina em relação ao extrato seco.

2.2.1.5 Determinação de substâncias extraíveis por álcool

Cerca de 1,0 g de cada fração granulométrica da droga vegetal moída (<125; 125-180; 180-250; -250-355; 355-710 µm) foi submetida à maceração

com etanol 95% durante 6 h sob agitação e, subsequentemente, por mais 18 h em maceração estática. Após filtração em papel filtro e eliminação do solvente sob pressão reduzida, o resíduo foi dessecado em estufa a 105 °C durante 6 h. A porcentagem de substâncias extraídas foi calculada e expressa em mg/g de material vegetal seco. O experimento foi realizado em triplicata.

2.2.1.6 Determinação da relação entre teor de substâncias extraíveis por álcool e o conteúdo de flavonoides totais

No intuito de observar a relação entre os teores de extraíveis e de flavonoides existentes nesses extratos, procedeu-se a determinação dos flavonoides totais presentes nos extratos obtidos de acordo com o procedimento descrito. Desta forma, a hidrólise ácida dos heterosídeos e quantificação da aglicona por CLAE foi realizada de acordo com o método otimizado e validado neste trabalho, descrito no item 3.4.

Em suma, os extratos foram retomados em metanol 70% 0,3 M de ácido clorídrico e, em seguida, submetidos à reação hidrólise durante 21 min, sob refluxo e aquecimento em banho-maria a 90 °C. A aglicona foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência e os resultados foram expressos em mg de quercetina/g de substâncias extraíveis por álcool.

2.2.2 Resultados e discussão

O ensaio de perda por dessecação demonstrou que as inflorescências de *S. chilensis*, após procedimento de secagem, possuem o teor médio (\pm desvio padrão) de 9,77% (\pm 0,39) de matéria volátil. As amostras comerciais de *Solidaginis herba* provenientes da Alemanha e Portugal apresentaram valores de 9 e 8%, respectivamente. Esses valores podem ser indicativos de que as condições de secagem e armazenamento foram adequadas, visto que para a Farmacopeia Britânica (2011) recomenda valor máximo de 10% de matéria volátil para espécies do gênero. Além disso, infere-se que a droga é pouco higroscópica e está protegida da umidade na embalagem plástica de acondicionamento.

O teor médio de cinzas totais (\pm desvio padrão) determinado para *S. chilensis* foi de $6,57 \pm 0,12\%$, enquanto que as amostras de *Solidaginis herba* apresentaram valores de 3 (alemã) e 4,3% (portuguesa). Considerando-se que a Farmacopeia Britânica (2011) preconiza valores máximos de 7% para cinzas totais em espécies do gênero, a *S. chilensis*, apesar de apresentar resíduo não incinerado médio consideravelmente superior às espécies europeias, atende o limite oficial da referida Farmacopeia. Desta forma, em relação às características físico-químicas descritas na literatura para espécies do gênero e a amostra de *S. chilensis*, pode-se inferir que não há evidências que permitam diferenciação entre as espécies.

As características dos pós, obtidos pela moagem da droga vegetal, foram avaliadas pela distribuição granulométrica quando submetidos à força mecânica em tamises com aberturas de 125 , 355, 180, e 710 μm . A distribuição granulométrica (Tabela 2.1) mostrou-se bastante heterogênea, tendo frações retidas em todas as malhas. A maior quantidade ($38,37 \pm 0,5\%$) de pó passou pelo tamis de 125 μm , o que caracteriza o produto como um pó finíssimo de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010).

Devido à importância da escolha da faixa granulométrica adequada para o controle de matérias-primas vegetais, especialmente para os ensaios de quantificação, foi avaliada a influência do tamanho de partícula no conteúdo de extraíveis por álcool e a relação deste com o teor de flavonoides totais.

Na Tabela 2.1 pode ser observado que teores de substâncias extraíveis por álcool são menores para os pós com partículas maiores de 710 μm (9,6 mg/g) e intermediárias a 710-355 μm (15,46 mg/g). Os maiores teores de extraíveis foram observados para os pós com tamanho inferior a 125 μm (38,37 mg/g) e os intermediários a 125-180 μm (30,05 mg/g). Se o teor de extraíveis fosse adotado como parâmetro analítico ou tecnológico, o pó com tamanho inferior a 125 μm seria o mais adequado. Entretanto, neste trabalho buscou-se padronizar tanto os processos analíticos, quanto os tecnológicos em função do maior teor substâncias ativas.

Reconhecidamente as drogas vegetais do gênero são caracterizadas pela presença de flavonoides e estes têm sido associados com diversas atividades farmacológicas, especialmente às relacionadas com processos inflamatórios e usos populares (Gourlart et al., 2007; Russo et al., 2008;

Tamura et al., 2009; Sabir et al., 2012). Desta forma, o teor flavonoides totais (FT) contidos nos resíduos foi determinante na seleção do tamis.

Os valores desta determinação estão representados na Tabela 2.1. O maior conteúdo de FT (mg/g de resíduo extraível por álcool) foi observado na faixa de 250-180 μm ($401,25 \pm 1,11$ mg/g), seguido do pó >125 μm ($321,9 \pm 1,5$ mg/g). Esses dados indicam para a determinação de FT, que o pó retido entre os tamises 250-180 μm apresentou características mais adequadas para a extração e determinação dos metabólitos deste grupo. Correlacionando os valores de extraíveis com o de FT, observa-se que não há relação proporcional direta, porém as maiores proporções são encontradas quando utilizados tamises de menor abertura de malha, considerando em conjunto as variáveis: quantidade de material moído, teor de extrativos e teor de FT. A pertinência do uso desta malha deve ser avaliada quanto aos aspectos relacionados ao desenvolvimento farmacotécnico.

Tabela 2.1: Dados da distribuição granulométrica ponderal do pó e dos conteúdos de extraíveis por álcool e flavonoides totais (FT) correspondentes.

Faixa granulométrica (μm)	Fração tamisada (%)	Teor de extraíveis por álcool (mg/g)	Teor de FT (mg/g)
>710	5,37	$9,60 \pm 0,5$	$55,9 \pm 0,6$
710-355	13,9	$15,46 \pm 0,3$	$142,75 \pm 0,15$
355-250	19,96	$21,40 \pm 0,7$	$204,6 \pm 3,84$
250-180	15,5	$23,59 \pm 1$	$401,25 \pm 1,11$
180-125	14,5	$30,05 \pm 1,2$	$218,1 \pm 4,11$
<125	28,24	$38,37 \pm 0,5$	$321,9 \pm 1,5$

2.3 Caracterização química qualitativa *S. chilensis*

2.3.1 Materiais e métodos

2.3.1.1 Material vegetal

As inflorescências de *Solidago chilensis* Meyer foram coletadas em diversos locais e adquiridas no comércio (Quadro 2.1). O material vegetal

coletado foi seco a temperatura de 30 °C e protegido da luz. A identificação botânica foi realizada pelo Dr. Sérgio Bordignon e a exsicata depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Quadro 2.1. Listagem das amostras de *Solidago chilensis* utilizadas para avaliação do perfil químico.

Amostra	Tipo	Origem	Data de coleta	Espécie
1	Coleta	Guaporé/RS	03/2011	<i>S. chilensis</i>
2	Coleta	Pinhal/RS	03/2011	<i>S. chilensis</i>
3	Coleta	Itati/RS	03/2011	<i>S. chilensis</i>
4	Coleta	Eldorado/RS	03/2012	<i>S. chilensis</i>
5	Coleta	Pelotas/RS	04/2012	<i>S. chilensis</i>
6	Coleta	Guaporé/RS	04/2012	<i>S. chilensis</i>
11	Coleta	Caxias do Sul/RS	04/2012	<i>S. chilensis</i>
7	Comércio	Biotae/Brasil	06/2012	<i>S. chilensis</i>
8	Comércio	Portugal	10/2012	<i>Solidaginis herba</i>
9	Comércio	Alemanha	10/2012	<i>Solidaginis herba</i>
10	Comércio	Edka	10/2012	<i>S. chilensis</i>
11	Coleta	São Valentim do Sul/RS	03/2013	<i>S. chilensis</i>
12	Coleta	Guaporé/RS	04/2013	<i>S. chilensis</i>
13	Coleta	São Valentim do Sul/RS	05/2013	<i>S. chilensis</i>
14	Coleta	Pelotas/RS	05/2013	<i>S. chilensis</i>
13	Coleta	Cotiporã/RS	05/2014	<i>S. chilensis</i>
15	Coleta	Dois Lagedados/RS	05/2014	<i>S. chilensis</i>
16	Coleta	Carlos Barbosa/RS	05/2014	<i>S. chilensis</i>
17	Coleta	Santa Clara/RS	05/2014	<i>S. chilensis</i>
18	Coleta	Guaporé/RS	05/2014	<i>S. chilensis</i>

2.3.1.2 Determinação do perfil químico de *S. chilensis* por cromatografia em camada delgada

Para o estabelecimento do perfil químico por cromatografia em camada delgada, foi desenvolvido sistema cromatográfico utilizando-se as soluções extrativas obtidas a partir de cerca de 0,4 g (250 µm) da droga vegetal e 20 mL de metanol mantidos sob refluxo por 10 min. Após filtração para balão volumétrico e aferição do volume até 25,0 mL com metanol, 20,0 µL de amostra e da solução referência (1 mg ácido clorogênico, 2,5 mg de rutina, 2,5 mg de quercetrina em 10,0 mL de metanol) foram aplicadas em cromatoplaça de gel de sílica GF_{254nm} (Merck). Como sistema eluente utilizou-se ácido fórmico, água, metiletilcetona e acetado de etila (6:6:18:30 v/v/v/v) e reagente natural 0,5 % em etanol para visualização do cromatograma à luz natural.

2.3.1.3 Determinação do perfil químico de *S. chilensis* por UPLC/PDA

Preparação da solução amostra

Com intuito de realizar a comparação de perfis químicos de *S. chilensis* com as espécies europeias consideradas intercambiáveis entre si, a extração do material vegetal foi realizada de acordo com a técnica descrita na Farmacopeia Britânica (2011) para *S. virgaurea*, *S. canadensis* e misturas comerciais. No entanto, fez-se necessária realizar adaptação na proporção droga/solvente. Desta forma, cerca de 0,50 g (250 µm) da droga vegetal seca foi submetida à extração sob-refluxo, com 20 mL de metanol durante 10 min. Após o arrefecimento, as soluções extrativas foram filtradas em papel filtro para balões volumétricos de 25 mL e os volumes ajustados com metanol. Todas as amostras foram filtradas por membrana 0,22 µm, PVDF, Millipore.

Para o desenvolvimento do sistema cromatográfico foram testadas diversas proporções dos solventes metanol e acetonitrila como fase orgânica (Fase B), além de diferentes concentrações de ácido fórmico nesta fase. O sistema gradiente com metanol 0,1 % ácido fórmico mostrou-se o mais adequado. Desta forma, os parâmetros cromatográficos estão descritos nos Quadros 2.2 e 2.3.

Quadro 2.2: Parâmetros cromatográficos empregados para o estabelecimento do perfil químico de *S. chilensis* por UPLC/UV-PDA.

Parâmetro	Descrição
Cromatógrafo	Acquity UPLC (Waters)
Detector	Acquity PDA/MS (Waters)
Coluna	Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm (Waters)
Sistema de eluição	Gradiente linear (Tabela 2.3.)
Fase móvel	Água e ácido fórmico 0,1 %, v/v (A) e metanol e ácido fórmico 0,1 % (B) ¹
Fluxo	0,13 mL/min
Temperatura	25 °C
Volume de injeção	1 µL
Comprimento de onda de detecção	210 a 400 nm

¹ água ultrapura (Milliq); ácido fórmico 96 % grau HPLC (Tedia®); metanol grau HPLC (Tedia®); fases móveis filtradas por membrana 0,22 µm, PVDF, Millipore) e degaseada durante 15 minutos em banho de ultrassom.

Quadro 2.3: Sistema gradiente linear utilizado para análise por UPLC empregado para a análise do perfil químico da droga vegetal *S. chilensis*.

Tempo (minutos)	A (%)	B (%)
0	80	20
1	65	35
1,6	60	40
2,5	59	41
14	58,5	41,5
15	5	95
16	0	100
19,3- 23	80	20

A eluição dos compostos foi monitorada empregando o *software Empower* (Waters, Milford/USA) e utilizando comprimento de onda de 300 nm.

2.3.1.4 Caracterização química dos principais constituintes de *S. chilensis* por UPLC/PDA/MS

A identificação dos principais constituintes de *S. chilensis* foi realizada utilizando-se UPLC/PDA/MS. A amostra foi preparada conforme procedimento descrito na determinação do perfil cromatográfico por UPLC/PDA e os parâmetros cromatográficos utilizados estão descritos nas Tabelas 2.3 e 2.4.

A identificação dos compostos foi realizada em espectrômetro de massas do tipo quadrupolo (LC/UV-PDA/ESI-MS²) com aquisição de dados em modo positivo sob variação de massa de 1000 a 1500 *m/z*. As condições gerais foram: temperatura da fonte de 120 °C; temperatura de dessolvatação de 250 °C; voltagem do capilar 3 kV; voltagem do cone de 40 V; voltagem do cone de extração de 2,5 V; fluxo de nitrogênio no cone de extração e na dessolvatação de 71 L/h e 350 L/h, respectivamente. Os dados de MS/MS foram obtidos no modo automático do equipamento, empregando três canais de análise para os íons mais abundantes, com variação de 100 a 1500 *m/z*. O sistema foi controlado e a análise dos dados cromatográficos e de massas foi realizada empregando o *software* Masslynx v.4.0 (Waters).

2.3.2 Resultados e discussão - caracterização química qualitativa

2.3.2.1 Determinação do perfil químico por cromatografia em camada delgada

A análise do perfil químico por cromatografia em camada delgada (CCD) é uma ferramenta simples e confiável no auxílio da identificação/autenticidade de drogas vegetais. Desta forma, o sistema cromatográfico desenvolvido para *S. chilensis* contempla parâmetros e substâncias de referência descritos para as principais espécies do gênero (*S. canadensis* e *S. gigantea*; *S. virgaurea*) em suas respectivas monografias farmacopeicas.

Nas figuras 2.1 e 2.2 estão representadas as fotografias das cromatoplasmas contendo o extrato metanólico de *S. chilensis*, amostras comerciais de *Solidaginis herba* e substâncias químicas de referência SQR (quercetrina, rutina e ácido clorogênico). De acordo com a Farmacopeia

Britânica (2011), neste mesmo sistema eluente, a espécie *S. virgaurea* não apresenta banda correspondente a SQR quercetrina. Por outro lado, essa substância está presente nas amostras de *S. canadensis* e *S. gigantea* e a detecção da mesma diferenciaria a espécie europeia das norte-americanas, uma vez que a presença de rutina e do ácido clorogênico é comuns às três espécies citadas.

Nos cromatogramas representados na figura abaixo, observa-se equivalência química entre as amostras de *Solidaginis herba* e ausência de, ao menos, uma banda logo abaixo do padrão quercetrina na amostra de *S. chilensis* quando comparada às amostras comerciais, além da presença de rutina nas três amostras e a ausência de ácido clorogênico em *S. chilensis*. Desta forma, é possível evidenciar as diferenças químicas entre a espécie brasileira e as europeias quando analisadas comparativamente por CCD.

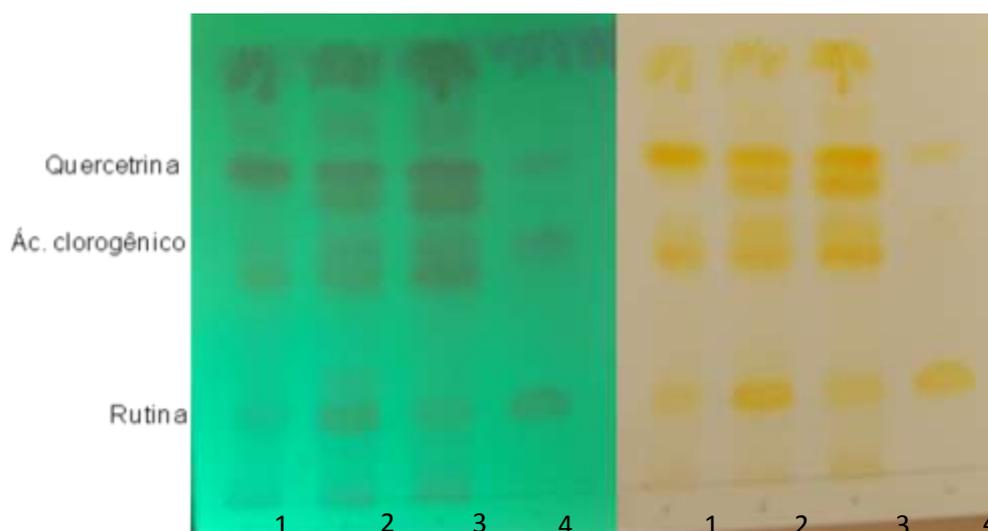


Figura 2.1.: Perfil químico de *S. chilensis* (1- Guaporé 2012; 2- *Solidaginis herba* (Portugal), 3- *Solidaginis herba* (Alemanha), 4- padrões: rutina, quercetrina e ácido clorogênico, Fig. A- observação em 365 nm; Fig. B- revelação com reagente natural.

No intuito de avaliar qualitativamente a variabilidade na composição química de *S. chilensis*, foram analisadas diversas amostras coletadas no Rio Grande do Sul (Figura 2.2).

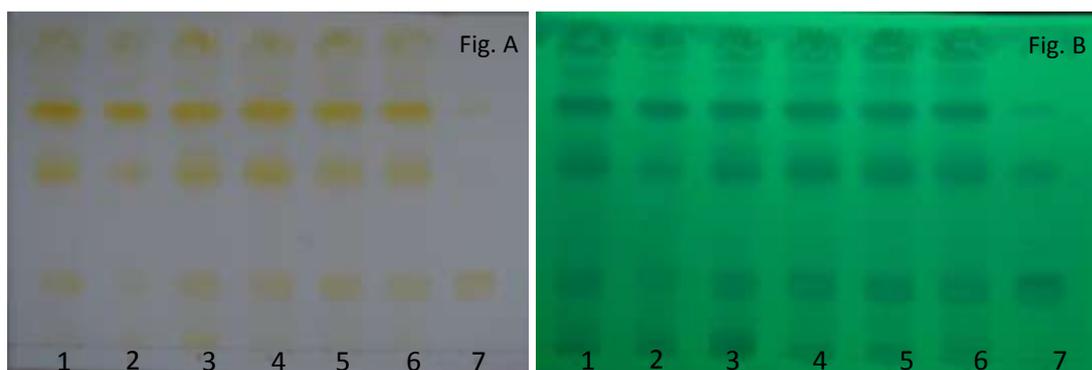


Figura 2.2: Perfil cromatográfico de diferentes coletas de *S. chilensis* (1-Guaporé 2012; 2- Guaporé (2011), 3- Pinhal, 4- Itati, 5- Eldorado, 6- Amostra comercial (EDKA®), 7- Padrões rutina, quercetrina e ácido clorogênico, A - revelação com reagente natural, B - observação em 365 nm.

A análise dos cromatogramas permite sugerir que a composição qualitativa dos compostos fenólicos presentes nas inflorescências da planta é independente do local de coleta. Além disso, os perfis idênticos observados para as amostras das coletas realizadas em Guaporé nos anos de 2011 e 2012 (Figura 2.2) também sugerem constância química qualitativa por cromatografia em camada delgada.

2.3.2.2 Determinação do perfil químico por UPLC-PDA

O estabelecimento do perfil químico ou impressão digital por cromatografia líquida de alta ou ultra eficiência é extremamente importante para o controle de qualidade de plantas medicinais, pois, após a definição dessa informação química, é possível verificar a autenticidade e a integridade do material vegetal bem como estabelecer um perfil cromatográfico de constituintes presentes e padrão farmacológico ativo.

No caso de plantas medicinais, que conhecidamente podem produzir diferentes grupos de metabólitos secundários e/ou com diferenças quali e quantitativas dependendo da sua característica genética, estágio de evolução e dos fatores edafo-climáticos, este parâmetro torna-se evidentemente indispensável. Desta forma, neste trabalho foram analisadas amostras coletadas em diferentes locais bem como acompanhou-se a variabilidade química no decorrer dos anos 2011, 2012, 2013 e 2014 em amostras coletadas no mesmo local (Guaporé, RS).

A análise do perfil por UPLC (espectro de UV; tempo de retenção dos constituintes e intensidade de absorção) das amostras (Figuras 2.3 a 2.21) permite a visualização de pequenas variações químicas qualitativas nos componentes minoritários e variações quantitativas nos majoritários.

A presença de quatro compostos majoritários manteve-se constante, independentemente do local e do ano de coleta. Esses compostos são representados pelos picos com tempos de retenção (RT) de 6,03 min (UV máximo: 217, 241, 328 nm), 6,52 min (UV máximo: 255, 354 nm), 7,4 min (UV máximo: 217,243, 328 nm), 8,05 min (UV máximo: 255, 349 nm). Entretanto, as amostras coletadas em Pinhal (Fig. 2.4) e Pelotas (Fig. 2.9) evidenciaram 5 compostos majoritários, sendo que além dos descritos acima, apresentaram nos RT de 4,69 min (UV máximo: 215, 334 nm), 6,7 min (UV máximo: 255, 352 nm) mais dois picos. A característica dos espectros de UV com os máximos mencionados acima e representados na Fig. 2.3 e dados de literatura para espécies do gênero permitem concluir de que tratam-se de ácidos fenólicos cafeiolquínicos e flavonoides derivados da quercetina.

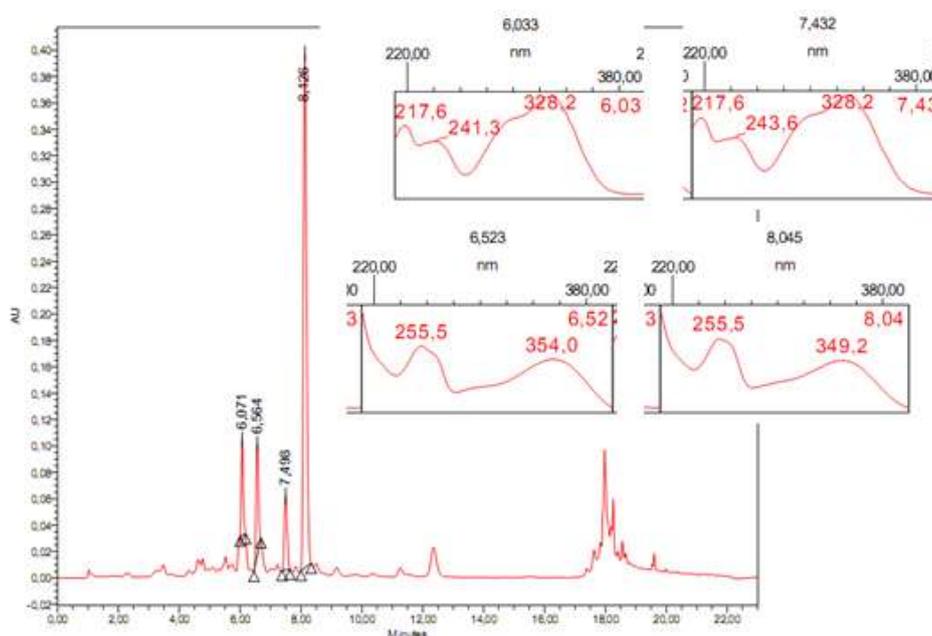


Figura 2.3: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Guaporé (2011)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.1.3.

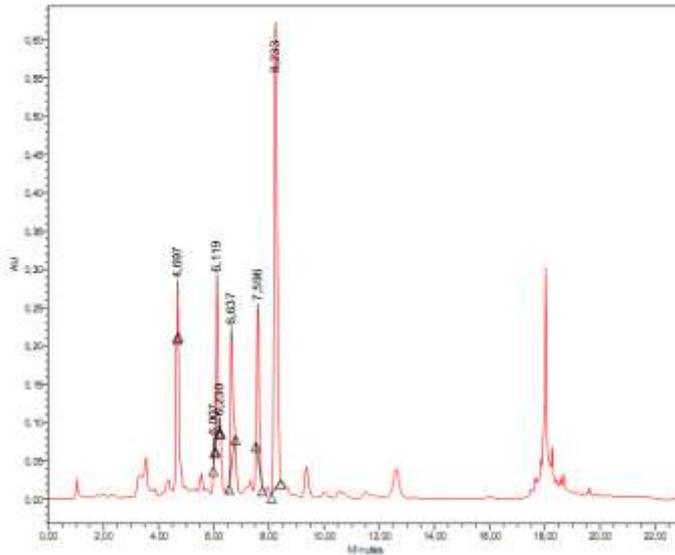


Figura 2.4: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Pinhal (2011)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.1.3.

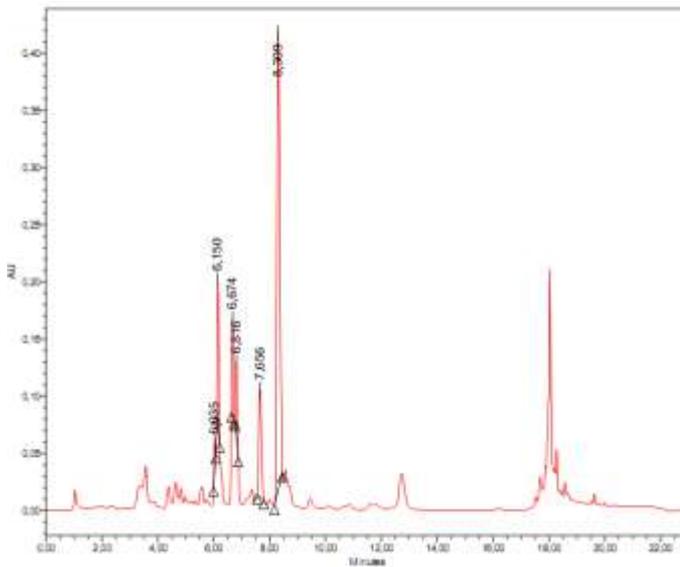


Figura 2.5: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Itati (2011)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.1.3.

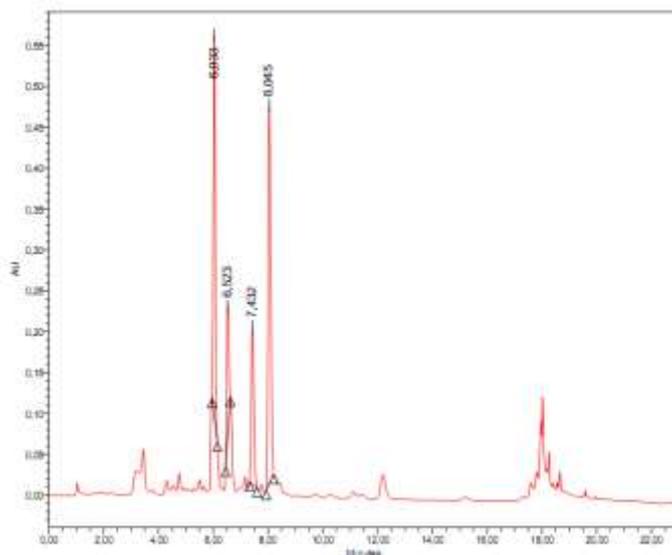


Figura 2.6: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Eldorado (2012)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.1.3.

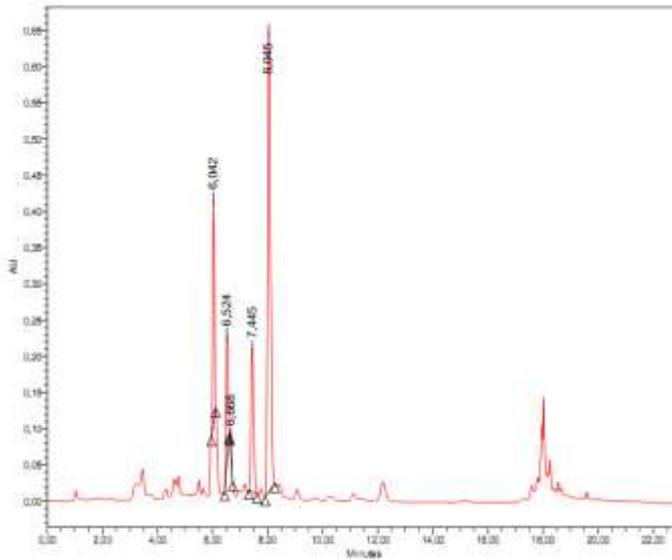


Figura 2.7: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Guaporé (2012)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

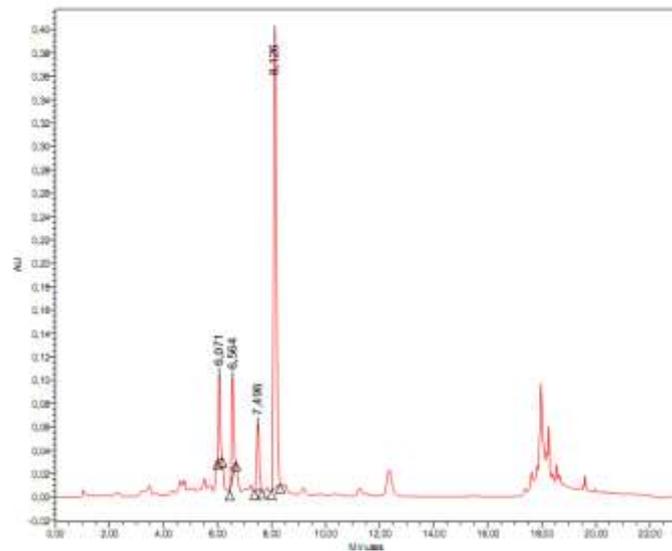


Figura 2.8: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Eldorado (2012)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

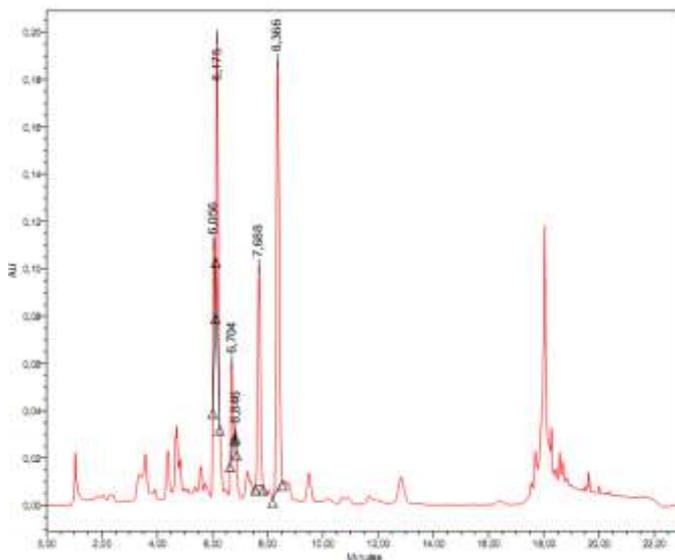


Figura 2.9: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Pelotas (2012)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

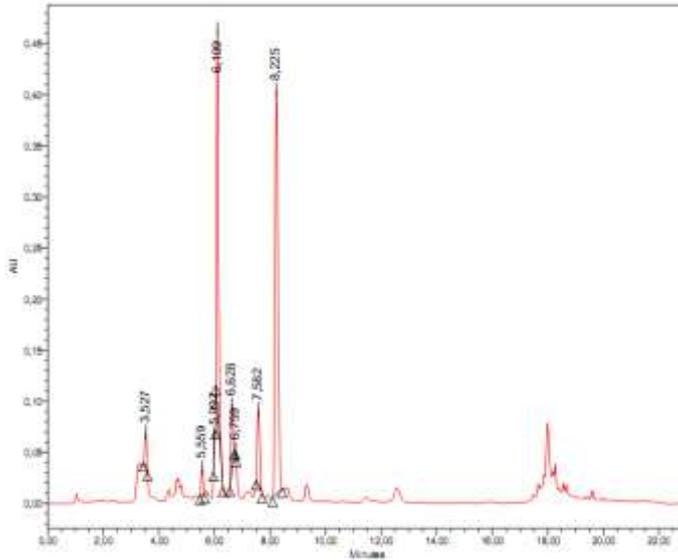


Figura 2.10: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em São Valentim (2012)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

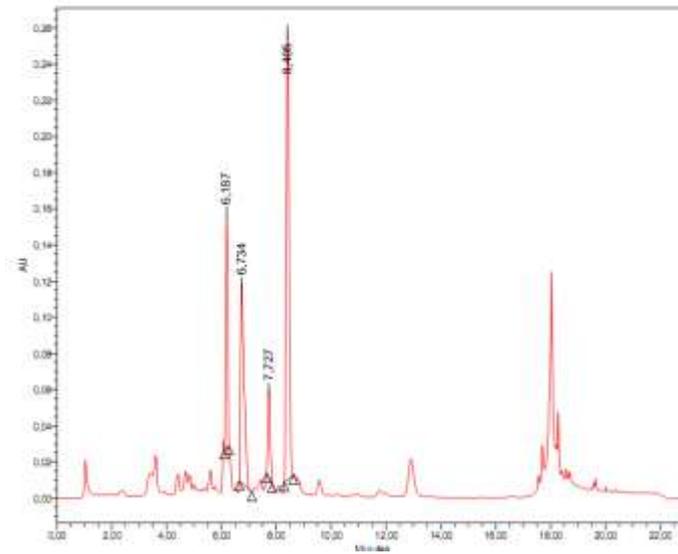


Figura 2.11: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Caxias do Sul (2012)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

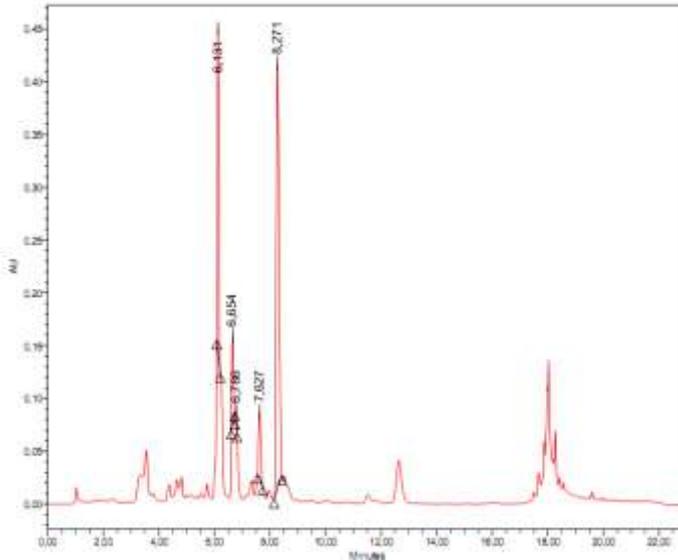


Figura 2.12: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Eldorado (2013)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

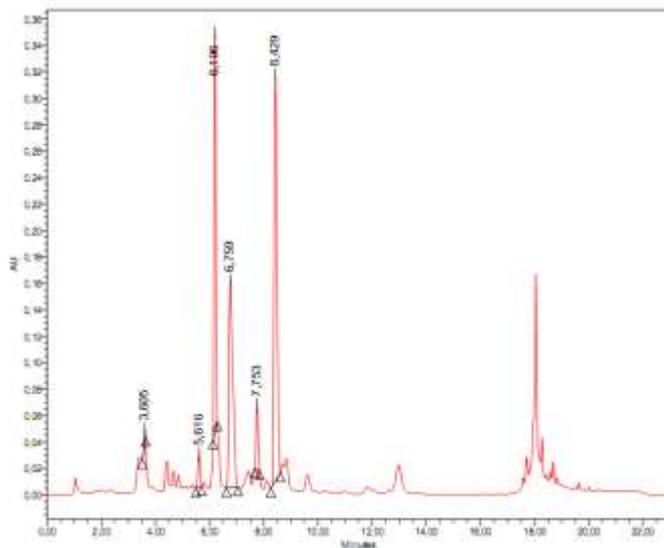


Figura 2.13: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Ibiraguera (2013)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

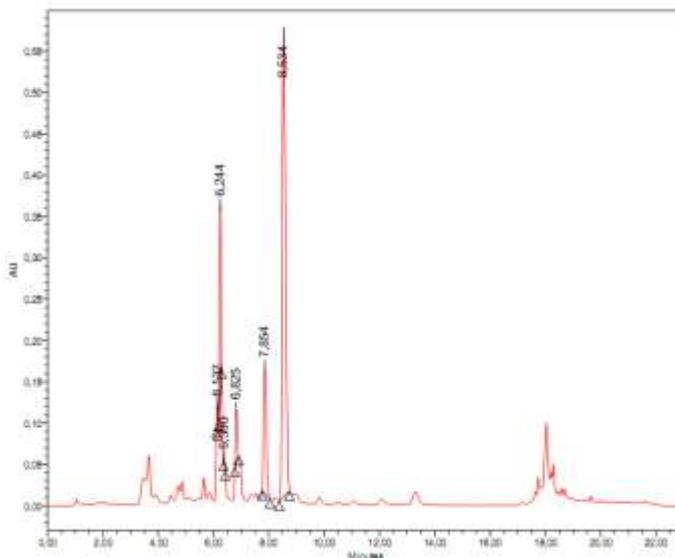


Figura 2.14: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Guaporé (2013)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

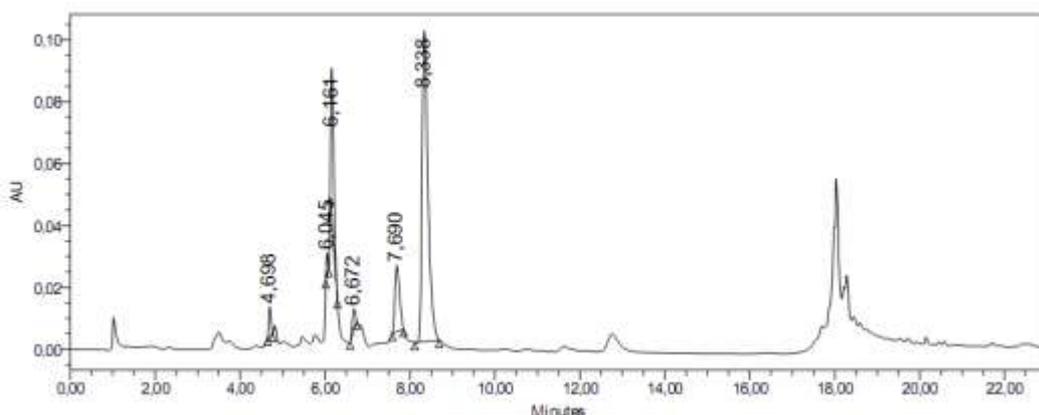


Figura 2.15: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Bento Gonçalves (2014)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

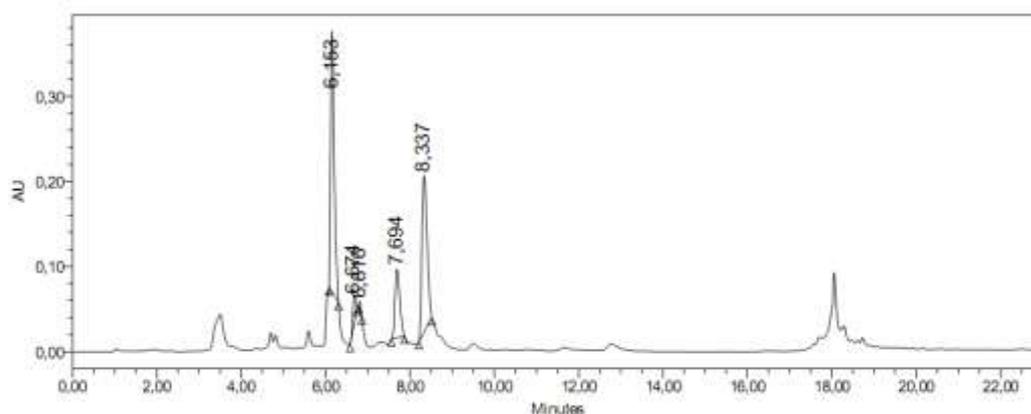


Figura 2.16: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Carlos Barbosa (2014)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

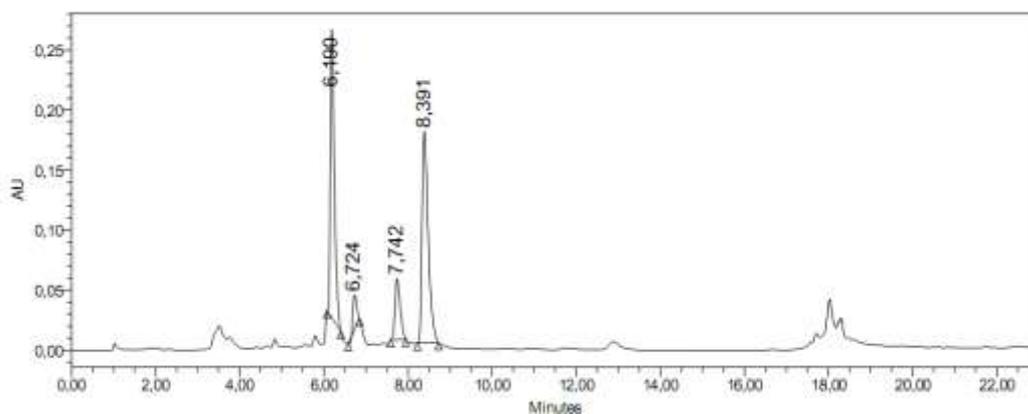


Figura 2.17: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Cotiporã (2014)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

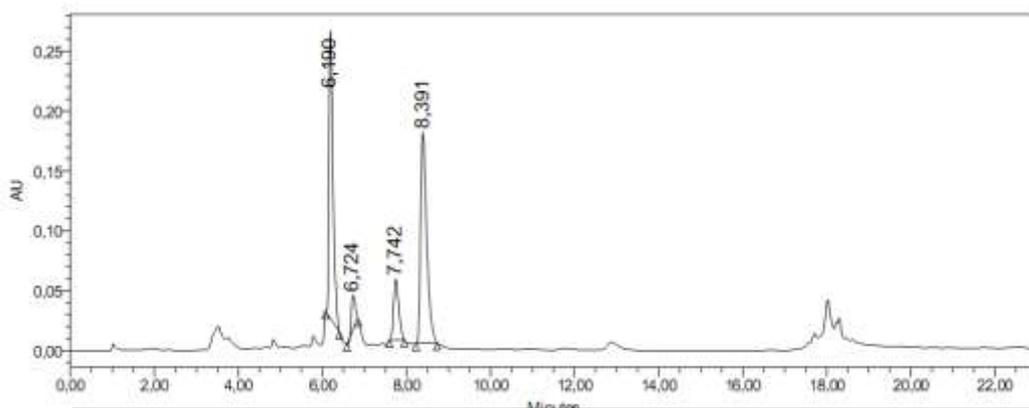


Figura 3.18: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em São Valentim (2014)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 3.3.3.3.

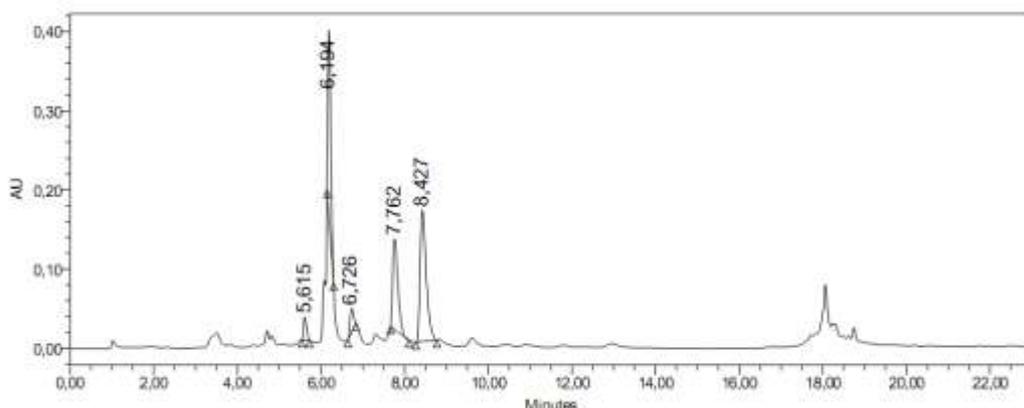


Figura 3.19: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Dois Lajeados (2014)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

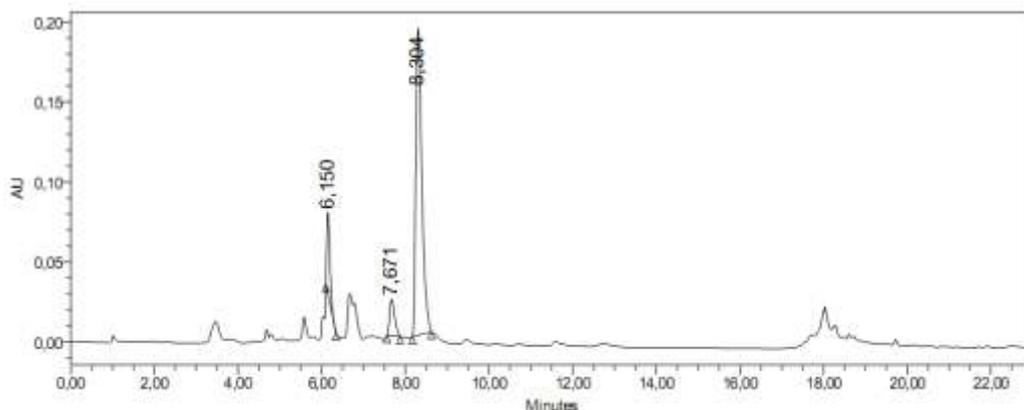


Figura 2.20: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Guaporé (2014)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

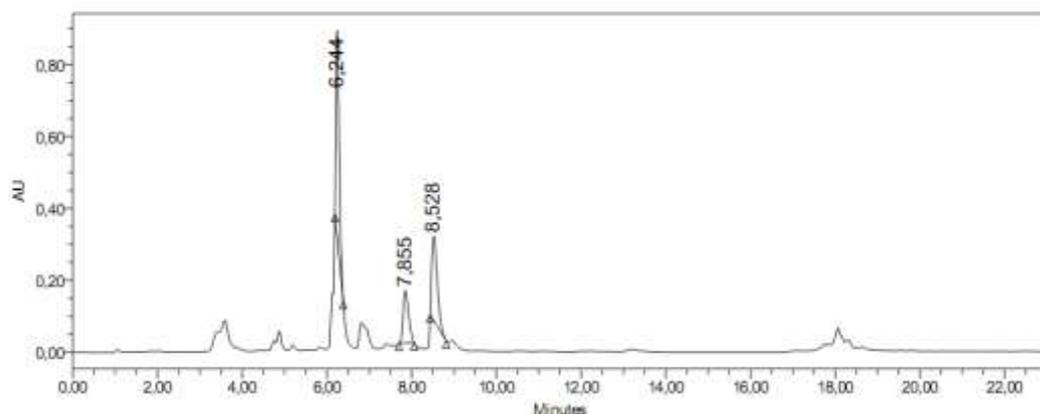


Figura 2.21: Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em Santa Clara (2014)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

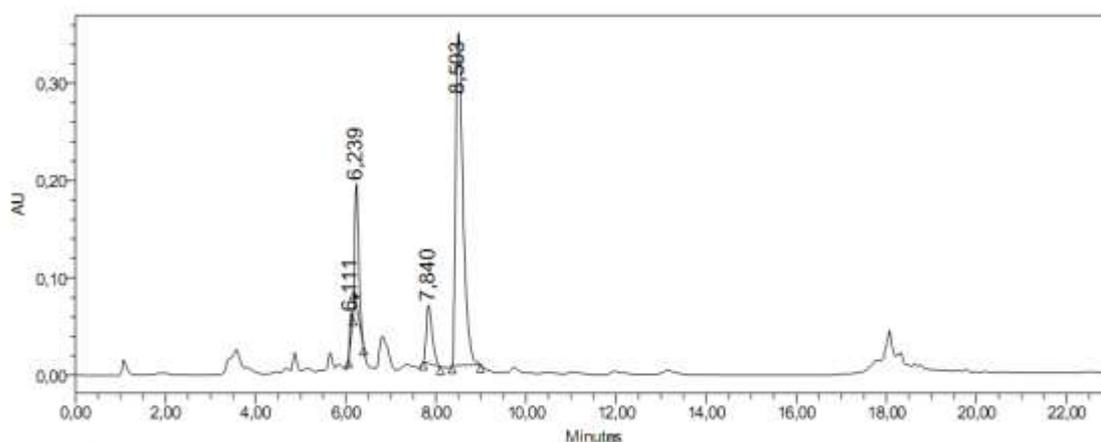


Figura 2.22 Cromatograma de *S. chilensis* - coleta em União da Serra (2014)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

As duas amostras comerciais analisadas neste trabalho apresentaram perfil químico distinto entre si. A amostra adquirida da Edka (Fig. 2.24) apresentou o mesmo padrão químico das amostras provenientes de coleta. Esse material foi recebido na forma íntegra, o que permitiu a visualização de características botânicas de identificação da espécie. Já a amostra proveniente da Biotae (Fig. 2.23), apresentou maior complexidade química. Como a amostra foi recebida em pó e não há caracterização botânica oficial descrita, a conclusão desse dado cromatográfico torna-se mais difícil, uma vez que a empresa paulista não informou o local de cultivo.

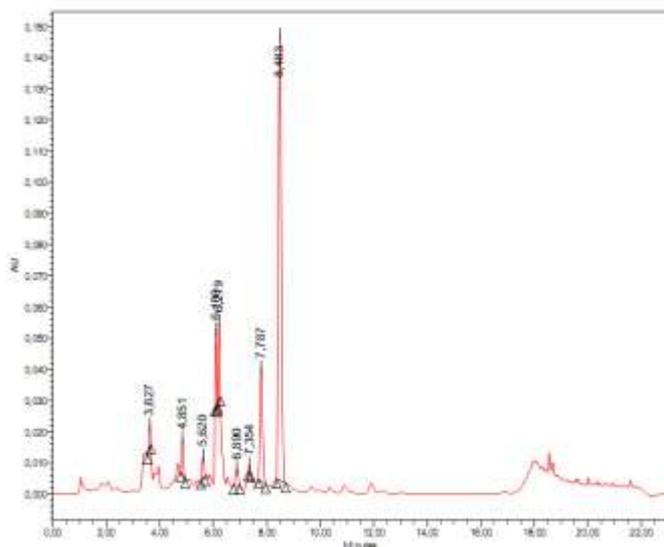


Figura 2.23: Cromatograma de *S. chilensis* - Biotae (2012)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

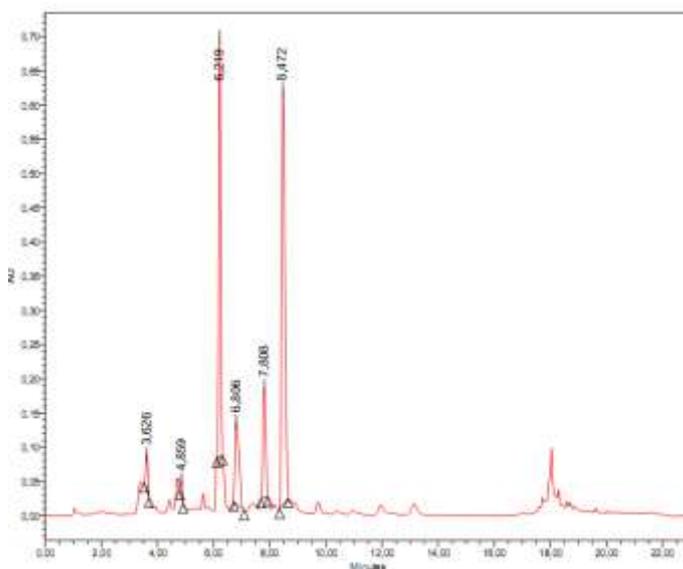
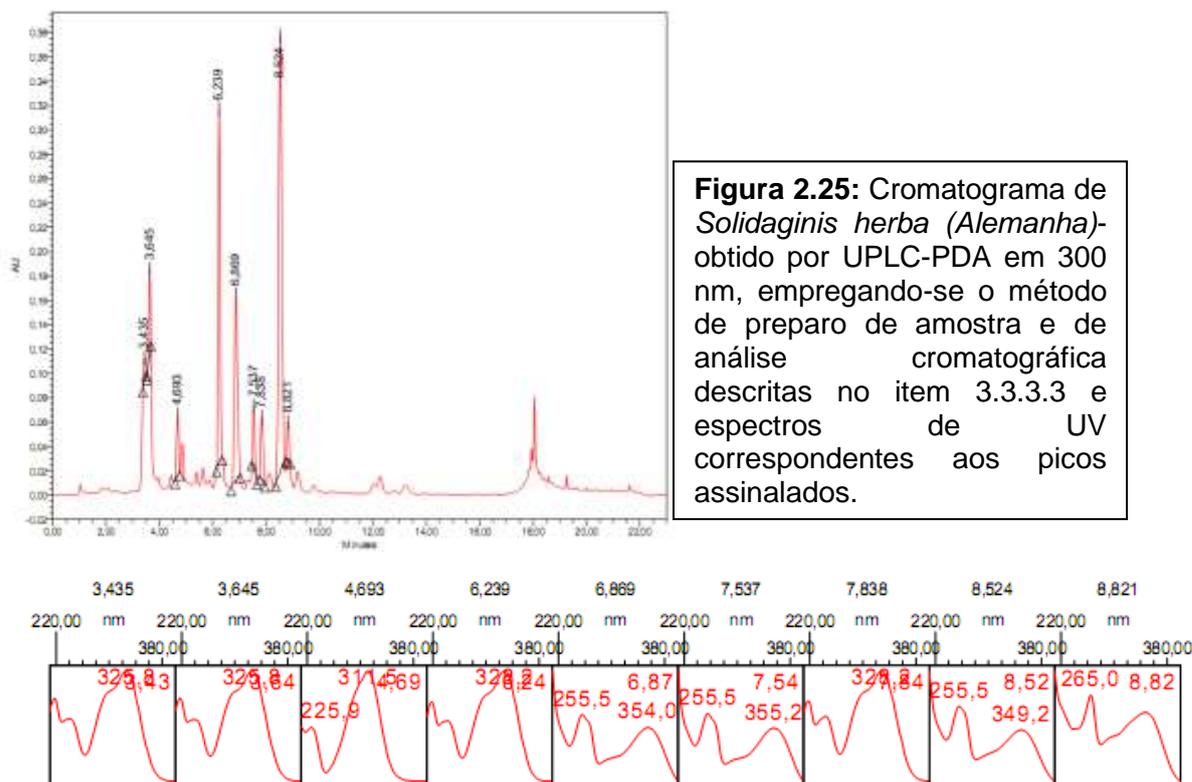


Figura 2.24: Cromatograma de *S. chilensis* - Edka (2012)- obtido por UPLC-PDA em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.3.3.

A amostra de *Solidaginis herba* proveniente da Alemanha apresenta perfil químico mais complexo (Fig. 2.25). Entretanto, a análise dos espectros de ultravioleta permite concluir que, com exceção dos picos eluidos em 4,69 e 8,62 minutos, tratam-se de compostos derivados dos mesmos núcleos dos presentes em *S. chilensis*.



2.3.2.3 Identificação dos principais constituintes de *S. chilensis* por UPLC-PDA-MS

A análise qualitativa de diferentes amostras demonstrou que o perfil químico da espécie não apresenta variabilidades de grande relevância. Desta forma, procedeu-se a identificação dos principais componentes por UPLC-PDA-MS com a amostra coletada em Guaporé. O preparo e as condições cromatográficas foram idênticos aos utilizados para avaliação do perfil cromatográfico.

A avaliação do padrão de fragmentação, espectros de ultravioleta, determinação de massa exata e a comparação com dados da literatura permitiram a identificação dos 4 principais componentes presentes na solução extrativa analisada.

Composto 1 - (Tempo de retenção: 4,73 min; UV $\lambda_{\text{máx}}$ 218, 240, 327; $[M+Na]^+$ 539) m/z : 517,499, 357, 191, 163 $[\text{cafeoil}]^+$ - Estes dados comparados com os

descritos por Aboy e colaboradores (2012) e dos Santos e colaboradores (2004) permitem inferir que trata-se do ácido 3,4-O-dicafeoilquínico.

Composto 2 - (Tempo de retenção: 5,63 min; UV $\lambda_{\text{máx}}$ 255, 354; $[M+H]^+$ 610) m/z : 633, 611, 487, 465, 333, 304, 303, 219, 170. Esses dados estão de acordo com o descrito por Obied e colaboradores (2007) para o composto rutina.

Composto 3 - (Tempo de retenção: 4,73 min; UV $\lambda_{\text{máx}}$ 218, 240, 327; $[M+Na]^+$ 539), Fragmentação: m/z : 373, 499, 191, 179, 163 [cafeoil] $^+$. O pico m/z 517 caracteriza um ácido dicafeoilquínico que somado ao padrão de fragmentação descrito por Aboy e colaboradores (2012) e dos Santos e colaboradores (2004) torna possível inferir que se trata do composto ácido 4,5-O-dicafeoilquínico.

Composto 4 - Tempo de retenção: 7,445 min; UV $\lambda_{\text{máx}}$ 255, 350; $[M+Na]^+$ 471,097 Da (erro 1,2 ppm).

O espectro de UV apresenta a segunda banda em 250 a 260 nm, o que caracteriza uma substituição em 3-OH (Tibertil et al., 2007). O padrão de fragmentação MS/MS do íon molecular com m/z : 449 e 301, somado aos dados de massa exata (massa calculada: 4720982 Da e massa experimental: 472,0976 Da- erro 1,27 ppm) permitem inferir que trata-se do composto quercetrina (quercetin-3-O-ramnosideo).

A presença de rutina e do ácido 4,5-O-dicafeoilquinico no extrato etanólico obtido das folhas de *S. chilensis* foi descrita por Tamura e colaboradores (2009), entretanto, a presença desses compostos nas inflorescências não é descrita na literatura. Bradette-Hébert e colaboradores (2008) identificaram o ácido 4,5-O-dicafeoilquinico nas inflorescências de *S. canadensis*. A identificação de rutina, quercetrina e ácido 3,4-O-dicafeoilquinico nas inflorescências de *S. chilensis* não havia sido anteriormente relatada.

Os testes realizados neste trabalho contribuem para o desenvolvimento de métodos e a seleção de parâmetros para caracterização e controle de *S. chilensis*. Entretanto, o estabelecimento dos limites mínimos para os ensaios físico-químicos requer maior número de amostras com diferentes pontos de coleta. Pela primeira vez foram identificados os flavonoides rutina e quercetrina

bem como o ácidos 3,4 e 4,5-O-dicafeoilquinico nas inflorescências *S. chilensis*, dados importantes para a caracterização química desta droga vegetal.

2.4 Caracterização química quantitativa de *S. chilensis* por CLAE-PDA

2.4.1 Materiais e métodos

2.4.1.1 Desenvolvimento e validação de método analítico pra quantificação de flavonoides totais

Preparação da amostra

Amostras de cerca de 0,1 g de droga vegetal moída (250 µm) foram submetidas a refluxo com 20 mL de metanol 70% e diferentes concentrações molares de ácido clorídrico, durante períodos de 10, 20 ou 30 minutos. A solução extrativa resultante foi filtrada, utilizando algodão. O resíduo juntamente com o algodão utilizado na filtração foram novamente submetidos à extração com 10 mL de metanol a 70 % (procedimento repetido duas vezes). Os três filtrados foram combinados e o metanol removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Após, as agliconas foram extraídas por partição com acetato de etila (1 alíquota de 20 mL, seguida de duas repetições com 15 mL cada). As frações orgânicas combinadas foram lavadas com duas alíquotas de 50 mL de água e posteriormente filtradas sobre sulfato de sódio anidro. O extrato foi seco em evaporador sob pressão reduzida e o resíduo ressuspensionado em 10 mL de metanol. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

As amostras foram diluídas em metanol 70% sempre que necessário para adequação à faixa de linearidade. As amostras foram filtradas através de membrana (PVDF, 0,45 µm) e 5 µL foram injetados em triplicata. Os teores foram calculados pela média das determinações, em gramas de quercetina por 100 gramas da amostra (g%), considerando o teor de água da amostra. Para a validação do método por CLAE, utilizou-se amostra obtida pela hidrólise em 30 min, com concentração de 0,3 M de ácido clorídrico.

Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em aparelho de cromatografia a líquido Waters Alliance 2695, acoplado a detector de arranjo de diodos UV/VIS (Modelo 2487, Waters) e sistema de gerenciamento e aquisição de dados *Empower Software* (Waters). Foi utilizada coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex®), protegida por pré-coluna Bondapak C₁₈, (8 x 1 mm, 37-55 µm, Waters). Os parâmetros cromatográficos utilizados foram a temperatura 22 °C ± 2 °C; sensibilidade de detecção de 0,05 AUFS; volume de injeção de 5 µL; fase móvel constituída por água: ácido fórmico 0,08 % v/v (Fase A) e metanol: ácido fórmico 0,08 % v/v (Fase B); fluxo de 0,9 mL/min; gradiente em modo linear (0-10 min - 30 a 47 % de Fase B; 10-20 min 47 %-100 %; 20-28 min - 30 % de Fase B; 28-38 min 47 % de Fase B); detecção em comprimento de onda de 371 nm.

Seletividade e especificidade

A seletividade foi determinada por fatiamento do pico de interesse e observação do espectro de ultravioleta em 371 nm. Considera-se que não há coeluição quando observados máximos de absorção com diferenças inferiores a ± 2 nm. A especificidade foi avaliada pela resposta cromatográfica obtida pelos resultados da análise da amostra antes e após a adição de substância química de referência (SQR) quercetina. Os parâmetros observados foram sobreposição dos picos, deslocamento no tempo de retenção e surgimento de picos adicionais quando adicionada a substância de referência.

Preparação das curvas analíticas padrão

A determinação da faixa de linearidade do método foi realizada pela construção de curvas preparadas de forma independente em duplicata. Os cinco pontos foram preparados dentro dos intervalos de 80 a 120 % da concentração média, representando a faixa de 480 a 720 µg/ml do padrão quercetina diluído em metanol 80 %. Cada ponto foi injetado em triplicata. As curvas de concentração em função da área foram plotadas e os dados analisados por regressão linear. Os resultados foram avaliados

estatisticamente através do teste de regressão linear com o auxílio do Microsoft Excel[®] (2007).

Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Foram utilizados os dados de regressão da curva analítica média de quercetina para efetuar os cálculos, de acordo com as equações abaixo e conforme preconizadas pela ICH (2005) e Anvisa (2003).

$$LD = 3,3 \cdot \left(\frac{S}{I} \right) \quad LQ = 10 \cdot \left(\frac{S}{I} \right)$$

Onde o S = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e I = inclinação da curva.

Precisão (precisão intermediária e repetibilidade)

A repetibilidade foi dada por 6 determinações, feitas no mesmo dia e pelo mesmo analista. A precisão intermediária foi dada pela concordância dos resultados obtidos em três dias consecutivos por dois analistas diferentes.

Recuperação

A recuperação foi avaliada em três níveis de concentração (80, 100 e 120 %), sendo observada a faixa de linearidade do método. Cada amostra e os brancos foram injetados em triplicata.

Robustez

A robustez do método foi avaliada pela concordância entre os resultados obtidos com variação dos seguintes parâmetros: colunas de diferentes lotes; fluxo; proporção de solventes e quantidade de ácido.

2.4.1.2 Desenho experimental e análise fatorial superfície de resposta

A influência das variáveis concentração molar de HCl e tempo de reação na determinação de flavonoides totais foram avaliadas por desenho fatorial 3^2 usando o software 15.0 Minitab (Minitab Inc.). Os valores das variáveis estão descritos na Tabela 2.2.

2.4.1.3 Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados para a obtenção da curva analítica envolveu a determinação da equação da reta por regressão linear e do coeficiente de correlação utilizando software Excel (Microsoft). Análise de variância (ANOVA) e teste-T foram utilizados nos experimentos de otimização por *software* Minitab (Minitab Inc.) 15.0.

2.4.1.4 Teor de flavonoides totais por espectrofotometria

O conteúdo de flavonoides totais, expressos em hiperosídeo, foi determinado de acordo com método descrito na Farmacopeia Britânica (2009) para *Solidaginis herba*. Para tal, em balão de 100,0 mL, foram mantidos sob refluxo por 30 min, 0,2 g da amostra (250), 1 mL de hexametilenotetramina (5 g/L), 2,0 mL de ácido clorídrico e 20,0 mL de acetona. Após filtração, a extração foi repetida mais duas vezes com alíquotas de 20,0 mL de acetona durante 10 min. As soluções extrativas foram então reunidas e o volume completado a 100,0 mL com o mesmo solvente. Exatamente 20,0 mL desta solução foram transferidos para funil de separação e adicionados 20,0 mL de água. Então foi realizada a partição com acetato de etila (1x15 mL e 2x10 mL). A fração orgânica foi lavada com 50,0 mL de água, filtrada sobre sulfato de sódio anidro e o volume completado a 50,0 mL. Após 30 min de reação entre alíquota de 10,0 mL da solução extrativa, 1,0 mL de cloreto de alumínio 5% e solução de ácido acético glacial 5 % em metanol q.s.p. 25,0 mL, foi realizada leitura em espectrofotômetro em 425 nm.

2.4.2 Resultados e discussão

Os estudos químicos realizados neste trabalho e apresentados no item 2.3.2.3 evidenciaram a presença predominante de ácidos fenólicos e flavonoides no extrato polar. Esses metabólitos podem ser relacionados com algumas atividades farmacológicas, como a ação antiinflamatória, relatada para a espécie (Tamura et al., 2009) por diversos autores e ensaiada em diferentes modelos *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* (Goulart et al., 2007 ; Liz et al., 2008 ; Tamura

et al., 2009; Melo et al. 2011) e em ensaio clínico duplo-cego placebo-controlado (Da Silva, et al., 2010). Além disso, ação gastroprotetora foi evidenciada em estudos realizados com extrato aquoso administrado a camundongos (Bucciarelli et al., 2010).

Apesar do notório potencial de utilização terapêutica, nenhum método de quantificação de flavonoides foi estabelecido para a caracterização da espécie ou qualificação química. Em estudos preliminares, foi verificada a presença de flavonóides glicosilados derivados da quercetina no extrato metanólico da espécie.

A determinação quantitativa individual de flavonóides glicosilados em material vegetal, de forma geral, é uma alternativa viável, porém deve-se considerar a disponibilidade comercial e o custo das substâncias de referência. Além disso, sempre que possível, deve ser avaliado se o composto quantificado é o responsável ou tem relação com a atividade biológica. Entretanto, no caso dos flavonoides, essa análise torna-se difícil pelo grande número de glicosídeos derivados de agliconas como quercetina e canferol, por exemplo. Além disso, dificilmente é possível associar o efeito terapêutico a um único componente do extrato, seja pela complexidade química e/ou pelo desconhecimento da farmacocinética do mesmo.

Desta forma, a hidrólise ácida dos glicosídeos com posterior quantificação da aglicona por CLAE, representa uma alternativa confiável, rápida e barata para determinação de flavonoides totais. Geralmente, esta hidrólise requer elevadas concentrações molares de ácidos minerais (1-2 M) em condições de refluxo. No entanto, as condições de hidrólise devem ser otimizadas para que o processo seja eficiente sem promover degradação das agliconas, uma vez que cada matriz possui diferente complexidade, tipo e grau de glicosilação (Huber et al., 2007, Francescato et al., 2013). Em experimentos prévios foi constatado que a técnica farmacopeica para a determinação de flavonoides totais em *S. virgaurea* e *Solidaginis herba* não é totalmente representativa do conteúdo para *S. chilensis*, pois provoca a degradação da aglicona que pode ser observada pela coloração avermelhada da fase aquosa, durante a etapa de extração das agliconas por partição. Essa reação de degradação é conhecida pela formação de cianidina a partir da degradação de flavonóis (Costa, 1994).

Desta forma, neste trabalho, foi realizada a otimização dos parâmetros tempo e concentração de HCl, que estão diretamente ligados à eficiência da hidrólise. A otimização foi realizada por Análise de Superfície de Resposta a fim de mensurar a influência simultânea dos parâmetros (Myers et al., 2009). A aglicona liberada foi quantificada em método desenvolvido e validado neste trabalho.

Otimização da hidrólise e quantificação por CLAE

A otimização dos parâmetros mais adequados para a realização da hidrólise foi dada em etapas e com o objetivo de esgotamento do material vegetal, com a mínima perda do analito por degradação. Primeiramente selecionou-se o melhor solvente extrator. Para isso, a concentração de ácido clorídrico (1,18 M) e o tempo de hidrólise (30 min) foram mantidos constantes para que fosse avaliada a influência da utilização de metanol a 20%, 50%, 70% e 80%, de acetonitrila e de acetona sobre teor de flavonoides totais. As concentrações de quercetina detectadas nas soluções extrativas foram de: $1,18 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ (MeOH 20%); $1,77 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$ (MeOH 50%); $2,01 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ (MeOH 70%); $0,81 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ (MeOH 80%). As concentrações de quercetina nas soluções extrativas obtidas com acetonitrila e acetona não foram numericamente determinadas por que se apresentaram abaixo do valor mínimo da faixa de linearidade do método. Desta forma, a proporção metanol 70 % foi selecionada para que os parâmetros tempo e concentração de ácido clorídrico fossem avaliados.

Os valores das variáveis independentes e os respectivos teores calculados de acordo com o método validado neste trabalho estão representados na Tabela 2.5. A análise fatorial demonstrou que os dois fatores têm influência sobre o teor. Na figura 2.26 observa-se que os valores plotados atingiram o platô máximo nas condições ótimas de 0,59 M e tempo de 21 minutos.

Tabela 2.2.: Matriz de planejamento experimental de condições de hidrólise.

Tempo (min)	HCl [Molar]	Teor médio ± DPR(g%)
10	0,30	4,99 ± 0,9
10	0,59	6,31 ± 3,0
10	1,18	3,09 ± 2,2
20	0,30	6,61 ± 0,7
20	0,59	7,69 ± 1,7
20	1,18	3,06 ± 4,7
30	0,30	5,97 ± 1,6
30	0,59	6,54 ± 1,1
30	1,18	2,84 ± 4,0

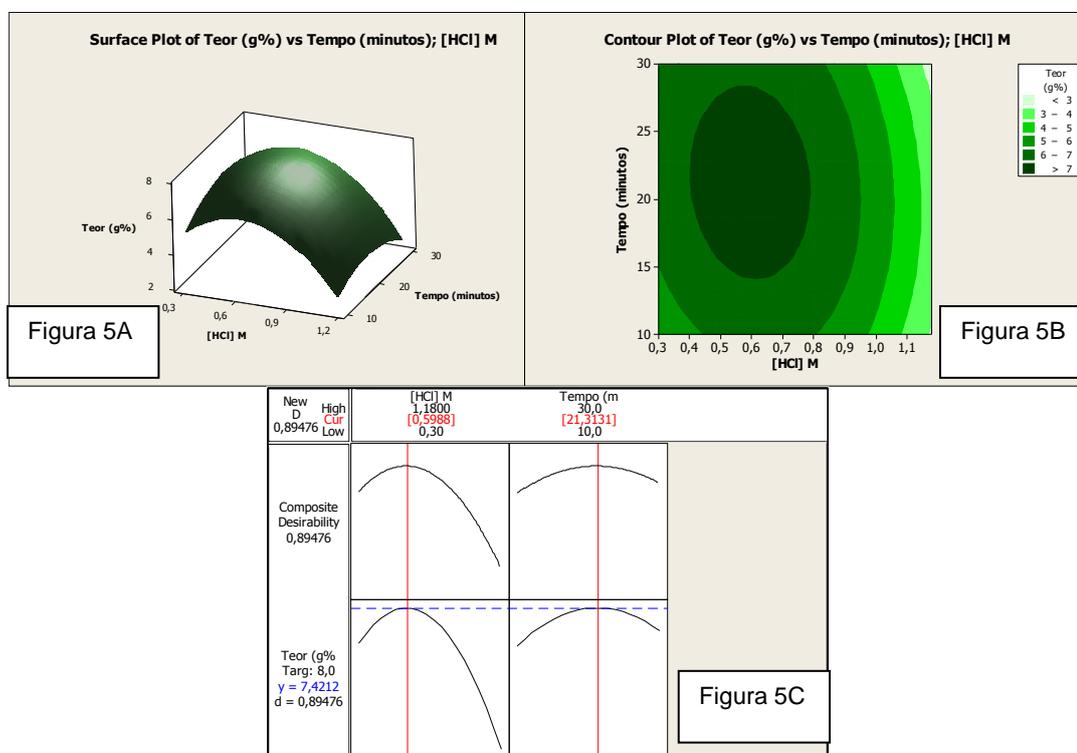


Figura 2.26: Superfície de resposta gerada a partir do planejamento fatorial 3^2 para a determinação do teor de quercetina em *S. chilensis*.

Validação de método de quantificação por CLAE

O sistema eluente mais adequado para a quantificação do analito foi determinado experimentalmente testando-se diferentes fases móveis, em várias proporções, de modo a obter a melhor resolução entre picos em menor tempo de análise. Após os testes e por não ter sido observada interferência no

analito, foi selecionado o gradiente composto por MeOH (0,08 % ácido fórmico) e H₂O (0,08 % ácido fórmico).

O comprimento de onda de 371 nm apresentou a absorção máxima e, desta forma, foi selecionado para a detecção do analito (quercetina). O perfil cromatográfico típico da solução de amostra é apresentado Figura 2.27.

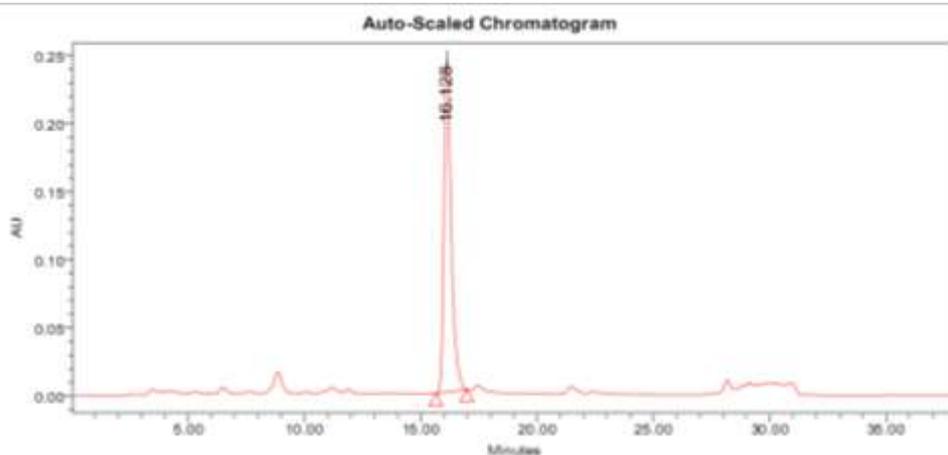


Figura 2.27: Cromatograma característico obtido de extrato hidrolisado de *S. chilensis*, em 371 nm.

Na Figura 2.28 está demonstrada a especificidade do método, verificada por comparação dos cromatogramas obtidos com solução amostra e solução amostra adicionada de quercetina. Como pode ser observado pelo aumento da absorção, houve a sobreposição do pico de interesse e o da quercetina adicionada, sem deslocamento importante no tempo de retenção. Desta forma, também é possível confirmar a identidade do analito.

A seletividade do método foi verificada pelo comportamento do espectro de UV da solução amostra e da solução amostra adicionada de quercetina quando realizada a varredura de 210 a 400 nm. Nenhum desvio nos máximos de absorção foi verificado. Desta forma, nas condições estabelecidas, o analito apresentou tempo de retenção médio de 16 minutos, em método de análise de 28 min acrescidos de mais 10 min de equilíbrio. Como pode ser visualizado na Figura 2.28, o máximo de absorção ocorre em 371 nm, comprimento de onda selecionado para realizar as análises.

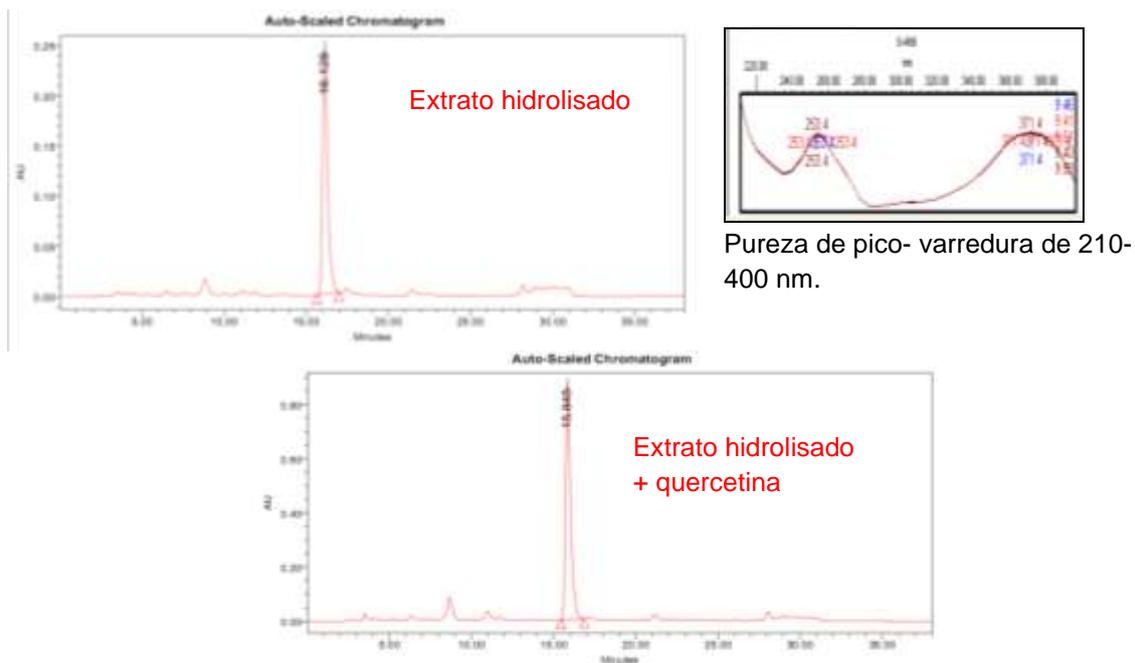


Figura 2.28: Parâmetro de especificidade do método referente ao extrato hidrolisado em relação ao extrato adicionado da substância de referência quercetina; parâmetro de seletividade, obtido por varredura de 210 a 400 nm.

A linearidade do método desenvolvido, para a faixa de concentração 0,48 - 0,72 mg/mL, foi evidenciada pelos coeficientes de regressão obtidos das curvas analisadas individualmente $R^2= 0,9969$ e $0,9925$ (Figura 2.29) e da curva média $R^2= 0,9991$ (Figura 2.30). A equação da curva média ($y = 2. 10^7x - 54822$) foi utilizada para determinar a concentração de analito nas amostras.

A Tabela 2.6 apresenta os dados obtidos na aplicação da análise de variância (ANOVA: fator único) com o auxílio do Microsof Excel[®] (2007) aplicada aos dados da curva analítica média de quercetina. A partir da análise dos dados de variância constata-se que a curva apresenta diferenças significativas entre as concentrações ($F_{\text{cal.}}: 3292,813$ e $F_{\text{crit.}}: 1,166E-05$) e desvio da linearidade não significativo.

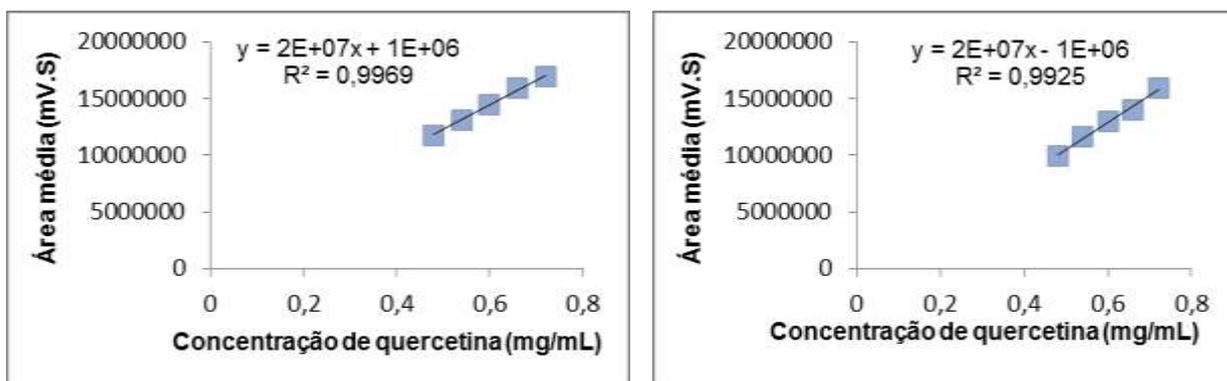


Figura 2.29: Gráficos das curvas analíticas de quercetina - Linearidade do método por CLAE.

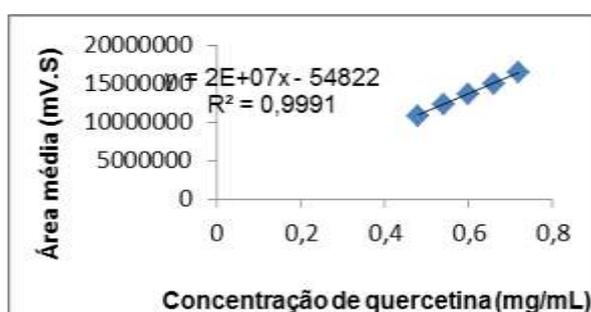


Figura 2.30: Gráfico correspondente a curva analítica média de quercetina - Linearidade do método por CLAE.

Tabela 2.3: Análise de variância (ANOVA) fator único, para a curva analítica média de quercetina.

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,87456E+13	1,87456E+13	3292,813	1,16586E-05
Resíduo	3	17078612991	5692870997		
Total	4	1,87626E+13			

Os limites de quantificação e detecção de foram LD= 0,035 mg/mL e LQ= 0,1 mg/mL, respetivamente, indicando a boa sensibilidade do método analítico para a quantificação de quercetina.

Na Tabela 2.4 estão representados os resultados obtidos no ensaio de precisão intermediária. Os teores médios de quercetina variaram de $5,841 \pm 0,19$ a $5,941 \pm 0,05$ g/% e os desvios padrão relativos (DPR%) nas hidrólises realizadas no mesmo dia e em três dias consecutivos foram adequados (<5 %), demonstrando-se, desta forma, que o método apresenta apropriada precisão.

Tabela 2.4: Resultados do ensaio de precisão intermediária para o método de quantificação do teor de flavonoides totais de *S. chilensis* por CLAE.

Dia	n	Área média ± DP	Teor de quercetina (g%)	Média (g%) ± DP	DPR %
1	1	10342900,5 ± 114696	5,832	5,873 ± 0,03	0,61
	2	10831463,5 ± 119743	5,581		
	3	10660991,5 ± 10574	5,891		
2	1	10877895,5 ± 139614	5,922	5,841 ± 0,19	3,29
	2	9973284 ± 119786	5,621		
	3	10766044 ± 19281	5,978		
3	1	10850157 ± 32236	5,882	5,941 ± 0,05	0,98
	2	10585448 ± 29736	5,941		
	3	10922789 ± 84766	5,999		
Média (inter-dias) (mg/g) ± DP				5,885 ± 0,051	0,87

Cada ponto corresponde à média de três determinações; DP: desvio padrão; Concentração (g/%): g de quercetina por 100 g de amostra; DPR: Desvio padrão relativo (%); n: replicatas.

A repetibilidade do método, verificada por 6 hidrólises realizadas no mesmo dia, está representada na Tabela 2.5 O teor médio de flavonoides, calculados como quercetina, foi de 5,891 ± 0,12 g%. O DPR observado para a sextuplicata foi de 2,10 %, o que demonstra que o método apresenta adequada precisão-repetibilidade.

Tabela 2.5: Resultados do ensaio de repetibilidade para o método de quantificação do teor de flavonoides totais de *S. chilensis* por CLAE.

Extrações	Massas (g)	Áreas médias ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Teor de quercetina (g%)
1	0,1783	10342900,5	5,832
2	0,1848	10831466,5	5,891
3	0,1817	10660991,5	5,898
4	0,1827	10339030	5,689
5	0,1812	10883708	6,037
6	0,1823	10877061	5,997
Média \pm DP: 5,891 \pm 0,12 g%; DPR: 2,10 %			

Os resultados obtidos para o parâmetro exatidão estão representados na Tabela 2.6. Foram obtidas recuperações de 95,25 a 102,9 % e média \pm DPR de 99,24 \pm 3,7 %, demonstrando que o método desenvolvido apresenta exatidão satisfatória.

Tabela 2.6: Resultados do ensaio de exatidão (recuperação) para o método de quantificação de quercetina em amostra hidrolizadas de *S. chilensis*.

Nível de concentração	Concentração adicionada (mg/mL)	Concentração detectada (mg/mL)	Recuperação (%)
Baixo (60%)	0,33	0,314	95,25
Médio (100%)	0,55	0,55	100
Alto (140%)	0,77	0,789	102,49

A robustez do método foi avaliada alterando-se os respectivos parâmetros: fluxo de 0,9 para 1 mL/min; intercâmbio de colunas com as mesmas especificações, porém de diferentes lotes; alteração da concentração de ácido fórmico na Fase A (original: 0,08 %; teste: 0,1 %) e mudança na proporção de solventes (condição original: início com 70 % de fase A; teste: início com 72 % de fase A). Os resultados (Tabela 2.7) demonstraram que não

houve influência sobre a determinação quantitativa de quercetina após as variações no método descritas. O teor médio encontrado foi de $5,72 \pm 0,07$ g% e o DPR (%) resultante de 1,26. Desta forma, conclui-se que o método desenvolvido resiste a pequenas variações sem prejuízo à confiabilidade analítica.

Tabela 2.7: Dados do parâmetro de robustez avaliados no método de quantificação do teor de flavonoides totais para extratos hidrolisados de *S. chilensis*.

Parâmetros	Teor de quercetina (g%)
Fluxo 1 mL/min	5,63
MeOH:ácido fórmico 0,1%	5,76
Coluna lote G4252EO	5,75
Proporção de solventes	5,70

Em suma, o resultado da otimização da hidrólise ácida para a determinação flavonoides totais em inflorescências de *S. chilensis* por planejamento fatorial 3^2 foi bastante satisfatória, pois os dados experimentais, nas condições simuladas, demonstraram a presença de quercetina em concentração de $8,03 \pm 1,6$ g%.

O método desenvolvido e validado mostra-se ainda mais útil para a qualificação e o controle de qualidade da droga vegetal quando este é comparado ao método farmacopeico descrito para *Solidaginis herba*. A determinação espectrofotométrica do teor, expressos em hiperosídeo, demonstrou valores de $3,15 \pm 0,06$ % para *S. chilensis*. Esse valor é condizente com o encontrado para a *Solidaginis herba*: $3,79 \pm 0,2$ % para a amostra comercial portuguesa e $2,64 \pm 0,07$ % para a amostra alemã. Ambas as amostras estão de acordo com o teor mínimo aceito, que é de 2,5 % (FB, 2010). Entretanto, se comparados os valores obtidos pelo métodos com hidrólise otimizada e o farmacopeico, observa-se que o valor é 154 % maior em condições otimizadas. Considerando-se que um método analítico ideal deve esgotar a droga vegetal sem provocar a degradação de analito, o método proposto mostra-se ideal para a determinação de flavonoides totais nas inflorescências de *S. chilensis*.

2.5 Procedimentos para tratamento dos resíduos

Os resíduos gerados foram descartados de acordo com os procedimentos descritos no Plano de Gerenciamento de Resíduos estabelecido pela Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT/FAR/UFRGS).

2.6 Referências

Aboy, A.L.; Apel, M.A.; Debenedetti, S.; Francescato, L.; Rosella, M.A.; Henriques, A.T. Assay of caffeoylquinic acids in *Baccharis trimera* by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.1219, p. 147-153, 2012.

Bradette-Hébert, M.E.; Legault, J.; Lavoie, S.; Pichette, A. A new labdane diterpene from the flowers of *Solidago canadensis*, **Chemical Pharma Bulletin**, v.56(1), p.82-84, 2008.

Anvisa, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 02 jun. 2003.

British Pharmacopoeia Commission Secretariat, British Pharmacopoeia 2011. Volume IV. Herbal Drugs, The Stationary Office, London, 2011.

Bucciarelli, A.; Minetti, A.; Milczakowskyg, C.; Skliar M. Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Pharmaceutical Biology**, v.48(9), p.1025-30, 2010.

Costa, A. F. (1994) “**Farmacognosia**”, Vol. 3, Fundação Calouste, Gulbenkian, Lisboa.

Da Silva, A.G.; De Sousa, C.P.G.; Koehler, J.; Fontana, J.; Christo, A.G.; Guedes-Bruni, R.R. Evaluation of an extract of Brazilian arnica (*Solidago chilensis* Meyen, Asteraceae) in treating lumbago. **Phytotherapy Research**, v.24 (2), p.283-287, 2010.

Dos Santos, A.R.; de Barros, M.P.; Santin, S.M.O.; Sarragiotto, M.H.; Souza M.C., Eberlin, M.N., Meurer, E.C. Constituintes polares das folhas de *Machaonia brasiliensis* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 27 (4), 2004.

Farmacopeia Brasileira (2010), 5ª Ed., Atheneu, São Paulo.

Francescato, L.N.; Debenedetti, S.L.; Schwanz, T.G.; Bassani, V.L.; Henriques, A.T. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC–ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. **Talanta**, v.105, p.192–203, 2013.

Gobbo-Neto L.; Lopes N.P.; Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30(2), p.374-81, 2007.

Goulart, S.; Moritz, M.I.G.; , Lang, K.L.; Liz, R.; Schenkel, E.P.; Fröde, T.S.; Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113 (2), p.346-353, 2007.
Helliwell K. Herbal Reference Standards. **Pharmeuropa**, v.2, p.235-238, 2006.

Huber, L.S.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Rodrigues, M.I. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66(2), p. 142-151, 2007.

ICH - **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005. 17 pag.

Klein, T.; Longhini, R.; Bruschi, M.L.; Mello, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissory. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v.30(3), p.241-248, 2009.

Khan, I.A., Troy Smillie, T. Implementing a “Quality by Design” Approach to Assure the Safety and Integrity of Botanical Dietary, **Supplements Journal of Natural Products**, v.75(9), p.1665–1673, 2012.

Liz, R.; Vigil, S.V.; Goulart, S.; Moritz, M.I.; Schenkel, E.P.; Fröde, T.S. The anti-inflammatory modulatory role of *Solidago chilensis* Meyen in the murine model of the air pouch. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.60(4), p. 515-21, 2008.

Melo, A.M.; Bittencourt, P.; Nakutis, F.S.; Silva, A.P.; Cursino, J.; Santos, G.A.; Ashino, N.G.; Velloso, L.A.; Torsoni, A.S.; Torsoni, M.A. *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract reduces JNK/I κ B pathway activation and ameliorates insulin resistance in diet-induced obesity mice. **Experimental Biology Medicine** (Maywood), v.236 (10), p.1147-55, 2011.

Myers, R.H.; Montgomery, D.C.; Anderson-Cook, C.M. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**, 3ed. Hardcover:Wiley, 2009.

Obied, H.K.; Bedgood, D.R.; Prenzler, P.D.; Robards, K. Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography **Analytica Chimica Acta**, v.12(2), p.176-89, 2007.

Reif, K.; Sievers, H.; Steffen, J-P.; The role of chemical reference standards as analytical tools in the quality assessment of botanical materials – A European perspective. **Herbal Gram**, v.63, p.38-43, 2004.

Russo, A., Garbarino, J. *Solidago chilensis* Meyen et *Kageneckia oblonga* Ruiz & Pav.: petite revue de leur profil antioxydant. **Phytothérapie**, v.6, p.333–341, 2008.

Sabir, S.M.; Ahmad, S.D.; Hamid, A.; Khan, M.Q.; Athayde, M.L.; Santos, D.B.; Boligon, A.A.; Rocha, J.B.T. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. **Food Chemistry**, v.131(3), p. 741-747, 2012.

World Health Organization (1998) "*Quality control methods for medicinal plant materials*", Geneva.

Tamura, E.K.; Jimenez, R.S.; Waisman, K.; Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P.; Malpezzi-Marinho, E.A.L.; Marinho, E.A.V.; Farsky, S.H.P. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.478-485, 2009.

Tiberti, L.A.; Yariwake, J.H.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K.; Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **Journal of Chromatogra B**, v.846, p.378-384, 2007.

Veit, M.; Wissel, S. 2007. Definitionen und Anforderungen an Referenzstandards in der Arzneimittelprüfung. **Pharma Industrial**, v.69, p.1475-1480, 2007.

2.7 Caracterização química quali e quantitativa dos óleos voláteis e atividade biológica – Manuscrito: *Solidago chilensis* essential oil as a potential new drug against resistant *Candida* isolates, without human blood cell damage and genotoxicity

Rafaela Marin¹, Alexandre M. Fuentefria¹, Luís Flávio Oliveira², Miriam Anders Apel¹,
Angélica Rocha Joaquim¹, Debora Marina Vian¹, Pedro Ros Petrovick¹, Amélia T.
Henriques¹

¹ Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

² Department of Pharmacy, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, Brazil

*Corresponding author

Address: Faculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga 2752, 90.610.000, Porto Alegre, RS, Brazil

Tel.: 55-51-3308 5258

Fax: 55-51-3308 5437

E-mail: rafaelamarin@gmail.com

Abstract

The increased incidence and severity of opportunist fungal infections, and the morbidity and mortality associated with them, have led to many reports of resistance of microorganisms to antifungal drugs, demonstrating the importance of bioprospecting studies in the search for active natural products without human toxicity. The aim of this study was to find new potential antifungal agents from *Solidago chilensis*, a species with medicinal use, which is easy to cultivate and has widespread occurrence. Plant leaves and inflorescences were steam distilled and the composition of the essential oils was determined by means of GC-MS analysis. The main constituents of the inflorescences were D-limonene (30.31%), germacrene D (33.07 %) and bicyclogermacrene (17.81%), and the main constituents of the leaves were germacrene D (29.81%), bicyclogermacrene (11.7%) and spathulenol (26.09%). The antifungal activity of the essential oils was evaluated against 15 clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *C. krusei* by the broth microdilution method. Human cell viability and DNA damage after treatment with essential oils were assessed through the comet assay. Both essential oils showed strong activity, with MIC and MFC ranging from 1.95 to 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Furthermore, it was also observed that *S. chilensis* essential oils have no cytotoxicity to human cells when used at concentrations of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The essential oils are active in vitro against the *Candida* species, proving to be promising sources, at non-cytotoxic concentrations, of new phytotherapeutic agents for the treatment mycosis.

Key words: *Solidago chilensis*, essential oils, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, cytotoxicity, antifungal activity.

1 Introduction

There is currently a limitation on the number of effective therapeutic drugs available, with low toxicity, for healing fungal infections, especially for resistant microorganisms and emerging and opportunistic strains. One such species is *Candida*, including *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, which causes serious opportunist fungal infections that lead to candidiasis (Hakeem et al., 2014, Chen et al., 2014), ranging from superficial (skin, oral cavity and esophagus, and vagina) to bloodstream infections (Svetaz, et al., 2010; Kathiravan et al., 2012; Pfaller et al., 2013; Pannanusorn et al., 2013). Within the genera, *Candida*, *C. albicans* is the predominant species that causes infection. However, there has been an increase in infections caused by emerging non-albicans species such *C. krusei*, associated with intrinsic resistance to fluconazole, decreased susceptibility to flucytosines and amphotericin B, and resistance to echinocandins (Richter et al., 2005). Often resistant to azole therapy, *C. krusei* can cause severe vulvovaginitis and systemic infections (Richter et al., 2005). *C. parapsilosis*, another emerging species of non-albicans, is the second most common yeast recovered from blood cultures. It is an important species to consider in patients with catheters because it tends to form extensive biofilms on the surface and lumen of catheters and other implanted devices. These organisms have been shown to be completely resistant to antifungal agents (Pfaller et al., 2013).

The incidence and severity of opportunistic fungal infections, as well the morbidity and mortality associated with them, have increased considerably over the past three decades. This is shown by the increase in the severely ill and/or immunocompromised patient population (e.g. HIV-infected and patients on immunosuppression treatment), the frequent use of more invasive medical procedures, treatment with broad-spectrum antibiotics and glucocorticoids, receipt of parenteral nutrition, and peritoneal dialysis or hemodialysis (Svetaz et al., 2010; Kathiravan et al., 2012). Added to these factors is the limitation of available therapies and cases of fungi intrinsically resistant to antifungal drugs (primary resistance) or with developed resistance in response to exposure to the drug during treatment (secondary resistance) (Perea and Patterson, 2002). Besides the increased resistance to conventional antifungal drugs, these drugs

have side-effects varying from mild reactions to hepatotoxicity, neurotoxicity, nephrotoxicity and haematologic reactions, and are frequently used without success (Del Rosso, 2000; Gupta & Cooper, 2008). Therefore, there is a clear and urgent need to find new alternative compounds with antifungal activity (Svetaz et al., 2010) and low toxicity. The search for active substances against emerging strains is therefore extremely important, and essential oils can be an excellent option when searching for new antifungals.

Essential oils (EO) are a rich source of biologically active compounds, and many of them have high antimicrobial potential (Policegoudra et al., 2011). This group of secondary metabolites can be obtained from several species, including those belonging to the *Solidago* genus (Asteraceae). Extracts of this large group of plants are recognized as having several therapeutic applications, including as anti-inflammatories and diuretics in the treatment of bladder and kidney disorders. They are used in Asian and Europe (*S. virgaurea* L.), North America (*S. canadensis* L., *S. odora* Ait and *S. gigantea* L) and South America (*Solidago chilensis* Meyer) (Vila et al., 2001; Goulart et al., 2007). Previous chemical studies of the essential oils obtained from species of this genus have reported the presence of many monoterpenes, such as limonene, alpha-pinene and beta-pinene, and sesquiterpenes such as germacrene D, beta-caryophyllene, and phellandrene (Vila et al., 2001; Kalemba et al., 1998; Kalemba et al., 1990). *Solidago* essential oils showed moderate antifungal potential against various dermatophytes and *Aspergillus* strains (Vila et al. 2001, Morel et al., 2006). However, despite their effectiveness in pharmaceutical formulations, the risk of exposure to these drugs is a concern. In this context, toxicological analysis is of great importance, and is essential for its application in cosmetics and health products (Gonçalves et al., 2012).

This study investigates the chemical composition of two oils of *Solidago chilensis* (leaves and inflorescences) and their antifungal activity against *Candida krusei* and *Candida parapsilosis* clinical isolates, pathogenic fungi responsible for human infection. Cytotoxicity assays were also performed to determine whether the active doses against yeasts are safe.

2 Material and Methods

2.1 Plant material

The inflorescences and leaves of *Solidago chilensis* were collected in Guaporé (in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil). Voucher specimens were deposited in the herbarium of the Federal University of Rio Grande do Sul (ICN/UFRGS) (number 176766).

2.2 Obtaining the Essential oils

The Essential oils were obtained by hydrodistilling the inflorescences (IO) and leaves (LO) for four hours, using a Clevenger-type apparatus. The yield (v/w) of essential oil was determined based on the fresh plant material weight. The oils were stored in sample vials and kept frozen at $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis by gas chromatography (GC) and trials.

2.3 Analyses of essential oils

The essential oils were qualitatively and quantitatively analysed by GC-MS using a Shimadzu QP-5000-quadrupole MS system, operating with ionization energy of 70 eV and an interface temperature of $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. The scan time and mass range were 1 s and 40–400 m/z, respectively. The injection volume was 1 μL . A DB-5 fused silica capillary column (30 m, 0.25 mm; film thickness 0.25 μm ; Supelco) was used. The oven temperature was programmed from $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ to 300°C at $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, with helium as the carrier gas at an inlet pressure of 80 kPa (1 mL/min). Injector (split ratio 1:50) and detector temperatures were set at $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. The percentage compositions were obtained from electronic integration measurements.

The identification of essential oils was based on the calculation of their retention indices (RI) relative to (C8–C22) *n*-alkane standards in comparison with those of authentic compounds available in our laboratory. Further identification was made by comparison of their mass spectral fragmentation patterns with those stored in the NIST database (National Institute of Standards

and Technology) mass spectral library of the GC–MS data system and other published mass spectra data (Adams, 2011).

2.4 Antifungal strains

A total of 15 isolates of *Candida krusei* (CK04, CK03, ATCC6258, CK01, CK02, CK05) and *C. parapsilosis* (3D02, 3D03, RL33, RL13, RL20, RL27, RL38, RL36, RL32) were tested. All isolates were obtained from the Fungal Collection of the Research Group in Applied Mycology (GPMA), School of Pharmacy, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

2.5 Antifungal activity

Inoculums of all opportunistic yeasts strains were prepared according the Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI, 2008). The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by the broth microdilution method, following the M27-A3 CLSI guidelines, with RPMI-MOPS (RPMI 1640 medium containing L-glutamine, without sodium bicarbonate buffered to pH 7.0 with 0.165 mol/L MOPS buffer –Sigma). The concentrations of Eos tested ranged from 1 to 500 µg/mL and 100 µL-aliquots were inoculated into a flat-bottom 96-well microtiter. The MIC was defined as the lowest concentration of compounds at which the microorganism tested did not demonstrate visible growth.

The minimal fungicidal concentration (MFC) was determined by sub-culturing volumes of 10 µL from the wells without visible growth in Sabouraud dextrose agar (SDA) (Difco, Detroit, USA) and incubated at 35°C for 48 h. The minimum fungicidal concentration (MFC) was defined as the lowest concentration yielding negative subcultures. The fungal growth of the MIC aliquots was compared with that of the positive control. Amphotericin, fluconazole and anidulafungin (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) were used as positive controls. All the experiments were conducted in triplicate.

2.6 Evaluation of cytotoxicity

2.6.1. Human study and ethic notes

The University Research Ethics Committee approved the study protocol (No.23081), and informed consent was obtained from all individuals whose information was collected prospectively.

2.6.2 Blood sample collection

Peripheral blood samples were collected by venipuncture using a syringe (BD Diagnostics, Plymouth, UK) and tubes with heparin. The leukocytes were then isolated, and a suspension was adjusted to obtain 8×10^3 cell·mm³. One aliquot of each sample was used for DNA damage analysis.

2.6.3 Single cell gel electrophoresis (comet assay)

The alkaline comet assay was performed as described by Montagner et al. (2010) in accordance with the general guidelines for use of the comet assay (Tice et al., 2000; Nadin et al., 2001; Hartmann et al., 2003). One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analysed. Cells were visually scored from 0 (no migration) to 4 (maximal migration), according to tail length. The damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). This assay was performed in triplicate, and the slides were analysed by at least two different individuals.

2.6.4 Cell non-viability

The cell viability assay was carried out by the method of Mischell and Shiingi (1980), with minor modifications. Cells were exposed to the same concentration of 100 ug/ml of both EO, as in the comet test, for 3 h. After incubation, 100 µL of a cell suspension was mixed with 100 µL of 0.4% Trypan Blue solution for 3 min. Cell viability was determined microscopically (400 ×

magnification) and two categories of cells were scored: (1) live cells, which appeared uncolored or light blue, and (2) dead cells, which appeared blue. At least 300 cells were counted for each survival determination.

2.6.5 Data analysis

All the experiments were carried out with $n=3$. The results are presented as mean \pm standard error of the mean (S.E.M) and the means were statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's Multiple Comparison test. In all cases, differences were considered statistically significant if $p < 0.05$. Data analyses were performed using the GraphPad software®, version 5.00.

3 RESULTS

3.1 Isolation and analyses of essential oils

The average yields of the essential oils from the inflorescences (IO) and leaves (LO) of *S. chilensis* were 0.3% and 0.8 % (v/w), respectively. Both oils were analysed by GC-MS and the qualitative and quantitative compositions are presented in Table 1. A total of 13 compounds were identified in IO and 8 in LO composition. Both oils are predominantly composed of sesquiterpene hydrocarbons (55.99% to LO and 61.75% to IO) and Germacrene-D is the major component of this group (33.07 and 29.81 %, respectively). Germacrene-D has previously been found as the main sesquiterpene in the oils of *S. canadensis*, *S. gigantea* and *S. virgaurea* (Kalemba D. 1998).

The composition of the oxygenated sesquiterpenes showed remarkable quantitative differences. While 26.09% spathulenol was found in LO, this compound represented only 2.27% of the IO. However, the greatest difference between the samples was observed in the absence of monoterpene hydrocarbons in the LO, with the group representing 31.27% of the IO composition and only 30.31% of the D-limonene.

3.2 Antifungal activity of the essential oils

The *in vitro* antifungal activity of the essential oils was evaluated by the microdilution method against *C. krusei* and *C. parapsilosis* clinical isolates. The results (MIC and MFC values) of both oils are summarized in Table 2. For *C. krusei*, the MIC and MFC values ranged from 1.95 to 62.5 µg/mL for the LO and IO samples. The fungistatic effect was observed for both samples on *C.krusei* isolates, except for strain CK04 which showed the highest sensitivity to oils, evidenced in MIC and MFC values of 1.95 µg/mL.

For the *C. parapsilosis* clinical isolates, differences between samples were more evident in the MIC and MFCs values. The MIC values ranged from 3.91- 31.25 µg/mL for both samples. However, different susceptibilities were observed when determining the MFCs. For the tests with LO, there was fungistatic and fungicidal effect in the isolates tested. However, in the tests with IO, there was only fungistatic effect up to the maximum concentration used in the experiments (500 µg/mL). Furthermore, it was observed that all clinical isolates were susceptible to the tested samples.

3.4 Cytotoxicity of the essential oils

To explore the potential for use of essential oils by the pharmaceutical and cosmetic industries, which require safety testing, toxicological assays were performed. In this work, the cytotoxicity was assessed through observation of the number of unviable cells after exposure to the test substance as well the occurrence of DNA damage. Thus, cytotoxic potential was checked by two possible mechanisms involved: lyses of the cell membrane and nuclear DNA damage.

The cytotoxicity was assessed by counting the non-viable cells in the negative control (NC), (distilled H₂O), positive control (PC) (H₂O₂ 4 mM), DMSO control (0.5% v/v) and OI and OL samples (100 µg/mL). The results are shown in Figure 1. The percentages of unviable cells were less than 8% in the controls and negative for the samples. The statistical analysis of the data showed no significant difference when IO and LO were compared with the NC and DMSO, and significance when these values were compared with the PC (p <0.0001).

Figure 2 shows the results of the comet assay. The results indicate the absence of DNA damage for the samples IO, LO and DMSO control, when compared with the negative control NC ($p < 0.0001$).

4 Discussion

This work demonstrates that essential oils from *S. chilensis* are potential antifungal agents. According to Ríos and Recio (2005), samples are promising as antifungal when the inhibitory concentrations are lower than 100 $\mu\text{g/mL}$ for extracts and 10 $\mu\text{g/mL}$ for isolated compounds. Thus, the results presented in this paper demonstrate that *S. chilensis* essential oils have important antifungal activity against *C. krusei* and *C. parapsilosis* with low concentration for both oils (Table 2). Moreover, none of the yeast isolates were resistant to the IO and LO. These results are more important when it is observed that the yeasts tested were multiresistente against three antifungal drugs. All *C. krusei* strains showed resistance to anidulafungin and fluconazole (susceptibility < 1 and 8 $\mu\text{g/mL}$, respectively); however, they were susceptible to oils, with MIC averages of 62.5 $\mu\text{g/mL}$ for both, demonstrating the fungistatic effect. Likewise, all *C. parapsilosis* strains were susceptible to samples. However, these isolates were susceptible to fluconazole and LO showed fungistatic for all strains, but fungicidal effect only for some strains.

It is known that the mechanism of action of azoles (fluconazole) is linked to the inhibition of 14 α -demethylation of lanosterol in the ergosterol biosynthetic pathway. Moreover, the target of action of echinocandins (anidulafungin) is the protein complex responsible for the synthesis of cell wall β -1,3-glucan polysaccharides. The amphotericin acts by destabilization of the fungal cell membrane by a mechanism not yet elucidated (Odds et al., 2003). Thus, it can be assumed that the analysed oils have more than one mechanism of action, as demonstrated by the activity achieved (or obtained) in strains resistant to anidulafungin and fluconazole. However, evidence suggests that the most important action is similar to that of amphotericin, because all strains were susceptible to this drug and samples. This hypothesis may be more evident when it is observed that terpenoids, such as linalool, citral, eugenol, linalyl acetate and citronellal inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane

integrity and cell cycle arrest (Zore et al., 2011).

Therefore, it is possible that several compounds of the essential oils play important roles in cell penetration, lipophilic or hydrophilic attraction, fixation on cell walls and/or membranes, and cellular distribution. These aspects are particularly relevant since they affect the distribution of the oil in the cells and influence different types of radicalar reactions that may occur (Bakkali et al., 2008, Zuzarte et al., 2012). In addition, these multiple modes of action may also target human cells, since fungi are eukaryotic cells and therefore similar to the metabolism of mammalian cells (Newman et al., 2000). Thus, the evaluation of the cytotoxicity of the oil is a crucial step for the exploration of potential antifungal agents (Zuzarte et al., 2012).

In our work, we tested the toxicity of the samples at concentrations of 100 µg/mL, which is a higher value than that observed in the highest MIC (62.5 µg/mL) determined. The results showed that neither sample affected cell viability (Figure 1). According to Collins et al. (2008), high viability (or low non-viability) is required as a previous condition for performing the comet assay, the results of which showed no damage to the cellular DNA (Figure 2) at a concentration of 100 µg/mL in both samples.

In conclusion, these results demonstrate that *S. chilensis* essential oils are a potential natural product to be used as antifungal agents against yeast that is pathogenic to humans, at concentrations that have no effects on blood cells viability or cause DNA damage. In order to explore its potential use by the pharmaceutical and cosmetics industries, studies with mucosal cells infected with *Candida* isolates are being considered, to evaluate the practical relevance of these in vitro assays. Furthermore, *S. chilensis* is an important species of medicinal plant that has potential for use in essential oil extraction in industrial scale because it has abundant occurrence across a vast territory, and is easy to cultivate.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments: We are grateful to CNPq, CAPES and FAPERGS for their financial support.

References

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils e a review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446-475.

Chen, L-Y., Yang, S-P., Chen, T-L., Liao, S-Y., Chen, Y-Y., Chan, Y-L., Chen, L-K., Wang, F-D. 2013. Clinical significance of time to positivity for yeast in candidemia. *J Microbiol, Immun and Infect.* Article in press,1-6.

Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith C. C., Stetina, R., 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* 23, 143-151.

Del Rosso, J.Q., 2000. Current Managment of onychomycosis and dermatomycoses. *J Infect Dis.* 2, 438–445.

Gonçalves, M.J., Tavares, A.C., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Lopes, M.C., Canhoto, J., Salgueiro, L., 2012. Composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oils of *Seseli tortuosum* L. and *Seseli montanum* subsp. peixotoanum (Samp.) M. Laínz from Portugal. *Ind Crop Prod.* 39, 204–209.

Goulart, S., Moritz, M.I.G., Lang, K.L., Liz, R., Schenkel, E.P., Fröde, T.S., 2007. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. *J. Ethnopharmacol.* 113 (2), 346-353.

Gupta, A. K., Cooper, E.A., 2008. Update in antifungals therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia.* 166, 353–367.

Hakeem, A., Al Thaqafi, O., Farahat, F.M., Al Harbi, M.I., Al Amri, A.F.W., Perfect, J.R. 2014. Predictors and outcomes of *Candida* bloodstream infection: eight-year surveillance, western Saudi Arabia. *Int J Infect Dis.* 21, 5–9.

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, G., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 18, 45–51.

Kalemba, D., Góra, J., Kurowska, A., 1990. Analysis of the essential oil of *Solidago canadensis*. *Planta Med.* 56(2), 222-223.

Kalemba, D., 1998. Constituents of the essential oil of *Solidago virgaurea* L. *Flavour Fragr. J.* 13, 373-376.

Kathiravan, M.K., Salake, A.B., Chothe, A.S., Dudhe, P.B., Watode, R.P., Mukta, M.S., Gadhwe, S., 2012. The biology and chemistry of antifungal agents: A review *Bioorg. Med. Chem.* 20, 5678–5698.

Mischell, B.B., Siingi, S.M. Selected methods in cellular immunology. San Francisco: W.H. Freeman Company, 1980. 486 p.

Montagner, G.F.F.S., Sagrillo, M., Machado, M.M., Almeida, R.C., Mastardeiro C.P., Duarte, M.M.M.F., Cruz, I.B.M. 2010. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotype. *Toxicol in Vitro*. 24(5), 1410-1416.

Morel, A.F., Dias, G.O., Porto, C., Simionatto E., Stuker, C.Z., Dalcol, I.I., 2006. Antimicrobial activity of extractives of *Solidago microglossa*. *Fitoterapia*. 77, 453–455.

Nadin, S., Vargas-Roig, L., Ciocca, D. 2001. A silver staining method for single-cell gel assay. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1183–1186.

Odds, F.C., Brown A.J.P., Gow, N.A.R., 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *TRENDS in Microbiology*. 11, 272-279.

Perea, S., Patterson, T.F., 2002. Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi. *Clin Infect Dis.* 35, 1073–80.

Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Ostrosky-Zeichner, L., Rex, J. H., Alexander, B.D., Andes, D., Brown, S.D., Chaturvedi, V., Ghannoum, M.A., Knapp, C.C., Sheehan, D.J.,

Walsh, T.J., 2008. Correlation of MIC with Outcome for *Candida* Species Tested against Caspofungin, anidulafungin, and Micafungin: Analysis and Proposal for Interpretive MIC Breakpoints. *J of clin microbiol.* 46, 2620–2629.

Pfaller, M.A., Pappas, P.G., Wingard, J.R., 2006. Invasive Fungal Pathogens: Current. Epidemiological Trends. *Epidemiology of Invasive Mycoses.* 43, 3-14.

Prabuseenivasan, S., Mayakumar, M., Ignacimuthu, S., 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complem. Altern. Med.* 6, 1-8.

Pannanusorn, S., Fernandez, V., Romling, U., 2013. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses.* 56, 264–272.

Policegoudra, R.S., Goswami, S., Aradhya S.M., Chatterjee, S., Datta, S., Sivaswamy, R., Chattopadhyay, P., Singh, L., 2011. Bioactive constituents of *Homalomena* aromatic essential oil and its antifungal activity against dermatophytes and yeasts. *J Mycol Méd.* 22, 83-87.

Richter, S.S., Galask, R.P., Messer, S.A., Hollis, R.J., Diekema, D.J., Pfaller, M.A., 2005. Antifungal Susceptibilities of *Candida* Species Causing Vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent Cases. *J of clin microbiol.* 42(5), 2155–2162.

Ríos, J.L., Recio, M.C., 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 100, 80–84.

Svetaz,L., Zuljan, F., Derita, M., Petenatti, E., Tamayo, G., Cáceres, A., Cechinel-Filho,

V., Giménez, A., Pinzón, R., Zacchino, S.A., Mahabir Gupta., 2010. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. J. Ethnopharmacol. 127, 137–158.

Tice, R.R., Agurell, D., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing'. Environ. Mol. Mutagen 35, 206–221.

Vila, R., Mundina, M., Tomi, F., Furlán, R., Zacchino, S., Casanova, J., Cañigueral, S., 2002. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. Planta Med. 68 (2),164-167.

Zore, G.B., Thakre, A.D., Jadhav, S., Karuppayil, M., 2011. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. Phytomedicine. 18 1181–1190.

Zuzarte, M., Gonçalves, M.J., Cruz, M.T., Cavaleiro, C., Canhoto, J., Vaz, S., Pinto, E., Salgueiro, L., 2012. Lavandula luisieri essential oil as a source of antifungal drugs. Food Chem. 135, 505–1510.

Table 1: Composition of essential oils from *Solidago chilensis* leaves and inflorescences.

IR*	Compound	% in samples	
		Leaves	Inflorescences
929	Alpha-pinene		0.96
1025	Limonene		30.31
	Monoterpene hydrocarbons		31.27
1046	E-beta-ocimene		0.53
1376	<i>Beta</i> -burbounene	2.8	1.34
1408	<i>Beta</i> -caryophyllene	11.14	8.46
1466	<i>Germacrene D</i>	29.81	33.07
1480	Bicyclgermacrene	11.7	17.81
1487	Germacrene A	0.54	0.54
	Sesquiterpene hydrocarbons	55.99	61.75
1512	<i>Delta</i> -cadinene	1.07	1.12
1569	Spathulenol	26.09	2.37
1573	Beta-caryophyllene	9.08	0.64
1583	epi-globulol		1.11
1648	<i>Alpha</i> -cadinol		1.06
	Oxygenated sesquiterpenes	36.24	6.3
	Total identified	92.23	99.32

*IR: CG-retention indices relative to C₈-C₂₄ *n*-alkanes on DB-5 column

Table 2: Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of leaves and inflorescences essential oils of *Solidago chilensis*.

Fungus pathogen clinical isolate	Leaves oil		Inflorescences oil		Susceptibility		
	MIC	MFC	MIC	MFC	Fluconazole	Anidulafungin	Amphotericin
<i>Candida krusei</i> CK04	1.95	1.95	1.95	1.95	R	R	S
<i>Candida krusei</i> ATCC6258	62.5	>500	62.5	>500	R	R	S
<i>Candida krusei</i> CK01	62.5	>500	62.5	>500	R	R	S
<i>Candida krusei</i> CK02	62.5	>500	62.5	>500	R	R	S
<i>Candida parapsilosis</i> 3D02	31.25	>500	31.25	>500	S	R	S
<i>Candida parapsilosis</i> RL33	7.81	31.25	15.62	>500	S	R	S
<i>Candida parapsilosis</i> RL13	31.25	125	15.62	>500	S	R	S
<i>Candida parapsilosis</i> RL20	7.81	31.25	15.62	>500	S	R	S
<i>Candida parapsilosis</i> RL27	31.25	62.5	3.91	>500	S	R	S
<i>Candida parapsilosis</i> RL38	15.62	>500	15.62	>500	S	R	S
<i>Candida parapsilosis</i> RL36	3.91	>500	7.81	>500	S	R	S
<i>Candida parapsilosis</i> RL32	15.62	>500	7.81	Nd	S	R	S

Data on antifungal susceptibility expressed in $\mu\text{g/mL}$

Nd: not determined (500 $\mu\text{g/mL}$ - maximum dose tested)

S (susceptible) and R (resistant): Fluconazole susceptibility < 8 $\mu\text{g/mL}$; Amphotericin susceptibility < 2 $\mu\text{g/mL}$; Anidulafungin susceptibility < 1 $\mu\text{g/mL}$.

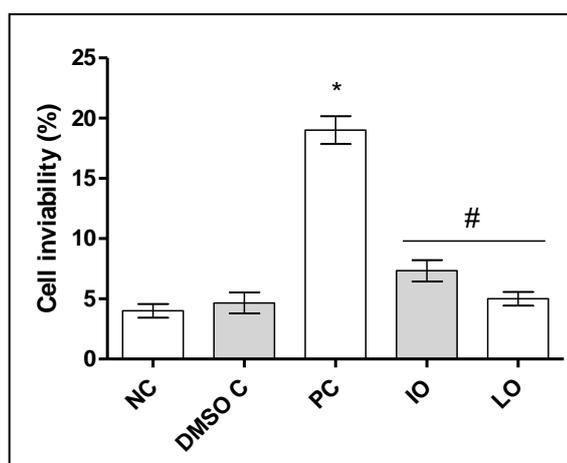


FIGURE 2. - Cell non-viability from the essential oil of the inflorescences (IO) and leaves (LO) at concentrations of 100 $\mu\text{g/mL}$. NC: negative control (distilled H_2O). DMSO C: DMSO control (0.5% v/v). PC: positive control (H_2O_2 4 mM). One-Way ANOVA and post-hoc Bonferroni's Multiple Comparison Test. (* $p < 0.001$). The data are expressed as a percentage; $n = 4$.

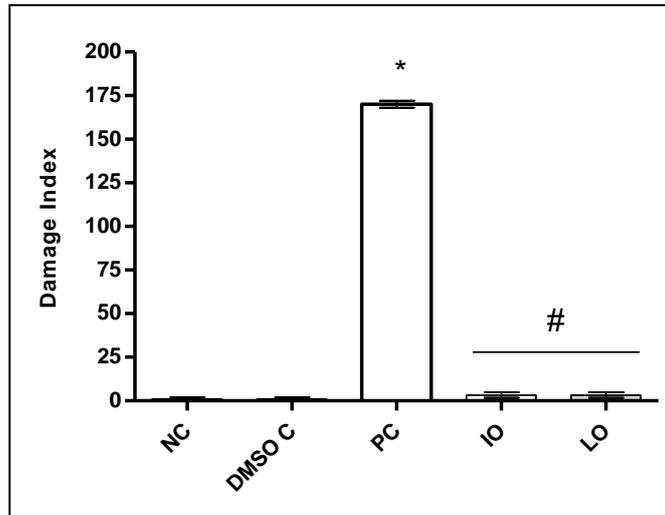


FIGURE 2 - Comet Assay - Index damage from the essential oil of the inflorescences (OI) and leaves (LO) at concentrations of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. NC: negative control (distilled H_2O). DMSO C: DMSO control (0.5% v/v). PC: positive control (H_2O_2 4 mM). One-Way ANOVA and post-hoc Bonferroni's Multiple Comparison Test. ($p < 0.001$). The data are expressed as damage index; $n = 4$.

**CAPITULO 3 - Obtenção de produto intermediário extrato seco e
qualificação química**

3.1 Introdução

A indústria moderna de fitoterápicos tem se voltado para a produção de formas farmacêuticas sólidas a partir de extratos secos padronizados, obtidos por aspersão (*spray drying*) (Arawwawala et al., 2011). Dentre as razões a favor dessa tendência tecnológica, podem-se destacar as maiores concentração, estabilidade e a facilidade de qualificação dos componentes ativos, menores riscos de contaminação microbiana e dosagem mais precisa (Senna et al., 1997; Oliveira et al., 2010), vantagens essas que facilitam a adequação do setor à legislação sanitária vigente.

Dentre os métodos de secagem por calor, a aspersão tem sido o mais usual em decorrência, especialmente, dos baixos riscos de degradação dos constituintes químicos devido ao curto tempo de contato entre o produto a ser seco e o calor e do menor custo (Broadhead et al., 1992; Oliveira et al., 2010). Entretanto, esse tipo de secagem normalmente necessita de utilização de adjuvantes de secagem, componentes estes que devem ser adequadamente selecionados visto que podem determinar ou influenciar a estabilidade e, inclusive, afetar as características químicas e de biodisponibilidade do produto seco (Oliveira et al., 2010).

Para a secagem do extrato de *S. chilensis*, foi selecionado o dióxido de silício coloidal. Este adjuvante apresenta elevada superfície específica, alto poder sorvente e tem sido amplamente empregado por apresentar excelentes resultados na obtenção de produtos secos por aspersão a partir de soluções extrativas de diferentes espécies vegetais (De Campos, 1996; De Souza, 1997). Diversos trabalhos demonstraram que a adição de dióxido de silício coloidal na solução extrativa implica na redução significativa da higroscopia dos produtos secos, sem formação de aglomerados (Carvalho, 1997; De Paula et al., 1998; Teixeira, 1996).

No que tange à utilização de solventes, além da água pode ser empregada grande variedade de líquidos orgânicos como álcoois, como etanol, metanol e isopropanol. Dependendo da estabilidade química dos compostos, um solvente que apresenta ponto de ebulição baixo pode ser a única opção para materiais termolábeis. Entretanto, apesar do processo de secagem ser eficiente quando os referidos solventes orgânicos são empregados, o risco de

explosão torna sua a utilização muito perigosa e gera a necessidade de um gás inerte em sistema de ciclo fechado (Çelik & Wendel, 2005). Desta forma, o uso de solventes orgânicos deve ser cauteloso.

Após a obtenção do extrato seco, a subsequente qualificação quali e quantitativa é essencial, pois a partir desta torna-se possível gerenciar/garantir a reprodutibilidade terapêutica, eficácia e segurança de utilização desses produtos, cumprindo assim os requisitos de qualidade almejada. A principal necessidade, e que torna esta etapa indispensável, está relacionada com a variabilidade química originada de características diversas que conhecidamente influenciam o metabolismo vegetal, tais como a variabilidade genética, influências ambientais bem como aquelas ligadas à colheita, à armazenagem e ao processamento de matérias-primas vegetais (Shi et al., 2014). Desta forma, dada a importância da obtenção dos extratos secos com qualificação dos componentes ativos presentes nas plantas, visando a qualidade do produto e reprodutibilidade de seus efeitos farmacológicos, dentre os objetivos deste trabalho está contemplada a obtenção de extrato seco por aspersão e sua padronização química.

Em relação à qualificação, é de suma importância que, primeiramente, tenha-se o conhecimento dos componentes químicos do extrato bem como o estabelecimento de marcador (es) químico (s). Este, de acordo com a ANVISA, deve, preferencialmente, ter correlação com o efeito terapêutico para que a qualificação seja uma condição na qual a eficácia do produto seja garantida através da constância no teor de constituintes ativos (Souza, 2007). Além disso, o marcador deve ser referência no controle de qualidade, permitindo a correta identificação da droga ou derivado. No caso de *S. chilensis*, foi eleita a solidagenona, pois a sua ocorrência é restrita ao gênero e está relacionada à atividade biológica da espécie. Entretanto, este composto não está disponível para aquisição no mercado, sendo necessários o seu isolamento e sua purificação.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Obtenção do extrato mole e isolamento do marcador químico

Material vegetal

As inflorescências de *Solidago chilensis* Meyer foram coletadas em Guaporé, Rio Grande do Sul (S28° 50' 45" S, 51° 53' 24" W), em abril de 2013. O material vegetal foi seco em estufa de ar circulante forçada a temperatura de 30 °C ± 5 °C e armazenado em embalagem hermeticamente fechada, opaca à luz.

Obtenção do extrato

O extrato foi obtido pela maceração estática a partir de 1,2 kg de inflorescências de *S. chilensis* e utilizando como líquido extrator a mistura dos solventes etanol:éter etílico (1:1), durante 5 dias. Após esse período, o solvente foi renovado e a maceração mantida por mais 4 dias. A proporção de droga:solvente foi estabelecida em 1:10 na primeira extração e 1:5 na extração subsequente. As soluções extrativas foram filtradas em papel filtro e o solvente eliminado em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura mantida a 4 °C. Para a eliminação completa do solvente, o extrato foi armazenado em dessecador por 2 dias. O rendimento foi calculado em relação à massa de droga seca.

O solvente de extração e a proporção droga:solvente foram estabelecidos de acordo com dados da literatura (Schmeda-Hirschmann et al., 1988; Valverde-Soares et al., 2009) que demonstraram a obtenção de produtos de extração com elevados teores de compostos de média polaridade.

Isolamento do marcador químico

Neste trabalho buscou-se o desenvolvimento tecnológico de um extrato seco obtido a partir de extração direcionada à obtenção compostos fenólicos e diterpenos, tendo em vista que esses dois grupos químicos têm sido relacionados às atividades da espécie. Desta forma, além da caracterização química do extrato, os procedimentos cromatográficos descritos a seguir foram otimizados para o isolamento do marcador solidagenona.

O fracionamento do extrato etanol:éter foi realizado por cromatografia líquida a vácuo (CLV). Para tal, utilizaram-se 2 g do extrato, cerca de 40 g de gel de sílica Merck® e sistema eluente, selecionado após otimização por cromatografia em camada delgada, constituído do gradiente: hexano (Fração 1 -FR 1); hexano:acetato de etila 9:1 (Frações 2-8 - FR 2 a 8).

Identificação do marcador e compostos voláteis por cromatografia a gás

Após a eliminação do solvente e determinação de rendimentos em massa, as FR 1 a 8 foram analisadas por cromatografia a gás na concentração de 1 mg/mL em hexano e acetato de etila. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas obtidos com os dados da literatura bem como os fornecidos por bibliotecas adquiridas (NIST 12 e NIST 62 – National Institute of Standards and Technology, Kyoto, Japão).

Os parâmetros cromatográficos foram otimizados utilizando-se cromatógrafo a gás e coluna DB5 Agilent® foram:

- Temperatura: 80 a 300 °C (15 °C/min) e manutenção em 300 °C por 5 min.
- Gás carreador: hélio (1 ml/min).
- Temperaturas do injetor e do detector: 220 °C e 250 °C, respectivamente.

3.2.2 Obtenção do produto seco por aspersão (PSA)

Adjuvantes e solventes

Água ultrapura obtida em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford/EUA). Celulose microcristalina (Microcel® MC 101, Blanver, Cotia/Brasil, lote 221/05), dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200) e polissorbatato 80 (Tween 80®, Sigma-Aldrich) foram os adjuvantes empregados para a obtenção do extrato seco por *spray-drier*. Também foram utilizados como solventes éter etílico, etanol, *n*-hexano e acetato de etila p.a. Tédia®, além de metanol e ácido fórmico grau HPLC Tedia® para a obtenção do extrato e análises cromatográficas.

Equipamentos e outros materiais

Agitador de tamises Bertel; cromatógrafo a líquido Waters UPLC Aquity, acoplado a detector ultravioleta UV/VIS e sistema de gerenciamento e

aquisição de dados Empower Software (Waters); Coluna C₁₈ Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7).

Preparo da solução de secagem e condições operacionais

O extrato etanol:éter, preparado de acordo com o descrito 3.2, foi ressuspenso em água com o auxílio de polissorbato 80, seguindo as proporções e ordem de adição padronizadas no Grupo de Pesquisa em Tecnologia Farmacêutica. Desta forma, cada grama da formulação contém 0,5 g de extrato + 0,336 g de dióxido de silício + 0,164 g polissorbato 80.

O produto seco por aspersão foi obtido com uso de torre de secagem por aspersão Niro® Production Minor nas seguintes condições de secagem: velocidade de rotação do disco: 15000 rpm; temperatura de secagem: 180 °C; temperatura de saída: 115 °C; fluxo de alimentação: 140 mL/min. As condições descritas foram determinadas em estudos preliminares realizados por participantes do Grupo de Pesquisa em Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFRGS bem como por testes realizados com a espécie em estudo.

3.2.3 Determinação da perda por dessecação

A determinação da perda por dessecação foi realizada por método gravimétrico com auxílio de estufa de secagem a 105 °C (Farmacopeia Brasileira, 2010).

3.2.4 Qualificação química qualitativa do extrato seco

Perfil químico do extrato seco por aspersão por UPLC-PDA

Para o perfil químico do extrato seco foi analisado por UPLC-PDA nas condições cromatográficas a seguir.

Preparação das amostras

A cerca de 0,7 g de PSA foram adicionados 8 mL de metanol e, durante 5 min, foram mantidos em agitação em placa multipoços IKA®, velocidade de 5 rpm. Após esse tempo, as amostras foram filtradas em papel filtro para balão

volumétrico de 10 mL e o resíduo lavado com 2 mL do solvente, divididos em pequenas porções.

Adicionalmente, para verificar a estabilidade química qualitativa dos compostos fenólicos, o extrato bruto também foi analisado. Para tal, alíquotas do mesmo foram ressuspensas diretamente em metanol na mesma concentração. Todas as amostras foram filtradas em membrana 0,22 µm, PVDF, Millipore®.

Parâmetros cromatográficos

O perfil químico do PSA foi estabelecido utilizando-se o sistema cromatográfico desenvolvido na etapa do trabalho apresentada no capítulo 2 e apresentado nos Quadros 3.1. e 3.2.

Quadro 3.1 Parâmetros cromatográficos empregados para o estabelecimento do perfil químico do PSA por UPLC/UV-PDA.

Parâmetro	Descrição
Cromatógrafo	Acquity UPLC (Waters)
Detector	Acquity PDA/MS (Waters)
Coluna	Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 µm) (Waters)
Sistema de eluição	Gradiente linear
Fase móvel	Água:ácido fórmico 0,1 %, v/v (A) e metanol: ácido fórmico 0,1 % (B) ¹
Fluxo	0,13 mL/min
Temperatura	25 °C
Volume de injeção	1 µl
Comprimento de onda de detecção	210 a 400 nm

¹ água ultrapura (Milliq); ácido fórmico 96 % grau HPLC (Tedia®); metanol grau HPLC (Tedia®); fases móveis filtradas por membrana 0,22 µm, PVDF, Millipore®) e degaseadas durante 15 min em banho de ultrassom.

Quadro 3.2: Sistema gradiente linear utilizado para análise por UPLC empregado para a análise do perfil químico do PSA.

Tempo (minutos)	A (%)	B (%)
0	80	20
1	65	35
1,6	60	40
2,5	59	41
14	58,5	41,5
15	5	95
16	0	100
19,3- 23	80	20

A eluição dos compostos foi monitorada empregando o *software Empower* (Waters, Milford/USA) e utilizando o comprimento de onda de 300 nm.

3.2.5 Qualificação química quantitativa do extrato seco

3.2.5.1 Determinação dos flavonoides totais

Preparação da amostra

Tanto as condições de hidrólise quanto o método analítico utilizados foram validados de acordo com os parâmetros descritos no capítulo 2. Para tanto a 0,2 g de PSA foram adicionados 20 mL de metanol a 70 % com ácido clorídrico 0,6 M e submetida hidrólise por 21 min. A solução extrativa resultante foi filtrada, utilizando algodão. O resíduo juntamente com o algodão utilizado na filtração foram novamente submetidos à extração com 10 mL de metanol 70 % (procedimento repetido duas vezes). Os três filtrados foram combinados e o metanol removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Após, as agliconas foram extraídas por partição com acetato de etila (uma alíquota de 20 mL, seguida de duas repetições com 15 mL cada). As frações orgânicas combinadas foram lavadas com duas alíquotas de 50 mL de água e posteriormente filtradas sobre sulfato de sódio anidro. O extrato foi seco em

evaporador sob pressão reduzida e o resíduo ressuspendido em 10 mL de metanol. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

As amostras foram filtradas através de membrana (PVDF, 0,45 µm) e 5 µL foram injetados em triplicata. Os teores foram calculados pela média das determinações, em gramas de quercetina por 100 g da amostra (g/%), considerando a determinação de água da amostra.

Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo a líquido Waters Alliance 2695, acoplado a detector UV/VIS (Modelo 2487, Waters) e sistema de gerenciamento e aquisição de dados Empower Software (Waters). Foi utilizada coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex®), protegida por pré-coluna Bondapak C₁₈, (8 x 1 mm, 37-55 µm, Waters). Os parâmetros cromatográficos utilizados foram: temperatura de 22 °C ± 2 °C; sensibilidade de detecção de 0,05 AUFS; volume de injeção de 5 µL; fase móvel constituída por água: ácido fórmico 0,08 % v/v (Fase A) e metanol: ácido fórmico 0,08 % v/v (Fase B); fluxo de 0,9 mL/min; gradiente em modo linear (0-10 min - 30 a 47 % de Fase B; 10-20 min 47 %-100 %; 20-28 min - 30 % de Fase B; 28-38 min 47 % de Fase B); detecção em comprimento de onda de 371 nm.

3.2.6 Determinação do teor de solidagenona - desenvolvimento e validação de método analítico por densitometria

3.2.6.1 Preparo de amostra

A cerca de 0,7 g de PSA foram adicionados 8 mL de metanol e, durante 5 min, mantidos em agitação em placa multipoços IKA®, velocidade de 5 rpm. Após esse tempo, as amostras foram filtradas em papel filtro para balão volumétrico de 10 mL e o resíduo lavado com 2 ml do solvente, dividido em pequenas porções. Todas as amostras foram filtradas em membrana 0,22 µm, PVDF, Millipore®.

3.2.6.2 Condições cromatográficas e aquisição de dados

Em cromatoplasmas de nanossílica (F₂₅₄), tamanho 10x20 cm (altura x largura) foram aplicadas as amostras e soluções padrões utilizando-se aplicador semi-automático Linomat 5® Camag, seringa de 100 µL em sistema gerenciado pelo *software* Wincats planar chromatography manager. Em cada cromatoplasma foram realizadas 15 aplicações em banda (6 mm), espaçadas entre si por 6 mm, distantes 10 mm das bordas laterais e 20 mm da base. A seringa foi lavada com metanol entre cada aplicação e o gás de secagem utilizado foi nitrogênio. As cromatoplasmas foram eluídas, por 8 cm, em cubas bipartidas Camag com fase móvel constituída de *n*-hexano:acetato de etila (8:2 v/v).

A aquisição de dados densitométricos foi realizada por meio de *Scanner* Camag em 254 nm. A varredura de 210 a 400 nm foi também efetuada para a obtenção dos espectros de UV e determinação da pureza de picos.

A validação do método foi realizada de acordo com o preconizado pela ICH 2005 e pela ANVISA, 2003. Os parâmetros avaliados são descritos a seguir.

3.2.6.3 Validação do método analítico por HPTLC- densitometria

Especificidade e seletividade do método

A especificidade do método foi determinada pela comparação dos R_f do padrão do analito equivalente na amostra, além da visualização do espectro de UV. A seletividade foi obtida pela varredura em 210 a 400 nm, fatiamento do pico e correlação dos espectros de UV após a varredura.

Determinação de Linearidade

A faixa linear de trabalho foi determinada pela aplicação de 5 pontos (420 a 5040 ng/banda) do marcador solidagenona, diluído em metanol a 210 µg/mL. As curvas foram preparadas em duplicata e cada ponto (bandas) aplicado em triplicata. Os gráficos de área do pico em função da quantidade de amostra foram plotados e a partir da curva média foi obtida a equação de regressão linear utilizada nos cálculos de concentração de amostra.

Limite de detecção e limite de quantificação

Foram utilizados os dados de regressão da curva analítica média de quercetina para efetuar os cálculos, de acordo com as equações abaixo e conforme preconizadas pela ICH (2005) e pela ANVISA (2003).

$$LD = 3,3 \cdot \left(\frac{S}{I} \right) \qquad LQ = 10 \cdot \left(\frac{S}{I} \right)$$

Onde o S = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e I = inclinação da curva.

Os limites também foram testados experimentalmente por meio de aplicação de solidagenona em quantidades decrescentes até o valor teórico determinado pelas equações acima descritas.

Precisão (precisão intermediária e repetibilidade)

A repetibilidade foi verificada por 6 replicatas a 100 % da concentração do analito e realizadas no mesmo dia e pelo mesmo analista. A precisão intermediária foi dada pela concordância dos resultados obtidos em três dias consecutivos por dois analistas diferentes.

Recuperação

A recuperação foi avaliada em três níveis de concentração (80, 100 e 120 %) por adição de solução padrão.

Robustez

A robustez do método foi avaliada pela concordância entre os resultados obtidos com variação dos seguintes parâmetros: tempo de saturação da cuba, distância de migração do solvente e proporção entre os solventes da fase móvel.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Obtenção do extrato mole e isolamento do marcador químico

O extrato bruto obtido a partir de inflorescências de *S. chilensis* apresentou rendimento de 10 %, considerando-se a massa de extrato etanol:éter obtida em relação a de droga dessecada. O valor observado é aproximado ao teor de 9 % descrito por Valverde-Soares e colaboradores (2009) quando utilizaram maceração dinâmica por 4 períodos de 6 h diárias.

Desse extrato, a partir dos cerca de 2 g submetidos à cromatografia líquida a vácuo foi possível a obtenção de 122 mg de solidagenona distribuídos nas frações 6, 7 e 8 (eluídas com *n*-hexano:acetato de etila; proporção 9:1). Para a purificação do produto, as três frações foram reunidas e então submetidas ao processo de recristalização a frio com a utilização dos solventes *n*-hexano e éter etílico na proporção 5:1. Ao final da evaporação do solvente, foram obtidos cristais em formato de agulhas com coloração transparente a esbranquiçada, aspecto condizente com a literatura (Schmeda-Hirschmann et al., 1988).

A análise do isolado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas bem como a comparação do perfil de fragmentação com dados da literatura permitiu a identificação do isolado. Na Figura 3.1 é apresentado o cromatograma obtido e o espectro de massas da substância. A presença do íon molecular m/z 316; picos base m/z 82 e m/z 81 (Figura 3.2); m/z 235 ($M-C_5H_5O$)⁺ são condizentes com a literatura (Schmeda-Hirschmann et al., 1988) e confirmam a identidade do composto.

As demais frações também foram analisadas e a comparação dos espectros de massas obtidos com os descritos em biblioteca de aquisição (NIST) permitiu identificar, na fração hexano, a presença dos sesquiterpenos γ -muuroleno; β -cariofileno; γ -gurjuneno; γ -elemeno. Também foram observadas as presenças de ácidos graxos e ceras na FR 1. Na FR 3 constatou-se a predominância do óxido de cariofileno, constituinte também presente no óleo volátil obtido por hidrodestilação e igualmente identificado por Schmeda-Hirschmann e colaboradores (1988) no fracionamento do extrato etanol:éter obtido dos rizomas.

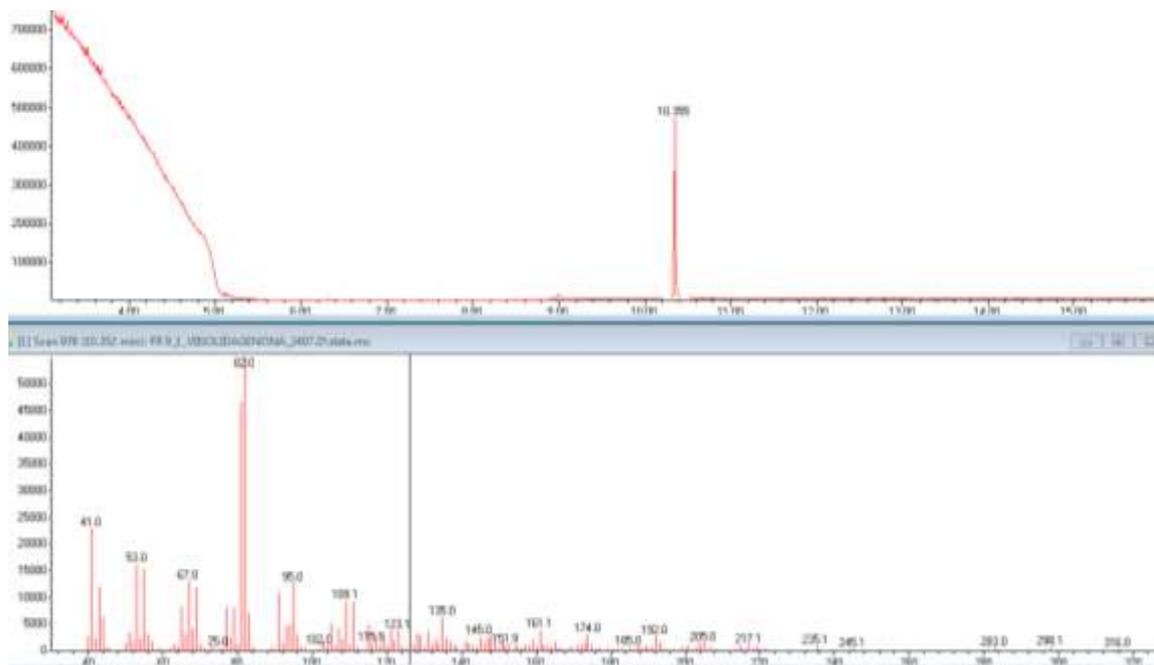


Figura 3.1: Cromatograma obtido por CG/MS para a solidagenona após a recristalização.

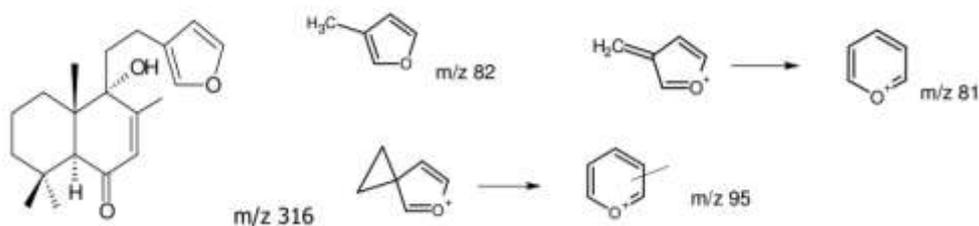


Figura 3.2: Perfil de fragmentação da solidagenona.

Ao mesmo tempo em que a extração direcionada a fim de se obter um produto tecnologicamente desenvolvido e que contenha flavonoides e diterpenos, grupos químicos aos quais têm sido atribuídas as atividades de *S. chilensis*, pode ser inovadora e promissora, as dificuldades analíticas e tecnológicas encontradas tornaram-se inerentes ao processo.

O extrato etanol:éter bruto possui complexidade e diversidade química que tornaram inviáveis a análise direta por CLAE em fase reversa ou por CG, devido à presença de compostos apolares (terpenos) e polares (ácidos

fenólicos e flavonoides). Quando analisado por CLAE, além da incompleta ressuspensão da amostra em metanol, não há separação dos constituintes de baixa polaridade com os solventes metanol ou acetonitrila, pois a solidagena é eluída somente com 100 % de fase orgânica, juntamente com outras substâncias apolares indesejadas na etapa analítica.

Outra possibilidade clássica de estabelecimento de perfil químico característico e de padronização quantitativa é por meio da cromatografia a gás. Entretanto, para tal é necessário que o extrato esteja livre de flavonoides e ácidos fenólicos, compostos não voláteis. Tentativas de purificação por SPE também foram tentadas sem sucesso na separação dos compostos voláteis dos não voláteis.

Além da dificuldade analítica, em termos de tecnologia farmacêutica tornou-se inviável a utilização do extrato sem adição de adjuvantes que permitam a ressuspensão em água e a fluidez do produto após a secagem. Desta forma, com vistas a continuidade do trabalho, utilizou-se polissorbato 80 e dióxido de silício coloidal para a transformação do extrato bruto, com natureza pastosa e insolúvel em álcool, em produto farmacêutico intermediário viável para posterior processamento.

3.3.2 Obtenção de extrato seco por aspensão

O extrato seco obtido por *spray drying* apresentou elevada solubilidade em água e com características tecnológicas adequadas para os fins a que este trabalho se propôs. Grande parte dos trabalhos que descrevem a obtenção de extratos secos por aspensão está relacionada com a utilização do mesmo em ciclos de produção de formas farmacêuticas. Denominados, desta forma, de produto intermediário de processo, os produtos secos são valorizados devido à sua elevada estabilidade química e microbiológica, e maior facilidade de transporte e de armazenamento, sendo a principal matéria-prima para a indústria de fitoterápicos (Soares et al., 2005; Oliveira et al., 2010).

Diversos fatores podem ter influência sobre a qualidade do produto obtido. O tipo de adjuvantes empregado e os parâmetros operacionais do equipamento (velocidade de rotação, temperaturas de entrada e saída), são exemplos de fatores críticos do processo (Oliveira et al., 2010). Entretanto, ao

longo de anos de trabalho e testes realizados com diferentes proporções e tipos de adjuvantes bem como o comportamento do produto final, o conhecimento do Grupo de Pesquisa em Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia tornou possível a seleção de condições e adjuvantes adequados para a obtenção de bons resultados.

Desta forma, o adjuvante de secagem utilizado foi dióxido de silício coloidal, pois além de apresentar características de elevada superfície específica (200 m²/g) e alto poder sorvente, tem sido amplamente empregado, apresentado excelentes resultados na obtenção de produtos secos por aspersão a partir de soluções extrativas de diferentes espécies vegetais (De Campos, 1996; De Souza, 1997; Yatsu et al., 2011). De Paula e colaboradores (1998) e Teixeira (1996) testaram a substituição do dióxido de silício coloidal por β -ciclodextrina ou por celulose microcristalina e observaram efeito negativo destes sobre a estabilidade dos produtos obtidos frente à umidade residual em extratos secos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. O mesmo efeito foi observado para os extratos secos de *Passiflora edulis* Sims. Quando utilizado apenas dióxido de silício coloidal como adjuvante, as características tecnológicas foram melhores do que as observadas com o uso de hidrolisado de gelatina (Gelita-Sol P) ou a mistura dos dois em diferentes proporções (De Souza et al., 2004).

Para a obtenção do extrato seco de *S. chilensis* foi utilizado o dióxido de silício coloidal (33 % m/m) e a umidade residual final de 3,72 \pm 0,12 % determinada por gravimetria pode ser considerada excelente e adequada. Valores baixos de umidade favorecem a estabilidade química e microbiológica (Oliveira et al., 2010).

O rendimento do processo de secagem foi de 88 %, o que pode ser considerado ótimo quando comparado a rendimentos obtidos em processos de secagem semelhantes e que utilizaram dióxido de silício coloidal como adjuvante. Observou-se para *Schinus terebinthifolius* rendimento de 80 % (Vasconcelos et al., 2005) e de 67 % para *Ilex paraguariensis* (Yatsu et al., 2011).

3.3.3 Caracterização química qualitativa do extrato seco

Perfil químico do extrato seco por aspersão por UPLC-PDA

O estabelecimento do perfil químico ou impressão digital por cromatografia líquida de alta ou ultra eficiência é um parâmetro importante para o controle de qualidade de plantas medicinais e derivados. Além do perfil característico que auxiliará na verificação da autenticidade do produto, é uma ferramenta útil na qualificação química de extratos vegetais e, nas fases de desenvolvimento e controle de processo.

No caso do extrato seco por aspersão obtido de *S. chilensis*, a análise comparativa do perfil cromatográfico antes e após a secagem (Figura 3.3 e 3.4, respectivamente) permite concluir que a temperatura e o tempo de contato com o calor não causaram alterações qualitativas em seus componentes majoritários.

Adicionalmente, a partir da análise do perfil do extrato seco, no mesmo sistema cromatográfico utilizado para avaliação do perfil químico e identificação dos principais componentes da droga vegetal, é possível inferir a presença dos mesmos compostos majoritários identificados na droga vegetal a partir da solução extrativa metanólica. Desta forma, infere-se que no extrato seco de *S. chilensis* também há a presença dos ácidos 3,4-O-dicafeoilquinico, 4,5-O-dicafeoilquinico; rutina e quercetrina.

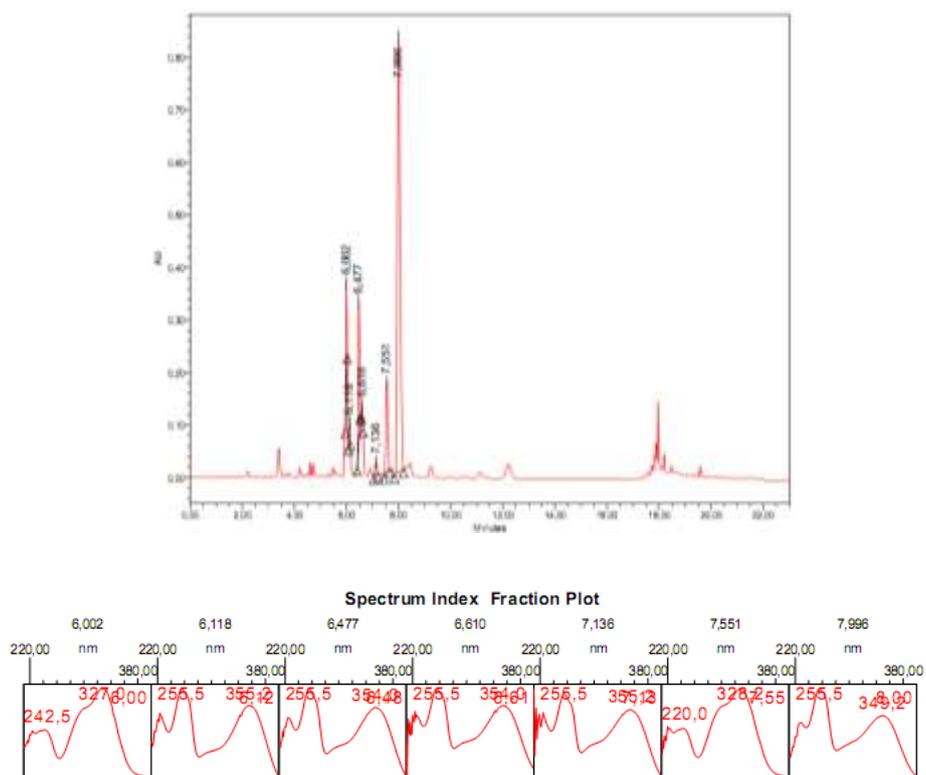


Figura 3.3: Cromatograma do extrato etanol:éter antes de ser submetidos a secagem por aspersão, obtido por UPLC-UV em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.1.3. e espectros de UV correspondentes aos picos assinalados.

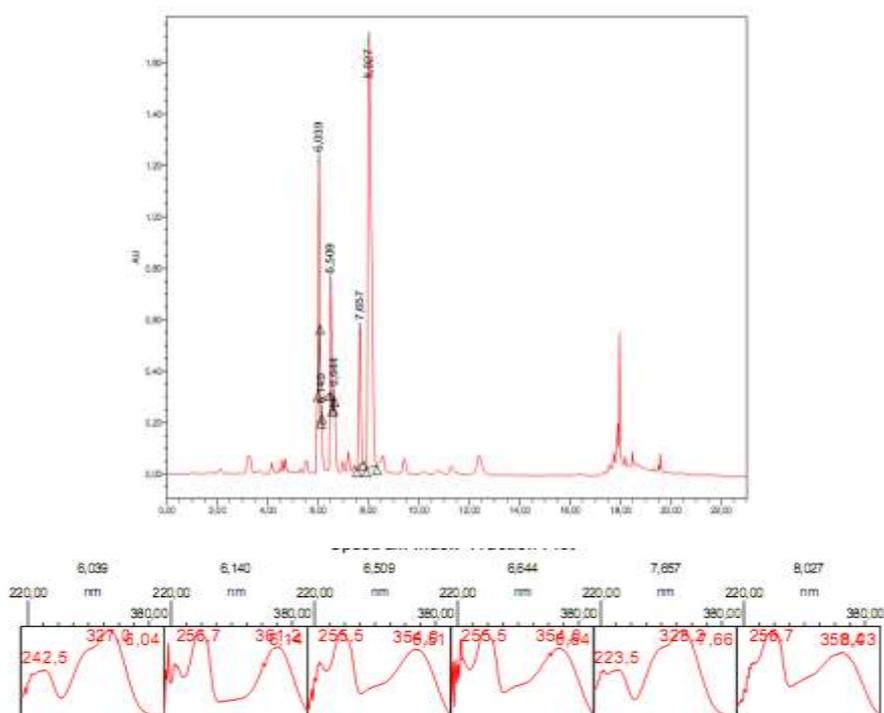


Figura 3.4: Cromatograma obtido extrato do seco por aspersão por UPLC-UV em 300 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.3.1.3 e espectros de UV correspondentes aos picos assinalados.

3.3.4 Qualificação química quantitativa do extrato seco

3.3.4.1 Determinação dos flavonoides totais

A quantidade de flavonoides totais foi determinada por quantificação da aglicona (quercetina) após o extrato ser submetido às condições de hidrólise a de análise por CLAE conforme descrição detalhada no Item 2.4. e preparação de amostra no Item 3.2.6.1. Desta forma, obteve-se o teor de 82,73 mg de quercetina/g extrato seco.

3.3.4.2 Determinação do teor de solidagenona - desenvolvimento e validação de método analítico por densitometria

A utilização da densitometria para a quantificação de produtos apolares tem sido muito utilizada atualmente devido à confiabilidade dos resultados, aliada ao baixo custo de análise e reduzido consumo de solventes, o que torna o método analítico e ecologicamente recomendável.

Neste trabalho, a quantificação por cromatografia em camada delgada de alta eficiência - densitometria (CUPCCD) mostrou-se uma ferramenta adequada ao propósito analítico, sendo que foi possível demonstrar a adequação dos parâmetros como linearidade, precisão, especificidade e recuperação às normas da ANVISA (2003) e da ICH (2005).

Especificidade e seletividade

Na Figura 3.5 (A) está representado o densitograma obtido com a aplicação, em banda, de 10 μ L do extrato a 70 mg/mL. A comparação deste com o densitograma oriundo da aplicação da substância de referência solidagenona (B), por meio da avaliação dos fatores de retenção equivalentes, permite inferir que o pico 6 da amostra é o analito de interesse. As cromatoplasmas foram submetidas à varredura em UV nos comprimentos de onda de 210 a 400 nm para a obtenção do espectro de UV característico bem como para a verificação de sua possível coeluição no pico a ser quantificado. Na Figura 3.6 (C) tem-se o espectro característico da solidagenona que se mostrou condizente com a literatura (Valverde-Soares et al., 2009),

comprovando desta forma a identidade do composto e especificidade do método.

A varredura espectral (200 a 400 nm) Figura 3.6 não indicou desvios nos máximos de absorção (A) tampouco não foram observados desvios de correlação (B) nos diversos pontos de corte do pico 6, sendo evidenciada, desta forma, a seletividade do método.

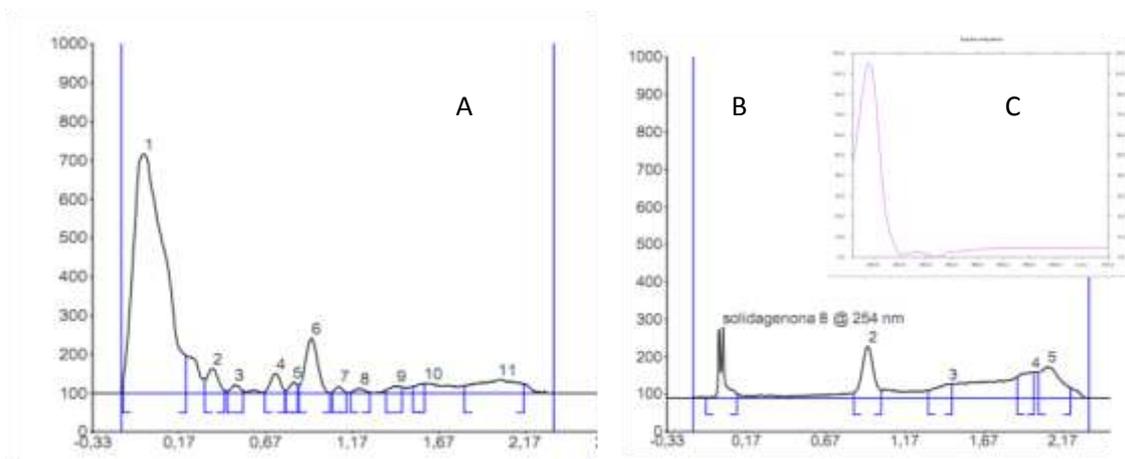


Figura 3.5: Densitograma obtido extrato seco por aspersão por CCDAP-densitometria (A) e substância de referência solidagenona (B) em 254 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 3.2.6.

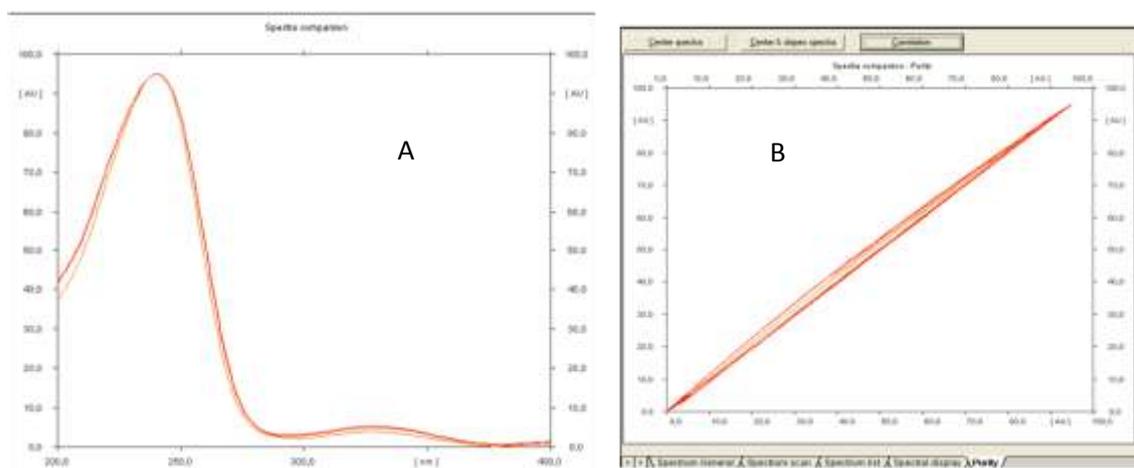


Figura 3.6: Espectro de UV obtido por varredura (200 a 400 nm) (A) e correlação obtida entre os espectros (B).

Após ensaios preliminares realizados com a amostra e a referência visando estabelecer a faixa de concentração ideal para trabalho, foi construída curva analítica relacionando-se a quantidade de padrão (0,42; 0,84; 1,68; 3,36 e 5,04 μg) aplicada em cada banda e a resposta densitométrica oriunda da absorvância do analito em 254 nm. Desta forma, foram construídos dois

gráficos em duplicata e a equação obtida pela curva média (Figura 3.7) foi determinada e utilizada para as quantificações do marcador nas amostras. De acordo com as normas mencionadas, valores de r^2 iguais ou superiores a 0,99 indicam que a faixa crescente de concentrações possui resposta proporcional e linear em absorvância, evidenciando, desta forma, a linearidade do método.

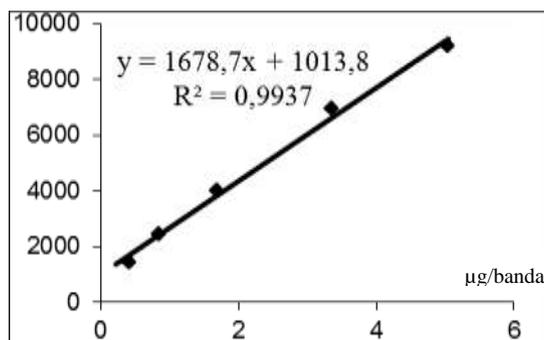


Figura 3.7: Gráfico correspondente a curva analítica média construída com o padrão solidagenona (λ 254 nm) - Linearidade do método obtida por cromatografia em camada delgada de alta eficiência - densitometria.

O densitograma (3D) obtido na determinação da curva analítica para o parâmetro de linearidade do método está representado na Figura 3.8. Observam-se as respostas proporcionais aos acréscimos de concentração.

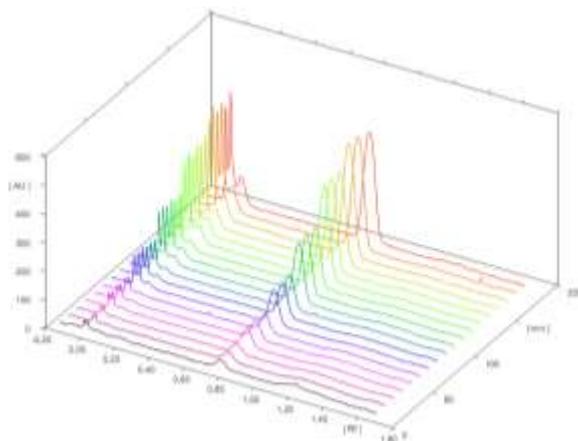


Figura 3.8: Densitograma correspondente à curva analítica construída com o padrão solidagenona (λ 254nm) - Linearidade do método obtida por cromatografia em camada delgada de alta eficiência - densitometria.

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção calculado, por ângulo de inclinação da curva, foi 18,16 ng/banda e o limite de quantificação de 55,04 ng/banda.

Experimentalmente também foram avaliadas as quantidades de 630, 420, 210, 105 e 52 ng/banda a fim de testar se o decréscimo de concentrações responderia proporcionalmente em área mantendo a linearidade do método até o limite de quantificação. Na figura 3.9. está representado o densitograma obtido com o ensaio. Os valores de área foram plotados em gráfico concentração/banda versus área e a equação da reta obtida apresentou r^2 de 0,9984, denotando-se, desta forma, que a linearidade do método é mantida até o limite de detecção.

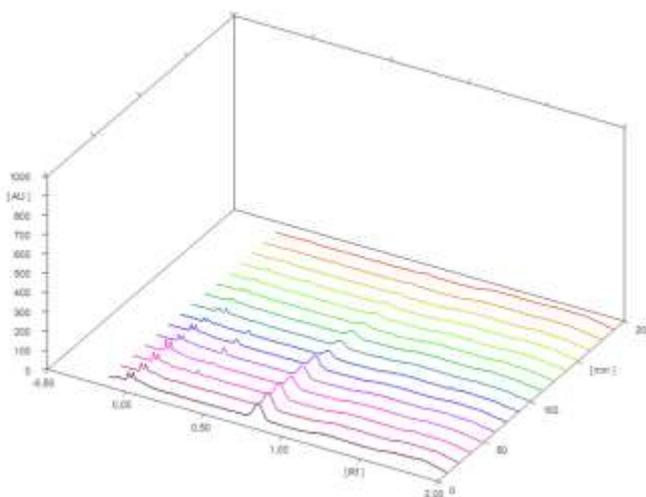


Figura 3.9: Densitograma correspondente à curva analítica construída com o padrão solidagenona (λ 254nm) - 630, 420, 210, 105 e 52 ng/banda - Limite de detecção do método obtida por cromatografia em camada delgada de alta eficiência - densitometria.

Precisão (intermediária e repetibilidade)

Na Tabela 3.1 estão representados os resultados obtidos no ensaio de precisão intermediária. Os teores médios de solidagenona variaram de 8,87 a 9,48 mg/g e os desvios padrão relativos (DPR%) nas das análises realizadas no mesmo dia e em 3 dias consecutivos foram adequados ($< 5\%$), demonstrando-se, desta forma, que o método apresenta apropriada precisão.

Tabela 3.1: Resultados do ensaio de precisão intermediária para o método de determinação do teor solidagenona por cromatografia em camada delgada de alta performance - densitometria.

Dia	n	Área média ± DPR	Teor de solidagenona (mg/g)	Média (mg/g) ± DP	DPR %
1	1	6393 ± 0,25	9,13	9,05	1,9
	2	6639 ± 0,89	9,17		
	3	6264 ± 1,3	8,85		
2	1	6393 ± 0,21	9,13	9,48	3,47
	2	6623 ± 0,63	9,54		
	3	6825 ± 0,48	9,78		
3	1	6261 ± 2,32	8,91	8,87	1,52
	2	6143 ± 2,49	8,72		
	3	6351 ± 1,51	8,98		
				9,13 ± 0,33	

Cada ponto corresponde à média de três determinações; DP: desvio padrão; Concentração (mg/g): mg de solidagenona por grama de extrato; DPR: Desvio padrão relativo (%); n: replicatas.

A repetibilidade do método, verificada por 6 análises realizadas no mesmo dia, está representada na Tabela 3.3. O teor médio de solidagenona foi de 8,71 ± 0,41 mg/g. O DPR observado para a sextuplicata foi de 4,7 %, o que demonstra que o método apresenta adequada precisão-repetibilidade

Tabela 3.2: Resultados do ensaio de repetibilidade para o método de determinação do teor solidagenona por cromatografia em camada delgada de alta eficiência - densitometria.

Amostra	Massas (mg)	Áreas médias	Teor de solidagenona (m/g)
1	353,53	5888,9	8,21
2	350,9	6393,4	9,13
3	353,55	5929,2	8,28
4	365,3	6639,2	9,17
5	353,2	6264,6	8,85
6	354,45	6123,0	8,58
Média ± DP: 8,71 ± 0,41 mg/g; DPR: 4,70%			

Os resultados obtidos para o parâmetro exatidão estão representados na Tabela 3.4. Foram obtidas recuperações de 97,28 a 101,69 % e média ± DPR de 99,48 ± 3,13%, demonstrando que o método desenvolvido apresenta exatidão satisfatória.

Tabela 3.3: Resultados do ensaio de exatidão (recuperação) para método de quantificação de solidagenona por cromatografia em camada delgada de alta eficiência - densitometria.

Nível de concentração	Quantidade teórica (µg)	Quantidade detectada (µg)	Recuperação (%)
Baixo (80%)	2,36	2,4	101,69
Médio (100%)	2,95	2,87	97,28
Alto (120%)	3,54	3,49	98,58
Média ± DPR: 99,48 ± 3,13			

Robustez

A robustez do método foi avaliada, inicialmente, pela alteração dos tempos de saturação da cuba cromatográfica e pela quantidade de amostra aplicada na cromatoplaça. O DPR (%) 2,77 observado entre as determinações (Tabela 3.4) indica que as mudanças desses parâmetros não afeta a quantificação do marcador. Também foram testadas variações na distância de migração da fase móvel (de 10 para 15 cm); alteração da proporção na fase móvel hexano: acetato de etila de (de 78:22 para 77:23). Essas variações tiveram influência negativa sobre o método. Desta forma, o método desenvolvido deve ser repetido nas condições estabelecidas para esses dois últimos parâmetros.

Tabela 3.4: Dados do parâmetro robustez avaliados no método de quantificação de solidagenona por cromatografia em camada delgada de alta eficiência-densitometria.

Parâmetros	Teor de solidagenona (mg/g)
Tempo de saturação (min)	
0	9,05
15	9,16
60	8,58
Volume de aplicação da amostra (µL)	
5	8,75
10	8,70

3.4 Conclusões

Em suma, o desenvolvimento tecnológico de extrato seco, com subsequente qualificação química em teor dos marcadores químicos ativos (flavonoides totais e solidagenona) bem como a caracterização qualitativa da presença de compostos fenólicos presentes na droga vegetal de origem, se traduz em valor agregado para a obtenção de produtos farmacêuticos fitoterápicos. Na continuidade dos estudos, a atividade farmacológica desse extrato padronizado bem como a viabilidade tecnológica de emprego deste em formulações farmacêuticas sólidas será avaliada.

3.5 Referências

Arawwawala, L.D.A.M.; Hewageegana, H.G.S.P.; Arambewela, L..R.; Ariyawansa, H.S. Standardization of spray-dried powder of *Piper betle* hot water extract. **Pharmacognosy Magazine**, v.7(26), p. 157-160, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determinar a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

Broadhead, J.; Rouan, S.K.; Rhodes, C.T.; The spray drying of pharmaceuticals. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.18, p.1169-1206, 1992.

Carvalho, E.L.S 1997. **Desenvolvimento de produtos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek – Celastraceae (espinheira-santa)**. Porto Alegre, 133p. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

Çelik, M.; Wendel, S.C. **Spray drying and pharmaceutical applications**. In: DM Parikh. Handbook of pharmaceutical granulation technology. 2 ed., Boca Raton: Taylor & Francis Group, p.129-158, 2005.

De Paula, I.C. Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. Compositae – Marcela. PPGCF-UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, (Dissertação), 1996, 194p.

De Paula, I.C.; González O.G.; Bassani, V.L.; Petrovick, P.R. Development of ointment formulations prepared with *Achyrocline satureioides* spray-dried extracts. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.24, p.235-241, 1998.

De Souza, K.C.B. **Desenvolvimento de metodologia analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* forma *flavicarpa***. Porto Alegre, 141p. Dissertação de mestrado,

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1997.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

ICH – International Conference on Harmonization. **Validation of analytical procedures: text and methodology**. Q2(R1). Switzerland: ICH Steering Committee, 2005. 17 pag.

Oliveira, O.W.; Petrovick, P.R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20(4), p.641-650, 2010.

Schmeda-Hirschmann, G. A Labdan Diterpene from *Solidago chilensis* Roots. **Planta Medica**, v.54(2), p.179-80, 1988.

Schmeda-Hirschmann, G.; Rodriguez, J.; Astudillo, L. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.8, p. 111-115, 2002.

Senna, E.L.; Petrovick, P.R.; Ortega, G. G.; Bassani, V.L. Preparation and characterization of spray dried powders from *Achyrocline satureoides* (Lam) DC extracts. **Phytotherapy Research**, v. 11 (2), p. 123-127, 1997.

Shi, Z.-Q.; Song, De-F.; Li, Ruo-Qian; Yang, H.; Qi, L.-W.; Xin, Gui-Zhong; Wang, Ding-Qian; Song, Hui-Peng; Chen, J.; Hao, H.; Li, P. Identification of effective combinatorial markers for quality standardization of herbal medicines. **Journal of Chromatography A**, v.1345, p. 78–85, 2014.

Soares, L.A.L.; Gonzalez Ortega, G.; Petrovick, P.R.; Schimidt, P.C. Dry granulation and compression of spray-dried plant extract. **AAPS PharmSciTech**, v.6(3), p. 358-466, 2005.

Souza, C.R.F. Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos spray dryer e leito de jorro. PPGCF-FCFRP/USP, (Dissertação), 2003, 179p.

Souza, C.R.F. Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras: estudo da viabilidade técnica e econômica do processo em leito de jorro. 2007. 219p. Tese. PPG-FCFRP/USP, Ribeirão Preto, SP, 2007.

Teixeira, H.F. **Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC Compositae (Marcela)**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1996.

Vasconcelos, E.A.F.; Medeiros, M.G.F.; Raffin, F.N.; Moura, T.F.A.L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius*

Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15(3), p.243-249, 2005.

Valverde-Soares, S.S.; Azevedo-Silva, R.C.; Tomassini, T.C.B. Utilização de CLAE, como paradigma na obtenção e controle do diterpeno solidagenona a partir de inflorescências de *Solidago chilensis* Meyen (arnica brasileira). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90(3), p. 196-199, 2009.

Yatsu, F.K.J.; KOESTER, L.S.; Lula, I.; PASSOS, J.J.; SINISTERRA, R.; Bassani, V.L. Multiple complexation of cyclodextrin with soy isoflavones present in an enriched fraction. **Carbohydrate Polymers**, v.98, p.726-735, 2013.

CAPITULO 4 - Avaliação da atividade gastroprotetora de extrato seco padronizado obtido das inflorescências de *Solidago chilensis* Meyer

4.1 Introdução

A espécie *Solidago chilensis* tem uso reconhecido na medicina popular brasileira para tratar distúrbios gástricos, úlceras intestinais, inflamações, reumatismo, além do emprego como diurético e analgésico (Russo, et al., 2008). Dentre os usos descritos anteriormente, destacam-se os destinados ao tratamento de problemas gástricos e inflamações pelas evidências científicas corroborarem com o benefício terapêutico de utilização (Schmeda-Hirschmann et al., 2002, Goulart et al., 2007; Liz et al., 2008; Tamura et al., 2010; Buccireli et al., 2010).

A busca por novos produtos com ação gastroprotetora e antiúlcera, eficazes e com baixa toxicidade, é muito relevante no panorama atual no qual é observado um aumento na incidência dessas patologias gástricas e que aproximadamente 8 a 10 % da população mundial é acometida por estas desordens (Brzozowski, 2003; Boligon et al., 2014). No Reino Unido, além das morbidades relacionadas à doença, é estimado que uma a cada mil pessoas/ano apresente complicações graves, como hemorragias e perfurações, ocasionadas por úlceras pépticas. Cerca de 5 a 10 % destas complicações podem ser fatais (González-Pérez et al., 2014).

Fisiologicamente, a gastrite resulta de um processo inflamatório no estômago e pode ser dividida em três principais tipos: atrófica (aguda), não-atrófica (crônica) e formas especiais, sendo que a forma crônica é a mais frequente. A úlcera, de acordo com o *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases* (2004), é caracterizada por uma lesão no revestimento do estômago ou do duodeno (Porth, 2004) e é advinda do desequilíbrio entre os fatores agressivos e de proteção da mucosa gastroduodenal. Esse desbalanço pode ser o resultado da associação de diversos fatores agressores endógenos (ácido, pepsina e bile) e exógenos relacionados às condições de vida (estresse, fumo, álcool, uso contínuo de drogas anti-inflamatórias não esteroides, ingestão de determinados alimentos e a presença do *Helicobacter pylori*, além de predisposição genética (Chan, 2002).

No Brasil, estudos conduzidos por Saul et al. (2007), indicaram que úlceras gastroduodenais atingem cerca de 3,3 % da população (Ramakrishnan

et al., 2007). Além disso, estipula-se que aproximadamente metade de toda população esteja infectada pela bactéria *H. pylori*, um dos principais agentes causadores de gastrite e que pode desencadear consequências danosas ao trato digestório, resultando em úlceras e carcinomas. Desta forma, estas patologias representam um importante problema de saúde pública no país (Santin et al., 2010; Oliveira, 2010; Lemos et al., 2011).

Apesar do amplo conhecimento da fisiopatologia das úlceras pépticas e da disponibilidade de diversos fármacos, não há um medicamento que produza 100 % de remissão das úlceras. Além disso, somada à elevada incidência mundial; a frequente necessidade de intervenção endoscópica-terapêutica que gera elevados custos; as elevadas taxas de reincidência, necessitando, muitas vezes, de intervenção cirúrgica; o elevado custo dos medicamentos disponíveis e a possibilidade de evolução clínica de gastrite para úlceras e carcinomas, novas estratégias terapêuticas de gastroproteção, com vistas à remissão ou prevenção da doença mostram-se importantes (Lemos et al., 2011; Oliveira, 2010).

Neste contexto, *Solidago chilensis*, espécie nativa do Brasil e integrante da Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), possui potencial gastroprotetor evidenciado por estudos *in vivo* realizados com extratos, obtidos das inflorescências, folhas e raízes. Tanto a ação anti-inflamatória da espécie, demonstrada pela inibição de diversas enzimas e mediadores sistêmicos como das mieloperoxidases, adenosina-desaminase, TNF α , além de ação na migração de leucócitos, neutrófilos e nos níveis de óxido nítrico e interleucina-1 (Goulart et al., 2007; Liz et al., 2008; Tamura et al., 2009), quanto o efeito gastroprotetor da solidagenona e de infusos obtidos das inflorescências justificam essa atribuição terapêutica (Schmeda-Hirschmann et al., 2002; Bucciareli et al., 2010).

A ação gastroprotetora observada por Bucciareli e colaboradores (2010) após a administração do infuso obtido das partes aéreas pressupõe que a solidagenona não é o único metabólito da espécie que exerce a referida ação, uma vez que pela completa insolubilidade do diterpeno em água (solvente extrator), este diterpeno não estaria presente no infuso. Nessas preparações foi relatada a presença de flavonoides e ácidos fenólicos e para os quais foi atribuída a ação anti-inflamatória da espécie (Tamura et al., 2009).

Desta forma, considerando-se que no desenvolvimento do extrato seco foi planejada a extração direcionada a obtenção das duas classe químicas mencionadas e que as análises quali e quantitativas do extrato seco padronizado de *Solidago chilensis* confirmaram a presença de compostos fenólicos e de solidagenona, a hipótese de que este produto possa ter ação multialvo sobre a gastrite foi desenvolvida. Assim, nesta etapa do trabalho foi avaliado o potencial gastroprotetor do referido extrato e marcador químico isolado em relação a fármacos disponíveis no mercado. Para tal, foram utilizados dois diferentes modelos experimentais de úlcera aguda (etanol e anti-inflamatório não-esteróide).

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando entre 90-140 g procedentes do biotério central da Univali para o experimento realizado com o extrato seco. Os ensaios com a solidagenona foram realizados em camundongos fêmeas com peso entre 40-80 g devido à quantidade de isolado disponível.

Os roedores escolhidos foram selecionados por possuírem a fisiologia/patologia do sistema digestório, principalmente nos aspectos relacionados à úlcera gastroduodenal, semelhante a do homem. Além disso, as metodologias propostas são consagradas na literatura científica, sendo utilizadas para avaliação da atividade antiúlcera de compostos/extratos há mais de 50 anos. Atualmente não existem métodos alternativos que não utilizem animais para a avaliação da atividade proposta neste trabalho.

Foram testadas as doses de 250, 125 e 50 mg/kg do extrato seco. Adicionalmente, após observação de ação do extrato, para fins comparativos da atividade também foi ensaiada a dose de 30 mg/kg de solidagenona. Para cada dose foi utilizado grupo de cinco animais (n=5). O tamanho de amostra utilizado foi fundamentado por estudos estatísticos prévios, os quais demonstraram que para obtenção de resultados confiáveis neste tipo de avaliação, este é o número representativo mínimo de animais necessários.

Adicionalmente, artigos publicados nesta área, descrevem em suas metodologias esse número de animais por grupo de tratamento.

Os animais foram retirados do biotério 24 h antes da realização de cada experimento para ambientação e mantidos em caixas de polipropileno, contendo maravalha, em sala com temperatura média de 22 °C e ciclos controlados (claro/escuro 12 h cada), umidade relativa do ar de 60 %, com ração e água *ad libitum*. Nas doze horas anteriores aos experimentos, os animais foram mantidos em jejum e com livre acesso à água, sendo adicionada à caixa uma grade para inibir a coprofagia.

Os experimentos realizados são específicos para avaliação de ação gastroprotetora. Após os tratamentos, os animais foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical ou câmara de CO₂. As carcaças foram acondicionadas em sacos plásticos adequados para descarte de material biológico e incineradas, conforme normas da Univali.

4.2.2 Avaliação da atividade gastroprotetora

Para a avaliação da atividade gastroprotetora foram utilizados experimentos que procuram mimetizar os distúrbios gástricos em humanos, baseados em fatores etiológicos da doença, como por exemplo, o uso de fármacos antiinflamatórios não-esteroides e uso abusivo de bebidas alcoólicas. Cada experimento constituiu-se dos grupos testes, controle positivo e negativo (veículo), dependendo da necessidade de cada modelo. Todos os experimentos foram realizados com o auxílio da equipe do Prof. Dr. Sérgio Faloni de Andrade.

4.2.3 Modelo de úlcera aguda induzida por etanol

O método utilizado foi descrito por Morimoto et al. (1991). Após jejum de 12 h, os camundongos foram divididos em diferentes grupos (n=5). O controle positivo foi tratado com carbexonolona 200 mg/kg; os controles negativos receberam água ou adjuvantes de formulação em dose de 100 mg/kg; os grupos tratados receberam o extrato nas doses de 50, 125 e 250 mg/kg ou solidagenona na dose de 30 mg/kg. Transcorrida uma hora, foi administrado

aos animais 0,1 mL/10 g (peso animal) de etanol 96 % (agente lesivo) por via oral e, após mais 1 h, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ou câmara de CO₂. Em seguida, os estômagos foram retirados e abertos ao longo da curvatura maior e esticados entre em placas de vidro para que as imagens pudessem ser captadas por *scanner* e, assim, analisadas pelo *software* EARP, a fim de determinar-se o número de lesões e seus tamanhos. Posteriormente, realizaram-se as medida da área total, área de lesão (mm²) e, por relação direta, foi determinado o índice percentual de gastroproteção.

4.2.4 Modelo de úlcera aguda induzida por antiinflamatório não-esteróide

A metodologia utilizada foi adaptada daquela descrita por Rainsford (1980). Após o jejum de 12 h, os animais foram divididos em diferentes grupos (n=5). O controle positivo foi tratado com ranitidina 100 mg/kg; os controles negativos receberam água ou adjuvantes de formulação em dose de 100 mg/kg; os grupos tratados receberam o extrato nas doses de 50, 125 e 250 mg/kg ou solidagenona na dose de 30 mg/kg. Uma hora após as administrações, os animais receberam 100 mg/kg de indometacina por via oral.

Transcorridas 12 h da administração de indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ou em câmara de CO₂, os estômagos retirados e abertos ao longo da curvatura maior. Após serem esticados e colocados entre placas de vidro para que as imagens pudessem ser captadas através de scanner e analisadas pelo *software* EARP, a fim de determinar-se o número de lesões e seus tamanhos. Posteriormente, realizou-se a medida da área total, área de lesão (mm²) e, por relação direta, foi determinada o percentual de prevenção.

4.2.5 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade de Vale do Itajaí.

4.2.6 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados obtidos foi empregada a análise de variância (ANOVA) e para comparação das médias dos grupos testados foi utilizado o teste de Dunnett, sendo que os valores com $p < 0,01$ e $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (Sokal, 1995).

4.3 Resultados e discussão

Os resultados referentes à gastroproteção demonstrada pelo extrato padronizado de *S. chilensis* em modelo de úlcera induzida por etanol estão apresentados na Figura 4.2 Os grupos tratados com 50, 125 e 250 mg/kg do extrato demonstraram índices de gastroproteção significativos quando comparado ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). O percentual de inibição para as três doses foi de $85 \pm 15 \%$, $77 \pm 3 \%$ e $83 \pm 9 \%$, respectivamente. Neste mesmo modelo de indução de lesão, a solidagenona, testada em camundongos, também apresentou atividade gastroprotetora pronunciada (Figura 4.3.). O índice de gastroproteção observado para a dose de 30 mg/kg foi de $86 \pm 13 \%$, valor equivalente aos $89 \pm 5 \%$ observado para o controle positivo carbenoxolona na dose de 200 mg/kg.

A formação de lesões na mucosa gástrica por etanol (agente necrosante), envolve a redução de mecanismos de defesa gástricos (Kinoshita et al., 1995) por diversos mecanismos tais como: redução no fluxo sanguíneo gástrico, contribuindo no desenvolvimento de hemorragia e necrose; solubilização do muco presente no estômago, resultando em uma redução da diferença de potencial transmucosa, aumentando o fluxo de íons Na^+ e K^+ ao lúmen, secreção de pepsina e perda de íons H^+ e de histamina no lúmen; indução do estresse oxidativo; aumento da atividade de xantina oxidase e dos níveis de malondialdeído; e redução nos níveis totais de glutatona nas células da mucosa gástrica (Szabo, 1990; Marotta et al., 1999).

Sabe-se que a úlcera gástrica pode ser uma patologia com indução multifatorial e resultante do desequilíbrio entre os fatores agressivos (HCl, pepsina) e a habilidade da mucosa gástrica de se proteger e curar a si própria (muco e secreção de HCO_3^- , prostaglandinas, fluxo de sangue e óxido nítrico)

(Lu, 2006). Dentre os fatores associados, frequentemente destacam-se o estresse, o fumo, deficiências nutricionais, uso de AINE, predisposição hereditária e infecção por *H. pilory* (Barros et al., 2008).

Considerando-se as importantes atividades do extrato e do diterpeno, optou-se por avaliar o comportamento destes em modelo de úlcera induzida por indometacina. Os resultados são apresentados nas Figuras 4.1 e 4.4. Os índices de gastroproteção (%) foram $64 \pm 16\%$, $63 \pm 23\%$ e $79 \pm 12\%$ para os grupos tratados com 50, 125 e 250 mg/kg do extrato, respectivamente. As atividades gastroprotetoras (%) para as diferentes doses apresentaram baixa variação com o aumento da dose. Esse acréscimo discreto talvez esteja relacionado à lesão observada no grupo controle tratado somente com adjuvantes de formulação em dose de 100 mg/kg. Desta forma, infere-se que quanto maior a dose, maior a quantidade de adjuvante e, conseqüentemente, maior a possibilidade de lesão da mucosa que não estaria sendo protegida de maneira proporcional à maior quantidade de ativo. Outra hipótese seria um possível platô de ação nas doses testadas e o efeito dose-resposta mais pronunciado seria observado em doses menores. Entretanto, independentemente, a atividade observada pode ser considerada ótima quando comparada ao controle positivo ranitidina (100 mg/kg), já que na dose de 50 mg/kg o efeito observado (considerando-se o erro padrão médio) foi semelhante ao do fármaco. Da mesma forma que o observado no modelo de lesão induzida por etanol, em modelo agudo de indução por AINE, a solidagenona (30 mg/kg) apresentou ação gastroprotetora pronunciável e comparada ao controle ranitidina (100 mg/kg) (Figura 4.4.).

Os AINE, como é o caso da indometacina, têm capacidade de inibir a ciclooxigenase, demonstrando fortes evidências que o efeito ulcerogênico destes está amplamente correlacionado à sua capacidade de suprimir a síntese das prostaglandinas (PG). PG endógenas regulam o fluxo sanguíneo da mucosa, proliferação de células epiteliais, regeneração epitelial, atividade imune da mucosa, secreção de muco e de HCO_3^- e secreção de ácido. Assim, com a inibição da síntese de prostaglandinas, haveria um enfraquecimento das defesas da mucosa e a conseqüente redução na capacidade de resistir a agressores (Chan, 2002). Porém, a diminuição na síntese de PG não é a única via responsável pela formação de úlcera por AINE. Paralelamente, os AINE

levam a um aumento dos níveis de mieloperoxidase e malondialdeído, ambos responsáveis pelo dano oxidativo, além de reduzir a síntese de NO, relacionado à secreção de muco, à regulação do fluxo sanguíneo e à prevenção da peroxidação lipídica (Suleyman et al., 2010). A ação de extratos etanólicos da espécie em diversas dessas vias foi observada em modelos *in vivo* (Liz et al., 2007; Goulart et al., 2007; Tamura et al., 2009). Mesmo não sendo um modelo específico, pode-se inferir que a gastroproteção gerada por *S. chilensis* provavelmente relaciona-se com a ação multialvo do extrato.

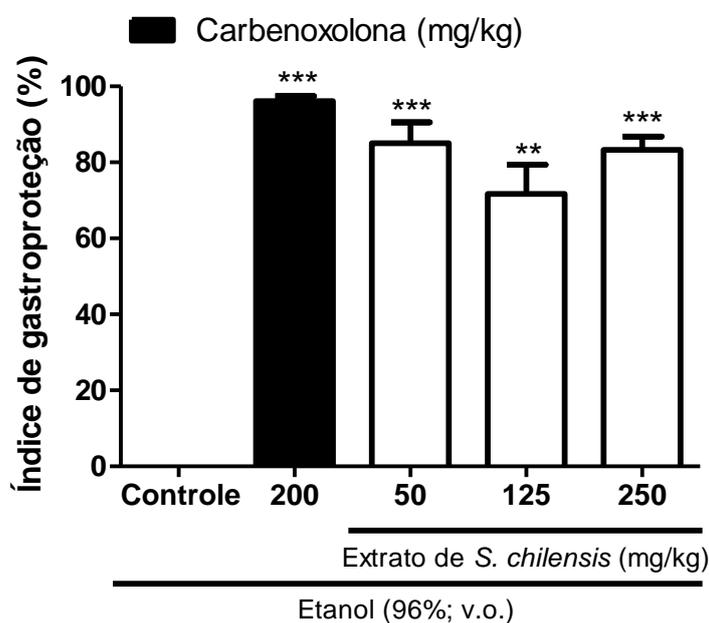


Figura 4.1: Índice de gastroproteção promovido pela carbenoxolona (200 mg/kg; v.o.) e pelo extrato *S. chilensis* (50-250 mg/kg; v.o.) em lesões induzidas por etanol 96 %; v.o.) em ratos (n = 5). Os resultados estão expressos em média \pm EPM.

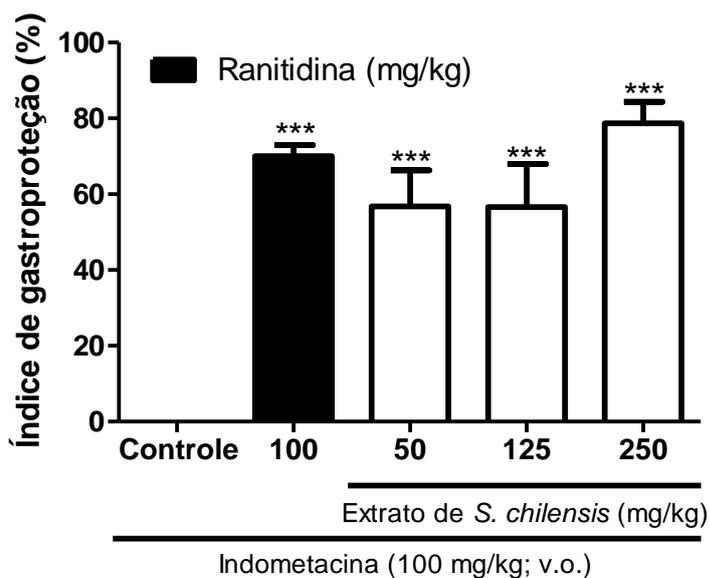


Figura 4.2: Índice de gastroproteção promovido pelo ranitidina (100 mg/kg; v.o.) e pelo extrato de *S. chilensis* (50-250 mg/kg; v.o.) em lesões induzidas por etanol 96 % v.o. em ratos (n = 5). Os resultados estão expressos em média \pm EPM.

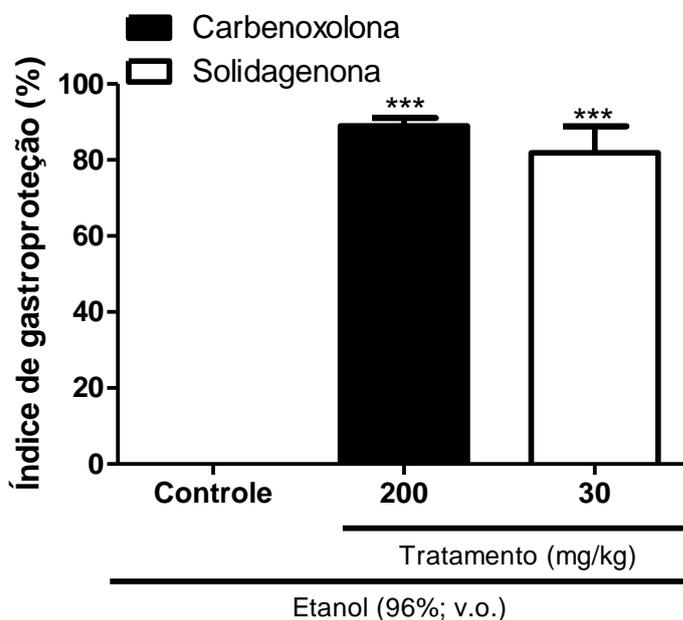


Figura 4.3: Índice de gastroproteção promovido pela carnenoxolona (200 mg/kg; v.o.) e pela solidagenona (30 mg/kg; v.o.) em lesões induzidas por etanol 96%; v.o.) em camundongos (n = 6). Os resultados estão expressos em média \pm EPM.

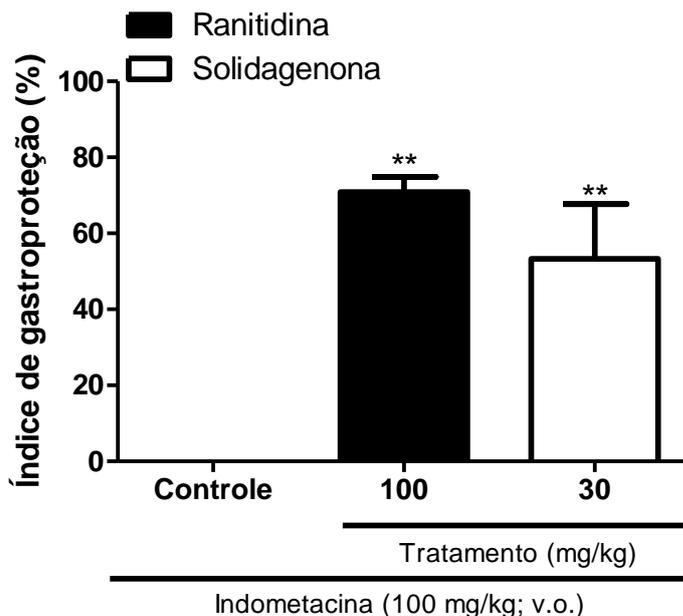


Figura 4.4: Índice de gastroproteção promovido pela ranitidina (100 mg/kg; v.o.) e pela solidagenona (30 mg/kg; v.o.) em lesões induzidas por indometacina 100 mg/kg v.o.) em camundongos (n = 6). Os resultados estão expressos em média \pm EPM.

Schmeda-Hirschmann e colaboradores (2002) avaliaram o efeito gastroprotetor da solidagenona em ratos submetidos a modelo de úlcera induzida por etanol. As doses de 100 e 200 mg/kg apresentaram efeitos comparáveis ao do lansoprazol (20 mg/kg). Também no mesmo modelo agudo, o infuso obtido das inflorescências de *S. chilensis* demonstrou ação gastroprotetora discreta em doses de 125-2000 mg/kg quando comparadas ao grupo não tratado ($p < 0,05$). Entretanto, o perfil fitoquímico desse extrato não foi avaliado, o que torna empírica a comparação entre os ensaios realizados com extratos da mesma espécie bem como com o produto isolado. Assim, torna-se ainda mais evidente a importância de utilizar extratos padronizados em modelos farmacológicos.

Os experimentos com o extrato padronizado foram realizados em ratos e aqueles com a solidagenona, devido à quantidade de material disponível, com camundongos. Desta forma, a comparação direta entre resultados obtidos não é possível de ser feita. Entretanto, pode-se inferir que a solidagenona contribui para a atividade gastroprotetora, porém não é a única responsável pela ação. Essa hipótese, apesar de empírica, pode ser sustentada se for considerado

que o teor de solidagenona no extrato padronizado é 9 mg/g e que, levando-se em conta que na dose de 50 mg/kg, por exemplo, proporcionalmente haveria menos de um mg da substância na dose administrada aos ratos. Entretanto, o índice percentual de gastroproteção observado na dose de 50 mg/kg do extrato foi cerca de 85% e a para a solidagenona a 30 mg/kg foi de 86%. Assim, poder-se-ia inferir a existência de sinergismo relacionado com a ação dos flavonoides sobre mediadores comuns ao processo inflamatório anteriormente descrito por diversos autores (Liz et al., 2007; Goullart et al., 2007; Tamura et al., 2009).

4.4 Conclusões

Os modelos empregados neste trabalho permitiram a observação do potencial gastroprotetor do extrato e foram observados bons índices de gastroproteção em doses baixas. Os resultados são orientadores para estudos complementares em modelos crônicos bem como o estabelecimento de um possível mecanismo.

4.5 Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Ministerial MS/GM nº 971 de 03 de maio de 2006. Publica a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, 04 mai. 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 5.813, em 22 de junho de 2006. Publica a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, 23 jun. 2006b.

Boligon, A.A.; de Freitas, R.B.; de Bruma, T.F.; Waczukc, E.P.; Klimaczewski, C.V.; de Ávilac, D.S.; Athayde, M.L.; Bauermann, L.F. Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *article in press*, 2014.

Bucciarelli, A.; Minetti, A.; Milczakowskyg, C.; Skliar M. Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Pharmaceutical Biology**, v.48(9), p. 1025-30, 2010.

Brzozowski, T. Experimental production of peptic ulcer gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, n. 3, p.99-126, 2003.

Chan, F. K. L.; Leung, W. K. Peptic-ulcer disease. **The Lancet**, v. 360, p. 933-941, 2002.

Lemos, M. **Estudo do perfil fitoquímico e avaliação da atividade gastroprotetora do extrato hidroalcoólico, frações e subfrações das folhas da couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C.)**. 2010. 114 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2010.

Goulart, S.; Moritz, M.; Lang, K.L.; Liz, R.; Schenkel, E.P.; Fröde, T.S. **Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy**. *Journal of Ethnopharmacology*. v.113 (2), p. 346-353, 2007.

Liz, R.; Vigil, S.V.; Goulart, S.; Moritz, M.I.; Schenkel, E.P.; FRöde, T.S. **The anti-inflammatory modulatory role of *Solidago chilensis* Meyer in the murine model of the air pouch**. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.60(4), p.515-21, 2008.

Morimoto, Y. et al. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.57, p.495-505, 1991.

NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES. What I need to know about peptic ulcers. **National Institute of Health** , U.S. Department of Health and Human Services, n. 5, p. 1-12, 2004.

Oliveira, L. F. S. **Prospecção de novos produtos naturais e sintéticos bioativos com atividade antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori***. 2010. 121f. Monografia de Conclusão de Curso (Mestrado) – Curso de Mestrado Profissional em Farmácia, Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, 2010.

Oliveira, A.P.; Santin, J.R.; Klein Jr., L.C.; Lemos, M.; Bittencourt, C.M.S.; Couto, A.G.; Cechinel-Filho, V.; Andrade, S.F. Gastroprotective activity of methanol extract and marrubiin obtained from aerial parts of *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.63 (9), p. 1230-1237, 2011.

Porth, C. M. Alterações na função gastrointestinal. In: Porth, C. M. **Fisiopatologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 802-813.

Rainsford, K. D. Biochemical gastroprotection from acute ulceration induced by aspirin and related drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 29, p. 1281-1289, 1980.

Ramakrishnan, K.; Salinas, R.C. Peptic ulcer disease. **American Family Physician.**, v.76(7), p.1005-12, 2007.

Russo, A.; Garbarino, J. *Solidago chilensis* Meyen et *Kageneckia oblonga* Ruiz & Pav.: petite revue de leur profil antioxydant. **Phytothérapie**, v.6, p. 333–341, 2008.

Santin, J.R.; Lemos, M.; Klein-Júnior, L.C.; Niero, R.; Andrade, S.F. Antiulcer effects of *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.130, p.334-339, 2010.

Saul, C. et al.. Prevalence reduction of duodenal ulcer: a Brazilian study (retrospective analysis in the last decade: 1996–2005). **Arquivos de Gastroenterologia**, v.44, p.320–324, 2007.

Schmeda-Hirschmann, G.; Rodriguez, J.; Astudillo, L. **Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice.** Journal of Ethnopharmacology, v.8, p.111-115, 2002.

Sokal, R.R.; Rohlf, F.J. **Biometry.** The principles and practice of statistics in biological research, New York: W. H. Freeman Company, p. 887, 1995.

Tamura, E.K.; Jimenez, R.S.; Waismam, K.; Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P.; Malpezzi-Marinho, E.A.L.; Marinho, E.A.V.; Farsky, S.H.P. **Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation.** Journal of Ethnopharmacology, v.122, p.478-485, 2009.

**Capítulo 5 - Obtenção da forma farmacêutica acabada a partir de
extrato seco padronizado**

5.1 Introdução

As formas farmacêuticas sólidas são as mais comumente empregadas pela indústria farmacêutica de fitoterápicos devido às diversas vantagens tecnológicas, de estabilidade, facilidade de manuseio, transporte e armazenamento (Sonaglio et al., 2003; Rocha et al., 2010). Além das vantagens técnicas de produção dessas formas farmacêuticas, os respectivos medicamentos são considerados mais apropriados para a adesão dos usuários ao tratamento, devido a vários fatores como a precisão da dosificação, facilidade de acondicionamento e manuseio. Essa tendência industrial pode ser mensurada ao ser avaliado o número de medicamentos fitoterápicos registrados, que, em 2008, representava 67,7 % das formas farmacêuticas registradas na ANVISA e referiam-se a cápsulas e comprimidos (Carvalho et al., 2008).

Frequentemente, extratos vegetais secos por aspersão são utilizados como produtos finais e intermediários para a obtenção de granulados, cápsulas e comprimidos devido a maior concentração de ativos somada à possibilidade de se obter melhores características tecnológicas pela adição de adjuvantes. A transformação deste produto intermediário em comprimidos por ser realizada por compressão direta ou com granulação prévia.

A compressão direta envolve, basicamente, apenas três estágios: a pesagem (fracionamento) dos pós que compõem a formulação, a mistura destes e a compressão (Prista et al., 2008). Outra possibilidade de compressão consiste no preparo prévio de grânulos ou granulados, que são aglomerados de matérias particuladas com aspecto homogêneo, que apresentam dentre outras vantagens melhores características de fluxo e de compactação do que as misturas pulveréas originais (Aulton, 2005; Couto et al., 2000).

Apesar da compressão direta apresentar vantagens como o baixo custo de produção, de ser um processo com poucas etapas envolvidas, além do menor consumo de energia e de tempo (Sá barreto & Cunha-Filho, 2009), há limitações reológicas características de extratos secos, os quais, em geral estão presentes em alta concentração na formulação, o que frequentemente inviabiliza sua utilização neste processo. Dentre as características desfavoráveis mais relevantes, salientam-se as propriedades empacotamento,

de fluxo, de coesão ou de lubrificação insatisfatórias (Gohel & Jogani, 2005). Estas estão relacionadas às propriedades comuns aos extratos vegetais obtidos por aspersão que caracteristicamente possuem partículas finas, leves, com baixa fluidez e compressibilidade, além da alta higroscopicidade (Minina, et al., 1996; Soares et al., 2005).

A granulação por via seca por desagregação resulta da agregação das partículas sólidas por meio de pressão mecânica. Esta pode ser oriunda de máquina de comprimir ou por compactação em rolos (Soares, 2002) com subsequente moagem dos compactos (briquetes) obtidos (Couto et al., 2000; Herting, 2008).

Se a pressão aplicada for excessiva e prolongada, pode haver aumento no tempo de dissolução, por redução da porosidade, e comprometimento da viabilidade da formulação. Porém, apesar desse possível limitante de processo, a granulação por via seca é a alternativa de escolha para extratos que possuam substância instáveis ou sem estabilidade conhecida em água, higroscópicas, termossensíveis ou excessivamente solúveis nos líquidos de molhagem utilizados na granulação por via úmida (Vila Jato, 2001; Bica, 2009).

Considerando as propriedades tecnológicas de extratos secos, em diversos trabalhos tem sido empregada a granulação por via seca por desagregação a fim de contornar essas limitações (Couto, 2000; Soares et al., 2002; De Souza, 2004; Spaniol, 2007; Petrovick, 2006, Bica, 2009) e os resultados obtidos pelos pesquisadores citados nortearam o delineamento experimental dos estudos de viabilidade tecnológica de obtenção de comprimidos a partir do extrato seco padronizado de *Solidago chilensis*.

5.2 Materiais e Métodos

A produção de comprimidos resultou da compressão do complexo farmacêutico (CF) formado pela mistura do granulado de adjuvantes (GRADJ) e do granulado de extrato seco (GRPSA) obtidos e caracterizados conforme descrito a seguir.

Matérias-primas

Água ultrapura obtida em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford/EUA). Celulose microcristalina (Microcel[®] MC 102, Blanver, Cotia/Brasil, lote1255/08), dióxido de silício coloidal (Aerosil[®] 200, Evonik-Degussa, Frankfurt/Alemanha, lote 3159071614), amidoglicolato de sódio (Explosol[®], Blanver, Cotia/Brasil, lote 1920109) e estearato de magnésio (Acros Organics, New Jersey/USA, lote A0235781) foram os adjuvantes empregados na constituição dos complexos farmacêuticos para produção de briquetes.

Para a obtenção dos granulados co-processados de adjuvantes (GRADJ) se empregou como aglutinante metilcelulose (Methocel A15, Dow, New York/USA, lote UL15012N21); como desintegrante amidoglicolato de sódio (Explosol[®], Blanver, Cotia/Brasil; lote 19201/97) e como material de enchimento e carga celulose microcristalina (Microcel[®] MC 101, Blanver, Cotia/Brasil; lote 221/05). No complexo farmacêutico final empregou-se, novamente, o lubrificante estearato de magnésio (Acros Organics, New Jersey/USA, Lote A0235781).

Equipamentos, acessórios e correlatos

- Agitador de tamises para análises granulométricas Bertel com tamises segundo as normas da Farmacopeia (2010);
- Aparelho de desintegração acoplado ao motor J. Engelsman modelo JEL – 70, de acordo com a Farmacopéia (2010);
- Destilador de água modelo 2008, Labortechnik (Central de águas/FAR/UFRGS);
- Durômetro Schleuninger 2E;
- Granulador oscilatório Erweka do tipo FG acoplado a motor Erweka AR 400.
- Máquina de comprimir alternativa Korsch EK0 com punções simples circulares, planos, facetados de 12 mm;

- Misturador sigma (malaxador) Erweka KM 5 acoplado a motor Erweka AR 400;
- Misturador tipo cúbico Erweka KB5 acoplado a motor Erweka AR 400;
- Misturador tipo Y com capacidade de 2 L acoplado a motor Erweka AR 400;
- Moinho granulador de rolos sulcados TG Erweka, acoplado a motor Erweka AR 400;
- Purificador de água Milli-Q Plus Millipore (Central de águas/FFAR/UFRGS);
- Volúmetro de compactação J. Engelsmann (EUROPEAN, 1997).
- Estufa de ar circulante Lawes 30 B/CLP

5.2.1 Obtenção de granulados de extrato seco por aspersão

Os granulados contendo o PSA foram obtidos por via seca, a partir da produção dos briquetes, devido à possibilidade de degradação dos constituintes ativos bem como a formação de massa pegajosa quando umidificada, o que inviabilizaria a granulação por via úmida.

Para a produção de briquetes contendo PSA se utilizou a formulação que obteve as melhores características tecnológicas de acordo com Petrovick (2006), acrescida do desintegrante amidoglicolato de sódio conforme Bica (2009).

A formulação ponderal foi constituída de PSA (70%), celulose microcristalina tipo 102 (26,5%) como material de enchimento/aglutinante seco, mistura de dióxido de silício coloidal (2%) e estearato de magnésio (0,5%) como sistema lubrificante e amidoglicolato de sódio (1%), como desintegrante. O PSA, a celulose microcristalina e o amidoglicolato de sódio foram misturados, após passagem em tamis de 106 µm, durante 15 min em misturador tipo Y a 36 rpm. Posteriormente, adicionou-se a mistura lubrificante, continuando-se a mistura por mais 5 min.

Os compactos foram obtidos por compressão direta em máquina de comprimir alternativa, equipada com alimentador e dotada de punções simples, circulares, facetados de 12 mm de diâmetro. Procurou-se obter compactos de cerca de 700 mg, com espessura de 3 mm e com dureza superior a 50 N.

5.2.1.1 Caracterização dos compactos

Mesmo não sendo o produto final, os briquetes obtidos foram caracterizados quanto ao peso médio, dureza, densidade aparente e espessura, uma vez que estes resultados, devido à similaridade em relação à produção de comprimidos, podem ser preditivos das características compressoriais do complexo farmacêutico (CF) e especificam sua qualidade processual.

Determinação da aparência e das dimensões (USP, 2011)

Avaliaram-se aspectos visuais, tais como homogeneidade de coloração e textura da superfície. Com auxílio de paquímetro digital se mensurou a espessura e o diâmetro de 20 compactos.

Determinação do peso médio (FARMACOPEIA, 2010) e densidade aparente (Ritschel e Bauer-Brandl, 2002)

Realizou-se a pesagem individual, em balança analítica de 20 compactos do PSA. A densidade aparente (ρ_{ap}) foi calculada se utilizando a equação 1.

$$\rho_{ap} = \frac{m}{\pi \cdot r^2 \cdot h} \text{ (eq. 1)}$$

Onde, m = peso médio dos compactos (mg); r = raio (cm) da superfície e h = espessura (cm) do compacto.

Determinação da dureza (FARMACOPEIA, 2010)

Mediu-se a resistência ao esmagamento radial de 20 compactos com auxílio de durômetro.

5.2.1.2 Granulação dos compactos de PSA

A granulação dos compactos de PSA (GRPSA) foi realizada em moinho granulador de rolos sulcados. A seguir foram tamisados em malha de 0,85 mm, sendo que a porção que ficou retida foi novamente cominuída em granulador oscilatório até a passagem de todo o produto pela malha de 0,85. A seleção foi realizada com auxílio de tamises de abertura de malha 0,250; 0,425; 0,500; 0,600; 0,710 e 0,850 mm em aparelho de tamisação vibratório durante 15 min. A faixa granulométrica de 0,25 a 0,85 mm foi a selecionada. Para o cálculo do rendimento foi considerado o percentual de granulados dentro da faixa estipulada de 0,85 a 0,25 mm, em relação à massa inicial de briquetes.

5.2.1.3 Caracterização do GRPSA

Análise granulométrica

a) Determinação granulométrica por tamisação (FARMACOPEIA, 2010)

Cerca de 50 g do granulado foram submetidos à passagem por tamises com abertura de malha de 0,250; 0,425; 0,500; 0,600; 0,710; 0,850 mm, em tamisador vibracional. A análise foi realizada com três repetições.

b) A avaliação das densidades bruta e compactada, fator de Hausner (FH), índice de compressibilidade (IC) e índice de densificação (ID) (Hausner, 1967; Carr, 1965; Voigt, 2005).

As densidades bruta e compactada foram determinadas utilizando-se 2,0 g de granulado em proveta de 10 mL. Realizaram-se três repetições para cada amostra.

Determinação do conteúdo do marcador solidagenona

O conteúdo solidagenona foi determinado por preparo de amostra e método analítico validado e descritos no capítulo 3.

5.2.2 Obtenção dos granulados de adjuvantes (GRADJ)

A formulação utilizada na granulação por via úmida por desagregação foi constituída de amidoglicolato de sódio (3,6 %, m/m), amido pré-gelatinizado

(19,0 %, m/m) e celulose microcristalina (q.s.), otimizada e selecionada por Bica (2009).

Mistura dos adjuvantes

A produção de lote de 300 g de GRADJ foi realizada utilizando-se misturador cúbico para a mistura dos componentes da formulação, em velocidade de 23 rpm durante 15 min.

Umedecimento

No modo *in situ*, aspergiu-se água, de forma intermitente, sobre a matriz pulveréa contida em misturador em sigma até o ponto de massa. A quantidade de água consumida no processo foi determinada por pesagem.

Granulação da massa úmida

A massa úmida foi submetida à passagem através de tamis com abertura de malha de 1,0 mm, empregando-se força manual e auxílio de espátula plástica flexível. Os granulados obtidos foram depositados sobre papel manteiga e levados à estufa para secagem.

Secagem

Os granulados úmidos foram colocados em estufa de ar circulante à temperatura de 40 °C ± 0,5 °C, durante 16 h.

Calibração granulométrica

Na calibração granulométrica foram selecionadas as partículas com tamanho entre 250 e 850 µm.

5.2.3 Produção do complexo farmacêutico

O CF foi preparado com base nos percentuais ponderais de GPSA como fase interna (71,4 %) e GRADJ como fase externa (28,1 %) conforme otimizado e empregado por De Souza (2004) e Bica (2009). Previamente à mistura das fases interna e externa, ambas tiveram a faixa granulométrica ajustada para tamanho intermediário a 0,250 - 0,850 mm. Esse procedimento visa garantir a

homogeneidade na etapa de mistura. Em seguida, a mistura foi adicionada de estearato de magnésio (0,5 %), como lubrificante antiaderente na fase externa.

A mistura dos granulados foi realizada em misturador cúbico durante 5 min a 36 rpm. Após, adicionou-se o estearato de magnésio e, na mesma velocidade de rotação, a mistura foi mantida por mais 5 min. Devido à diferença de coloração entre os granulados da fase interna e externa foi possível visualizar homogeneidade da mistura.

5.2.3.1 Caracterização do CF

A avaliação das densidades bruta e compactada foi realizada de acordo com GUYOT e col., 1995, modificado, além do fator de Hausner, índice de compressibilidade e índice de densificação (HAUSNER, 1967; CARR, 1965; VOIGT, 2005).

Determinação da perda por dessecação (FARMACOPEIA, 2010)

A determinação da perda por dessecação foi realizada por método gravimétrico com auxílio de estufa de secagem a 105 °C.

Determinação do conteúdo do marcador solidagenona

O conteúdo solidagenona foi determinado por preparo de amostra e método analítico validado e descritos no capítulo 3.

5.3 Produção dos comprimidos

Após testes prévios e fundamentados no trabalho de Bica (2009), decidiram-se os parâmetros de ajuste da máquina. A máquina de comprimir foi ajustada para obtenção de comprimidos com massa de 700 mg (\pm 12,5 mg) e os comprimidos obtidos durante a regulagem do equipamento foram descartados nos ensaios de caracterização.

5.3.1 Caracterização dos comprimidos

Determinação da aparência e das dimensões (USP, 2011)

A aparência foi avaliada, visualmente, quanto à homogeneidade de coloração e textura da superfície. As dimensões foram medidas por meio da mensuração em paquímetro digital da espessura central (h) e, diâmetro (d).

Determinação do peso médio (FARMACOPEIA, 2010)

Realizou-se conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5 ed.

Perda por dessecação (FARMACOPEIA, 2010)

A determinação da perda por dessecação foi realizada por método gravimétrico com auxílio de estufa de secagem a 105 °C. Cada comprimido foi individualmente pesado e transferido para pesa-filtro previamente tarado.

Determinação da dureza (FARMACOPEIA, 2010)

A dureza de 20 comprimidos foi determinada medindo-se a resistência ao esmagamento radial em durômetro.

Uniformidade de conteúdo

Analisaram-se, individualmente, 10 comprimidos em relação ao teor do marcador solidagenona, empregando-se método analítico densitométrico, desenvolvido e validado conforme descrito no capítulo 3. As amostras de comprimidos foram cominuídas em gral com auxílio de pistilo, transferidas analiticamente para béquer no qual, após a adição de 3 mL de metanol, foram mantidas sob agitação por 5 min. Transcorrido o tempo, as amostras foram filtradas, em papel filtro, para balão volumétrico de 5 mL e o volume ajustado com metanol.

5.4. Resultados e discussão

Obtenção de granulados de extrato seco por aspensão e de adjuvantes

A produção dos briquetes foi realizada com parâmetros padronizados em estudos anteriores desenvolvidos no laboratório de tecnologia farmacêutica

UFRGS (Petrovick, 2006; Bica, 2009) e sob condições controladas de temperatura (20 °C) e umidade (44 %). O rendimento resultante do processo foi de 93 %, sendo que as perdas podem ser atribuídas, principalmente, às tentativas de ajuste de posição dos punções. Durante o processo não foi observada aderência do produto os punções ou alimentador. Também não foram observados os eventos de laminação, escurecimento ou percolação.

A caracterização dos briquetes foi realizada com intuito de prever as características dos comprimidos obtidos pela compressão do complexo farmacêutico. Desta forma, por amostragem aleatória determinou-se o peso médio de $719,9 \pm 0,03$ mg (DPR: 4,15 %) para os compactos. A espessura, mensurada em paquímetro digital apresentou valor médio de $3,72 \pm 0,02$ mm (DPR: 0,52 %) e dureza média de 78 ± 6 N (DPR:7,9 %). Os valores obtidos estão de acordo com os descritos nos trabalhos citados e considerados adequados para que esta forma farmacêutica intermediária seja empregada de forma a obter resultados satisfatórios na produção dos granulados.

O processo de granulação teve como objetivo a melhora nas propriedades reológicas e prevenção da segregação de pós durante a mistura, objetivo plenamente atingido se avaliado o teor de marcador na amostragem. As condições e parâmetros utilizados demonstraram os resultados de trabalhos prévios de granulação por via seca de formulações com alto teor de extratos secos vegetais (Couto, 2000; De Souza, 2004; Soares, 2005; Petrovick, 2006; Spaniol, 2007; Bica, 2009).

Após a caracterização, os mesmos foram desagregados em granulador de rolos sulcados e posteriormente em granulador oscilatório respeitando a faixa de tamanho de partículas selecionada de 0,25 a 0,85 mm e conforme padronizado por De Souza (2004) e Spaniol (2007). O rendimento deste processo de calibração granulométrica foi de 72,81 %. As partículas maiores de 0,85 foram reprocessadas e as menores de 0,25 mm foram descartadas.

Neste granulado calibrado, a avaliação da umidade residual evidenciou teor de 4,02 % água. Este valor pode ser considerado adequado à estabilidade química e microbiológica para produtos sólidos com armazenamento não hermético, de acordo com List e Schimidt (1989).

Na tabela 5.1 estão apresentadas as densidades bruta e de compactação do produto seco por aspensão e do granulado do produto seco.

Observa-se que os valores diferem entre si e demonstram melhora em termos tecnológicos, uma vez que a granulação e adição de adjuvantes tornou as partículas maiores, aumentando a densidade e facilitando o empacotamento.

Tabela 5.1: Resultados da análise densitométrica do PSA e GRPSA.

Parâmetro	PSA Média ± s (DPR%)	GRPSA Média ± s (DPR%)
Densidade bruta (g/mL)	0,3335 ± 0,001 (0,39)	0,472 ± 0,06 (1,24)
Densidade compactada (g/mL)	0,4549 ± 0,007 (1,55)	0,511 ± 0,06 (1,24)
Fator de Hauser	1,36	1,08
Índice de Carr (%)	26,7 ± 1,4	7,32 ± 2,2
Índice de densificação (ml)	4,33 ± 0,12	0,57 ± 0,11

Os índices derivados da análise do comportamento do empacotamento são guias teóricos que avaliam a estabilidade da ocupação volumétrica e podem ser considerados como indicadores indiretos de propriedades de movimentação. Os valores apresentados na tabela 5.2 atestam a adequabilidade dos granulados para a posterior produção de comprimidos, sendo que os valores observados são inferiores aos descritos na literatura (< 1,25 para FH e < 15% para IC) e considerados indicativos de boas características reológicas (Vila jato, 2001; Wells, 2005).

Visualmente, possibilitado pela diferença de cor entre o PSA e adjuvantes, não se observou o fenômeno de percolação. Entretanto, esse parâmetro foi avaliado experimentalmente pelo doseamento do teor de marcador em três amostras da mistura de pós e três amostragens do granulado. Além de auxiliar no acompanhamento dos parâmetros tecnológicos, a determinação das características químicas durante o processo é fundamental quando se objetiva o produto acabado devido à relação com as resposta terapêutica e toxicológica almejadas. Assim, tanto a mistura de pós quanto o granulado seco foram avaliados em relação ao teor de marcador. Na figura 5.2

está demonstrado que não houve alteração do perfil químico após a granulação.

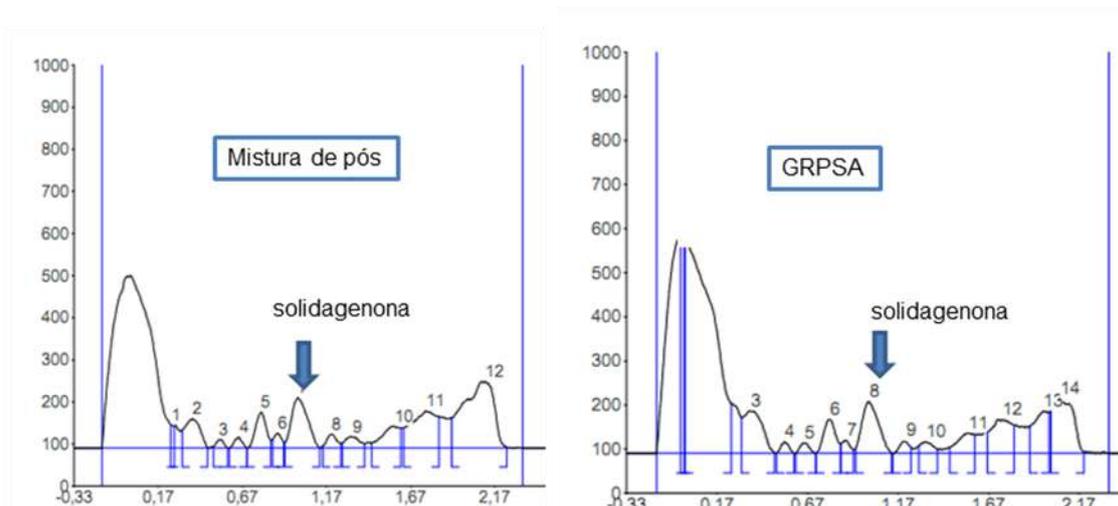


Figura 5.2: Densitograma obtido pela análise da mistura de pós e do granulado do produto seco por aspensão (GRPSA) em 254 nm.

Os teores médio de solidagenona \pm DPR de $1,1 \pm 4,8$ e $1,24 \pm 4,33$ mg/g para a mistura de pós e granulado dos compactos, respectivamente, corroboram com a homogeneidade da mistura observada visualmente inicialmente pela coloração, o que caracteriza ausência de percolação. A análise química também permite inferir que há estabilidade da formulação frente ao processo pela manutenção quali e quantitativa dos teores do marcador, além da observação da ausência de formação de pico adicional em 254 nm. A diferença entre os teores é desprezível se levados em conta os desvios da média.

Produção do CF e dos comprimidos

O CF, obtido pela mistura de do GRADJ e GRPSA adicionados de estearato de magnésio foi caracterizado quanto às suas densidades, conforme apresentado na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Resultados da análise densitométrica do CF.

Parâmetro	Complexo farmacêutico Média ± s
Densidade bruta (g/mL)	0,423 ± 0,02
Densidade compactada (g/mL)	0,501 ± 0,03
Fator de Hauser	1,18
Índice de Carr (%)	7 ± 1,8
Índice de densificação (ml)	0,8 ± 0,26

Os valores de densidades e índices preditivos de propriedades de movimentação mantiveram-se adequados para o CF quando comparados aos obtidos para o GRPSA, o que viabilizou a posterior produção dos comprimidos.

Os comprimidos foram obtidos em máquina alternativa, com os mesmos parâmetros e punções utilizados para a produção dos briquetes. O rendimento de processo foi de 90 % tendo em vista a quantidade de CF produzida e a massa de comprimidos total e os resultado de caracterização estão representados na Tabela 5.3.

A perda por dessecação realizada individualmente com os comprimidos demonstrou presença de 4,02 ± 0,1 % de materiais voláteis. Esse valor está dentro das especificações recomendadas para formas sólidas.

Tabela 5.3: Avaliação do peso médio, densidade aparente, espessura, dureza e perda por dessecação dos comprimidos.

Parâmetro	Comprimidos Média ± s (DPR)
Peso médio (mg)	699,4 ± 12,02 (1,77)
Densidade de aparente (g/cm ³)	1,06 ± 0,4
Espessura (mm)	5,42 ± 0,31
Dureza (N)	90,22 ± 2,5
Perda por dessecação	4,02 ± 0,1

O coeficiente porcentual do peso médio observado, inferior a 2 % e a diferença menor do que 1 % do peso médio planejado (700 mg) além de atenderem as especificações farmacopeicas, corroboram com os valores indicativos do comportamento de fluxo do CF empregado.

A uniformidade de conteúdo foi realizada por doseamento do marcador solidagenona nos comprimidos. Por meio desta determinação é possível verificar a homogeneidade das misturas além da estabilidade do produto durante o processo de compressão. Desta forma, o valor obtido para os comprimidos de $0,88 \pm 0,29$ mg/g pode ser comparado aos valores de $1,1 \pm 4,8$ e $1,24 \pm 4,33$ mg/g para a mistura de pós e GRPSA quando considerado que cada comprimido possui 71,92 % de GRPSA. Esses valores, analisados em conjunto, sugerem estabilidade do marcador ao processo bem como uniformidade de distribuição do marcador.

Na caracterização de comprimidos, o ensaio de cedência tem grande importância por informar do tempo necessário para que haja a liberação dos marcadores e se os adjuvantes de formulação estão adequados, ou seja, não interferem expressivamente neste parâmetro. Nesta etapa do trabalho não foi possível finalizar este ensaio devido à necessidade de otimizar e validar método analítico mais sensível do que a densitometria.

5.5 Conclusões

Com os resultados obtidos é possível confirmar a viabilidade de produção de comprimidos de *Solidago chilensis* a partir de granulados de extrato seco por aspersão e granulado co-processado de adjuvantes, uma vez os resultados obtidos para as propriedades mecânicas e uniformidade de conteúdo foram totalmente satisfatórios frente às exigências farmacopeicas.

5.6 Referências

Auton, M.E. Secagem. in: Delineamento de formas farmacêuticas. 2.Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap.26, p.384-401.

Bica, V. **Avaliação do comportamento de compressão de dois extratos secos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (marcela)**. 2009. 293p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

Carr Jr, R.L. Evaluating flow properties of solids. Chemical engineering, v.2, n.2, p.163-168, 1965.

Couto, A. G. **Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado contendo produto seco nebulizado de *Phyllanthus niruri* L. – Euphorbiaceae (quebra-pedra)**. 2000. 179p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

Carvalho, A.C.B.; Balbino, E.E.; Maciel A.; Perfeito, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.314-319, 2008.

De Souza, T.P. 2004. **Desenvolvimento tecnológico e otimização de formas farmacêuticas sólidas contendo alto teor de produto seco por aspensão de *Phyllanthus niruri* L (Euphorbiacea)**. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2004.

FARMACOPEIA AMERICANA. **The United States Pharmacopoeia**. 32 ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, Easton: Mack. 2009. CD-ROM.

FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010), 5ª Ed., Atheneu, São Paulo.

FARMACOPEIA BRITÂNICA. British Pharmacopoeia Commission Secretariat. **British Pharmacopoeia 2011**. Volume IV. Herbal Drugs. London, The Stationary Office, 2011.

Hausner, H.H. Frictions conditions in a mass of metal powder. *International Journal of metallurgic*, v.5, p.7-13, 1967.

Herting, M.G.; Kleinebudde, P. Studies on the reduction of tensile strength of tablets after roll compaction/dry granulation. *European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics*, v.70, p.372-379, 2008.

Petrovick, G.F. Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado revestido contendo produto seco por spray dring de *Achyrocline satureioides* (Lam. DC.) Asteraceae (marcela). 2006. 188p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

Prista, L.N.; Alves, A.C.; Morgado, R. *Tecnologia farmacêutica*. 6 ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2003.

Soares, L. A. L. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek - Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final**. 2002. 279 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

Ritschel, W.A.; Bauer-Brandl, A. *Die tablet: handbuch der Entwicklung herstellung and qualitätssicherung*. 2. Aufl. Aulendorf: ECV, 2002.

Soares, L.A.L.; Gonzalez Ortega, G.; Petrovick, P.R.; Schimidt, P.C. Dry granulation and compression of spray-dried plant extract. **AAPS Pharm Scitech**, v.6(3), p. 358-466, 2005.

SONAGLIO, D.; GEORGE, G.O.; PETROVICK, P.R. BASSANI, V.L. Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos. In: SIMÕES,

C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; Petrovick, P.R. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5 ed. rev. ampl. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2003, cap. 13, p. 289-326.

Spaniol, B. Comparação do comportamento compressional de granulado contendo produto seco por aspensão de *Phyllanthus niruri* L. entre máquinas de comprimir alternativa e rotativa. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

Vila Jato, J.T. (Ed.) *Tecnologia Farmacêutica*. Madrid: Sintesis, 2001.

Voigt, R. *Pharmazeutische Technologie für stadium und beruf*, 10, vollst. überab.Aufl., Stuttgart:Deutscher apotheker, 2005.

A espécie *Solidago chilensis*, foi selecionada como tema central do trabalho desenvolvido e apresentado nesta tese, após revisão bibliográfica detalhada e indicativa de potencial uso terapêutico bem como a necessidade de aprofundamento em estudos químicos, farmacológicos e de viabilidade tecnológica de produção de produto acabado. Desta forma, o presente trabalho delineou-se para agregar conhecimentos à utilização da espécie e fornecer, desta forma, mais subsídios científicos para as políticas públicas de saúde avaliarem a continuidade ou não desta espécie integrante da RENISUS na cadeia produtiva de fitoterápicos.

A revisão sistemática, apresentada no capítulo 1, evidencia a distribuição global do gênero (Quadro 1.1), porém com maior número de exemplares distribuídos em solo norte-americano e europeu. No Brasil é relatada ocorrência somente da espécie tema deste trabalho, o que pode ser uma vantagem se considerada a possibilidade de substituições intragênero, comuns na comercialização de plantas medicinais e derivados.

A grande semelhança fenotípica, em especial na época de floração, é responsável pela caracterização genérica de “*Goldenrod*” (vara-de-ouro) (Centeno, 2003; Russo et al., 2008) atribuída aos exemplares do gênero. Essa difícil distinção entre as espécies em floração, especialmente em países de maior ocorrência natural, também tem implicações no uso popular. Essa confusão é praticamente impossível de ser evitada sem a realização de trabalho especializado, pois o farmacógeno são as partes aéreas floridas e o ciclo de vida do vegetal é sazonal e o caule subterrâneo. Em época de reprodução vegetal, ocorre o brotamento dos ramos e, quando completado o ciclo, a parte aérea seca e desaparece.

A indistinção entre algumas espécies não se restringe ao conhecimento popular, pois o uso terapêutico específico dos exemplares europeus e norte-americanos também não é consensual em literaturas científicas. Essa afirmação é suportada ao serem avaliadas as espécies com maior número de informações científicas: *Solidago virgaurea* L. (nativa da Europa e Ásia), *Solidago gigantea* L., *Solidago odora* Aint e *Solidago canadensis* L. (nativas da América do Norte) e que têm uso descrito em importantes órgãos europeus como a ESCOP e Comissão E (Centeno, 2003; Melzing, 2004; Choi et al., 2005; Russo et al., 2008).

O fato de a Comissão E considerar que as espécies e híbridos são terapeuticamente intercambiáveis pela presença dos mesmos grupos químicos (saponinas, flavonoides, terpenos) originou a apresentação comercial da droga vegetal como uma mistura de espécies: *Solidaginis herba* = *Goldenrod herba* (mistura de *S. canadensis*, *S. gigantea* e híbridos ou mistura das espécies). No entanto, talvez por ver com mais cautela essa indistinção, a ESCOP viabilizou também outra forma comercial da droga: a *Solidaginis virgaurea herba* = *European goldenrod herba* (*S. virgaurea*) (Blumenthal, 2000; Centeno, 2003).

Se analisada a composição química (Quadros 1.2; 1.3 e 1.4) é clara a distinção química entre as espécies, apesar dos constituintes pertencerem basicamente ao grupo das saponinas, fenólicos e terpenos. Somado a isso, tanto a *S. virgaurea*, a *S. canadensis* bem como a mistura de *S. canadensis* e *S. gigantea*, possuem critérios químicos de diferenciação definidos por monografias farmacopeicas (Farmacopeia Britânica, 2009 e 2011).

A presença de saponinas, por exemplo, é comum as duas espécies, no entanto, para a *S. virgaurea* é preconizado o conteúdo de 2 a 6 % de saponinas triterpênicas, sendo que mais de 30 % são derivadas do ácido poligalo bidesmosídico e virgaureageninas. Já para a *Solidago canadensis*, o conteúdo de saponinas é de cerca de 9 a 12 % e estas são, predominantemente, glicosídeos derivados da baiogenina (núcleo triterpênico derivado do ácido oleanóico) (Blumenthal, 2000). Da mesma forma, enquanto o conteúdo de flavonoides totais para *S. virgaurea* é cerca de 1,5 %, na monografia farmacopeica de *Solidaginis Herba* é preconizado o mínimo de 2,5 %. Em relação à constituição, a diferença mais marcante está na presença dos heterosídeos fenólicos bidesmosídicos leiocarposídeo (0,01-0,14 %) e virgaureosídeo A (0,08-0,48 %) relatadas somente para a *S. virgaurea*. Àquele está relacionado à atividade diurética da espécie (Bader et al., 1992; Blumenthal, 2000; Centeno, 2003). Portanto, tais evidências expostas devem ser levadas em consideração especialmente por que grande parte dos estudos químicos e farmacológicos são mais recentes do que as últimas edições da ESCOP e Comissão E.

O uso recomendado, tanto pela Comissão E quanto pela ESCOP, remete à preparação de infusões (3-4 g/150 mL) para tratar casos de inflamação e infecção no trato urinário, litíase e como agente diurético. Esses

usos são respaldados por ensaios *in vivo* e clínicos (Racz-Kotilla et al., 1978; Metzner et al., 1984; Pfannkuch et al., 2002; Bauer et al., 2003; ESCOP, 2003; Borchert, 2004), descritos detalhadamente no item 1.1.5.

A *Solidago chilensis* é considerada a equivante sul-americana dessas espécies comercializadas na Europa (Russo et al., 2008), especialmente nas indicações de uso popular para o tratamento de distúrbios no trato urinário e processos inflamatórios, sendo utilizada também em substituição à *Arnica montana* (Goulart et al., 2007).

Diversos estudos têm evidenciado a atividade anti-inflamatória das partes aéreas de *Solidago chilensis*, na forma de extratos obtidos com diversos solventes, tanto na resposta aguda quanto crônica da inflamação, em que a sua atividade está relacionada à inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios e redução da infiltração de leucócitos. Na resposta à inflamação crônica, destaca-se o ensaio clínico realizado com soluções extrativas etanólicas de partes aéreas da espécie para tratamento da lombalgia. A composição química conhecida para *Solidago chilensis* contempla, basicamente, três classes químicas: terpenos (mono, sesqui, di e triterpenos), flavonoides e ácidos fenólicos. Dentre os diversos constituintes descritos, destaca-se a presença de solidagenona (diterpeno labdano) em raízes, folhas e inflorescências.

No entanto, não há relatos na literatura sobre a qualificação de produtos tecnológicos, o que constitui uma importante limitação para a produção de medicamento fitoterápico. Neste contexto, na primeira etapa do trabalho buscou-se o estabelecimento dos padrões físico-químicos e químicos da espécie.

Os ensaios físico-químicos, como a determinação de cinzas totais, por exemplo, apesar de serem inespecíficos, são de fundamental importância como informação complementar para o controle de qualidade detectar adulterações inorgânicas. Para *Solidago chilensis*, o teor médio de cinzas totais (média \pm dp) foi de $6,57 \pm 0,12\%$ e, apesar de não haver dados na literatura para a espécie, quando esse valor é comparado ao limite de 7% estabelecido pela Farmacopeia Britânica (2011) para espécies do gênero, podemos inferir que está adequado ao limite oficial e que o pode ser utilizado como parâmetro para a espécie. O mesmo raciocínio pode ser transposto à perda por dessecação

que apresentou teor médio de $9,77 \pm 0,39\%$, valor este abaixo do limite de 10 % estabelecido como adequado à conservação da droga vegetal.

Em relação aos procedimentos analíticos específicos, é de fundamental importância a determinação da faixa de fragmentação mais adequada para o esgotamento da droga durante o ensaio. Desta forma, procedeu-se a seleção da faixa granulométrica mais adequada por meio da determinação do teor de extraíveis bem como pela quantificação do total de flavonoides presentes nesse resíduo. Levando-se em consideração o teor de flavonoides, rendimento de extração e viabilidade tecnológica para posterior continuidade do trabalho, o tamis de abertura 250 μm foi selecionado.

A avaliação química qualitativa realizada em diversas amostras provenientes de diversos pontos de coleta (Tabela 2.2) e nos anos de 2011, 2012, 2013 e 2014 evidenciou que a composição química característica é constante. Esse dado é extremamente relevante quando se planeja a utilização terapêutica de um produto, já que a composição química está relacionada com a eficácia e segurança deste.

Em relação aos constituintes majoritários, foi identificada, nas inflorescências, a presença dos ácidos 3,4-O-dicafeoilquínico e 4,5-O-dicafeoilquínico, além de rutina e quercetrina empregando-se técnica de UPLC-PDA-MS/MS. Bradette-Hébert e colaboradores (2008) identificaram esses dois ácidos cafeilquínicos nas inflorescências de *S. canadensis* e Tamura e colaboradores (2010) verificaram a presença de rutina nas inflorescências frescas de *S. chilensis*. Esses dados, avaliados em conjunto, demonstram que há correlação química entre *S. canadensis* e *S. chilensis*, porém não há equivalência entre essas duas espécies, uma vez que a *S. canadensis* não contém quercetrina, de acordo com a Farmacopeia Britânica (2006). O mesmo ocorre com *S. virgaurea*, que de acordo com este compêndio contém quercetrina e ácido clorogênico (ausente em *S. chilensis*). Os mesmos ácidos cafeoilquínicos identificados nas inflorescências em *S. chilensis* foram relatados para as partes aéreas *S. virgaurea* por Apati e colaboradores (2002) e Choi e colaboradores (2004). Desta forma, não foi observada a equivalência intragênero nas amostras analisadas e dados da literatura.

Esses metabólitos têm sido relacionados com algumas atividades farmacológicas da espécie, em especial com a ação anti-inflamatória relatada

por diversos autores e ensaiada em diversos modelos *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* (Goulart et al., 2007 ; Liz et al., 2008 ; Tamura et al., 2009; Melo et al. 2011) e em ensaio clínico duplo-cego placebo-controlado (Da Silva et al., 2010). Desta forma, julgou-se adequado realizar a avaliação quantitativa desses metabólitos na droga vegetal, além da avaliação qualitativa que teve a finalidade de caracterização da espécie e comparação com outras consideradas equivalentes (Russo, 2008),

A quantificação individual de flavonoides glicosilados em material vegetal, de forma geral, é uma alternativa viável, porém deve-se considerar a disponibilidade comercial da substância de referência, custo e representatividade que a análise possui quando pensa-se em efeito terapêutico relacionado dado o conhecimento científico disponível. Sempre que possível, deve ser avaliado se o composto quantificado é o responsável ou tem relação com a atividade biológica. Entretanto, no caso dos flavonoides, essa avaliação torna-se difícil pelo grande número de glicosídeos derivados de agliconas como quercetina, canferol e luteína, por exemplo. Além disso, dificilmente é possível associar o efeito terapêutico a um componente do extrato, seja pela complexidade química e/ou pelo desconhecimento da farmacocinética dos mesmos.

Desta forma, optou-se pela determinação do conteúdo de flavonoides totais como ferramenta analítica para qualificação da droga vegetal. Devido a observação de degradação da aglicona quando a amostra foi submetida ao método farmacopeico descrito para as espécies europeias, foi realizada a otimização das condições de hidrólise por planejamento fatorial 3^2 para as variáveis tempo e concentração de ácido, consideradas as que possuem maior influência sobre o resultado final (Francescato et al., 2013). Em complementaridade, o método de quantificação por CLAE foi validado de acordo com a normas da ANVISA (2003) e ICH (2005).

A técnica desenvolvida para a proposta foi bastante satisfatória, considerando-se que o resultado médio obtido de $8,03 \pm 1,6$ g% (gramas de quercetina/100 gramas de droga seca) foi 154 % maior do que os valores observados quando realizada a quantificação por hidrólise clássica de acordo com o método farmacopeico descrito para *Solidaginis herba*. A determinação espectrofotométrica do teor, expressos em hiperosídeo, demonstrou valores de

3,15 ± 0,06 % para *S. chilensis*. Esse valor é condizente com o encontrado para a *Solidaginis herba*: 3,79 ± 0,2 % para a amostra comercial portuguesa e 2,64 ± 0,07 % para a amostra alemã. Ambas as amostras estão de acordo com o teor mínimo aceito, que é de 2,5% (FB, 2011). Considerando-se que um método analítico ideal deve esgotar a droga vegetal sem provocar a degradação de analito, o método proposto mostra-se ideal para a determinação de flavonoides totais nas inflorescências de *S. chilensis*.

Dentre os testes de caracterização química da droga vegetal, avaliação da presença, teor e constituição química de óleos voláteis se faz importante devido as relevantes ações farmacológicas relacionadas a essa classe química. O gênero *Solidago* possui relato de presença de óleos voláteis bem como de atividades antimicrobianas associadas (Morel et al., 2006).

Das inflorescências e folhas de *S. chilensis* foram extraídos óleos voláteis em teores de 0,3 e 0,8%, respectivamente. A composição química mostrou-se variável apesar de predominantemente constituída por sesquiterpenos em ambos os produtos. Dentre as diferenças químicas, a mais notável está relacionada a presença do limoneno no óleo obtido das inflorescências (30,31%) e ausência no óleo obtido das folhas. O espatulenol também teve notória diferença percentual (26,9 e 2,37% para folhas e inflorescências, respectivamente).

A ação de terpenóides sobre fungos é conhecida para alguns derivados. Desta forma buscou-se avaliar se os dois óleos de *S. chilensis* poderiam apresentar efeito biológico sobre fungos emergentes que têm se apresentado como problema pela elevada resistências aos antibióticos existentes. Desta forma, após a realização de *screening* com diversas cepas de fungos oportunistas e dermatófitos, foram selecionados os resultados mais promissores avaliando-se também a necessidade de novos produtos ativos contra leveduras multirresistentes. Assim, procedeu-se com a determinação da CIM e CFM para as leveduras *Candida krusei* e *Candida papansilosis*. As MIC e MFC permaneceram na faixa de valores de 1,95 a 62,5 µg mL⁻¹ para os dois óleos.

A principal diferença entre a composição dos óleos é a ausência do limoneno no óleo das folhas. Apesar da atividade não ter sido expressivamente diferente entre as amostras, o limoneno foi testado isoladamente e não

apresentou ação antifúngica sobre essas cepas. Esse resultado sugere que a atividade não esteja relacionada a este composto e/ou que seja atribuída ao conjunto de terpenos, o que caracteriza o óleo como um potencial agente antifúngico.

Além da atividade, um composto para ser promissor deve apresentar baixa toxicidade e, desta forma, foram realizados ensaios de citotoxicidade em células humanas. Nestes, além da lise da membrana, foi avaliado se houve dano ao DNA por meio do ensaio cometa. Os resultados demonstraram que na dose de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ não há efeito tóxico observado.

Ainda dentro do objetivo de obtenção de produtos ativos, com qualidade e segurança assegurados pelo controle de qualidade e qualificação química, após a caracterização da droga vegetal, a continuidade do trabalho envolveu a obtenção de extrato seco. Essa escolha foi realizada devido às diversas vantagens que esse tipo de intermediário possui em relação às formas líquidas e também pela tendência da indústria moderna de fitoterápicos estar voltada para a produção de cápsulas e formas farmacêuticas sólidas a partir de extratos secos padronizados, obtidos por aspersão (Arawwawala et al., 2014).

A seleção do método e solvente de extração buscou a obtenção de um produto rico em compostos fenólicos e diterpenos, tendo em vista que esses dois grupos químicos têm sido relacionados às atividades da espécie. Porém, ao mesmo tempo em que a extração direcionada a fim de se obter um produto tecnologicamente desenvolvido pode ser inovadora e promissora, as dificuldades analíticas e tecnológicas encontradas tornaram-se inerentes ao processo. O extrato obtido apresentou-se com consistência pegajosa e parcialmente insolúvel em solventes orgânicos.

Essa dificuldade pode ser contornada adicionando-se Tween 80 durante o processo de eliminação do solvente de extração. Com isso, o resíduo tornou-se solúvel em água, o que possibilitou a continuidade nas etapas necessárias até a secagem por aspersão. O produto seco foi obtido com bons rendimentos de processo e baixa umidade residual.

A subsequente qualificação quali e quantitativa visou viabilizar os estudos de forma a tornar possível a reprodutibilidade dos estudos farmacológicos relacionados à eficácia e segurança, uma vez que estes podem

ser comprometidos pela variabilidade química característica do metabolismo vegetal (Shi et al., 2014).

A seleção dos marcadores químicos: flavonoides totais e solidagenona levou em consideração o preceito estabelecido pela ANVISA de correlação com o efeito terapêutico. Entretanto, este composto não está disponível para aquisição, o que gerou a necessidade de isolamento e purificação. A substância foi solada por meio de técnicas clássicas de cromatografia líquida a vácuo em coluna. A recristalização tornou possível a obtenção de cristais em forma de agulhas e purificados com bons rendimentos totais (cerca de 6 %).

Em relação à qualificação qualitativa, por UPLC-DAD foi evidenciado a presença dos mesmos componentes descritos para droga vegetal, desta forma julgou-se adequado à quantificação dos flavonoides totais por CLAE no sistema otimizado para a droga vegetal. Ao final do procedimento de quantificação da aglicona quercetina, concluiu-se que o extrato possui teor médio de 82,73 mg/g deste flavonoide.

A qualificação em teor de solidagenona foi extensivamente testada por sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência, porém, suas características químicas e dos demais componentes do extrato inviabilizaram a análise por técnica de fase reversa. A alternativa pela cromatografia a gás também foi avaliada sem sucesso devido a difícil separação dos flavonoides pouco glicosilados (quercetrina) da solidagenona em sistema de SPE. Assim, uma alternativa bastante confiável e que tem sido cada vez mais empregada para a análise de produtos polares é a quantificação por HPTLC-densitometria.

Neste sistema, é possível fazer a eluição dos componentes de média e alta polaridade selecionando-se a fase móvel mais adequada. Os flavonoides, nesse caso, ficam retidos no ponto de aplicação de amostra. O método foi validado de acordo com os parâmetros e limites estabelecidos pela ANVISA 2003. Desta forma, obtiveram-se valores de aproximadamente 9 mg/g de solidagenona no extrato seco.

Na continuidade dos estudos, a atividade gastroprotetora desse extrato padronizado foi avaliada *in vivo*. A seleção deste ensaio está relacionada com os relatos de uso popular bem como com os experimentos realizados por Buccirelli e colaboradores (2009) com o infuso e por Schmeda-Hirschmann e colaboradores (2002) com a solidagenona. Associado a isso, extratos

etanólicos e aquosos obtidos das inflorescências e folhas desta espécie demonstraram ação anti-inflamatória importante *in vivo* e esta foi relacionada à presença de flavonoides e ácidos fenólicos.

Desta forma, com vistas ao potencial de ação multialvo, propôs-se a avaliação do potencial efeito gastroprotetor do referido extrato seco padronizado visando uma potencial nova estratégia terapêutica para a gastrite.

O PSA apresentou um índice de gastroproteção, nas doses de 50, 125 e 250 mg/kg respectivamente, de $85 \pm 15\%$, $77 \pm 3\%$; $83 \pm 9\%$; $64 \pm 16\%$ quando utilizado etanol como agente lesivo e de $63 \pm 23\%$ e $79 \pm 12\%$ quando utilizada a indometacina. A solidagenona testada na dose de 30 mg/kg, apresentou índices de gastroproteção próximos aos dos padrões positivos ranitidina e carbenoloxona em doses de 100 e 200 mg/kg, respectivamente. Considerando que o extrato padronizado possui 9 mg/g e que na dose de 50 mg/kg haveria menos de 1 mg deste diterpeno e que os índices percentuais de gastroproteção observados nesta dose de extrato foi cerca de 85% e para a solidagenona a 30 mg/kg foi de 86%, pode-se inferir que a escolha dos dois marcadores está adequada em termo de resposta farmacológica.

Assim, os resultados farmacológicos obtidos para o extrato e compostos isolados ensaiados nos modelos propostos, demonstram a potencial atividade gastroprotetora de *S. chilensis*. Abrem perspectivas para a investigação de mecanismo de ação bem como a realização de ensaios em modelos crônicos que são de fundamental importância para a obtenção de conclusões mais consistentes.

Por fim, o estudo da viabilidade de obtenção de comprimidos a partir de extrato seco foi realizado fazendo uso de informações e constatações de trabalhos anteriores desenvolvidos no laboratório de Tecnologia Farmacêutica. Optou-se pelo modelo mais complexo, o de obtenção de comprimidos com elevado teor de GRPSA. O comportamento plástico e muitas vezes elástico dos PSA constitui uma barreira na obtenção de comprimidos com características mecânicas e de liberação adequadas (Bica, 2009).

O lote de comprimidos produzido apresentou características mecânicas adequadas, apesar dos elevados DPR em alguns ensaios. A uniformidade de conteúdo demonstrou que as misturas foram homogêneas e que o processo é

viável. Entretanto, ensaios complementares como o de cedência devem ser realizados para a avaliação mais adequada da formulação.

Os dados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- a revisão bibliográfica indicou que as partes aéreas de *Solidago chilensis*, empregadas com finalidades medicinais, possuem poucos estudos químicos e considerável número de avaliações farmacológicas, porém estas foram realizadas sem a qualificação química o que se torna limitante no planejamento de um produto fitoterápico.
- a caracterização físico-química e química das inflorescências de *S. chilensis* possibilitou o estabelecimento de parâmetros para o controle de qualidade e qualificação da matéria-prima vegetal, além de agregar conhecimento químico à espécie;
- o perfil cromatográfico obtido por CCD e UPLC-DAD mostrou-se apropriado para a avaliação qualitativa dos compostos fenólicos presentes, além de possibilitar a diferenciação química entre as espécies mais conhecidas do gênero. Por meio desta informação foi possível observar a constância qualitativa nas análises realizadas em diversos pontos e por 4 anos sequencias;
- a obtenção e caracterização química do óleo volátil, além de auxiliar na caracterização da droga vegetal, evidenciou que a espécie é uma potencial fonte do produto ativo contra leveduras emergentes e multirresistentes, em concentrações baixas e com ausência de citotoxicidade.
- o processo de hidrólise dos flavonoides heterosídicos presentes nas partes aéreas foi estatisticamente otimizado e, juntamente com o método analítico por CLAE validado, demonstrou melhor adequabilidade do que aquele estabelecido na monografia de espécies do gênero pela Farmacopeia Britânica (2011);
- a aglicona quercetina pode ser empregada como marcador para análises qualitativas e quantitativas da droga vegetal;
- a obtenção de produto seco por nebulização em torre de secagem semi-industrial mostrou-se viável e com elevado rendimento;

- a caracterização química do extrato foi realizada com a utilização de dois marcadores: a solidagenona, analisada por HPTLC-densitometria e flavonoides totais por CLAE-UV. Essa definição quantitativa agrega enorme valor ao produto intermediário.
- o extrato seco e a solidagenona apresentaram atividade gastroprotetora frente a dois modelos de indução de lesão gástrica: etanol e indometacina.
- a atividade gastroprotetora apresentada pela solidagenona também evidencia a correta seleção desta como marcador químico de qualificação do PSA.
- o extrato seco obtido não apresentou características tecnológicas adequadas para a compressão direta ou produção de cápsulas, sendo necessária a utilização de processos de granulação no intuito de viabilizar o processo de compressão.
- a obtenção de comprimidos de 700 mg a partir de misturas de granulados de adjuvantes (GRADJ) e de extrato seco (GRPSA) mostrou-se viável em termos de propriedades físicas e de uniformidade de conteúdo. O parâmetro de cedência será avaliado em trabalho posterior.

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho representam importantes contribuições para três diferentes etapas da cadeia produtiva de fitoterápicos.

1) O estabelecimento de parâmetros e métodos para a caracterização e o controle de qualidade da droga vegetal de *S. chilensis* são a etapa inicial e primordial para produtos com utilização terapêutica.

2) A viabilidade de produção, caracterização e qualificação química de extrato seco representa um grande avanço na área tecnológica, agregando valor e possibilitando a avaliação farmacológica com constância exigida pela legislação doo setor.

3) O estudo da viabilidade tecnológica de obtenção de comprimidos contribuem enormemente para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos a partir de *S. chilensis*. Este pode ser considerado inovador, na medida em que trata da associação de uma matriz complexa, rica em constituintes terpênicos e flavonoides com caracterização quali e quantitativa

conhecidas, e a sua inserção em forma farmacêutica sólida que apresentou viabilidade de produção.

Referências

Arawwawala, L.D.A.M.; Hewageegana, H.G.S.P.; Arambewela, L.R.; Ariyawansa, H.S. Standardization of spray-dried powder of Piper betle hot water extract. **Pharmacognosy Magazine**, v.7(26), p. 157-160, 2011.

Apáti, P.; Szentmihályib, K.; Kristóá, T.; Pappa, I.; Vinklerb, P.; Szokea, É.; Ké, Á.; Herbal remedies of *Solidago*-correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.32 (4-5), p.1045-1053, 2002.

Bader, G.; Wray, V.; Hiller, K. Virgaureasaponin, a 3,28-bisdesmosidic triterpenoid saponin from *Solidago virgaurea*, **Phytochemistry**, v.31(2), p. 621-623, 1992.

Bauer, H.W.; Wiedemann, A. Diuretic, anti-inflammatory, spasmolytic and immune-modulation therapy of golden rod | [Diuretische, antiinflammatorische, spasmolytische und immunmodulatorische therapie mit goldrutenkraut], **Zeitschrift fur Phytotherapie**, v.24 (5), p. 218-221, 2003.

Blumenthal M.; Goldberg A.; Brinckmann J. 2000. **Herbal Medicine, Expanded Commission E Monographs**, Austin, American Botanical Council.

Borchert, V.E.; Czyborra, P.; Fetscher, C.; Goepel, M.; Michel, M.C. Extracts from *Rhois aromatica* and *Solidaginis virgaurea* inhibit rat and human bladder contraction, **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology**, v.369, p. 281-286, 2004.

Bradette-Hébert, ME.; Legault, J.; Lavoie, S.; Pichette, A. A New Labdane Diterpene from the Flowers of *Solidago Canadensis*, **Chemical Pharma Bulletin**, v.56(1), p.82-84, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Ministerial MS/GM nº 971 de 03 de maio de 2006. Publica a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, 04 mai. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da ciência, tecnologia e insumos estratégicos. Departamento de assistência farmacêutica. RENISUS- Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Brasília: Ministério da saúde, 2010. 60 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da ciência, tecnologia e insumos estratégicos. Departamento de assistência farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da saúde, 2006. 60 p.

Bica, V. **Avaliação do comportamento de compressão de dois extratos secos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (marcela)**. 2009. 293p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

Bucciarelli, A.; Minetti, A.; Milczakowskyg, C.; Skliar M. Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Pharmaceutical Biology**, v.48(9), p. 1025-30, 2010.

Carvalho, A.C.B.; Balbino, E.E.; Maciel A.; Perfeito, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.314-319, 2008.

Centeno, L.M.M. Vara de oro (*Solidago virgaurea* L). Aspectos botánicos y terapéuticos. **Revista de Fitoterapia**, v.3(1), p. 35-42.

Choi, S.Z.; Choi, S.U.; Bae, S.Y.; Pyo, S.; Lee, K.R.. Immunobiological activity of a new benzyl benzoate from the aerial parts of *Solidago virgaurea* var. gigantea. **Archives Pharmaceutical Research**. v.28, p. 49-54, 2005.

Francescato, L.N.; Debenedetti, S.L.; Schwanz, T.G.; Bassani, V.L.; Henriques, A.T. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC–ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. **Talanta**, v.105, p.192–203, 2013.

Goulart, S.; Moritz, M.I.G.; , Lang, K.L.; Liz, R.; Schenkel, E.P.; Fröde, T.S.; Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113 (2), p.346-353, 2007.

Liz, R.; Vigil, S.V.; Goulart, S.; Moritz, M.I.; Schenkel, E.P.; Fröde, T.S. The anti-inflammatory modulatory role of *Solidago chilensis* Meyen in the murine model of the air pouch, v.60(4), p. 515-21, 2008.

Khan, I.A., Troy Smillie, T. Implementing a “Quality by Design” Approach to Assure the Safety and Integrity of Botanical Dietary, **Supplements Journal of Natural Products**, v.75(9), p.1665–1673, 2012.

Melo, A.M.; Bittencourt, P.; Nakutis, F.S.; Silva, A.P.; Cursino, J.; Santos, G.A.; Ashino, N.G.; Velloso, L.A.; Torsoni, A.S.; Torsoni, M.A. *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract reduces JNK/I κ B pathway activation and ameliorates insulin resistance in diet-induced obesity mice. **Experimental Biology Medicine** (Maywood), v.236(10), p.1147-55, 2011.

Melzig, M. F. Goldenrod - a classical exponent in the urological phytotherapy. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v.154, p. 523-527, 2004.

Metzner, J.; Hirschelmann, R.; Hiller, K. Antiphlogistic and analgesic effects of leiocarposide - A phenolic bisglucoside from *Solidago virgaurea* L. **Pharmazie**, v.39(12), p. 869-870, 1984.

Morel, A.F., Dias, G.O., Porto, C., Simionatto E., Stuker, C.Z., Dalcol, I.I., 2006. Antimicrobial activity of extractives of *Solidago microglossa*. *Fitoterapia*. 77, 453–455.

Racz-Kotilla, E.; Racz, G. Hypotensive and sedative effect of extracts obtained from *Solidago virgaurea* L. **Planta Medica**, v.33 (3), p. 300, 1978.

Russo, A., Garbarino, J. *Solidago chilensis* Meyen et *Kageneckia oblonga* Ruiz & Pav.: petite revue de leur profil antioxydant. **Phytothérapie**, v.6, p.333–341, 2008.

Samy, R.P.; Gopalakrishnakone, P. Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.7, n.3, p. 283-294, 2010.

Schmeda-Hirschmann, G.; Rodriguez, J.; Astudillo, L. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.8, p. 111-115, 2002.

Shi, Z.-Q.; Song, De-F.; Li, Ruo-Qian; Yang, H.; Qi, L.-W.; Xin, Gui-Zhong; Wang, Ding-Qian; Song, Hui-Peng; Chen, J.; Hao, H.; Li, P. Identification of effective combinatorial markers for quality standardization of herbal medicines. **Journal of Chromatography A**, v.1345, p. 78–85, 2014.

Tamura, E.K.; Jimenez, R.S.; Waisman, K.; Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P.; Malpezzi-Marinho, E.A.L.; Marinho, E.A.V.; Farsky, S.H.P. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.478-485, 2009.

Teles, A.M.; Borges, R.A.X. 2010. *Solidago* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB005502>).