

Desenvolvimento tecnológico de extratos padronizados, a partir de *Chenopodium ambrosioides* L. (Amaranthaceae), e estudos de toxicidade

Thaís M. S. Ferreira^{1*}(PG), Júlia A. dos Santos²(IC), Leandra A. Modesto²(IC), Ludimilla S. Souza²(IC), Maria Patrícia V. dos Santos²(IC), Ana Luisa Trautenmuller²(PQ), Marielly Carvalho¹(PG), Vanessa C. S. Amaral¹(PQ), Plínio L. F. Naves¹ (PQ), Joelma A. M. de Paula¹ (PQ)

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (Mestrado), UEG, Anápolis, GO

²Curso de Graduação em Farmácia, Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, UEG, Anápolis, GO

*thaispharma@yahoo.com

Resumo: *Chenopodium ambrosioides* L. (Amaranthaceae), conhecida como erva-de-santa-maria, apresenta inúmeras propriedades medicinais como antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antioxidante e antitumoral. O objetivo do trabalho foi desenvolver extratos padronizados a partir das partes aéreas de *C. ambrosioides* L. e avaliar sua toxicidade. Para tanto, as partes aéreas dessecadas e pulverizadas de *C. ambrosioides*, coletadas no Estado de Goiás, foram submetidas a estudos farmacognósticos, desenvolvimento e validação de métodos analíticos cromatográficos para a identificação e quantificação de flavonoides, estudos de otimização da extração de flavonoides em pequena escala, produção de extrato seco em *spray dryer* e avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato produzido.

Palavras-chave: Estudo farmacognóstico. Validação analítica. Controle de qualidade. *Spray drying*.

Introdução

Figura 1: *Chenopodium ambrosioides* L.



A espécie vegetal *Chenopodium ambrosioides* L. é popularmente conhecida como erva-de-santa-maria, mastruz, ambrósia entre outros. Planta herbácea presente em regiões de climas tropicais a temperados, pertencente à família Amaranthaceae com propriedades antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antioxidante e antitumoral (BARROS et al., 2013; TRIVELLATO-GRASSI et al., 2013; JESUS et al., 2017).

Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de extratos padronizados, a partir de *C. ambrosioides* e estudos de toxicidade, com o intuito de contribuir para



a disponibilização de matéria-prima que possa ser utilizada pela indústria farmacêutica na produção de fitoterápicos. A pesquisa realizou o estudo farmacognóstico, validação analítica parcial para equipamento de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), otimização de extração assistida por ultrassom (EAU), obtenção de extrato seco por *spray drying* e ensaios de toxicidade do extrato seco em *Artemia salina* e ratas Wistar.

Material e Métodos

Partes aéreas de *C. ambrosioides* foram coletadas, identificadas, secas em estufa de circulação de ar a 40°C, pulverizadas e caracterizadas segundo critérios da Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). O estudo morfoanatômico foi realizado com as folhas e conduzido conforme Kraus e Arduin (1997).

A validação parcial de método analítico por CLAE, para detecção e identificação de flavonoides, foi realizada para os critérios de seletividade e linearidade de acordo com a RDC 166/2017, em CLAE Varian® ProStar. A curva de calibração foi determinada a partir de leituras do padrão rotina entre as concentrações de 31,25 a 1000 µg/ml, em triplicata, em método gradiente de metanol em ácido acético 2%, comprimento de onda 360nm, fluxo 1ml/min e volume de injeção 20µl.

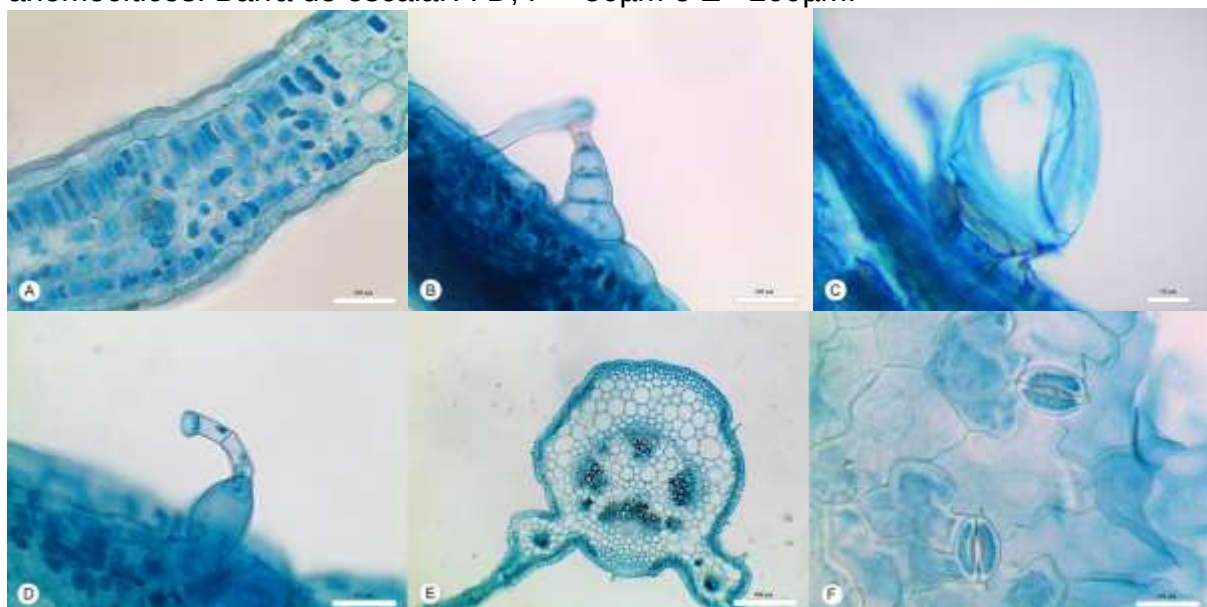
A otimização da EAU dos flavonoides das partes aéreas de *C. ambrosioides* foi realizada com o auxílio de um planejamento fatorial Box Benhken 3³ e da metodologia de superfície de resposta (MSR) para as variáveis: tempo de extração (min), temperatura (°C) e teor alcoólico (% p/p). A concentração de flavonoides foi determinada por método espectrofotométrico (Biospectro – modelo SP 22), conforme Rolim et al. (2005), com adaptações.

O extrato etanólico em maior escala foi obtido por percolação, concentrado e seco em *spray dryer* (LABMAQ® - modelo LM-MSD 1.0), com fluxo co-corrente. O extrato seco foi avaliado quanto a toxicidade *in vitro* para o microcrustáceo *Artemia salina* nas concentrações de 125 a 1000 µg/ml. A toxicidade oral aguda em ratas Wistar foi executada segundo o protocolo internacional da OECD nº423 (2001), após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEG nº 006/2017).

Resultados e Discussão

As secções transversais da lâmina foliar de *C. ambrosioides* evidenciaram epiderme superior e inferior uniestratificadas, parênquima paliçádico dorsiventral (Figura 2A), tricomas tectores (Figura 2B), tricomas glandulares captados (Figura 2C) e não captados (Figura 2D). A nervura central (Figura 2E) preenchida com parênquima fundamental, presença de colênquima nas regiões adjacentes e alas laterais, feixes vasculares colaterais parcialmente fechados. Nas secções paradérmicas verificou-se a presença de estômatos anomocíticos (Figura 2F). Na caracterização do material vegetal obteve-se perda por dessecação de $8,65\% \pm 0,03$, cinzas totais de $11,01\% \pm 0,03$, cinzas insolúveis em ácido clorídrico de $0,54\% \pm 0,03$, granulometria do pó classificada como grosso e $0,2 \text{ ml} \pm 0,26$ de índice de intumescência. Na prospecção fitoquímica foram identificados flavonoides, compostos fenólicos simples, heterosídeos antraquinônicos, taninos, compostos terpênicos.

Figura 2 – *Chenopodium ambrosioides* L. secções transversais da lâmina foliar: A. epidermes superior e inferior, parênquimas paliçádico e lacunoso. B. tricoma não-glandular multisseriado. C. tricoma glandular captato. D. tricoma glandular não-captado. E. nervura central. Corte paradérmico adaxial foliar: F. estômatos anomocíticos. Barra de escala: A-D, F = 50µm e E= 200µm.



REALIZAÇÃO



A seletividade do método analítico por CLAE foi determinada mediante a comparação dos cromatogramas do diluente da solução do padrão rotina (TR=39,448) e do extrato etanólico bruto de *C. ambrosioides* (TR=39,774). Quando avaliada somente a fase móvel não se verificou a interferência de impurezas no tempo de retenção dos cromatogramas analisados. A curva de calibração média para rotina apresentou equação linear representativa $y = 13572x - 113420$ ($N = 6$; $r = 0,9981$ e $r^2 = 0,9998$), homocedástica com valor de C crítico 0,546 inferior ao valor de C 0,616, e coeficiente angular 13572, diferente de zero, portanto o método foi linear. O teor médio de rutina presente no material vegetal constituído pelas partes aéreas de *C.ambrosioides* foi de 0,17 % ($\pm 0,03$).

Nos estudos de otimização, a ANOVA indicou que o modelo foi significativo ($p=0,003303$) e demonstrou o efeito linear do tempo de extração e da temperatura sobre os teores de flavonoides totais. Os teores alcoólicos exerceram pouca influência na extração de flavonoides e houve efeito linear dos parâmetros tempo de extração e temperatura, pois a eficiência máxima de extração ocorreu próxima aos pontos altos destas variáveis, ou seja, acima de 40 minutos e 50°C de temperatura. As condições analisadas pela MSR demonstraram que o tempo de extração em torno de 60 minutos no ultrassom, a uma temperatura em torno de 57°C e teor alcoólico em torno de 57% (m/m) permitem maior eficiência na extração de flavonoides com o rendimento 107,78% do valor previsto.

Os resultados relativos à obtenção do extrato seco de *C. ambrosioides* estão sob sigilo de patente. No ensaio de toxicidade em *Artemia salina*, o extrato seco nas concentrações analisadas não apresentou mortalidade de artemias indicando que a CL_{50} está acima de 1000 $\mu\text{g/ml}$, portanto atóxico. De modo semelhante, no experimento com roedores não foram verificadas mortes em nenhum grupo (controle/teste), de modo que o extrato seco se enquadra na categoria “5”, de baixa toxicidade, conforme OECD 423. Logo, a DL_{50} do extrato está entre 2000 a 5000 mg/kg (OECD, 2001).

Considerações Finais



Quanto à identificação vegetal foram confirmadas características pertinentes à família e à espécie, bem como foram determinados parâmetros relevantes para o controle de qualidade do material vegetal. O método analítico desenvolvido foi seletivo e linear. As condições ótimas da EAU de flavonoides da amostra foram determinadas. O produto intermediário obtido mostrou ter alta qualidade e apresentou baixa toxicidade tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Goiás (UEG) pelo apoio financeiro por meio do edital PrP 029/2016 Pró-projetos/Pesquisa. Ao programa de bolsas *Stricto sensu* e de Iniciação Científica e Tecnológica da UEG. Ao CNPq e à FAPEG pelo apoio financeiro. Ao Horto Medicinal do Jardim Botânico de Goiânia pelo fornecimento das mudas. Ao LabMic UFG e ao Biotério da UniEvangélica.

Referências

BARROS, L., PEREIRA, E., CALHELHA, R.C., DUEÑAS, M., CARVALHO, A.M., SANTOS-BUELGA, C. AND FERREIRA, I.C. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Functional Foods**, v.5, p.1732-1740, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 5.ed., v.1, Brasília, DF: ANVISA, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2017.

JESUS, R.S.; PIANA, M.; FREITAS, R.B.; BRUM, T.F.; ALVES, C.; BELKE, B.V.; MOSSMANN, N.J.; CRUZ, R.C.; SANTOS, R.C.V.; DALMOLIN, T.; BIANCHINI, B.V.; CAMPOS, M.; BAUERMANN, L. DE F. In vitro antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC–DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-7, 2017.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997.

OECD's - Guideline for the Testing of Chemicals – no 423: **“Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method”**. (Adopted: 17th December 2001).

ROLIM, A. et al. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* A. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) commercial extract. **J AOAC Int.** v.88, p.1015-1019, 2005.

TRIVELLATO-GRASSI, L.; MALHEIROS, A.; MEYRE-SILVA, C.; BUSS, Z. DA S.; MONGUILHOTT, E.D.; FRÖDE, T.S.; SILVA, K.A. DA; SOUZA M.M DE. From popular use to pharmacological validation: a study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.145, p.127–138, 2013.