



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
RENORBIO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUSSÍGENO E EXPECTORANTE
DE VITEXINA ISOLADA DE *JATROPHA MUTABILIS* E DO
COMPLEXO DE INCLUSÃO VITEXINA/ β -CICLODEXTRINA**

ELIATANIA CLEMENTINO COSTA

RECIFE-PE

2018

ELIATANIA CLEMENTINO COSTA

Tese apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), para obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Xirley Pereira Nunes

Co-orientadora: Larissa Araújo Rolim

RECIFE-PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Centra, Recife-PE, Brasil

C837a Costa, Eliatania Clementino
Avaliação do efeito antitussígeno e expectorante da vitexina isolada de *Jatropha mutabilis* e do complexo de inclusão vitexina/ β -ciclodextrina / Eliatania Clementino Costa. – 2018. 111 f.

Orientadora: Xirley Pereira Nunes.
Coorientadora: Larissa Araújo Rolim.
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, Recife, BR-PE, 2018. Ponto focal em Pernambuco – Universidade Federal Rural de Pernambuco.
Inclui referências e apêndice (s).

1. Flavonóides 2. Oligossacarídeos 3. Tosse 4. Cromatografia a líquido de alta eficiência 5. Antitussígenos I. Nunes, Xirley Pereira, orient. II. Rolim, Larissa Araújo, coorient. III. Título

CDD 620.8

TERMO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
RENORBIO

TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:
ELIATANIA CLEMENTINO COSTA

Avaliação do efeito antitussígeno e expectorante da vitexina isolada de *Jatropha mutabilis* e do complexo de inclusão vitexina/ β -ciclodextrina

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em 12 de dezembro de 2018.

Orientadora:

Prof.^a. Dr.^a Xirley Pereira Nunes (RENORBIO)

Examinadores:

Prof. Dr. Mario Adriano Ávila Queiroz (RENORBIO)

Prof. Dr. James Almada da Silva (UFS)

Prof.^a. Dr.^a Edigênia Cavalcante da Cruz Araújo (UNIVASF)

Prof. Dr. Fabrício Souza Silva (UNIVASF)

**“Jesus, fitando neles o olhar, disse-lhes:
Isto é impossível aos homens, mas para
DEUS tudo é possível” Mateus 19:26**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, a quem devo a minha existência, fé e esperança de dias melhores. Tudo é permitido por Ele e esse doutorado é a prova disso.

À minha mãe por tudo que fizestes por mim até hoje, pela amizade e palavras de conforto. Ao meu irmão, Eduardo, pela força e amizade de sempre.

Ao meu filho, Mateus, combustível diário de ânimo, perseverança, alegria, AMOR e MILAGRE. Agradeço a Deus por ter enviado para mim no momento dEle. Ao meu esposo por cuidar tão bem do nosso filho.

À professora Larissa Rolim pela orientação, força e por acreditar que iria dar certo. Não tenho palavras para agradecê-la, mas a melhor forma que achei foi pedir a Deus que Ele a retribua com muitas bênçãos. A professora Xirley pela orientação e por acreditar na minha proposta. Sou imensamente grata a Deus por essas duas pessoas maravilhosas.

À professora Edigênia Cavalcante pela excelente orientação durante o mestrado, por ter me apresentado à professora Xirley e pelas colaborações e disponibilidade durante o doutorado.

À Ana Paula pelos espectros de RMN e por todo o apoio que me destes desde sempre.

Ao professor Helinando e ao técnico Gineton (UNIVASF) pela disponibilidade para a análise de microscopia eletrônica de varredura das amostras.

À Professora Leopoldina do IF Sertão Pernambucano pela força e dedicação em contribuir pelo desenvolvimento profissional de todos os seus alunos e pela disponibilidade do equipamento para análise do infravermelho.

Aos meus colegas de trabalho do IF Sertão, Giovanna, Victor, Márcio, Diego e Andreia pela motivação e solidariedade no decorrer de todo esse doutorado.

À toda equipe da CAFMA pelas contribuições, aprendizagens e disponibilidade, em especial a professora Kátia (exemplo de solidariedade), Emanuela, Isabela, Natália e Pedrita.

Ao pessoal do LAFEX, em especial à Modesto e Ricardo pelos experimentos, disponibilidade e todos os aprendizagens adquiridos. Aos professores Fabricio Souza e Luciano Ribeiro pela disponibilidade do laboratório e contribuições nas discussões sobre as metodologias utilizando camundongos.

À UNIVASF pela disposição de seus laboratórios e equipamentos para desenvolvimento dos experimentos.

Ao Professor James (UFS) pelas excelentes contribuições dadas, não tenho palavras para agradecer, mas retribuo desejando muitas bênçãos.

RESUMO

O estudo teve como objetivo incluir a vitexina isolada de *Jatropha mutabilis* na cavidade da β -ciclodextrina para melhorar a solubilidade desta flavona. Vitexina foi quantificada em extrato de *J. mutabilis* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodo (CLAE/DAD). A caracterização do complexo de inclusão (CI) vitexina/ β -CD foi realizada por técnicas como Ressonância Magnética Nuclear (^1H , ^{13}C e ROESY), Infravermelho com Transformada de Fourier, Microscopia Eletrônica de Varredura e estudo de dissolução *in vitro*. Além disso, avaliou-se em modelos animais, as atividades expectorante, por meio da dosagem de vermelho de fenol no lavado broncoalveolar, e antitussígena, em tosse induzida por ácido cítrico, da vitexina e do CI vitexina/ β -CD. Triagem de toxicidade da vitexina e do CI vitexina/ β -CD foi realizada utilizando *Artemia Salina*. A validação da metodologia analítica por CLAE-DAD mostrou-se simples, linear, precisa, exata e específica. Na caracterização do CI vitexina/ β -CD observou-se interação entre hidrogênios do anel B da vitexina e hidrogênio (H3) da β -CD, além de mudanças na morfologia do CI vitexina/ β -CD quando comparados com vitexina. No teste de dissolução, observou-se aumento da taxa de dissolução da vitexina nos primeiros 20 minutos para o CI vitexina/ β -CD quando comparado com a vitexina. Em relação à atividade farmacológica foi observado que o CI vitexina/ β -CD nas doses equivalentes 0,2, 1 e 5 mg/kg da vitexina apresentaram atividade expectorante mais eficaz quando comparados com a vitexina livre ($p < 0,05$). Na atividade antitussígena, tanto a vitexina quanto o CI vitexina/ β -CD apresentaram efeitos semelhantes, independente da dose. No ensaio de toxicidade utilizando *Artemia salina*, vitexina e CI vitexina/ β -CD (concentrações 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ de vitexina) foram considerados não tóxicos. Por fim, o estudo apresenta uma metodologia analítica validada para quantificação de vitexina em extratos de *Jatropha mutabilis*, além de demonstrar eficácia do CI vitexina/ β -CD como expectorante e da vitexina como antitussígeno. Todos esses dados estão sendo descritos pela primeira vez.

Palavras-chaves: flavonoides, oligossacarídeos cíclicos, vermelho de fenol, tosse, CLAE, validação

ABSTRACT

The study aimed to include the isolated vitexin of *Jatropha mutabilis* in the β -cyclodextrin cavity to improve the solubility of this flavone. Vitexin was quantified in extract of *J. mutabilis* by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD). The characterization of the inclusion complex (IC) vitexin/ β -CD was performed by techniques such as Nuclear Magnetic Resonance (^1H , ^{13}C and ROESY), Infrared with Fourier Transform, Scanning Electron Microscopy and dissolution study *in vitro*. In addition, expectorant activities were evaluated in animal models by phenggggol red in bronchoalveolar lavage and antitussive, citric acid-induced cough, vitexin and IC vitexin/ β -CD. Screening for toxicity of vitexin and vitexin/ β -CD IC was performed using *Artemia Salina*. The validation of the analytical methodology by HPLC-DAD was simple, linear, precise, exact and specific. In the characterization of vitexin/ β -CD IC, interaction between vitexin B-ring hydrogens and hydrogen (H3) of β -CD was observed, as well as changes in the morphology of vitexin/ β -CD IC when compared to vitexin. In the dissolution test, the dissolution rate of vitexin was increased in the first 20 minutes for vitexin/ β -CD IC when compared to vitexin. Regarding pharmacological activity, vitexin/ β -CD IC at the equivalent doses of 0.2, 1 and 5 mg/kg of vitexin showed a more effective expectorant activity when compared to free vitexin ($p < 0.05$). In antitussive activity, both vitexin and vitexin/ β -CD IC had similar effects, regardless of dose. In the toxicity test using *Artemia salina*, vitexin and IC (concentrations 1, 10, 100 and 1000 $\mu\text{g/mL}$ vitexin) were considered non-toxic. Finally, the study presents a validated analytical methodology for quantification of vitexin in extracts of *Jatropha mutabilis*, in addition to demonstrating efficacy of vitexin/ β -CD IC as an expectorant and of vitexin as antitussive. All of these data are being described for the first time.

Key words: flavonoids, cyclic oligosaccharides, phenol red, cough, CLAE, validation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Jatropha mutabilis</i> (Fonte: Autora).....	19
Figura 2. Estrutura química dos constituintes químicos identificados no óleo essencial de <i>Jatropha mutabilis</i> (Fonte: COSTA et al., 2014).....	21
Figura 3. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.	24
Figura 4. Biossíntese dos flavonoides (ANDERSEN, MARKHAM, 2006).	26
Figura 5. Estrutura básica dos flavonoides.....	27
Figura 6. Principais classes dos flavonoides.....	28
Figura 7. a) Estrutura geral das ciclodextrinas (CD's). Os derivados α , β e γ -CD são definidos por $n=1$, 2 e 3, respectivamente. (b) Representação esquemática da estrutura tridimensional das CD's, mostrando as características estruturais definidas pelo arranjo das unidades de glicose. Fonte: BRITTO, NASCIMENTO J.R., SANTOS, 2004).....	33
Figura 8. Estrutura espacial cônica de β -ciclodextrina. Fonte: DEL VALLE, 2004.	34
Figura 9. Esquema do reflexo da tosse através de ligante químico ativando as fibras C e expressando o canal iônico TRPV1 da membrana.	44
Figura 10. Secreção de muco das vias aéreas e hipersecreção. Fonte: DUNCAN, ROGERS, 2007.....	45
Figura 11. Espectro de RMN ^1H de Jm-1 (DMSO, 400 MHz).....	62
Figura 12. Expansão do espectro de RMN ^1H de Jm-1 para a região característica de hidrogênios do açúcar (DMSO, 400 MHz).....	63
Figura 13. Expansão do espectro de RMN ^1H de Jm-1 da região de hidrogênios aromáticos (DMSO, 400 MHz).	63
Figura 14. Estrutura básica de flavonoide.	64
Figura 15. Espectro de correlação heteronuclear HSQC de Jm-1 (DMSO, 400 e 100 MHz).....	65
Figura 16. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de Jm-1 (DMSO, 400 e 100 MHz).....	65
Figura 17. Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de Jm-1 (DMSO, 400 e 100 MHz).....	67
Figura 18. Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY de Jm-1 (DMSO, 400 MHz).....	68

Figura 19. Expansão do espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY de Jm-1 (DMSO, 400 MHz).	68
Figura 20. Expansão do espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - TOCSY de Jm-1 (DMSO, 400 MHz).	69
Figura 21. Representação estrutural das principais correlações observadas no espectro HMBC para Jm-1.	69
Figura 22. Estrutura da 8-C- β -D-glicosilapigenina ou vitexina.	70
Figura 23. Estrutura da orientina e principais correlações observadas no HMBC.	71
Figura 24. Expansão do espectro de RMN ^1H de Jm-1 para a região de hidrogênios aromáticos com atribuições de sinais da orientina (DMSO, 400 MHz).	71
Figura 25. Expansão do espectro de correlação heteronuclear HSQC de Jm-1 mostrando as correlações dos hidrogênios da orientina (DMSO, 400 e 100 MHz).	72
Figura 26. Expansão do espectro de correlação heteronuclear HMBC de Jm-1 mostrando as correlações dos hidrogênios da orientina (DMSO, 400 e 100 MHz).	72
Figura 27. Cromatograma obtido por CLAE-DAD de vitexina e do extrato etanólico de <i>J. mutabilis</i> (Jm-EEB). Condições cromatográficas: Gradiente de eluição de acetonitrila (A) e ácido fórmico 0,1% (B) (0,01-40 min,90-72%B; 40,0-50,0 min, 72-90%), Fluxo de 0,4 mL/min das fases móveis, volume de injeção de amostra de 10 μL , 37°C, 336 nm.	75
Figura 28. Cromatograma obtido por CLAE-DAD da avaliação da especificidade do método. Condições cromatográficas: Gradiente de eluição de acetonitrila (A) e ácido fórmico 0,1% (B) (0,01-40 min,90-72%B; 40,0-50,0 min, 72-90%), Fluxo de 0,4 mL/min das fases móveis, volume de injeção de amostra de 10 μL , 37°C, 336 nm.	76
Figura 29. Curva de calibração construída a partir dos resultados do teste de linearidade para vitexina nas concentrações de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 $\mu\text{g/mL}$.	77
Figura 30. Curva de calibração construída a partir dos resultados do teste de linearidade para vitexina no Jm-EEB com concentrações do extrato de 400, 500, 600, 700, 800 e 900 $\mu\text{g/mL}$.	78

Figura 31. Espectros de RMN ¹ H da β-CD (picos em vermelho) e do complexo vitexina/β-CD (picos em azul) (D ₂ O, 400 MHz).	83
Figura 32. Espectro do bidimensional ROESY do complexo vitexina/β-CD solubilizado em D ₂ O.....	84
Figura 33. Expansão do espectro do bidimensional ROESY do complexo vitexina/β-CD solubilizado em D ₂ O.	85
Figura 34. Fotomicrografias da β-CD (a), vitexina (b), MF (c) e do complexo vitexina/β-CD (d).	86
Figura 35. Espectros de IV-TF para (a) β-CD, (b) vitexina, (c) mistura física e (d) vitexina/β-CD.....	88
Figura 36. Expansão do espectro de IV-TF para (a) β-CD, (b) vitexina, (c) mistura física e (d) complexo de inclusão vitexina/β-CD.....	88
Figura 37. Estudo de dissolução in vitro de vitexina e complexo de inclusão vitexina/β-CD numa solução salina acidificada (pH 1,5), 37°C.....	90
Figura 38. Quantificação de vermelho de fenol (n=5) no LBA para os controles negativos (água e β-CD), vitexina, complexo vitexina/β-CD e guaifenisina. Dados expressos em média ± E.P.M. e *p<0,05 (ANOVA one-way com pós teste de Tukey).	92
Figura 39. Estrutura da narigenina.	93
Figura 40. Frequência de tosse a partir da exposição do ácido cítrico (0,4 M) após administração dos tratamentos: controles negativos (água e β-CD), vitexina, complexo (vitexina/β-CD) e codeína. Dados expressos em média ± E.P.M. e n = 5; *,#, a (p<0,05) (ANOVA two-way com pós teste de Sidak).....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de deslocamentos químicos de Jm-1 obtidos através dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C e bidimensionais.....	64
Tabela 2. Dados espectroscópicos de Jm-1 (vitexina e orientina) comparados com a literatura (ZHOU et al., 2005 e WEN et al., 2007).....	73
Tabela 3 - Resultados obtidos no teste de linearidade de vitexina.....	78
Tabela 4. Resultados obtidos para precisão intra e intermediária para a vitexina no extrato.....	80
Tabela 5. Resultados obtidos no teste de exatidão com valores médios de recuperação.....	80
Tabela 6. Resultados obtidos na avaliação da robustez do método para quantificação de vitexina no extrato (Jm-EEB).....	81
Tabela 7. Deslocamentos químicos de β -CD livre e complexada	82

LISTA DE ABREVIATÖES

COSY: Espectroscopia de correlaçaõ homonuclear de hidrogênio (correlated spectroscopy)

d: duplete

dd: duplo duplete

DMSO: Dimetilsulfóxido

δ: Deslocamento químico

EEB: Extrato etanólico bruto

HMBC: Correlaçaõ heteronuclear de múltiplas ligações (multiple bond correlation)

Hz: Hertz

HSQC: Correlaçaõ heteronuclear quântica simples (heteronuclear single quantum correlation)

HMQC: Correlaçaõ heteronuclear de múltiplas ligações (heteronuclear Multiple Quantum Coherence)

HVASF: Herbário Vale do São Francisco

IV-TF: Infravermelho com transformada de Fourier

J: Constante de acoplamento

Jm-1: Substância 1

Jm-EEB: Extrato etanólico bruto de *Jatropha mutabilis*

m: multiplete

ppm: partes por milhão

RMN ¹H: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C: Ressonância magnética nuclear de carbono

ROESY: Espectroscopia de efeito nuclear Overhauser de estrutura rotativa

s: simpleto

t: tripleto

Sumário

1. Introdução	16
2. Revisão da literatura	18
2.1 <i>Jatropha mutabilis</i> : família, gênero e espécie	18
2.2 Metabolismo secundário: Flavonoides	22
2.2.1 Vitexina	28
2.3 Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	29
2.4 Ciclodextrina	32
2.4.1 Complexos de inclusão com β -ciclodextrina	32
2.4.2 Técnicas utilizadas no preparo de complexos de inclusão com ciclodextrina	35
2.4.3 Caracterização de complexos de inclusão com ciclodextrina	36
2.4.4 Complexos de inclusão com flavonoides	39
2.5 Reflexo da tosse e produção de muco pelo sistema respiratório	40
2.5.1 Considerações sobre o reflexo da tosse	40
2.5.2 Considerações sobre produção de muco no sistema respiratório	44
2.6 Toxicidade utilizando <i>Artemia salina</i>	47
3. Justificativa	49
4. Hipótese	50
5. Objetivos	51
5.1. Geral	51
5.2. Específicos:	51
6. Material e Métodos	52
6.1 Coleta do material vegetal	52
6.2 Isolamento e identificação de vitexina	52
6.3 Validação de metodologia analítica para quantificação de vitexina em extrato etanólico bruto (EEB) de <i>Jatropha mutabilis</i>	54
6.3.1 Preparação das soluções estoque de extrato de <i>Jatropha mutabilis</i>	54
6.3.2 Preparação das soluções estoque de vitexina	54
6.3.3 Instrumentação e condições cromatográficas	55
6.3.4 Validação de método	55
6.4 Preparação e caracterização do complexo de vitexina/ β -ciclodextrina ...	57
6.4.1 Preparação de complexo vitexina/ β -ciclodextrina e mistura física	57
6.4.2 Caracterização do complexo	57

6.5 Avaliação farmacológica	59
6.5.1 Animais	59
6.5.2 Avaliação da atividade expectorante a partir da quantificação do marcador vermelho de fenol	59
6.5.3 Avaliação da atividade antitussígena em camundongos	60
6.6 Toxicidade com <i>Artemia salina</i>	60
6.7 Análise dos dados.....	61
7. Resultados e Discussão	61
7.1 Elucidação estrutural de vitexina.....	61
7.2 Validação de metodologia por HPLC	74
7.3 Caracterização do complexo.....	81
7.3.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)	81
7.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	85
7.3.3 Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)	87
7.3.4 Estudo de dissolução <i>in vitro</i>	89
7.4 Avaliação da atividade expectorante em camundongos	90
7.5 Atividade antitussígena	93
7.6 Toxicidade utilizando <i>Artemia salina</i>	96
8. Conclusão	97
9. Referências	98
10. Apêndice	110

1. Introdução

Vitexina é uma flavona C-glicosilada, sendo quimicamente conhecida como 8-D-glucosil-4',5,7-trihidroxi-flavona ou apigenina-8-C-glucosídica. Esta substância apresenta uma diversidade de atividades farmacológicas *in vivo* e *in vitro*, incluindo anticâncer, antioxidante, anti-inflamatória, antinociceptiva, anti-hipertensiva, antiespasmódica, antiviral e antidepressiva (AN et al., 2015; ROSA et al., 2016; BORGHI et al., 2013; YANG et al., 2013; EPSTEIN SHOCHET et al., 2015; DEMIR OZKAY, CAN, 2013; ZHU et al., 2016; JE et al., 2014; RAGONE et al., 2007; KRCATOVIC et al., 2008; CAN, DEMIR OZKAY, UCEL, 2013; HE et al., 2016). Pesquisas mostram que essa flavona (400 µg/kg, via intraperitoneal) reduziu em 80% o influxo de neutrófilos pulmonares em camundongos expostos a aerossóis de lipopolissacarídeo (DE MELO et al., 2005). Recentemente, demonstraram que a vitexina (0,2, 1 e 5 mg/kg, via oral) inibe a inflamação na asma alérgica induzida por ovalbumina (VENTURINI et al., 2018). No entanto, estudo do metabolismo de vitexina em ratos mostrou que ela é pouco absorvida no trato gastrointestinal (ZHANG et al., 2007) e apresenta baixa biodisponibilidade (XUE et al., 2014; WANG, 2015). Isso provavelmente se deve a baixa solubilidade em água (7,62 µg/mL), sendo importante o desenvolvimento de metodologias que melhorem a solubilidade de vitexina em meio aquoso para que sua ação terapêutica seja melhorada.

Nesse contexto, um grupo de moléculas classificadas como oligossacarídeos cíclicos estão sendo utilizados no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, particularmente devido às suas propriedades complexantes, promovendo incremento na solubilidade de fármacos poucos solúveis. Estes oligossacarídeos são chamados de ciclodextrinas (CDs) (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007). As CDs encapsulam moléculas/fármacos, atuando como veículo e melhorando sua biodisponibilidade. As CDs parentais ou de primeira geração são de três tipos (α -CD, β -CD e γ -CD) e possuem respectivamente, seis, sete e oito unidades de açúcar (α -(1,4)-glicosil) (DASS, JESSUP, 2000). Entre elas, a β -CD é a mais acessível devido ao baixo custo e baixa toxicidade (DEL VALLE, 2004).

A utilização dos diversos nanocarreadores macrocíclicos vem obtendo grande interesse, pois melhora as propriedades físico-químicas de substâncias,

aumentando a eficácia do tratamento e reduzindo efeitos tóxicos ou colaterais (GONG et al., 2012). Assim, os complexos de inclusão são utilizados na área farmacêutica para aumentar a solubilidade, a estabilidade e a biodisponibilidade de drogas (JANSOOKA, OGAWAB, LOFTSSONC, 2018).

Fármacos poucos solúveis frequentemente apresentam comportamento de biodisponibilidade *in vivo* inferior quando comparados àqueles de alta solubilidade. Logo, a formação de complexos está dentre as alternativas mais vantajosas e eficientes quando se busca melhoria nas propriedades de dissolução e biodisponibilidade de fármacos pouco hidrossolúveis (SPRICIGO, 2008; LIMA et al., 2008).

Nesses contextos, diante do potencial farmacológico da vitexina como anti-inflamatório, principalmente sobre o sistema respiratório, da baixa solubilidade em meio aquoso e conseqüentemente baixa biodisponibilidade, o presente estudo visou isolar vitexina de *Jatropha mutabilis*, validar metodologia para quantificação dessa flavona em extrato dessa espécie, preparar e caracterizar o complexo de inclusão vitexina/ β -CD com o objetivo de melhorar sua solubilidade. O complexo resultante foi caracterizado por técnicas como Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) para verificar a formação do complexo. Avaliar ainda os efeitos expectorantes e antitussígenos *in vivo* tanto da vitexina quanto do complexo de inclusão vitexina/ β -CD.

2. Revisão da literatura

2.1 *Jatropha mutabilis*: família, gênero e espécie

A espécie *Jatropha mutabilis* pertence a família Euphorbiaceae que possui cerca de 317 gêneros, 8.000 espécies e distribui-se principalmente nos trópicos e subtropicais (SANTOS, MACHADO e LOPES, 2005). No Brasil, estima-se a ocorrência de 1.100 espécies e 72 gêneros, estabelecidas nas diferentes fitofisionomias. Considera-se a região Nordeste do Brasil como grande centro de diversidade da família, com 240 espécies em 50 gêneros, distribuídas em sua grande maioria nas áreas de Caatinga, onde apresenta grande número de espécies endêmicas. Seus principais gêneros em número de espécies são: *Euphorbia* L. (1.500), *Croton* L. (700), *Phyllanthus* L. (400), *Acalypha* L. (400), *Macaranga* Thouars (400), *Antidesma* Burman (150), *Drypetes* Vahl (150), *Jatropha* (150), *Manihot* Mill. (150) e *Tragia* Plumier (150) (OLIVEIRA, 2013). É a segunda família mais representativa da Caatinga em número de espécies, superada apenas pela família Leguminosae (SANTOS, SCHRIPSEMA, J., KUSTER, 2005).

A família Euphorbiaceae está entre as famílias de maior importância econômica entre as Eudicotiledôneas, especialmente, no setor farmacológico-medicinal, industrial, madeireiro, ornamental e na produção de alimentos (OLIVEIRA, 2013).

Estudos fitoquímicos de espécies da família Euphorbiaceae demonstram a presença de diversas classes de substâncias químicas, tais como tanino e lignana (CUI, TAN, 2004), flavonoide (SANTOS, SCHRIPSEMA e KUSTER, 2005), alcalóide (LEITE et al., 2005), cumarina (LIMA et al., 2009).

O gênero *Jatropha*, está inserido na família Euphorbiaceae. O nome deriva da palavra grega “jatos” (médico) e “trophe” (alimentos), o que implica seus usos medicinais (KUMAR, SHARMA, 2008).

Jatropha é um grupo de grande importância econômica, principalmente pela presença de várias espécies referidas por seus usos medicinais e/ou ornamentais, também empregadas como cercas-vivas, em várias partes do mundo, especialmente na África, como *J. gossypifolia*, *J. curcas* e *J. multifida*. A fácil propagação de suas sementes intensifica sua utilização na horticultura, bem como em ornamentações nos jardins tropicais (LEAL, AGRA, 2005).

Espécies do gênero *Jatropha* são usadas na medicina tradicional para curar várias doenças na África, Ásia e América Latina, como plantas ornamentais e como fontes de energia (produção de biodiesel). A utilização das plantas deste gênero pela população como medicamentos para tratamento de saúde é realizada por 80% da população mundial da Ásia, América Latina e África, sendo relatados efeitos adversos mínimos (SABANDAR et al., 2013).

Jatropha mutabilis (Pohl) Baill. (Figura 1) é uma espécie endêmica do bioma Caatinga, ocorrendo desde o Piauí até a Bahia, em áreas de caatinga hiperxerófila, sendo encontrada em terreno arenoso (SANTOS, MACHADO e LOPES, 2005). Suas flores e folhas são utilizadas pela medicina popular como depurativo e para constipação (ALBUQUERQUE et al., 2007).



Figura 1. *Jatropha mutabilis* (Fonte: Autora).

Estudo realizado durante pesquisa de mestrado (COSTA, 2014) relatou que vitexina e β -sitosterol glicosilado foram isolados de folhas de *Jatropha mutabilis*.

Estudo derivado da referida dissertação apresentou a análise da composição química dos óleos voláteis das folhas de *J. mutabilis* em que a mesma revelou a presença de 20 compostos, dentre estes houve a predominância de sesquiterpenos oxigenados (42,86 %) seguido de uma

unidade de diterpeno oxigenado (41,38 %), sesquiterpenos hidrocarbonados (12,14 %), uma cetona alifática (1,44 %) e um alcano alifático (2,18 %). O composto majoritário identificado foi um diterpeno oxigenado alifático, o fitol (41,38 %). A Figura 2 mostra as estruturas químicas dos constituintes identificados (COSTA et al., 2014).

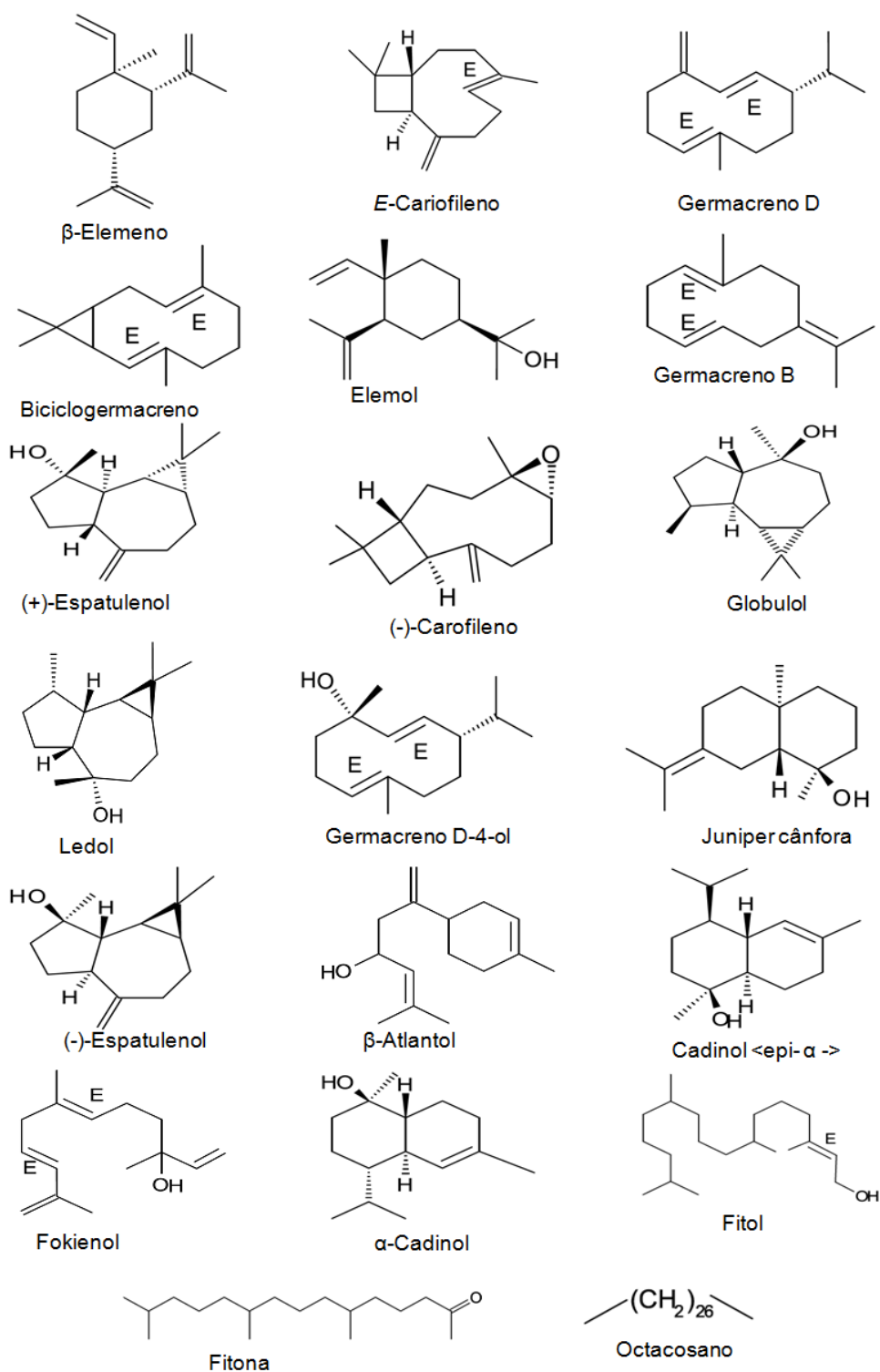


Figura 2. Estrutura química dos constituintes químicos identificados no óleo essencial de *Jatropha mutabilis* (Fonte: COSTA et al., 2014).

2.2 Metabolismo secundário: Flavonoides

O metabolismo é definido como o conjunto total das transformações das moléculas orgânicas que ocorrem nas células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo o equilíbrio. Essas transformações possuem certa direção devido à presença de enzimas específicas, estabelecendo assim as rotas metabólicas, visando o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula. Além do metabolismo primário, responsável pela síntese de celulose, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais, as plantas também apresentam o chamado metabolismo secundário (PEREIRA, CARDOSO, 2012).

Os metabólitos secundários são compostos produzidos pelas plantas para a sua sobrevivência e preservação, atuando na defesa do vegetal, agindo como dissuasórios alimentares e como toxinas. Por outro lado, alguns metabólitos secundários atuam de maneira oposta, atraindo insetos, pássaros, morcegos e até mesmo ratos, responsáveis pela polinização de muitas plantas. Essas moléculas geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes atividades biológicas e são encontradas em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas (SIMÕES et al., 2010).

Os metabólitos secundários aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas com este fim, podendo agir como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos, e também apresentando atividades antigermativas ou tóxicas para outras plantas, fitoalexinas. Além disso, alguns destes metabólitos constituem importantes compostos que absorvem a luz ultravioleta evitando que as folhas sejam danificadas (FUMAGALI et al., 2008).

Por exemplo, o crescimento e a produtividade das plantas são comprometidos pela radiação ultravioleta (UV). A mesma cria mecanismos de proteção, tal como a produção de metabólitos secundários. Por exemplo, os flavonoides, se acumulam nas células da epiderme da folha e protegem as camadas celulares internas dos danos por radiação UV. Além disso, a síntese destes compostos é induzida por radiação UV e as plantas cultivadas em

condições que induzem a síntese de flavonoides são mais tolerantes à radiação UV (LI et al., 1993).

Para Simões e colaboradores (2010), a origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (Figura 3). O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Algumas micromoléculas derivam da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivado deste, como por exemplo, as antraquinonas, flavonoides e taninos condensados. Os metabólitos podem ser encontrados na forma livre (agliconas) ou estar ligados a um ou mais unidades de açúcar (heterosídeo).

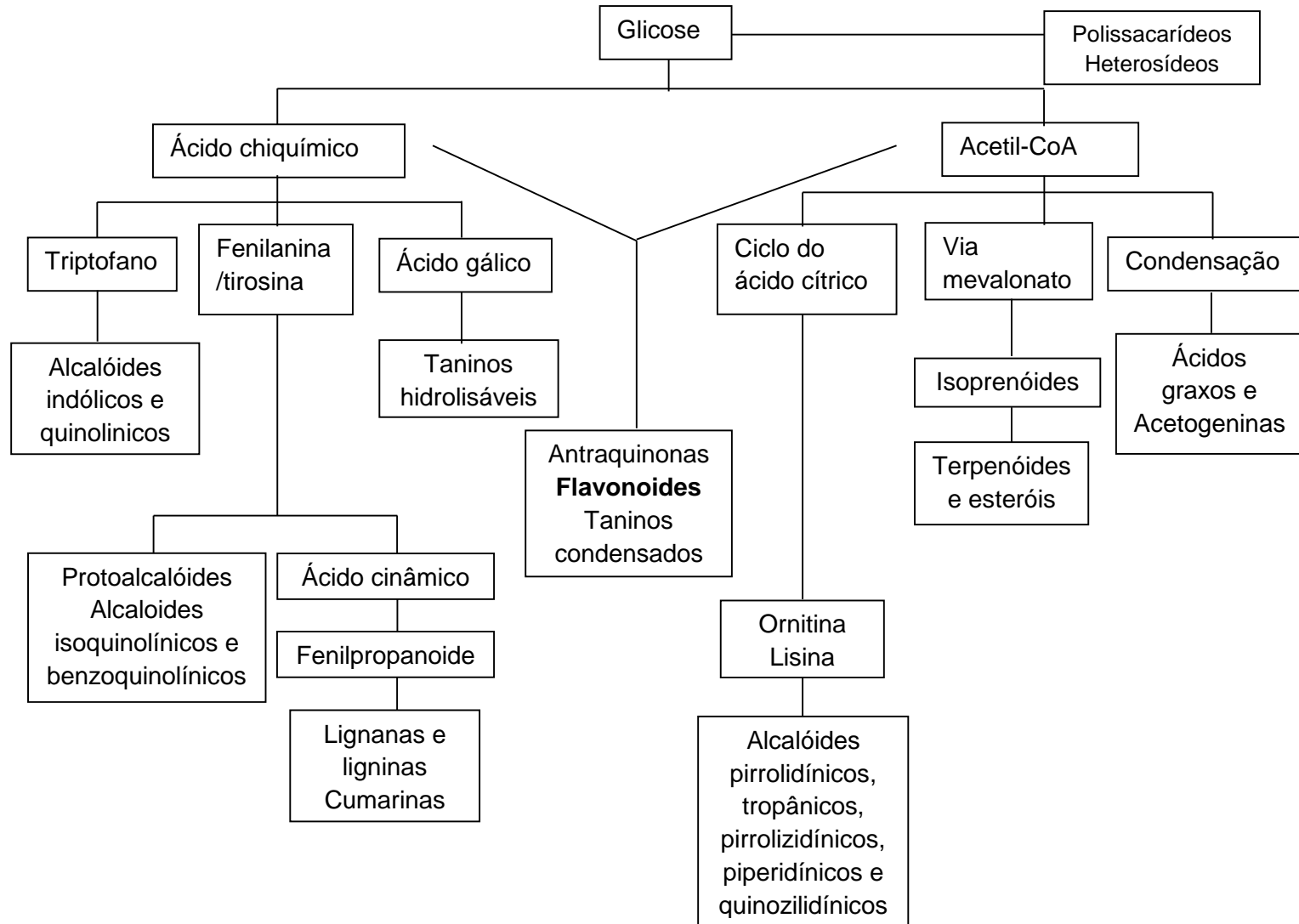


Figura 3. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal (SIMÕES et al., 2010), estando presentes na maioria das plantas, concentrados em sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores (DORNAS et al., 2007). Essa classe geralmente ocorre em plantas como derivados glicosilados, e que contribuem para as cores brilhantes de azul, púrpura, e laranja, em folhas, flores e frutos. (PIETTA, 2000).

Nas plantas, os flavonoides desempenham funções como proteção contra incidência de raios ultravioleta e visível, proteção contra insetos, fungos, vírus, bactérias, antioxidantes, agentes alelopáticos, dentre outros.

Atividades biológicas dos flavonoides têm sido reportadas, como antiviral, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, hepatoprotetor, antitrombótica e anticarcinogênica (SIMÕES et al., 2010; MIDDLETON, KANDASWAMI, THEOHARIDES, 2000).

Já foram identificados mais de 4.200 flavonoides diferentes, apresentando-se em diversas formas estruturais. A maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental (SIMÕES et al., 2010).

Os flavonoides participam da fase luz-dependência durante a fotossíntese, no qual catalisam o transporte de elétrons. Eles são sintetizados a partir de aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, em conjunto com unidades de acetato (Figura 4). A fenilalanina e a tirosina dão origem ao ácido cinâmico e ao ácido hidroxicinâmico, respectivamente, que mediante condensação com unidades de acetato, originam a estrutura cinamoil dos flavonoides (MIDDLETON, KANDASWAMI, THEOHARIDES, 2000). Subseqüentemente, derivados glicosilados ou sulfatados são formados (MARTINEZ-FLÓREZ et al., 2002).

A estrutura comum dos flavonóides é biossintetizada a partir dos metabólitos derivados do ácido chiquímico e acetyl-CoA (Figura 4). O ácido chiquímico produz a fenilalanina que é o precursor inicial da síntese dos flavonóides. O aminoácido fenilalanina é desaminado pela enzima fenilalanina-amônia-líase (PAL) e produz o ácido cinâmico. Este é convertido em ácido *p*-cumárico por ação da enzima 4-hidroxilase cinamato. Por conseguinte, ocorre a adição da CoA, catalisada pela enzima *p*-cumarato/CoA liase originando a *p*-cumaroil-CoA. A *p*-cumaroil-CoA, ao reagir com três moléculas de malonil-CoA forma a calcona. Esta reação é catalisada pela enzima calcona sintetase. Finalmente, ocorre a ciclização do anel da calcona

pela ação da enzima calcona isomerase, originando a flavanona, núcleo básico de todos os flavonóides. Assim, nos flavonóides, o anel A é formado via acetilCoA, o anel B via ácido chiquímico e o anel C deriva do fosfoenolpiruvato (ANDERSEN, MARKHAM, 2006).

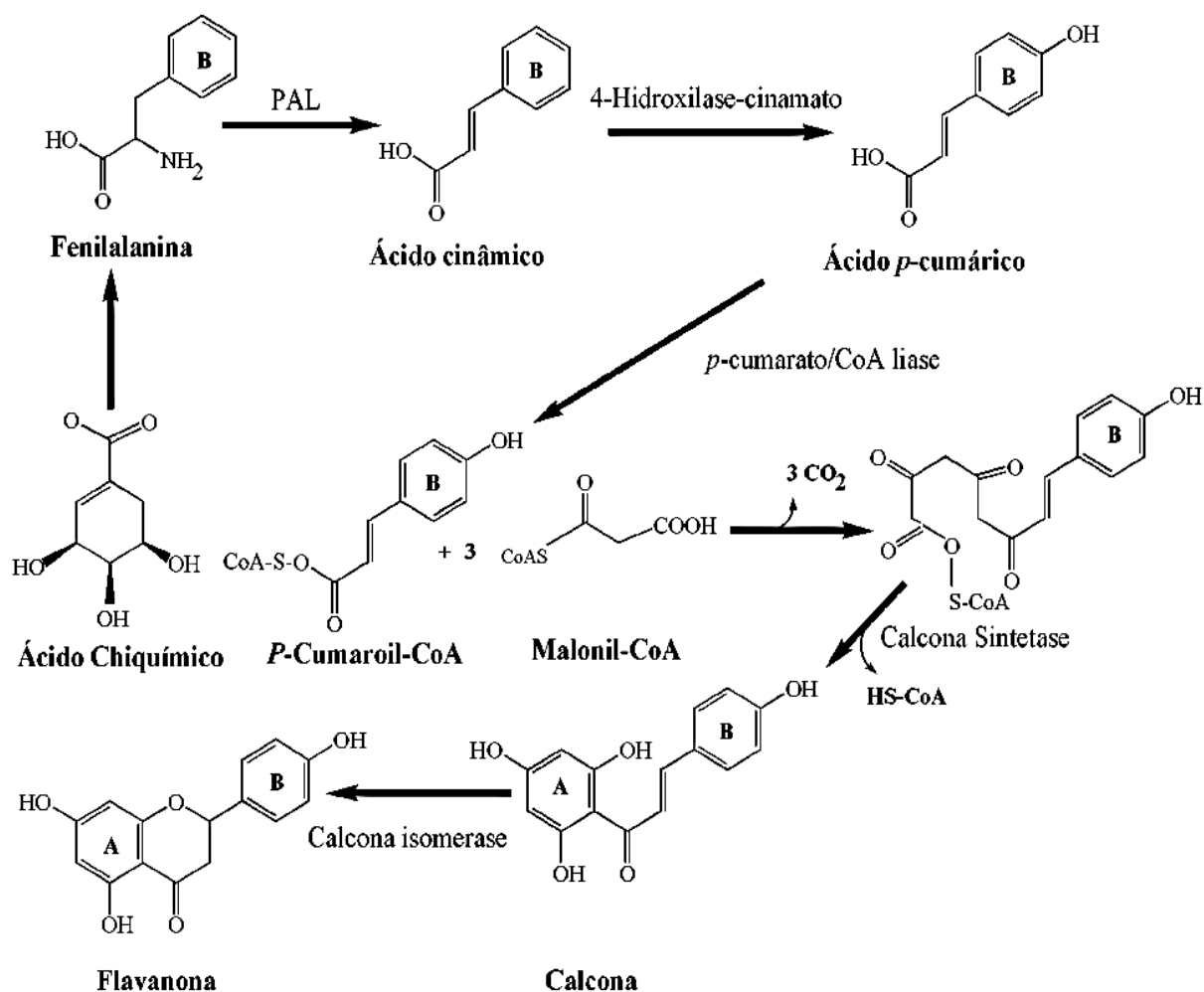


Figura 4. Biossíntese dos flavonoides (ANDERSEN, MARKHAM, 2006).

Estes metabólitos secundários são compostos de baixo peso molecular que compartilham um esqueleto comum de difenilpiranos (C6-C3-C6), constituído por dois anéis fenílicos (A e B), ligados através de um anel pirano C (heterocíclico). Os átomos de carbono nos anéis C e A são numerados de 2 a 8, e o anel B de 2' a 6' (Figura 5) (MARTINEZ-FLÓREZ et al., 2002).

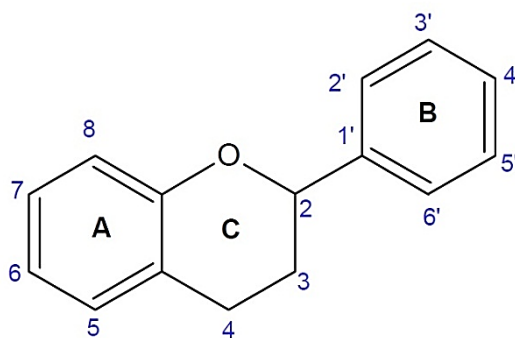


Figura 5. Estrutura básica dos flavonoides.

Os flavonoides são subdivididos nas principais classes: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas e isoflavonas (Figura 6) (BRAVO, 1998).

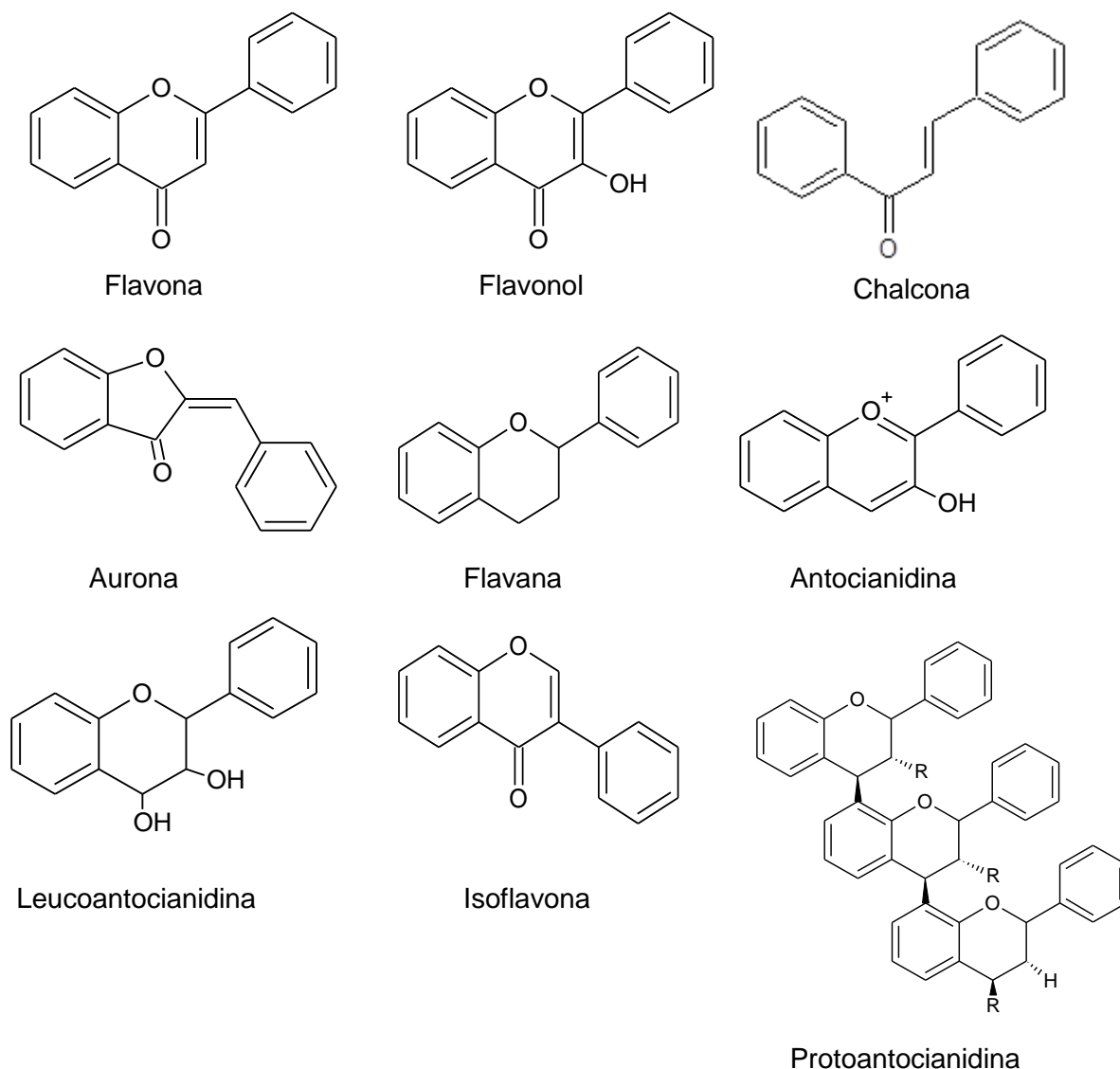


Figura 6. Principais classes dos flavonoides.

2.2.1 Vitexina

Vitexina (apigenina-8-*C*-glucosídeo ou 8-*D*-glucosil-4',5,7-trihidroxi-flavona) é uma flavona *C*-glicosilada de coloração amarela com fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{10}$ e massa molar 432,3775 g/mol. Flavonas são uma classe de flavonoides que foram nomeadas devido a cor amarela em comum ao grupo, isto é, “flavus” (HE et al., 2016).

Essa flavona é encontrada em várias espécies de plantas medicinais como o milhete, espinheiro, feijão mungo, passiflora, dentre outras. (HE et al., 2016).

He e colaboradores (2016) mostraram que a vitexina vem apresentando uma gama de atividades farmacológicas incluindo atividades anticâncer, antioxidante, anti-inflamatório, anti-nociceptivos, anti-DA (Doença de Alzheimer), anti-hipertensiva,

antiespasmódica, tratamento de lesão por hipoxia/isquemia, ação do tipo antidepressivo, antiviral e anticonvulsivante. Demonstraram ainda potencial para o tratamento de hipertrofia cardíaca, hipertensão, diabetes, obesidade, infecções, distúrbios metabólicos e asma. Esses mesmos autores em revisão sobre efeitos farmacológicos de vitexina concluíram em sua pesquisa com base em uma ampla perspectiva sobre a pesquisa *in vivo* e *in vitro*, que essa flavona pode se tornar um substituto das drogas comercializadas atualmente e/ou adjuvante no tratamento de doenças ao qual possui potencial de ação.

Diante do potencial da vitexina, torna-se interessante sua quantificação em espécies vegetais de onde ela foi isolada através de metodologia analítica, tornando-se importante a validação desta para reproduções futuras.

2.3 Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004).

Validação analítica é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos. A validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos (BRASIL, 2017).

Dentre as técnicas empregadas na validação para determinação quantitativa e qualitativa de substâncias em extratos, pode-se destacar a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), técnica bastante difundida e consolidada na atualidade. A CLAE é uma importante técnica de toda uma família de técnicas de separação, uma vez que consegue separar misturas que contém um grande número e compostos similares, sendo seu emprego em vários laboratórios indispensável. Além disso, utiliza instrumentos automatizados, colunas recheadas com materiais especiais e fase

móvel, eluída sob altas pressões. Realiza separações e análises quantitativas de vários compostos em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

Na CLAE, o solvente, também denominado eluente ou fase móvel, acondicionado em um frasco apropriado, é impulsionado, ou aspirado, por uma bomba de alta pressão em direção à uma coluna. No caminho, a amostra é introduzida na fase móvel, por meio de uma válvula de introdução de amostra (ou válvula de injeção) e arrastada para a coluna, na qual ocorre a separação. O efluente da coluna é direcionado para um detector, que acusa a presença dos analitos eluídos da mesma. O sinal gerado pelo detector é captado por um software apropriado, tratado no computador, e um cromatograma é gerado, mostrando a variação do sinal do detector em função do tempo de análise (LANÇAS, 2009).

A CLAE é comumente empregada para validação de metodologias analíticas, sendo que com o término do desenvolvimento desta metodologia, a implementação da mesma compreende um procedimento que avalie e comprove a sua eficiência para uso em análises de rotina. Por isso, é indispensável a realização da validação, que envolve a avaliação da eficiência de um procedimento, equipamento ou método por desenhos estatísticos para todas as condições de trabalho estabelecidos (RIBANI et al., 2004).

A validação de métodos analíticos baseia-se nas orientações da Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 e na Resolução da Diretoria Colegiada nº 166 de 2017, ambas da ANVISA, através dos parâmetros de especificidade/seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), robustez, em concordância com as recomendações das instituições nacionais (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003) e internacionais (ICH, 2005) e a da comunidade científica (RIBANI et al., 2004).

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz. No entanto, para insumos farmacêuticos ativos de origem vegetal e medicamentos que os contenham, deve-se demonstrar a capacidade do método de distinguir o material de interesse de outras espécies vegetais semelhantes, principalmente aquelas que possam estar presentes como adulterantes ou substituintes (BRASIL, 2017).

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (BRASIL, 2017).

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade. Repetibilidade refere-se a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. A reprodutibilidade é avaliada através dos testes realizados em laboratórios diferentes (BRASIL, 2017).

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (BRASIL, 2017).

Limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2017).

A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (BRASIL, 2017).

Acima foram relatados todos os parâmetros para validação de uma metodologia analítica para quantificação de um analítico em determinada amostra. Desta forma, vitexina pode ser quantificada em extratos da espécie *Jatropha mutabilis* através destes parâmetros.

Os flavonoides constituem uma classe de metabólitos de importante relevância, tendo em vista a diversidade de atividades farmacológicas já descritas para esse grupo assim como para a vitexina. No entanto, alguns flavonoides, inclusive a vitexina, apresentam baixa biodisponibilidade e solubilidade em meio aquoso. Nesse contexto, surge a classe de oligossacarídeos chamada ciclodextrinas que podem formar complexos com flavonoides e melhorar as suas propriedades físico-químicas.

2.4 Ciclodextrina

2.4.1 Complexos de inclusão com β -ciclodextrina

As ciclodextrinas (CDs) são uma nova classe de excipientes farmacêuticos compostas por unidades de D-glucopiranoose, que unidas originam estruturas cíclicas troncocônicas. As CDs naturais são obtidas com um rendimento maior e possuem seis, sete e oito unidades de glicose, sendo chamadas de α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) e γ -ciclodextrina (γ -CD) respectivamente (Figura 7a). (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007). As CDs modificadas surgiram a partir da tentativa de alterar ou melhorar suas estruturas a fim de obter complexos de inclusão adequados a vários setores, como industrial, alimentício e farmacêutico, e assim um largo número de CDs modificadas tem sido sintetizado (VENTURINI et al., 2008).

As unidades de glicose são conectadas através de ligações α -1,4 glicosídicas, como ilustrado na Figura 7. A consequência estrutural desse modo de ligação é a formação de uma molécula em forma de anel com bordas contendo hidroxilas e o interior da cavidade revestida com uma sequência de grupos com ligações C-H (CONNORS, 1997).

Estruturalmente, esses oligossacarídeos apresentam-se como “cones truncados” com o lado mais largo formado pelas hidroxilas secundárias em C-2 e C-3 e a face mais estreita constituída pelas hidroxilas primárias ligadas em C-6 (Figura 7b). A dimensão da cavidade é determinada pelo número de unidades de glicose constituintes da CD. Os átomos de oxigênio envolvidos nas ligações glicosídicas (em C-1 e C-4) e os átomos de hidrogênio ligados em C3 e C5 determinam o caráter hidrofóbico do interior da cavidade das CD's. A presença das hidroxilas livres na parte externa das CD's confere a essas moléculas um caráter hidrofílico. Esse arranjo estrutural das moléculas de glicose nas CD's possibilita a utilização desses compostos como hospedeiros na formação de complexos de inclusão. A presença de uma cavidade hidrofóbica e de grupos hidroxilas livres na parte externa da molécula permite a “dissolução” em meio aquoso de compostos (hóspedes) de baixa solubilidade (BRITTO, NASCIMENTO JR., SANTOS, 2004).

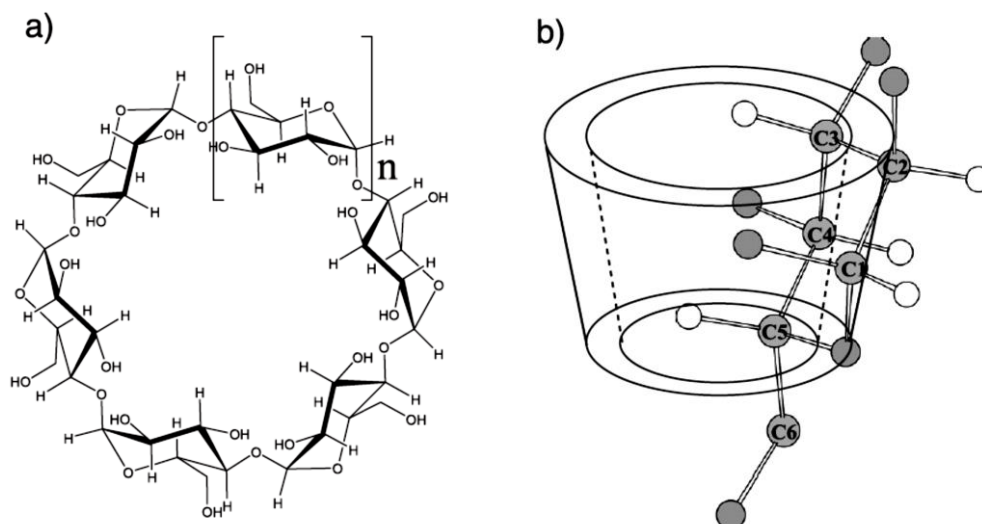


Figura 7. a) Estrutura geral das ciclodextrinas (CD's). Os derivados α , β e γ -CD são definidos por $n=1$, 2 e 3, respectivamente. (b) Representação esquemática da estrutura tridimensional das CD's, mostrando as características estruturais definidas pelo arranjo das unidades de glicose. Fonte: BRITTO, NASCIMENTO J.R., SANTOS, 2004)

A estrutura espacial cônica (Figura 8) e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior conferem as ciclodextrinas propriedades físico-químicas únicas, podendo solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas, ou parte de moléculas, sem que haja o estabelecimento de ligações covalentes entre as duas moléculas. A este fenômeno denomina-se complexação e pode ocorrer tanto em solução quanto no estado sólido (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007; SALTÃO, VEIGA, 2001).

Como já citado, essa característica das ciclodextrinas em formar complexos de inclusão sólidos (hospedeiro-hospede) pode ocorrer com uma variedade de compostos sólidos, líquidos e gasosos através de uma complexação molecular. Nestes, uma molécula é mantida dentro da cavidade da ciclodextrina. A formação do complexo é um ajuste dimensional entre a cavidade do hospedeiro e a molécula hóspede (DEL VALLE, 2004).

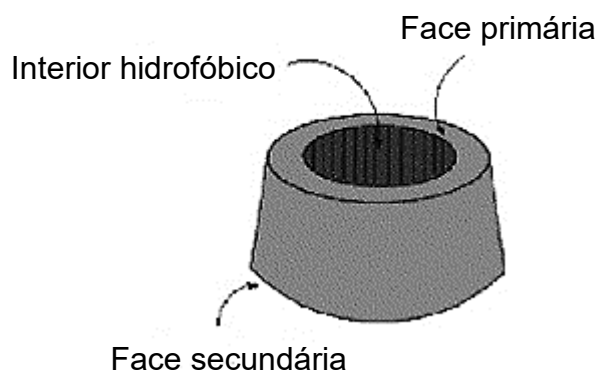


Figura 8. Estrutura espacial cônica de β -ciclodextrina. Fonte: DEL VALLE, 2004.

Geralmente, no complexo de inclusão formado em meio aquoso as moléculas de águas localizadas dentro da cavidade central lipofílica (localização energeticamente desfavorável, pois a interação é polar-apolar) são substituídas por uma molécula hospedeira, lipofílica ou uma porção lipofílica. Contudo, os grupos “hidroxi” na superfície exterior da molécula de ciclodextrina são capazes de formar ligações de hidrogênio com outras moléculas e este oligossacarídeo pode formar complexos solúveis em água com compostos que apresentam baixa solubilidade em meio aquoso (LOFTSSON, DUCHENÊ, 2007). Assim, nenhuma ligação covalente é formada ou quebrada durante a formação do complexo, e as moléculas do fármaco no complexo estão em rápido equilíbrio com moléculas livres na solução (SZEJTLI, 1998; JANSOOKA, OGAWAB, LOFTSSONC, 2018).

Diante disso é que esse excipiente vem sendo utilizado na área farmacêutica não só no incremento da solubilidade, mas também na estabilidade, biodisponibilidade de fármacos, diminuição da irritação gástrica, dérmica ou ocular causada por determinados fármacos, diminuição ou eliminação de odores ou sabores desagradáveis, prevenção de interações entre diferentes fármacos ou entre fármacos e excipientes (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007; SALTÃO, VEIGA, 2001).

Existem várias técnicas utilizadas no preparo para obtenção de um complexo de inclusão (CI), elas podem ser de dois tipos a depender das características do material: em solução aquosa ou no estado sólido. A seguir, um breve resumo dessas técnicas será abordado.

2.4.2 Técnicas utilizadas no preparo de complexos de inclusão com ciclodextrina

2.4.2.1 Em solução aquosa

Para obtenção do complexo, existem diversos tipos de metodologias adotadas, mas a maioria é bem simples e a escolha depende de cada tipo de molécula hospede. A mais simples e rápida é realizada em solução aquosa, em que a CD é solubilizada em água ou solução tampão e em seguida adiciona excesso do composto ativo. Essa suspensão formada é colocada a temperatura constante, sob agitação, por um intervalo de tempo suficiente para atingir o equilíbrio termodinâmico de encapsulação (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007).

2.4.2.2 Em estado sólido

Em estrutura sólida ocorre em situações diferentes das encontradas em soluções aquosas. Na primeira, há um equilíbrio dinâmico entre as moléculas em um meio polar, enquanto que em sistemas sólidos ocorre limitada influência do seu conteúdo aquoso residual devido a propriedade estática. A seguir, serão resumidas algumas técnicas no estado sólido (malaxagem, atomização, liofilização, coprecipitação e fluidização supercrítica) para formação do complexo, mas é importante ressaltar que cada composto possui características particulares diferentes e inerentes a cada sistema (hospede-hospedeiro) e, por isso, as condições devem ser definidas para cada molécula hóspede. (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007).

Uma das técnicas utilizadas em estado sólido é conhecida como malaxagem e consiste na formação de uma pasta a partir da adição da mínima quantidade de líquido (água ou misturas hidroalcoólicas) suficiente para umedecer a mistura sólida de fármaco e CD. Em escala laboratorial, é realizada em um almofariz com auxílio de um pistilo. Industrialmente, a mistura de componentes é efetuada em uma malaxadora (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007).

Outro método é a atomização, um dos mais empregados para produzir complexos a partir de uma solução. Consiste em obter uma mistura parcial do sistema e eliminar rapidamente a água, aumentando a eficiência de complexação. Esta técnica permite controlar o tamanho das partículas obtidas em curtos intervalos de tempo (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007).

O método de liofilização é uma outra técnica em que ocorre a eliminação de solvente dos sistemas em solução através de um prévio congelamento e posterior

secagem a pressões reduzidas. A liofilização permite a obtenção de complexos de inclusão com elevado rendimento e um baixo estresse térmico (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007).

Já a coprecipitação parte de uma solução de fármaco e CD em condições muito próximas à saturação e através de mudanças bruscas de temperatura ou adição de solventes orgânicos. Obtém-se a precipitação do material em forma de complexo de inclusão, onde os cristais formados são coletados por centrifugação ou filtração (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007).

Um dos métodos mais inovadores para obtenção de complexos em estado sólido é o de fluidização supercrítica e utiliza CO₂ gasoso em estado supercrítico, conferindo aos materiais obtidos por esta técnica, características únicas quanto à interação (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007). Apesar da fluidização ser um método atóxico (não utiliza solventes orgânicos), rápido, quimicamente estável (utiliza temperaturas moderadas), de baixo custo de manutenção e com promissores resultados descritos na literatura, ainda é uma técnica experimental que apresenta um custo inicial bastante elevado (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007).

2.4.3 Caracterização de complexos de inclusão com ciclodextrina

Após a preparação do complexo, é necessário caracterizá-lo e isso pode ser feito utilizando alguma técnica sensível que consiga detectar as principais diferenças entre a ciclodextrina, molécula hospede, mistura física e o complexo de inclusão.

Variações nas propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes podem ser identificadas através de metodologias analíticas, que permitam detectar a formação dos complexos (UEKAMA, HIRAYAMA, IRIE, 1998). A maioria dos estudos de caracterização de CI's com CDs em solução são por espectroscopia de absorção UV-Vis, técnica de fluorescência e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Para os estudos que envolvem complexos em fase sólida, são utilizadas com mais frequência as técnicas de difração de Raios-X, estudos térmicos, espectroscopia de IV-TF e estudos de dissolução (LYRA et al., 2010).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), por exemplo, é uma das mais úteis técnicas para estudar interações de CDs com os hóspedes. Trata-se de uma técnica relativamente fácil, rápida e que fornece informações sobre a elucidação estrutural das substâncias envolvidas e orientação correta da molécula hóspede dentro da cavidade (PESSINE, CALDERINI, ALEXANDRINO, 2012)

A RMN como todas as técnicas de espectroscopia trata da interação da radiação eletromagnética com a matéria e é utilizada para determinar a estrutura de substâncias orgânicas. Ela consiste numa técnica que tem como característica o momento magnético do núcleo atômico devido ao spin nuclear resultante. Esse campo magnético do núcleo poderá alinhar ou com o campo externo ou contra esse campo. O fenômeno de RMN ocorre quando núcleos alinhados com um campo aplicado são induzidos a absorver energia e a mudar a orientação de spin em relação ao campo aplicado. Assim, o fóton com a quantidade certa de energia pode absorver e causar a inversão do estado de spin, sendo que a diferença de energia é proporcional à força do campo magnético (PAVIA et al., 2012).

A RMN é de grande utilidade porque nem todos os prótons em uma molécula tem ressonância exatamente na mesma frequência. Isso ocorre porque os prótons de uma molécula estão rodeados por elétrons e estão em ambientes eletrônicos diferentes em relação aos outros. Desta forma, um espectrômetro de RMN de onda contínua, por exemplo, opera pela excitação dos núcleos de determinado isótopo que se observa, um tipo de cada vez e então cada pico de ressonância é observado e registrado de maneira independente em relação aos outros (PAVIA et al., 2012).

A técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) é bastante utilizada na caracterização de sistemas sólidos com CDs, por serem determinações rápidas e precisas, ainda que a informação conseguida por este ensaio apresente limitações. A fraca natureza dos fenômenos envolvidos na complexação torna os desvios e mudanças de intensidade das bandas correspondentes aos grupos químicos do fármaco ou da CD bastante sutis, requerendo uma cuidadosa interpretação dos dados (HEDGES, 1998; CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007).

A maioria dos compostos que possuam ligações covalentes absorvem várias frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho do espectro eletromagnético, sendo que essa região envolve comprimentos de onda maiores do que a luz visível e menor que o micro-ondas. As moléculas ao absorver radiação no infravermelho são excitadas para atingir um estado de maior energia e isso é quantizado. Essa radiação absorvida corresponde à faixa que engloba frequências vibracionais de estiramento e dobramento das ligações na maioria das moléculas mais covalentes. Apenas as ligações que tem um momento de dipolo que muda como uma função do tempo é capaz de realizar a referida absorção. Cada tipo de ligação tem sua própria frequência natural de vibração e dois tipos idênticos de ligações em dois

diferentes compostos estão em dois ambientes levemente diferentes, logo os padrões de absorção no infravermelho (ou espectro de infravermelho) desses dois compostos nunca são exatamente idênticos. Desta forma, o espectro de infravermelho pode servir como uma impressão digital e também para fornecer a informação estrutural de uma molécula (PAVIA et al., 2012).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) fornece informações sobre o grau de interação entre componentes e permite relacionar as propriedades morfológicas dos complexos de inclusão com sua conduta de compressão. Esse método é útil no desenvolvimento inicial dos complexos (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007).

Um microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007).

Sabe-se que o comprimento de onda de um elétron é função de sua energia através das descobertas sobre o dualismo onda-partícula. A energia pode ser comunicada a uma nova partícula carregada por meio de um campo elétrico acelerador. Assim, sob uma alta voltagem, elétrons de comprimento de onda extremamente curto ($\lambda = 0,005 \text{ \AA}$) e, portanto, de poder de resolução potencialmente alto como uma fonte de iluminação, podem ser produzidos. Além disto, devido às suas cargas, os elétrons podem ser focalizados por campos eletrostáticos ou eletromagnéticos e, então, são capazes de formar imagens.

O princípio do MEV consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra, sendo que este sinal recolhido pelo detector é utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007).

Dedavid e colaboradores (2007) ressaltam que o MEV é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia, identificação de elementos químicos de uma amostra sólida, observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas. Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das

amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica.

Diante do conhecimento de técnicas para preparo e caracterização de complexos, destaca-se aqui alguns exemplos da formação de CI com flavonoides.

2.4.4 Complexos de inclusão com flavonoides

Como já foi visto, os flavonoides possuem uma diversidade de atividades farmacológicas tanto *in vivo* quanto *in vitro*, mas muitas vezes os compostos desses grupos possuem limitada solubilidade em água. O preparo de complexos de inclusão de ciclodextrinas com os flavonoides tem o objetivo de melhorar principalmente a solubilidade, mas também a estabilidade, toxicidade e biodisponibilidade.

Estudo apresentou a preparação, caracterização e propriedades do complexo de inclusão da crisina, uma flavona, com β -CD na proporção de 1:3 através do método de cristalização. O processo de inclusão não apenas aumentou a solubilidade da crisina, mas também seu potencial antioxidante, atividade antimicrobiana e atividade antitumoral (ZHU et al., 2016).

Outra pesquisa relatou a formação de CI entre a rutina e quatro ciclodextrinas (β -CD), (2-hidroxiopropil)- α -ciclodextrina (HP- α -CD), (2-hidroxiopropil) – β -ciclodextrina (HP- β -CD) e (2-hidroxiopropil)- γ -ciclodextrina (HP- γ -CD). Resultados de estudos de diagrama de solubilidade mostraram que a rutina formou CI com todas as CDs utilizadas. No entanto, os complexos formados com HP- γ -CD e HP- β -CD apresentaram as maiores constantes de estabilidade. A formação desse complexo de inclusão conferiu graus moderados de proteção contra a degradação pelo calor e radiação UV durante o armazenamento, e aumentou significativamente sua capacidade antioxidante (NGUYEN et al., 2013).

Kim e colaboradores (2008) estudaram a preparação de CI de CDs com flavonas em solução aquosa através do estudo de solubilidade. Avaliaram o efeito da β -CD, heptaquis-(2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina (DM- β -CD) e 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) na solubilidade aquosa de três flavonas: crisina, apigenina e luteolina. Eles observaram melhorias na solubilidade de todas as flavonas obtido com as três CDs, seguindo a seguinte ordem: HP- β -CD > DM- β -CD > β -CD, e além disso, as CDs mostraram maior constante de estabilidade quando complexada com a

luteolina do que com as outras flavonas. O aumento observado da solubilidade da luteolina para as três CDs foi explicado pela diferença de interação eletrostática de cada complexo, especialmente nas ligações de hidrogênio.

Tommasini e colaboradores (2004) mostraram a formação de CI da hesperetina e narigenina com a β -CD e observaram um aumento da solubilidade destes flavonoides após a formação dos complexos. Eles realizaram estudo de diagrama de solubilidade e estudo de dissolução, sendo o método de preparo do CI realizado por co-precipitação.

Por exemplo, estudo recente (SALI et al, 2018) mostraram que a fisetina, um flavonol pouco solúvel em água, complexa com β -ciclodextrina. Eles avaliaram o efeito citotóxico do complexo fisetina/ β -CD em linhagem de células tumorais HepG2 e verificaram que a presença de β -CD não modificou consideravelmente os efeitos de fisetina em células HepG2, mantendo os efeitos.

Żyżelewicz e colaboradores (2018), prepararam complexo de inclusão de (+)-catequina com β -CD por métodos de co-precipitação e liofilização. Avaliaram ainda a atividade antioxidante e observou que a inclusão de (+)-catequina na cavidade de β -CD diminui sua capacidade antioxidante contra espécies reativas de oxigênio.

De forma geral, percebe-se que os complexos de inclusão formados entre flavonoides e CDs aumentam significativamente a solubilidade desse grupo de metabólitos e melhoram ou mantêm suas atividades. Como foi visto a baixa solubilidade em água é uma característica comum a alguns flavonoides. Outra forma de verificar se houve formação de CI envolvendo flavonoides é comparar as atividades farmacológicas da substância livre e do CI. Como a vitexina possui potencial sobre doenças do sistema respiratório, incluindo a asma (VENTURINI et al., 2018), atividades mais específicas podem ser avaliadas para comparar o efeito da formação de complexo. Essas atividades podem ser avaliadas com o modelo experimental de redução de tosse e ação como expectorante, portanto, um breve resumo sobre tosse e produção de muco será relatado.

2.5 Reflexo da tosse e produção de muco pelo sistema respiratório

2.5.1 Considerações sobre o reflexo da tosse

A palavra tosse descreve um reflexo respiratório protetor e é um mecanismo de desobstrução das vias aéreas, podendo ser tanto um sintoma de doenças

respiratórias quanto um movimento voluntário. Desta forma, a tosse pode ser iniciada por uma variedade de estímulos, mas os seres humanos também podem realizá-la sob demanda ou suprimi-la parcialmente. A tosse é um reflexo protetor complexo que remove material irritante ou secreções excessivas das vias aéreas. Além disso, a tosse pode ser uma resposta a agressores ambientais, alterações de temperatura e exposição a estímulos como fumaça de cigarro (SPINO, 2018).

O reflexo da tosse é composto por três fases, inspiratória, compressão e expiratória, respectivamente. A fase inicial é caracterizada por uma inspiração rápida e profunda. Na fase de compressão, a glote se fecha e ocorre aumento da pressão intrapleural pela contração dos músculos expiratórios. E na terceira fase (passados 0,2 segundos), ocorre a abertura da glote, levando a um fluxo intenso de ar. Esse fluxo alto e veloz leva a expelção das secreções contidas no trato respiratório e gera o som característico da tosse (MCCOOLD, 2006; RODRIGUES, GALVÃO, 2017).

A tosse é iniciada após a ativação dos nervos sensoriais das vias aéreas. Estes nervos são adaptados para detectar alterações física e química no ambiente e, se necessário, provocar eventos reflexos de proteção, como a tosse. É importante ressaltar que embora a tosse seja frequentemente descrita como um reflexo, ela também pode ser um evento voluntário e não ser iniciado pela estimulação nervosa sensorial aferente (BONVINI, 2015).

O referido reflexo, que é mediado por nervos sensoriais, termina nas vias aéreas superiores e inferiores. Esses nervos diferem em sua origem (gânglio sensorial), local de terminação (vias aéreas superiores ou inferiores), características fisiológicas (mielinização, velocidade de condução, expressão receptora) e sensibilidade a estímulos (GRACE, et al., 2013).

O início dela se dá pela irritação dos receptores presentes na faringe, traqueia, carina, pontos de ramificação das grandes vias aéreas e porção distal das pequenas vias aéreas. A ativação de tais receptores ocorre por estímulos químicos (ácido, calor e compostos semelhantes à capsaicina) e mecânicos. Os receptores presentes nas fibras C são ativados pela estimulação química e os receptores sensíveis a estímulos mecânicos podem ser encontrados no estômago, pericárdio, pleura, diafragma, faringe, seios paranasais, tímpanos e meato acústico externo. Eles são ativados pelo tato e por distensão (POLVERINO et al., 2012; RODRIGUES, GALVÃO, 2017).

As terminações nervosas sensitivas estão amplamente distribuídas por toda a via aérea, e os terminais estão geralmente próximos às estruturas de epitélio ou

inervação (por exemplo, corpos neuroepiteliais, glândulas mucosas e músculo liso das vias aéreas), embora os terminais não estejam limitados a estes. Receptores presentes em certos nervos sensoriais das vias aéreas alojados no interior do nervo vago detectam estímulos potencialmente perigosos, e se a ativação atingir certo limite, então uma ação potencial é produzida que é levada até o nervo vago e sinapses em regiões distintas da medula, onde o reflexo é processado. Um sinal é então enviado através dos mecanismos parassimpáticos colinérgicos eferentes para causar broncoconstrição ou via nervos motores à laringe, músculos respiratórios e diafragma para causar a tosse (BONVINI, 2015).

Assim, o reflexo da tosse é desencadeado pela estimulação de terminais nervosos aferentes (sensoriais) nas vias aéreas, resultando na coordenação central de fibras motoras que inervam a glote, a parede torácica e o diafragma (TAYLOR-CLACK, 2016).

Os nervos aferentes vagais são ativados e o início da tosse é evidenciado, sendo esta composta por vias aferentes, centrais e eferentes. A via aferente possui fibras nervosas sensoriais vagais, que estão localizadas no epitélio ciliado das vias aéreas superiores e ramos cardíacos e esofágicos a partir do diafragma. Tais aferentes chegam difusamente à medula e deste o estímulo segue para o centro da tosse (porção superior do tronco cerebral e na ponte). O centro da tosse é controlado por centros corticais superiores e gera eferências que estimulam a musculatura respiratória por meio do nervo vago, nervos frênicos e motores espinhais, para desencadear o reflexo da tosse (CANNING et al., 2014; POLVERINO et al., 2012).

O reflexo da tosse tem início quando os canais iônicos nociceptivos são ativados ao longo das fibras. O receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 1 (TRPV1) e receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1). O TRPV1 é um canal catiônico não seletivo presente no músculo liso e epitélio do trato respiratório e na membrana plasmática dos neurônios sensoriais que inervam as vias aéreas superiores e inferiores. Diversos ligantes químicos endógenos e exógenos podem ativar o TRPV1, como compostos vanilóides (capsaicina), metabólitos de ácido araquidônico endógeno e em condições de pH baixo e temperaturas acima de 43°C. O TRPV1 e o TRPA1 não são considerados mecanorreceptores, logo as fibras C são insensíveis a estímulos mecânicos. A ativação dos referidos receptores desencadeia aferências nervosas para o tronco cerebral que emite eferências que alcançam à musculatura respiratória por meio do nervo frênico e dos nervos motores espinhais.

Essas vias nervosas transmitem os impulsos à laringe e a árvore traqueobrônquica, causando o aparecimento da tosse (Figura 9) (SADOFSKY et al., 2014; HUNTER et al. 2016; BONVINI, 2015; RODRIGUES, GALVÃO, 2017).

Os principais mecanorreceptores envolvidos na tosse são os de adaptação rápida (RARs) e os de estiramento de adaptação lenta (SARs). As aferências vagais que apresentam os referidos receptores são insensíveis a estímulos químicos, pois não possuem os canais iônicos TRPV1 ou TRPA1. Os corpos celulares dos neurônios envolvidos nas aferências por estímulos mecânicos estão localizados no gânglio inferior do nervo vago. Os RARs são mediadores primários da tosse que regulam a duração e a magnitude da fase inspiratória e expiratória da tosse. Tanto os RARS quanto os SARS são ativados pela insuflação pulmonar sustentada. Os SARs são altamente sensíveis a estímulos mecânicos exercidos sobre o pulmão durante a respiração. Eles são mais ativos nas vias aéreas superiores, já que existe uma maior área de superfície para despolarização. Quando os SARs são ativados o reflexo da tosse é iniciado (CANNING et al., 2014; RODRIGUES, GALVÃO, 2017)

É necessário destacar que o receptor TRPV1, mesmo sendo conhecido por ativar fibras C, também ativam a fibra A δ , porém a ativação desta possui um efeito indireto. Já o receptor TRPA1 ativa apenas a fibra C. Existem ainda o receptor TRPV4 que é um canal iônico permeável a Ca²⁺, sendo ativado por temperaturas maiores que 24° C e sua ativação nas vias aéreas está associada a liberação de ATP. Similarmente ao TRPV1 e TRPA1, a ativação TRPV4 também está vinculada ao receptor acoplado a proteína G. O receptor TRM8 é também um canal iônico ativado por baixas temperaturas entre 15 e 28°C (BONVINI, 2015).

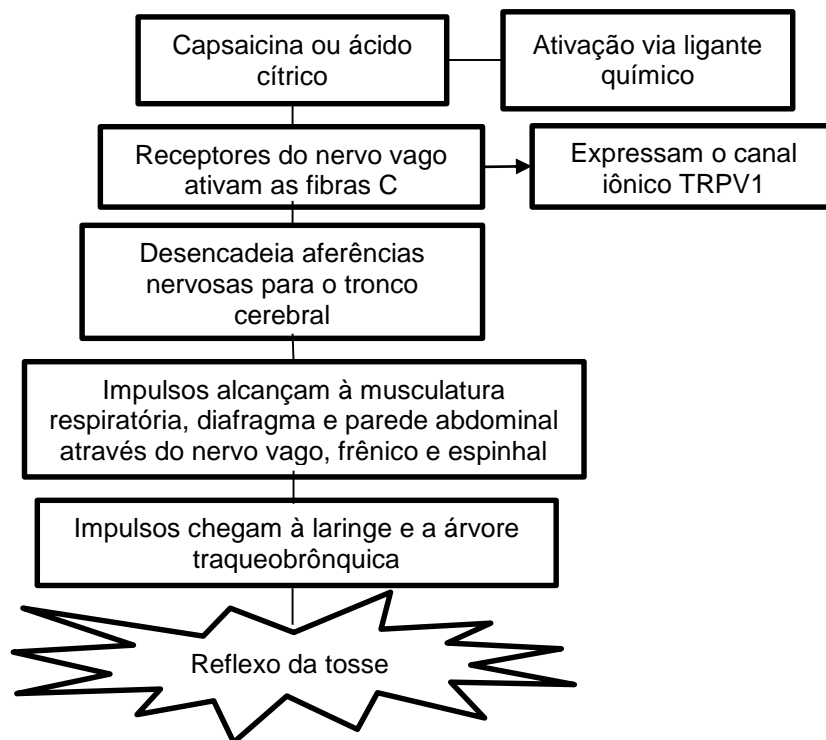


Figura 9. Esquema do reflexo da tosse através de ligante químico ativando as fibras C e expressando o canal iônico TRPV1 da membrana.

Diante do exposto, percebe-se que embora a tosse seja um reflexo protetor natural para eliminar as secreções das vias aéreas, os agentes patogênicos do trato respiratório é um dos sintomas comuns associados à doença inflamatória crônica do trato respiratório, como asma, bronquite crônica, pneumonia e síndrome do gotejamento pós-nasal (SONG et al., 2014).

2.5.2 Considerações sobre produção de muco no sistema respiratório

O epitélio das vias aéreas desenvolveu maneiras de combater ataques, como por exemplo, de fuligem, poeira, micróbios e alérgenos, e sua primeira defesa contra o que invade e danifica o epitélio é a produção de muco. Este muco é um gel viscoelástico que forma uma película fina na superfície das vias aéreas. É um importante mecanismo de defesa homeostático que progride para reduzir o dano epitelial por irritantes inalatórios. Em circunstâncias normais, o muco das vias aéreas protege o revestimento epitelial, aprisionando detritos, bactérias e vírus estranhos, e limpando-os da via aérea por movimentos ciliares, um processo denominado “*clearance*” mucociliar (Figura 10). Já em condições clínicas associadas à hipersecreção de muco nas vias aéreas, como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e fibrose cística (FC), o muco ao invés de protetor torna-se um

contribuinte para determinada doença respiratória (Figura 10). A hipersecreção e as alterações nas propriedades biofísicas do muco podem prejudicar o “clearance” mucociliar, acumulando assim muco nos pulmões o que dificulta a respiração, a morbidade e, em casos graves, mortalidade (ROGERS, 2007; HOUTMEYERS, et al., 1999; DEL DONNO, et al., 2000).

O referido muco das vias aéreas é então uma solução aquosa complexa composta de lipídeos, glicoconjugados e proteínas. Ele é composto ainda de eletrólitos, enzimas e anti-enzimas, oxidantes e antioxidantes, produtos bacterianos exógenos, secreções antibacterianas endógenas, mediadores e proteínas derivadas de células, mediadores e proteínas derivados do plasma (Fig. 10) e ácido desoxirribonucleico (DNA). (ROGERS, 2007).

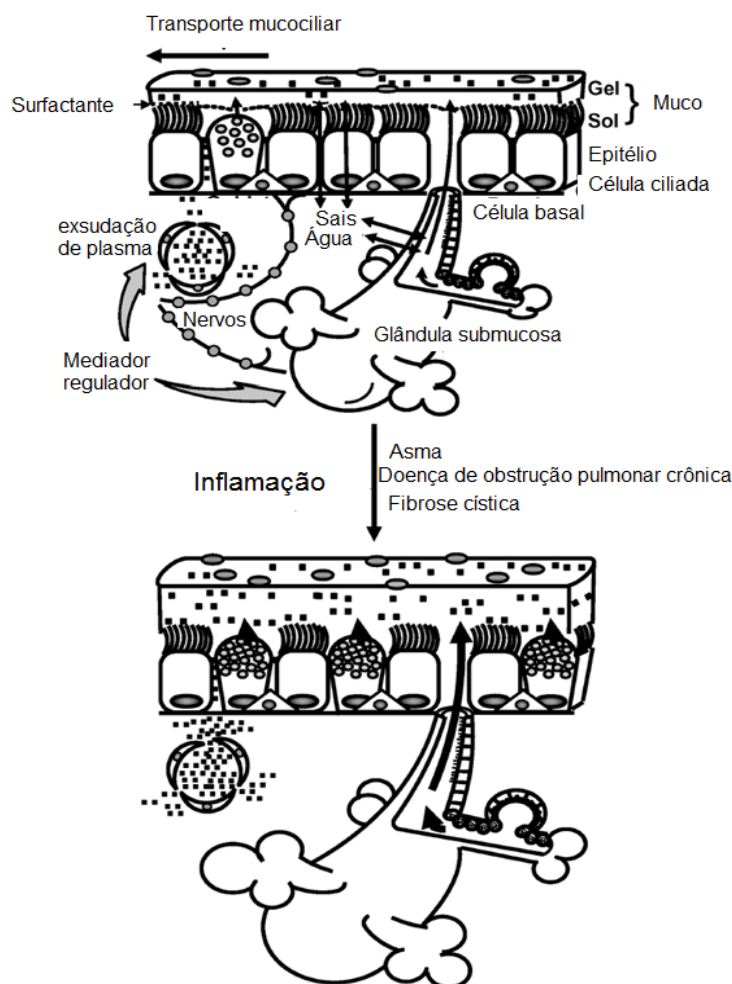


Figura 10. Secreção de muco das vias aéreas e hipersecreção. Fonte: DUNCAN, ROGERS, 2007.

Acredita-se que o muco das vias aéreas forma uma bicamada líquida, sendo uma camada superior chamada gel (viscosa), uma inferior aquosa chamada sol e o

fluido periciliar (Figura 10). É provável que uma fina camada de surfactante esteja entre as fases sol e gel. Presume-se que a função da camada sol inclua a lubrificação dos cílios. A camada surfactante pode facilitar a disseminação do muco sobre a superfície epitelial. Já a camada gel atua retendo partículas e é movida sobre as pontas do batimento ciliar. O fluido periciliar basicamente é composto por água cuja concentração é determinada por transporte ativo de Na e Cl através do epitélio respiratório. As partículas inaladas ficam aderidas a camada gel e são removidos das vias respiratórias por um processo denominado a “*clearance*” mucociliar. Quando o muco atinge a garganta, ou é engolido e entregue para o trato gastrointestinal para degradação, ou, se excessiva, como na doença respiratória, é expelido por “expectoração” (ROGERS, 2007; KNOWLES, BOUCHER, 2002; MORGENRHOT, et al., 2000; TRINDADE, 2007).

Ainda segundo Roges e colaboradores (2007), a figura 10 mostra (parte superior) que nas vias aéreas saudáveis, o muco forma uma dupla camada sobre o epitélio, com o surfactante (linha pontilhada) separando as camadas “gel” e “sol”. Mucinas secretadas por células caliciformes e glândulas submucosas conferem viscoelasticidade ao muco, o que facilita a “*clearance*” mucociliar de partículas inaladas e irritantes. A hidratação do muco é regulada pelo fluxo de sal (e, portanto, água) através do epitélio. As proteínas plasmáticas exsudadas da microvasculatura traqueobrônquica banham a submucosa e contribuem para a formação de muco. Os processos acima estão sob o controle de nervos e mediadores reguladores. A parte inferior da referida figura mostra o processo de inflamação das vias aéreas (asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e possivelmente fibrose cística) que induz a alterações associadas a um fenótipo de hipersecreção de muco, incluindo aumento da exsudação plasmática (mais predominante na asma do que a DPOC ou FC), hiperplasia de células caliciformes, através de diferenciação das células basais e associado aumento da síntese e secreção de muco e hipertrofia da glândula submucosa (com aumento associado da produção de muco), levando ao aumento do muco luminal (e obstrução das vias aéreas).

Em indivíduos saudáveis o muco é primariamente transportado pelos cílios, porém em vários estados patológicos onde existe uma hiperprodução de muco, o “*clearance*” pela tosse e espirro assume um papel fundamental. A tosse é caracterizada por uma inspiração de aproximadamente 2 litros de ar, com um rápido fechamento da glote e aumento da pressão pleural para 100 cm H₂O ou mais. Com a

abertura da glote ocorre a liberação de um fluxo de ar bifásico com componente inicial rápido com duração de aproximadamente 30-50 milissegundos seguido de um componente mais lento, que viaja ao longo da traqueia parcialmente colapsada. O gás expirado atinge a camada de muco e transfere parte de sua energia cinética causando a movimentação do muco em direção a glote (TRINDADE, 2007; MACCHIONE et al., 1995).

A efetividade na remoção do muco é dependente da magnitude do pico do fluxo gerado durante a tosse. A pressão intrapulmonar elevada alcançada a partir de uma inspiração profunda, do fechamento da glote e da contração da musculatura expiratória proporciona altos fluxos na fase explosiva da tosse e este alto fluxo transfere energia cinética do ar para a secreção ou para o corpo estranho, removendo-os da parede brônquica e transportando-os até a faringe ou a boca, onde podem ser eliminados. Para que este mecanismo aconteça de forma satisfatória, é necessário haver atividade neuromuscular intacta e coordenação efetiva (FREITAS, PARREIRA, IBIAPINA, 2010).

Assim, quando se utiliza um fármaco expectorante pretende-se diminuir a viscosidade do muco ou fluido periciliar. Embora essa diminuição não seja suficiente para melhorar a “*clareance*” no caso de líquido de superfície das vias aéreas empobrecido, melhorar a hidratação do fluido periciliar pode separar as secreções do epitélio, diminuindo a tenacidade e melhorando a transportabilidade e a “*clareance*” (SONG et al., 2014). Portanto, há uma demanda crescente por fármacos que promovam atividades antitússicas e expectorantes com menos efeitos adversos.

No entanto, não basta apenas encontrar substâncias com ação antitússígena e expectorante, pois isso não garante a segurança do futuro produto, para isso é necessário avaliar a sua toxicidade e um dos métodos de triagem mais simples utiliza a *Artemia salina* como organismo de observação, conforme será descrito a seguir.

2.6 Toxicidade utilizando *Artemia salina*

Existem várias metodologias *in vitro* e *in vivo* para determinação da toxicidade de extratos vegetais, frações e substâncias isoladas de plantas. Há uma grande discussão sobre a utilização de animais em determinados experimentos, como o da toxicidade, por exemplo, pois inicialmente pode-se fazer a utilização de métodos

alternativos *in vitro* como prévia de estudos *in vivo* ou até mesmo para substituir (FRAZIER, 1992).

Um dos métodos alternativos amplamente utilizados em triagem de substâncias de origem vegetal é o método que utiliza a *Artemia salina*. Este organismo é um microcústáceo da ordem Anostraca utilizado na alimentação de peixes e camarões por seu alto valor nutritivo. Possui como característica a de nadar com a parte ventral do corpo voltada para cima, direcionada para a luminosidade e de estarem sempre em locomoção, por serem animais filtradores e dependentes disso para alimentar-se e respirar (ASEM, 2008). É um método que avalia preliminarmente a toxicidade de substâncias, sendo conhecido por seu baixo custo já que os ovos de *A. Salina* custam em média R\$ 7,00 cada grama, duração do experimento é em torno de 2 a 3 dias e não exige técnicas assépticas nem autorização de comitê de ética para utilização. Inúmeros constituintes bioativos têm sido obtidos de extratos vegetais utilizando este teste na monitoração de estudos fitoquímicos (SIQUEIRA et al., 1998).

A metodologia utilizando *Artemia salina* faz uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, DL_{50} , de extratos de plantas sobre esse microcústáceos, considerando que quando verificados valores acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e não havendo morte acima de 50%, estes, são considerados atóxicos (MEYER, et al., 1982).

Desta forma, o referido teste de letalidade utiliza um método simples na pesquisa de produtos naturais e que possui uma boa correlação com testes de toxicidade aguda oral *in vivo*, sendo que o procedimento determina valores de concentração letal média (DL_{50}), em $\mu\text{g/mL}$, de compostos e extratos, sendo que inúmeras substâncias ativas conhecidas apresentam toxicidade por este teste (MEYER et al., 1982; PARRA et al., 2001).

3. Justificativa

Em pesquisa de mestrado (COSTA, 2014) foi isolada vitexina de *Jatropha mutabilis*, dado relatado pela primeira vez para esta espécie. Em busca realizada na literatura, uma diversidade de atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* foram encontradas para a mesma, incluindo anticâncer, antioxidante, anti-inflamatória, antinociceptiva, anti-hipertensiva, antiespasmódica, antiviral e antidepressiva (AN et al., 2015; ROSA et al., 2016; BORGHI et al., 2013; YANG et al., 2013; EPSTEIN SHOCHET et al., 2015; DEMIR OZKAY, CAN, 2013; ZHU et al., 2016; JE et al., 2014; RAGONE et al., 2007; KRATOVIC et al., 2008; CAN, DEMIR OZKAY, UCEL, 2013; HE et al., 2016).

No entanto, um dado mais recente chamou a atenção, pois mostrava que concentrações baixas de vitexina (0,2, 1 e 5 mg/kg) administradas via oral em camundongos inibiu a inflamação na asma alérgica induzida por ovalbumina (VENTURINI et al., 2018). Desta forma, como os autores da referida pesquisa mostraram o potencial da vitexina sobre essa doença do sistema respiratório, propôs-se avaliar as atividades expectorantes e antitussígena dessa flavona. Para complementar, como foi visto que a vitexina possui baixa solubilidade em água, sugeriu-se formar complexos de inclusão da mesma com β -CD e observar o efeito. Além disso, como não haviam estudos sobre a validação de metodologia analítica para quantificação de vitexina em *Jatropha mutabilis*, também se propôs a realizá-lo.

As doenças respiratórias estão entre as principais causas de morte no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, as quatro doenças pulmonares mais comuns (pneumonia, tuberculose, câncer de pulmão e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) serão responsáveis por cerca de uma em cada cinco mortes no mundo em 2030. Além da mortalidade prematura, as doenças têm um impacto dramático na sociedade no que diz respeito à deficiência, aos custos dos cuidados de saúde e à perda de produtividade. Assim, a prevenção e o controle de doenças respiratórias representam um dos principais objetivos em termos de política de saúde (SÉCHER et al., 2018). Nesse contexto, a tosse e a produção de muco estão associadas às doenças respiratórias, sendo os sintomas mais comuns entre elas. Portanto, é necessária uma busca por substâncias de origem vegetal que tenha algum tipo de atividade antitussígena e/ou expectorante com efeitos adversos mínimos.

4. Hipótese

Estudos mostram que substâncias isoladas de plantas medicinais geralmente apresentam algum tipo de atividade biológica, assim como seus extratos e frações. Pesquisas apresentam a vitexina como tendo potencial no tratamento de doenças respiratórias, incluindo a asma (VENTURINI et al., 2018). Como não há nenhum tipo de estudo em relação a atividade antitussígena e expectorante da vitexina propõe-se que a mesma possa apresentá-las. Em consonância, por a vitexina apresentar baixa solubilidade em água, pretende-se ainda comparar tais atividades para essa flavona livre e também para o complexo de inclusão de vitexina com β -ciclodextrina, já que este oligossacarídeo atua no incremento da solubilidade de substâncias através da inclusão destas em sua cavidade.

5. Objetivos

5.1. Geral:

Produzir complexo de inclusão de vitexina com β -ciclodextrina, bem como avaliar as atividades expectorantes e antitussígenas dessa flavona e do complexo de inclusão vitexina/ β -CD.

5.2. Específicos:

- Isolar vitexina das folhas de *Jatropha mutabilis*;
- Validar metodologia analítica por CLAE-DAD para quantificação de vitexina em extrato etanólico bruto de *Jatropha mutabilis*;
- Preparar e caracterizar o complexo de inclusão vitexina/ β -CD por técnicas como Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF);
- Avaliar os efeitos expectorantes e antitussígenos em camundongos tanto da vitexina quanto do complexo de inclusão vitexina/ β -CD;
- Avaliar a Toxicidade frente a *Artemia Salina* da vitexina e do complexo de inclusão vitexina/ β -CD.

6. Material e Métodos

6.1 Coleta do material vegetal

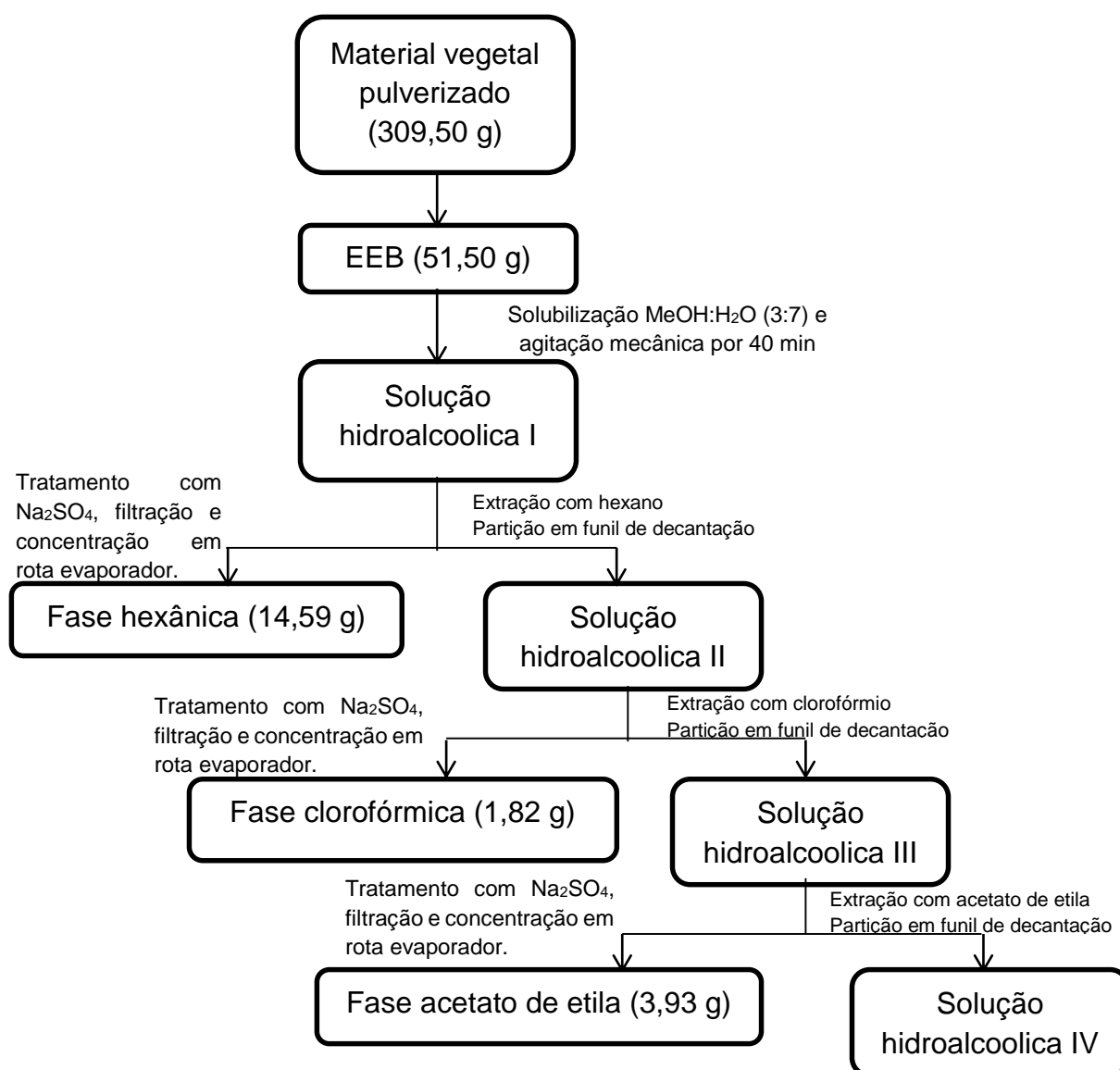
O material vegetal (folhas) de *Jatropha mutabilis* foi coletado no Centro de Recuperação de Áreas Degradadas da UNIVASF (coordenadas geográficas 09°19'32,60''S, 040°32'51,20''W, 387 m de altitude) no município de Petrolina, no estado de Pernambuco, sendo a exsicata depositada no Herbário da UNIVASF (HVASF) da cidade de Petrolina com número de tombo #14316. A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos sob número AB715E4.

6.2 Isolamento e identificação de vitexina

As folhas de *Jatropha mutabilis* coletadas (1,52 kg) foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar a 40 °C por 8 dias consecutivos. Após a retirada da umidade, o material foi pulverizado em moinho mecânico, fornecendo 309,5 g de folhas. As folhas secas e pulverizadas foram maceradas à temperatura ambiente com álcool etílico a 95 % em recipiente de aço inoxidável, sendo realizadas extrações num intervalo de 72 horas entre cada extração. A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo a uma temperatura de aproximadamente 50 °C, obtendo-se 56,5 g de extrato etanólico bruto (Jm-EEB).

O Jm-EEB (51,5 g) foi solubilizado em uma mistura de metanol e água, MeOH:H₂O (3:7, v/v), sob agitação mecânica por 40 minutos para homogeneização, resultando na formação da solução hidroalcóolica I. Esta foi submetida a uma partição do tipo líquido/líquido em funil de decantação com o solvente hexano. A mistura anterior foi agitada, sendo em seguida colocada em repouso para promoção da decantação. Após este processo físico, duas fases foram observadas e coletadas em recipientes separados, a fase hexânica (Jm-Hex) e a solução hidroalcóolica II. Uma nova partição foi feita com esta solução e o solvente clorofórmio, resultando nas fases clorofórmica (Jm-CHCl₃) e solução hidroalcóolica III. Com esta última, foi feita uma partição com o solvente acetato de etila, obtendo-se a fase acetato de etila (Jm-AcOEt) (Fluxograma 1).

Fluxograma 1 - Fracionamento do extrato etanólico bruto (Jm-EEB) de *Jatropha mutabilis*.



Às fases obtidas foi adicionada uma pequena quantidade de um agente dessecante, o sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), intercalando-se vigorosa agitação. Em seguida, foram filtradas e concentradas em evaporador rotativo a $50\text{ }^\circ\text{C}$. Este procedimento resultou na obtenção das fases Jm-Hex (14,59 g), Jm- CHCl_3 (1,82 g) e Jm-AcOEt (3,93 g).

Durante a concentração da Jm-AcOEt em rota evaporador, ocorreu a formação de um precipitado de coloração amarelada no fundo do balão. O concentrado desta fase foi solubilizado em acetato de etila enquanto que o precipitado já citado ficou aderido às paredes do balão, sendo posteriormente solubilizado parcialmente em metanol e submetido a uma sonicação em aparelho de ultrassom para desprender o

precipitado (Jm-1) do recipiente, obtendo-se 725,5 mg de Jm-1. Para purificação de Jm-1, o mesmo foi submetido à recristalização com metanol. Os experimentos relatados acima foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Farmacognosia da UNIVASF (campus centro em Petrolina-PE).

Jm-1 foi identificada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), sendo solubilizada em DMSO (DMSO-d6). Os espectros uni de ^1H -RMN (400 MHz), ^{13}C RMN (100 MHz) e bidimensionais (HSQC, HMBC e COSY) das amostras foram obtidos com um espectrômetro Bruker Ascend 400. Os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados para RMN de ^1H pelos picos característicos dos hidrogênios em relação ao tetrametilsilano (TMS), Dimetilsulfóxido-DMSO ($\delta\text{H} = 2,49$). As multiplicidades das bandas de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (simpleto), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (triplete) e *m* (multiplete). As análises de RMN foram realizadas pela Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos (CAFMA) da UNIVASF (campus centro em Petrolina-PE).

6.3 Validação de metodologia analítica para quantificação de vitexina em extrato etanólico bruto (EEB) de *Jatropha mutabilis*

6.3.1 Preparação das soluções estoque de extrato de *Jatropha mutabilis*

Soluções estoque (2 mg/mL) foram preparadas a partir de 50 mg do Jm-EEB, que foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e solubilizadas com metanol/acetonitrila grau HPLC (1:1). Uma sonicação por 5 min foi usada para otimizar o processo de solubilização. Seis diferentes concentrações que variaram de 400 a 900 $\mu\text{g/mL}$ foram preparadas a partir das soluções estoque. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Todas as análises de validação foram realizadas na CAFMA da UNIVASF (campus centro em Petrolina-PE).

6.3.2 Preparação das soluções estoque de vitexina

Soluções estoque de vitexina (256 $\mu\text{g/mL}$) foram preparadas utilizando metanol/acetonitrila grau-HPLC como solvente e sonicadas por 5 minutos. Diluições com a mesma proporção de metanol/acetonitrila foram realizadas e obtidas soluções que variavam de 2 $\mu\text{g/mL}$ a 128 $\mu\text{g/mL}$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

6.3.3 Instrumentação e condições cromatográficas

As análises foram realizadas utilizando um HPLC (Shimadzu®, Japão) sistema composto por uma bomba quaternária (modelo LC-20ADVP) acoplada a detector de arranjo de diodos (Modelo SPD, 20AVP), compartimento de coluna termostaticado (modelo CTO, 20ASVP), injetor automático (modelo SIL, 20ADVP), controlador (modelo SCL, 20AVP) e desgaseificador (modelo DGU, 20A). A coleta de dados e análises foram realizadas usando o software Shimadzu® LCSolution™. Todas as soluções foram desgaseificadas e filtradas através de um filtro de poros de 0,45 µm (Chromfilter®, Xangai, China). Foi utilizada uma coluna RP C-18 (150 × 4,6 mm), tamanho de partícula de 2,7 µm (Agilent®, Poroshell). A fase móvel do método desenvolvido foi composta por acetonitrila como solvente A e ácido fórmico 0,1% como solvente B. As separações foram efetuadas por um gradiente linear como segue: 0.01-40.0 min, 90-72% B; 40.0-50.0 min, 72-90%. Cada corrida foi seguida pelo tempo de equilíbrio de 10 min. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 0,4 mL/min e o volume de injeção foi de 10 µL. Os ensaios cromatográficos foram realizados a 37 °C. A detecção de UV foi realizada a 336 nm.

6.3.4 Validação de método

Na validação do método analítico utilizado para quantificar a vitexina no extrato de *Jatropha mutabilis*, os seguintes parâmetros foram determinados: especificidade, linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), de acordo com os padrões estabelecidos pela RDC 166/2017 da ANVISA (BRASIL, 2017) e documento INMETRO DOQ-GCRE-008, de março/2003.

6.3.4.1 Especificidade

A especificidade foi demonstrada pela análise de uma solução de 700 µg/mL do extrato de *Mimosa tenuiflora* sob as mesmas condições cromatográficas do extrato de *Jatropha mutabilis* e vitexina (substância de referência). Compararam-se os tempos de retenção e espectro de UV obtidos nos cromatogramas.

6.3.4.2 Linearidade

A linearidade foi determinada pela construção de três curvas de calibração com cinco pontos cada, com as concentrações de vitexina no extrato obedecendo ao limite de 80 a 120% da faixa de trabalho. As curvas padrão foram obtidas pela construção de gráficos de concentração versus área absoluta. A equação da reta foi determinada por meio do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e a análise de variância por ANOVA foi realizada para verificação da linearidade do método.

6.3.4.3 Limite de detecção e Limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados a partir das curvas de calibração do padrão vitexina. O LD foi calculado de acordo com a expressão $(DP \times 3,3)/IC$, em que DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y, IC é a inclinação das curvas de calibração. O LQ foi estabelecido usando a expressão $(DP \times 10)/IC$ (BRASIL, 2017).

6.3.4.3 Exatidão

A exatidão foi determinada a partir de ensaio de recuperação de padrão, isto é, por meio da adição de quantidades conhecidas de vitexina nas soluções do extrato etanólico de *Jatropha mutabilis*. Alíquotas de 100 µL de solução de vitexina (32 µg/mL) foram adicionadas a volumes conhecidos de soluções do extrato nas concentrações de 400, 700 e 900 µg/mL, visando avaliar a porcentagem de recuperação em cada nível de concentração. Cada solução foi preparada em triplicata. A exatidão foi expressa pela relação percentual entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2017).

6.3.4.4 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermédia de acordo com a RDC 166/2017 (BRASIL, 2017). Para repetibilidade, 6 soluções diferentes (700 µg/mL) do EEB foi preparado pelo mesmo analista. A precisão intermediária foi avaliada em dois dias e por dois analistas. O resultado foi expresso como o desvio padrão relativo (DPR), conforme o resultado obtido em seis medições

intradia e dezoito medições interdia da solução do extrato na concentração correspondente a 700 µg/mL.

6.3.4.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio de pequenas modificações nas condições cromatográficas, tais como vazão (0,3 e 0,5 mL/min) e temperatura (36 e 38°C).

6.4 Preparação e caracterização do complexo de vitexina/ β -ciclodextrina

6.4.1 Preparação de complexo vitexina/ β -ciclodextrina e mistura física

Foram preparados complexos de vitexina/ β -CD, em que tanto o flavonoide (50 mg) quanto a β -CD (131,1 mg) foram misturadas com metanol (~700 mL), sonicadas em aparelho de ultrassom por 15 minutos a 25° C e em seguida rotaevaporados a 40° C durante 40 minutos. Em seguida, o precipitado obtido foi solubilizado em água para garantir que todo o complexo formado fosse solubilizado em água, filtrado para retenção de precipitado não complexado (vitexina, 9,9 mg) e submetidos à secagem em estufa com circulação de ar a 40°C. Após secagem, o complexo vitexina/ β -CD (171,1 mg) foi reservado. Todos os cálculos utilizando o complexo resultante foram corrigidos ao equivalente de vitexina retida no papel de filtro, inclusive para administração das mesmas nos animais, a referida diferença foi utilizada para correção.

6.4.2 Caracterização do complexo

6.4.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para elucidação da estrutura da substância, os espectros unidimensionais de ^1H -RMN (400 MHz), ^{13}C RMN (100 MHz) e bidimensionais COSY, HSQC, HMBC e ROESY das amostras foram obtidos com um espectrômetro Bruker Ascend™ 400. A vitexina foi solubilizada em DMSO (DMSO-d6). A β -CD e a vitexina/ β -CD foram solubilizadas em água deuterada (D_2O).

6.4.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)

Os espectros de IV-TF foram registrados em um espectrômetro Spectrum Two™ da Perkin Elmer Versão 10.4.00. A análise foi realizada entre 4000 e 400 cm^{-1} ,

utilizou pastilhas de brometo de potássio, para obtenção de espectros com bandas de absorções referentes aos grupos funcionais das amostras. Essa análise foi realizada no Instituto Federal do Sertão Pernambucano (IF-Sertão Campus Petrolina).

6.4.2.3 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A amostra foi fixada em adesivo dupla face de carbono e inserida no *stub* com superfície plana circular de 1,2 cm de diâmetro. Em seguida, procedeu-se com a deposição de ouro a uma taxa de 5 nm por minuto, durante 5 minutos, pelo método de *Sputtering*, utilizando um equipamento QUORUM modelo Q150R. A caracterização através da MEV foi realizada em um microscópio VEGA3 TESCAN, operando com tensão de 10 kV. Essa análise foi realizada na UNIVASF campus Juazeiro-BA.

6.4.2.4 Estudo de dissolução *in vitro*

Para determinação do comprimento de absorção máxima uma solução de vitexina foi preparada com solução NaCl (0,15 M) acidificada em pH 1,5 com HCl, a 37 °C. A varredura foi realizada em comprimentos de onda de 200-400 nm usando um espectrofotômetro Even® UV-Vis. Em seguida uma curva de calibração a 340 nm ($y = 0,0162x - 0,0216$ e $R^2 = 0,9957$, onde x é a concentração de vitexina e y é a Absorbância) foi construída através das absorbâncias correspondentes as concentrações de 2, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL de vitexina em solução NaCl (0,15 M) acidificada (pH 1,5) com HCl, a 37 °C.

Para estudo do perfil de dissolução, 3 mg de vitexina livre e do complexo vitexina/ β -CD (equivalência de 3 mg de vitexina no complexo) foram colocados, separadamente, em 50 mL de solução NaCl (0,15 M) acidificada (pH 1,5) com HCl. O experimento foi realizado sob agitação magnética (100 rpm) e temperatura de 37 °C. Alíquotas das amostras foram coletadas ao longo do tempo e analisadas em espectrofotômetro a 340 nm para determinar a quantidade de vitexina solubilizada no meio. Todas as análises foram realizadas em triplicata (WANG et al., 2011; PIRES, ALMEIDA, MEIRELLES, 2016).

6.5 Avaliação farmacológica

6.5.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos albinos Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 25-30 g, procedentes do Biotério Setorial da UNIVASF (Petrolina/PE). Antes dos experimentos, todos os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com condições ambientais padrões (22°C, ciclo 12/12, claro/escuro) e com livre acesso à ração e água. Os animais foram mantidos em jejum por 2 h antes do experimento. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os regulamentos da legislação brasileira e a comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco registrou a autorização através de nº 0008/180816.

6.5.2 Avaliação da atividade expectorante a partir da quantificação do marcador vermelho de fenol

Camundongos machos pesando 25-30 g (n=5/grupo) foram pré-tratados por via oral com Guaifenisina 100 mg/kg (controle positivo), vitexina (0,2, 1 ou 5 mg/kg) (VENTURINI et al., 2018), complexo vitexina/ β -CD (dose da flavona a 0,2, 1 ou 5 mg/kg), β -CD (controle negativo) e água (controle negativo). Após 30 minutos, foi administrada suspensão de vermelho de fenol (500 mg/kg) por via intraperitoneal. Transcorridos 30 minutos, os animais foram anestesiados com tiopental sódico 160 mg/kg via intraperitoneal, sendo posteriormente eutanasiados. O lavado bronco alveolar (LBA) foi obtido com 2 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl a 0,9 %), recuperando aproximadamente 1 mL de LBA, sendo 600 μ L submetidos a centrifugação (2500 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante (500 μ L) foi transferido para outro recipiente e houve adição de 50 μ L de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M). A concentração do vermelho de fenol foi mensurada por densidade óptica em comprimento de onda de 565 nm e os resultados expressos em μ g/mL. Uma curva padrão ($y=0,1741x+0,0168$ e $R^2=0,99$) foi obtida com concentrações de 0,1 a 10 μ g/mL de vermelho de fenol (ENGLER, SZELENYL, 1984; LIN et al., 2008; LIU, WANG, LIU, 2009; SCHICKANEDER, ENGLER, SZELENYL, 1987).

6.5.3 Avaliação da atividade antitussígena em camundongos

Os animais (n= 6/grupo) foram colocados em câmara de vidro de 500 mL e expostos, individualmente, por aeração com nebulizador a uma solução de ácido cítrico 0,4 M durante 3 minutos, sendo observada a frequência de tosse (quantas vezes o animal tossiu em 3 minutos). O comportamento de tosse foi padronizado por uma contração abdominal seguida de uma distinta abertura da boca, sendo contadas quantas vezes isso aconteceu durante a exposição. Na triagem, utilizou-se como critério de inclusão de animais no teste um número de tosse superior a 3 (subresponsivos) e inferior a 20 (hiperresponsivos). Após a triagem e passadas 23 h e 30 minutos de exposição do animal ao agente tussígeno, administrou-se por via oral soluções de Codeína (30 mg/kg), vitexina (0,2, 1 ou 5 mg/kg) (VENTURINI et al., 2018), vitexina/ β -CD (dose da flavona a 0,2, 1 ou 5 mg/kg no complexo) e β -CD (controle negativo) e água (controle negativo). Decorridos 30 minutos do pré-tratamento, os animais foram expostos a nebulização com ácido cítrico 0,4 M durante 3 minutos, sendo observadas e registradas a frequência de tosse. (KAMEI et al., 2007, 2011 e 2013; TANAKA, MARUYAMA, 2005).

6.6 Toxicidade com *Artemia salina*

A toxicidade foi avaliada utilizando o teste de letalidade descrita por Meyer et al. (1982) e adaptadas por Moreira et al. (2003). Estes utilizam a concentração letal média (CL₅₀) como parâmetro de atividade biológica. Larvas de *Artemia salina*, foram utilizadas na forma de náuplios.

Um recipiente de vidro (17 x 10 cm) preenchido com solução de sal marinho artificial (38 g/L) foi utilizado para eclodir os ovos de *Artemia Salina*. Um plástico divisor com vários furos de aproximadamente 2 mm foi adicionado ao recipiente para formar dois compartimentos desiguais. Os ovos (25 mg) foram colocados dentro no maior compartimento, protegido da luz, enquanto que o menor compartimento era iluminado. Após 30 h, as larvas de *A. salina* eclodiram e migraram para o compartimento iluminado.

Soluções estoque de vitexina e complexo foram preparadas a 5 mg/mL em água com 3% de DMSO. Alíquotas foram adicionadas a 5 mL de solução de sal marinho e colocadas 10 larvas de *A. Salina*. As concentrações do teste foram 1, 10, 100 e 1000 μ g/mL. O teste foi realizado em triplicata. Um controle negativo foi realizado, com 10 larvas e solução de sal marinho com DMSO (3%).

6.7 Análise dos dados

Os dados da validação de metodologia analítica foram submetidos à análise estatística utilizando o OriginPro8®. Quando aplicável, utilizou-se Análise de Variância (ANOVA) one-way e teste *t* de Student com nível de significância de 95%.

Os dados numéricos foram expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m). As diferenças entre as médias foram comparadas usando o teste *t* Student não-pareado, análise de variância de uma via (ANOVA *one-way*) com pós-teste de Tukey ou análise de variância de duas vias (ANOVA *two-way*) com medidas repetidas (Para antitussígena, dias 1 e 2), seguido de pós-teste de Sidak, usando o Graphpad Prism 6. As diferenças foram consideradas significantes quando o valor calculado de *p* foi menor que 0,05 (* $p < 0,05$).

7. Resultados e Discussão

7.1 Elucidação estrutural de vitexina

A partir das folhas de *Jatropha mutabilis* obteve-se o extrato etanólico bruto (56,5 g Jm-EEB), deste 51,5 g foram particionados, resultando nas fases Jm-Hex (14,59 g), Jm-CHCl₃ (1,82 g) e Jm-AcOet (3,93 g). Durante a concentração em rotaevaporador, a substância Jm-1 (725,5 mg) que precipitou na fase Jm-AcOEt das folhas de *J. mutabilis* como um sólido amarelo foi submetida a várias recristalizações com metanol para purificação. Para purificação, ao sólido era adicionado metanol, essa mistura era aquecida e, em seguida, resfriada. Posteriormente, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o sobrenadante era separado do precipitado (Jm-1). Esse procedimento foi repetido por várias vezes até obter-se um sobrenadante incolor. A substância Jm-1 (precipitado amarelo) foi solúvel apenas em DMSO, sendo submetida a análise espectroscópica de RMN de ¹H e ¹³C e bidimensionais para elucidação estrutural.

O espectro de RMN ¹H de Jm-1, mostrado na Figura 11, apresentou vários sinais de multiplicidade variadas na faixa entre δ H 3 a 4 ppm característicos provavelmente de unidade osídica. Nesta região, têm-se vários sinais como multipletos, tripletos e dubletos correspondentes aos hidrogênios do açúcar (Figura 12).

O sinal em δ H 2,49 ppm é um deslocamento do solvente que neste caso é o dimetilssulfóxido (DMSO).

Verificou-se ainda a presença de quatro sinais intensos na região de átomos de hidrogênio ligados a carbonos aromáticos (Figura 13), pois geralmente as faixas aproximadas de deslocamentos químicos (ppm) desses prótons é entre δ H 6,0 a 8,0 ppm (PAVIA et al, 2010). Destes sinais, dois são dubletos em δ H 6,9 (2H, d, $J= 8$) e δ H 8,0 (2H, d, $J= 8$) ppm, ou seja, característico de uma simetria presente na estrutura, pois cada sinal tem integração para dois hidrogênios, sendo que a constante de acoplamento indica posição orto para estes sinais.

Observou-se também a presença de um singlete em δ H 13,1 ppm que é característico de hidroxila quelatogênica e dois singletos largos com pouco intensidade em δ H 10,3 e 10,8 ppm característicos de hidroxilas bastante desprotegidas (Figura 11).

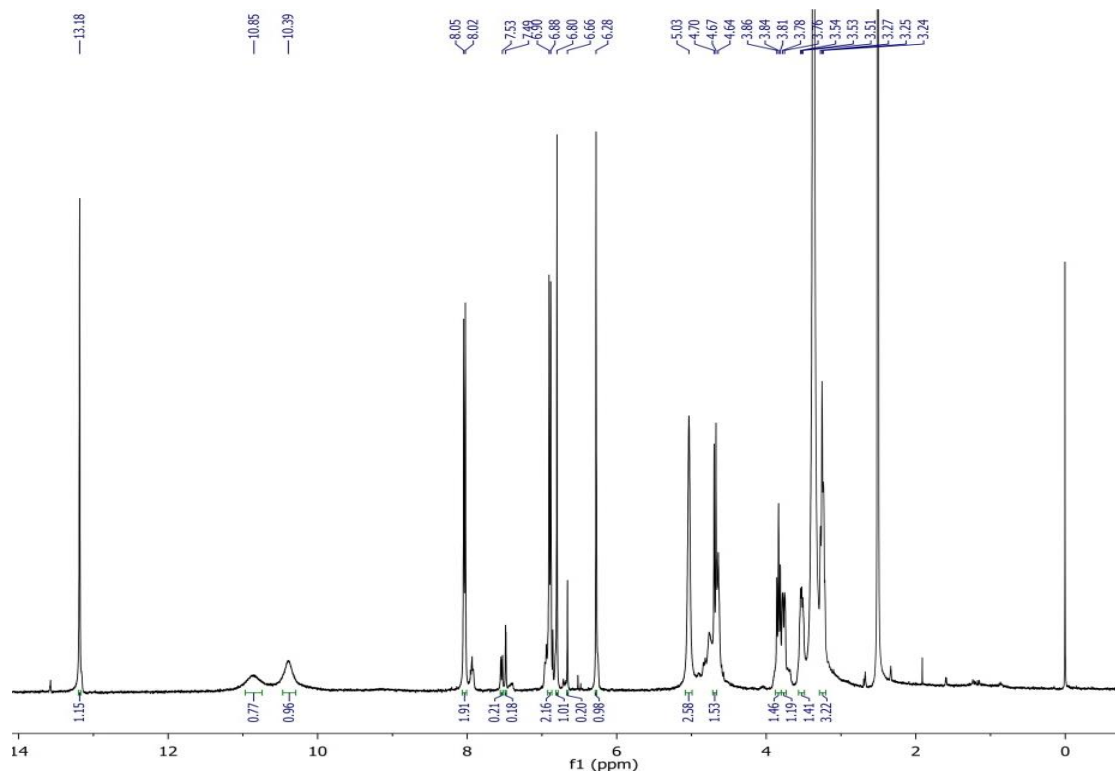


Figura 11. Espectro de RMN ^1H de Jm-1 (DMSO, 400 MHz).

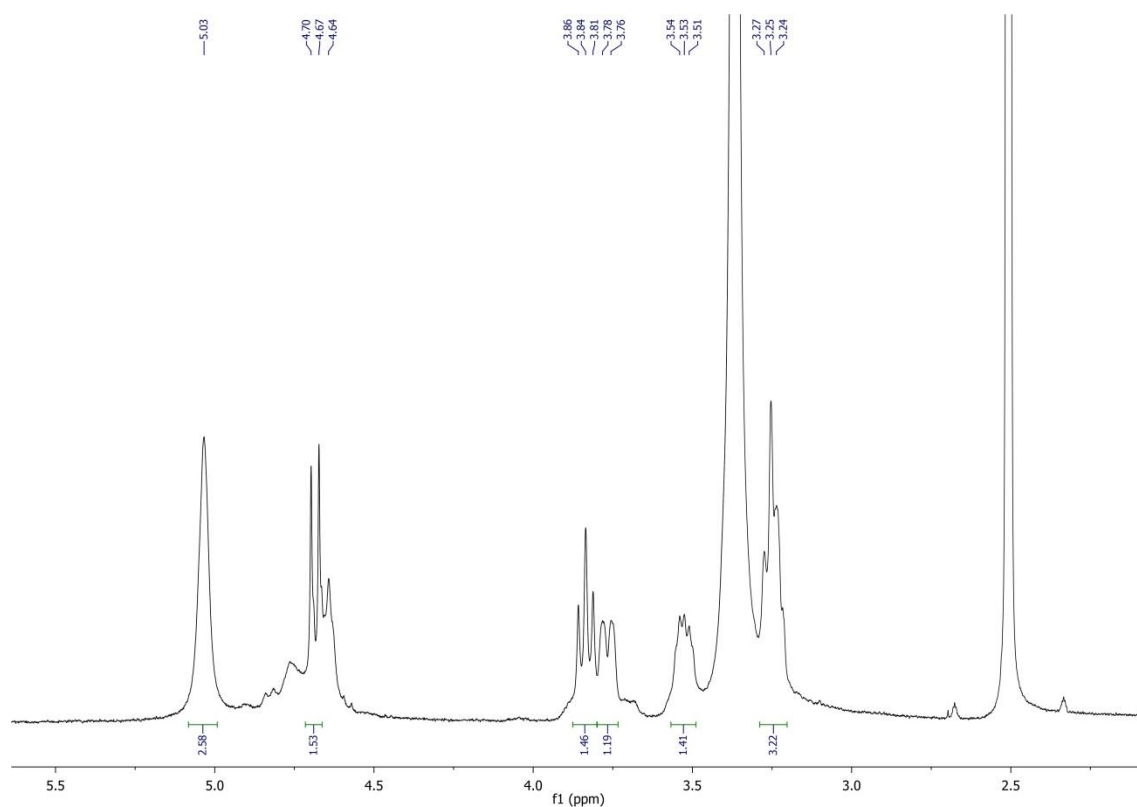


Figura 12. Expansão do espectro de RMN ^1H de Jm-1 para a região característica de hidrogênios do açúcar (DMSO, 400 MHz).

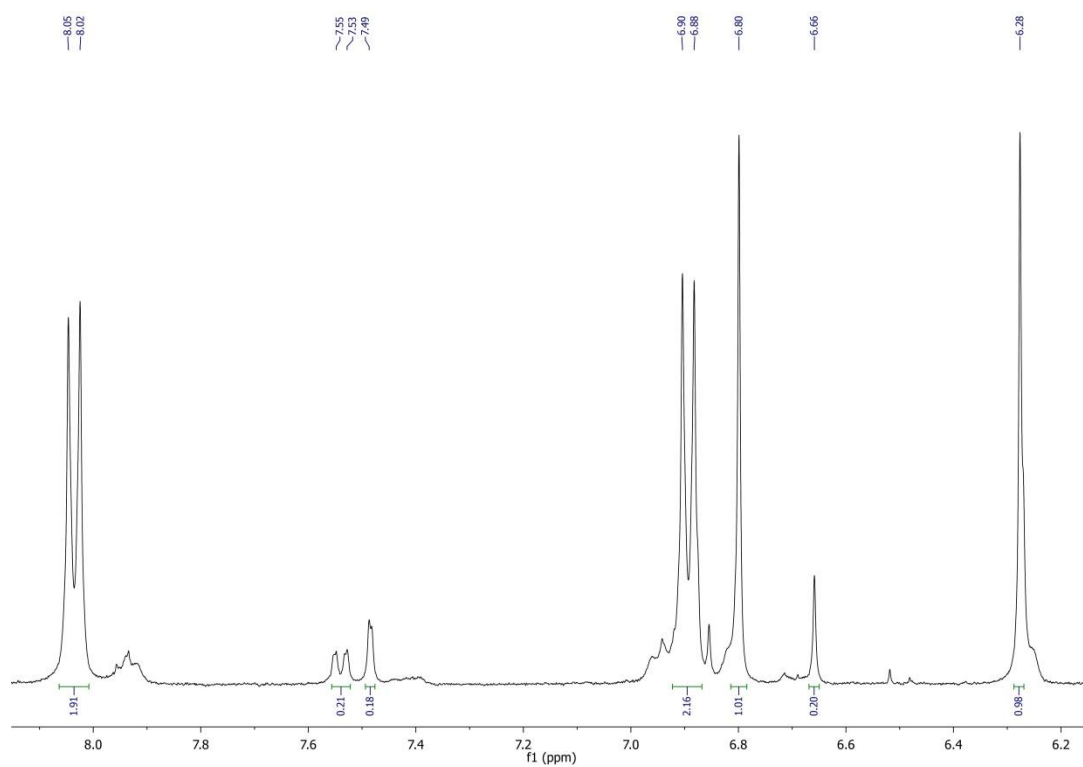


Figura 13. Expansão do espectro de RMN ^1H de Jm-1 da região de hidrogênios aromáticos (DMSO, 400 MHz).

De acordo com a quantidade de sinais relatados acima, dos deslocamentos observados, padrão de acoplamento e da integração, pode-se sugerir que se trata de um flavonoide (Figura 14) com uma unidade de açúcar como substituinte.

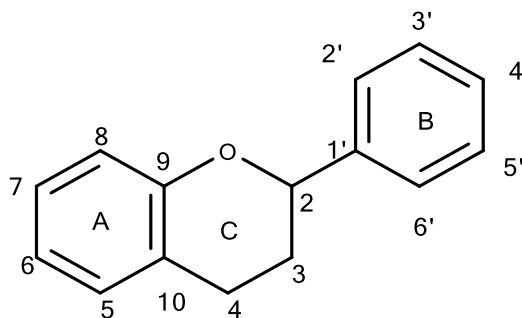


Figura 14. Estrutura básica de flavonoide.

A análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (Figura 15) correlaciona os carbonos hidrogenados de acordo com as posições na estrutura, conforme relacionado na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados de deslocamentos químicos de Jm-1 obtidos através dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C e bidimensionais.

Hidrogênio correspondente	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ – HSQC	$\delta^{13}\text{C}$ - HMBC
OH (5)	13,1 (s)		98,7
OH (4')	10,3 (s)		
OH (7)	10,8 (s)		
H2' e H6'	8,03 (d, $J=8$)	129,7	164,4 (C2); 161,5 (C4')
H3' e H5'	6,90 (d, $J=8$)	116,8	116,4 (C3' e 5'); 122,1 (C1'); 161,5 (C4')
H3	6,80 (s)	102,9	104,4 (C10); 122,1 (C1'); 164,4 (C2); 182,8 (C4)
H6	6,28 (s)	98,7	104,9 (C8); 160,9 (C5); 163,1 (C7)
H1''	4,68 (d, $J=12$)	74,1	71,4(C2''); 79,2 (C3''); 104,9 (C8); 156,4 (C9); 163,1 (C7)
H2''	3,84 (t, $J= 8, 12$ e 20)	71,4	79,2
H3''	3,26 (m)	79,2	
H4''	3,3 (m)	71,4	
H5''	3,25 (t, $J= 4, 8$ e 12)	82,7	71.4
H6''	3,7(m)	61,8	
H6''	3,53 (m, $J= 4,8$ e 12)	61,8	

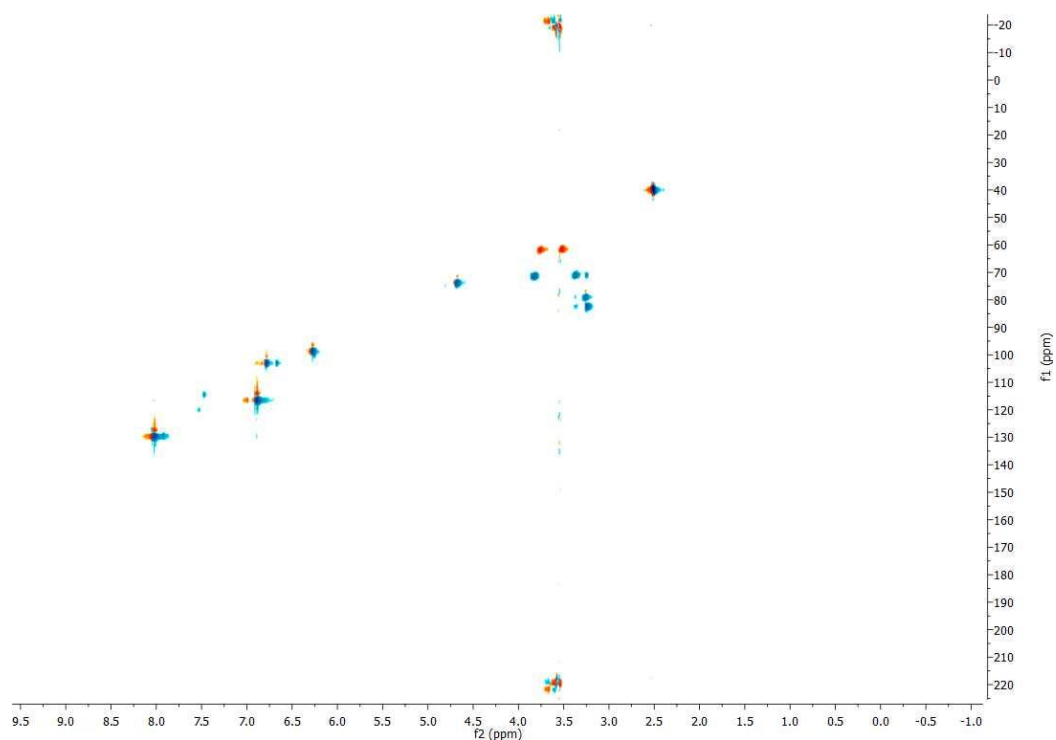


Figura 15. Espectro de correlação heteronuclear HSQC de Jm-1 (DMSO, 400 e 100 MHz).

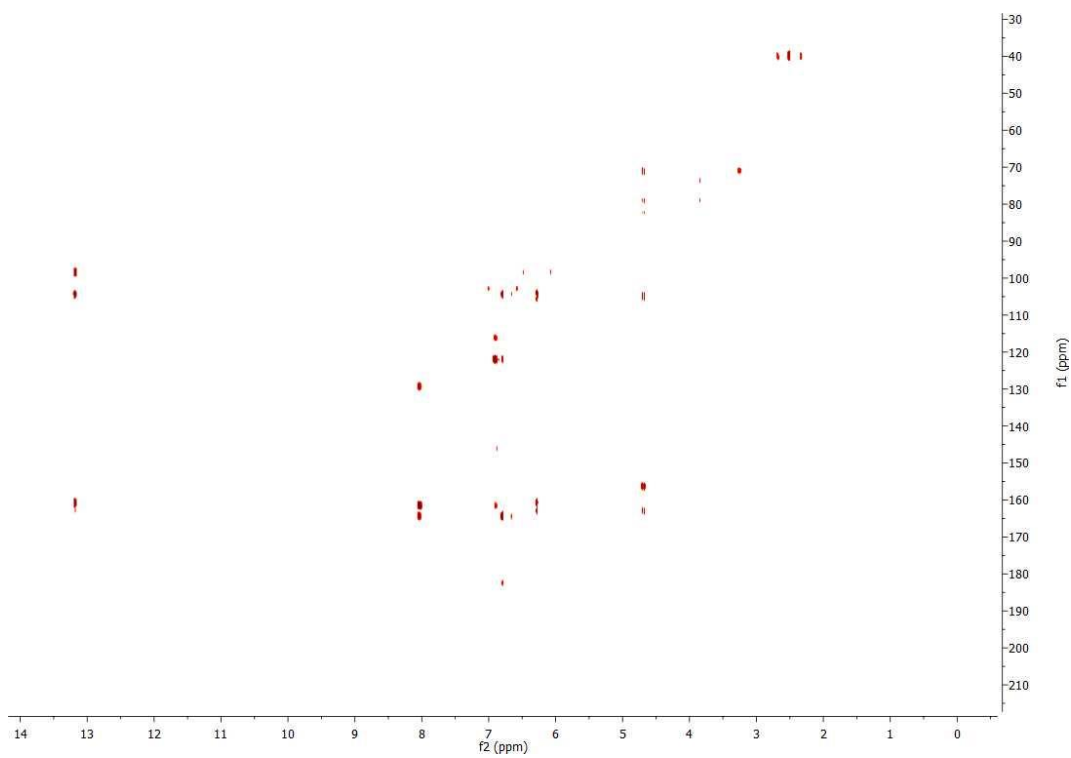


Figura 16. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de Jm-1 (DMSO, 400 e 100 MHz).

Como já foi citado na análise do espectro de RMN ^1H , observou-se a presença de dois sinais do tipo dubleto em δ 6,9 (2H, d, $J= 8$) e δ 8,0 (2H, d, $J= 8$) e integrando para dois hidrogênios, acoplado orto, sugerindo uma simetria na estrutura que é bem característico no anel B de flavonoides, ou seja, prótons ligados aos carbonos 2', 3', 5' e 6' deste anel para-dissubstituído (BIANCO, SANTOS, 2003).

O sinal em δC 182,8 no espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC (Figura 16) indica a presença de uma carbonila α, β insaturada (TANAKA et al., 2005), no carbono 4 do anel C. O sinal em δH 13,1 do espectro de RMN ^1H , sugere a presença de uma hidroxila quelada que provavelmente está ligada ao carbono 5 do anel A, formando um ciclo estável de 6 membros (BIANCO, SANTOS, 2003).

Com os dados espectrais e o fato de não ter sido observado nenhum carbono com deslocamento característico de carbono anomérico na região de 100 ppm, levantou-se a possibilidade de tratar-se de um flavonoide C-glicosilado. (TANAKA et al., 2005).

Com as informações obtidas nos experimentos de ressonância magnética nuclear, cujos espectros indicaram para o núcleo flavonoídico, observa-se a presença de um padrão conhecido para 4', 5, 7-triidróxilflavona (BIANCO, SANTOS, 2003), com uma unidade osídica como substituinte.

O singlete integrando para um próton em δH 6,8 ppm é característico de hidrogênio ligado ao carbono 3 de flavonas (MOREIRA et al., 2003). Ainda na região de aromáticos, observou-se outro singlete integrando para um próton em δ 6,28 ppm que pode ser atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono 6 do anel A. O dubleto observado no espectro do RMN ^1H em δ 4,7 pode ser atribuído ao próton ligado ao carbono C1" do açúcar (δC 74,1 ppm), sendo que este carbono foi identificado com auxílio dos espectros HSQC e HMBC (Figura 15 e 16). A posição do açúcar também pode ser identificada através do espectro de HMBC (Figura 17) no qual se observa a correlação do H1" (δH 4,7 ppm) com os carbonos 104,9 (C8), 156,4 (C9) e 163,1 (C7) ppm do anel A, sugerindo que a unidade osídica está ligada ao C8. Estas correlações confirmaram que Jm-1 trata-se de um flavonoide 8-C-glicosilado.

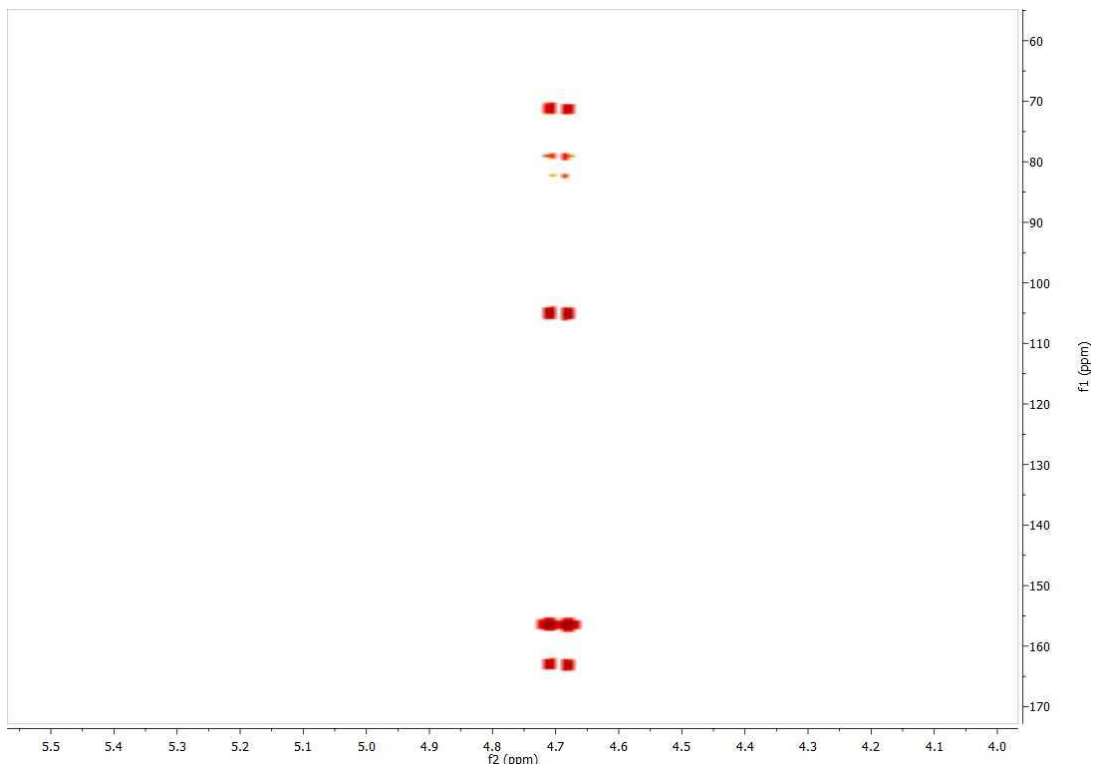


Figura 17. Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de Jm-1 (DMSO, 400 e 100 MHz).

Os dois singletos em 10,3 e 10,8 ppm são deslocamentos característicos de hidroxila de anel aromático devido aos altos deslocamentos apresentados, sugerindo assim tratar-se das hidroxilas dos carbonos C4' e C7 do núcleo flavonoidico.

Para o núcleo flavonoidico, observa-se na expansão do COSY (Figura 19) as correlações entre os H3'/H5' com os H2'/H6', confirmando a simetria na molécula.

Os prótons do açúcar foram identificados com o auxílio dos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear (HSQC e HMBC) (Figuras 16 e 17). O dublete em δH 4,7 (d, $J=12$ Hz) atribuído ao próton do carbono anomérico do açúcar apresenta uma relação *trans* diaxial com o H2'' que confirma a configuração β da glicose. Esse próton correlaciona-se no espectro de COSY (Figura 18) com o sinal em δH 3,8 (t, 1H, $J=12$ Hz), sugerindo tratar-se do H-2'', que no HSQC (Figura 15) correlaciona-se com o sinal em 71,43 ppm (C-2''). No TOCSY (Figura 20), observa-se que o sinal em δH 3,8 (H-2'') correlaciona-se com o sinal em δH 3,2 ppm, sugerindo ser este o H-3'' que está ligado ao carbono com sinal 70,9 ppm (C-3''), conforme mostra o HSQC (Figura 15). Observa-se ainda no TOCSY o sinal do H3'' (δH 3,2) se correlacionando com o δH 4,7 (H1'') (Figura 20).

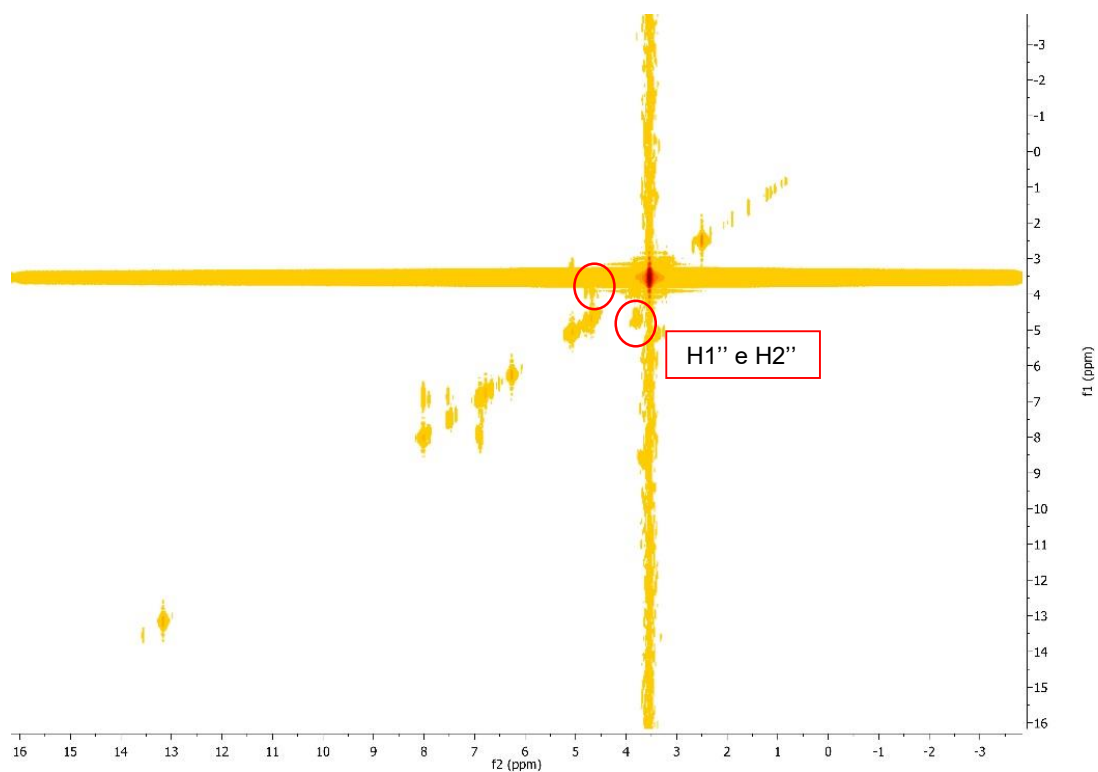


Figura 18. Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY de Jm-1 (DMSO, 400 MHz).

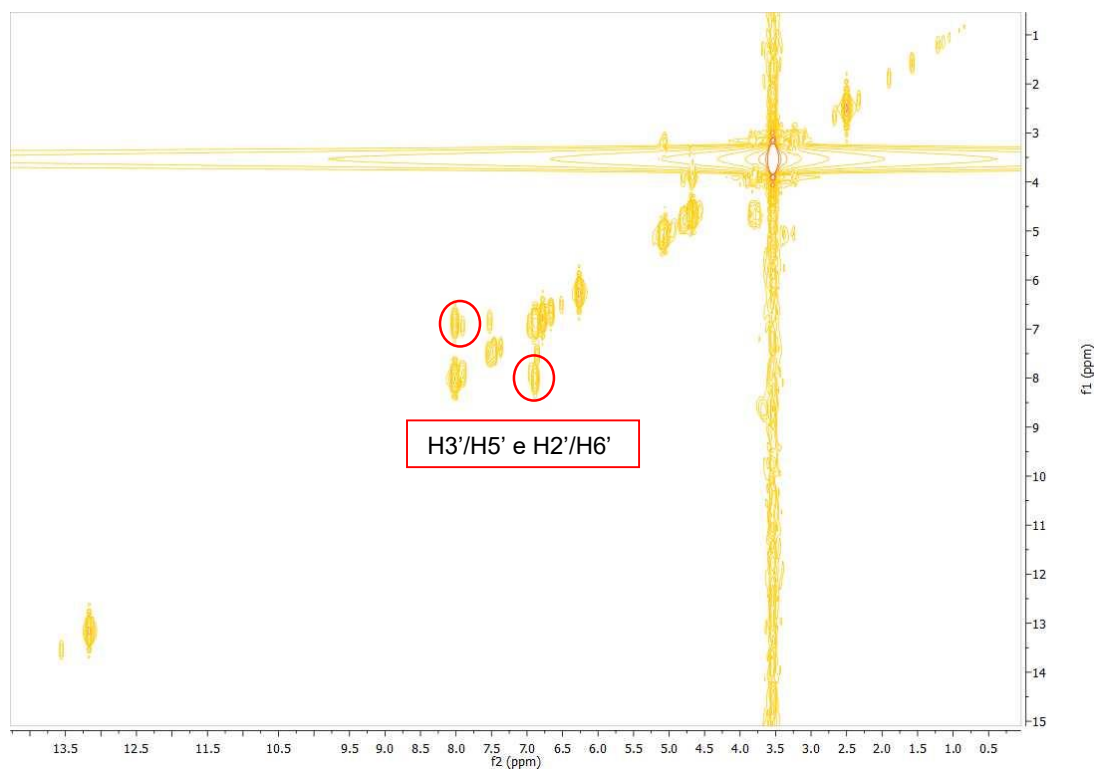


Figura 19. Expansão do espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY de Jm-1 (DMSO, 400 MHz).

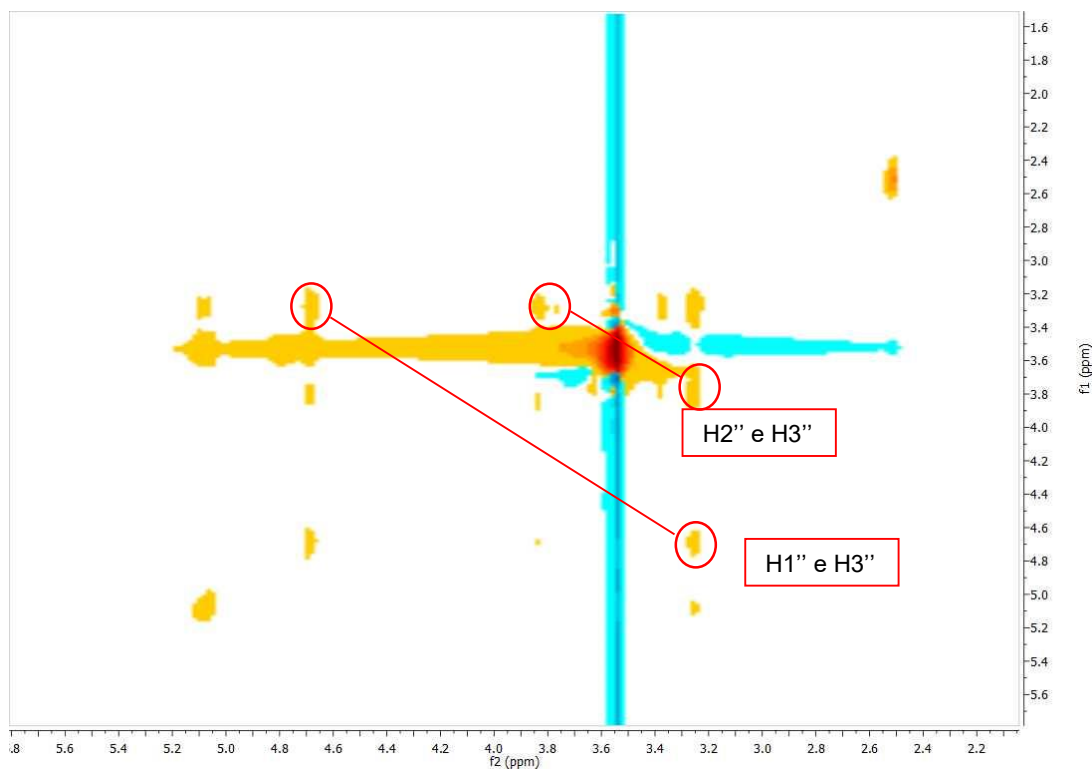


Figura 20. Expansão do espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - TOCSY de Jm-1 (DMSO, 400 MHz).

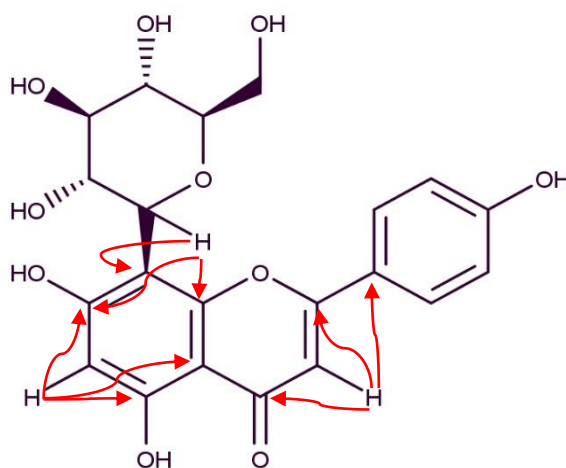


Figura 21. Representação estrutural das principais correlações observadas no espectro HMBC para Jm-1.

Após análise destes dados e comparação (Tabela 2) com valores da literatura (ZHOU et al., 2005; WEN et al., 2007), foi possível identificar a substância como 8-C- β -D-glicosilapigenina ou vitexina (Figura 22), sendo descrita pela primeira vez em *Jatropha mutabilis*.

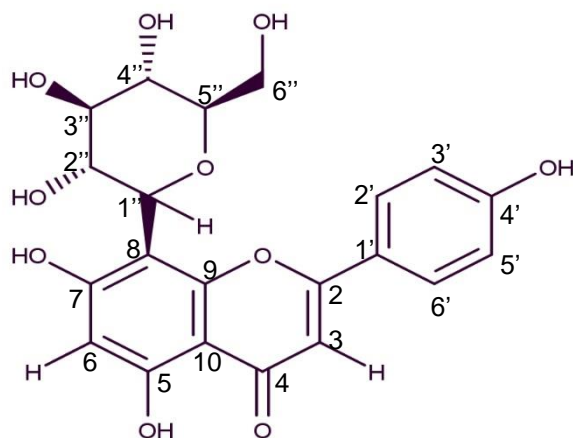


Figura 22. Estrutura da 8-C- β -D-glicosilapigenina ou vitexina.

Ao analisar os espectros de RMN uni e bidimensionais, observou-se a presença de alguns sinais com intensidade menor e que ao comparar com a literatura (ZHOU et al., 2005), foi possível identificar que além da vitexina, outro flavonoide de estrutura parecida estava presente.

Inicialmente, alguns sinais a mais se apresentaram no espectro de RMN ^1H (Figura 24) para a região de hidrogênios aromáticos: δH 6,67, δH 7,49 e δH 7,55 ppm. Os mesmos apresentam correlações no HSQC com os seguintes carbonos δC 103,07, 114,6 e 120,1 ppm (Figura 25), respectivamente. No HMBC, o sinal em δH 6,67 apresenta correlação com δC 104,4 (C10) e 164,5 (C2) (Figuras 23 e 26), sendo que são observadas estas mesmas correlações com o H3 da vitexina apresentada anteriormente, porém com uma pequena diferença nos deslocamentos químicos do carbono, sugerindo tratar-se de uma estrutura parecida. Assim, os sinais δH 6,67, δH 7,47 e δH 7,55 são respectivamente dos H3, H2' e H6' dessa outra estrutura, conforme Figura 24. Observa-se ainda no HMBC o sinal em δH 6,90 faz correlação com os seguintes sinais em δC 116,45 e δC 122. De acordo com o comparado na literatura, trata-se da orientina (ZHOU et al., 2005).

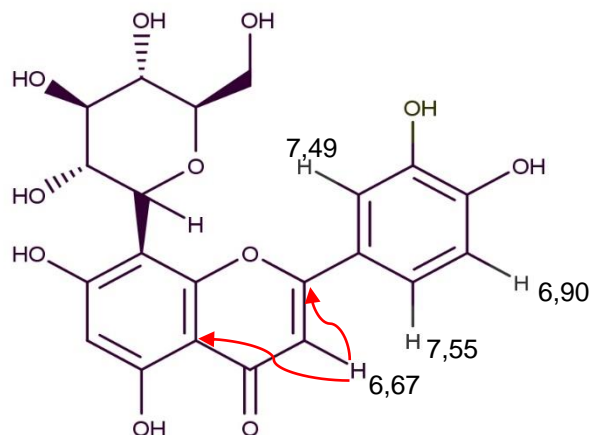


Figura 23. Estrutura da orientina e principais correlações observadas no HMBC.

Como o sinal do H3 do anel C da orientina (Figura 24), δ H 6,67, integra para 0,20 e o sinal δ H 6,8 da vitexina integra para 1,0, a proporção é de 1:5, ou seja, a cada molécula de orientina, tem-se 5 de vitexina. Devido à similaridade entre as estruturas dessas duas flavonas e também a proporção de cada uma em Jm-1, alguns sinais se sobrepõem, porém pela presença dos sinais descritos acima é possível distingui-las.

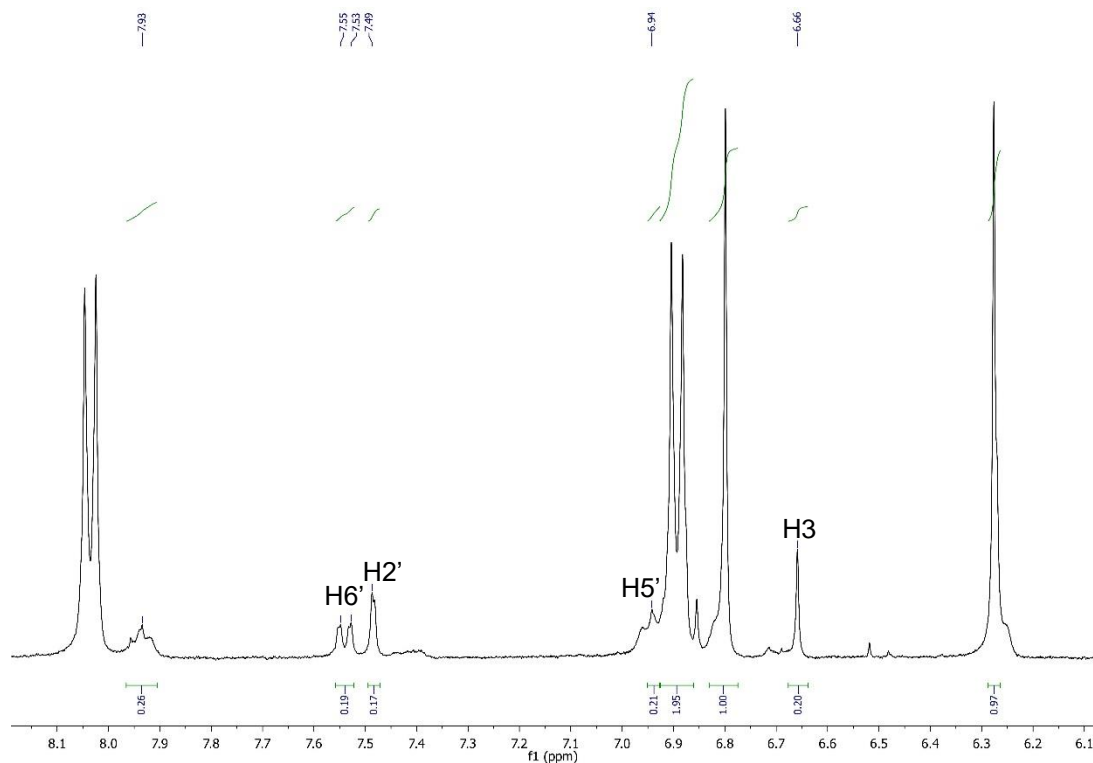


Figura 24. Expansão do espectro de RMN 1 H de Jm-1 para a região de hidrogênios aromáticos com atribuições de sinais da orientina (DMSO, 400 MHz).

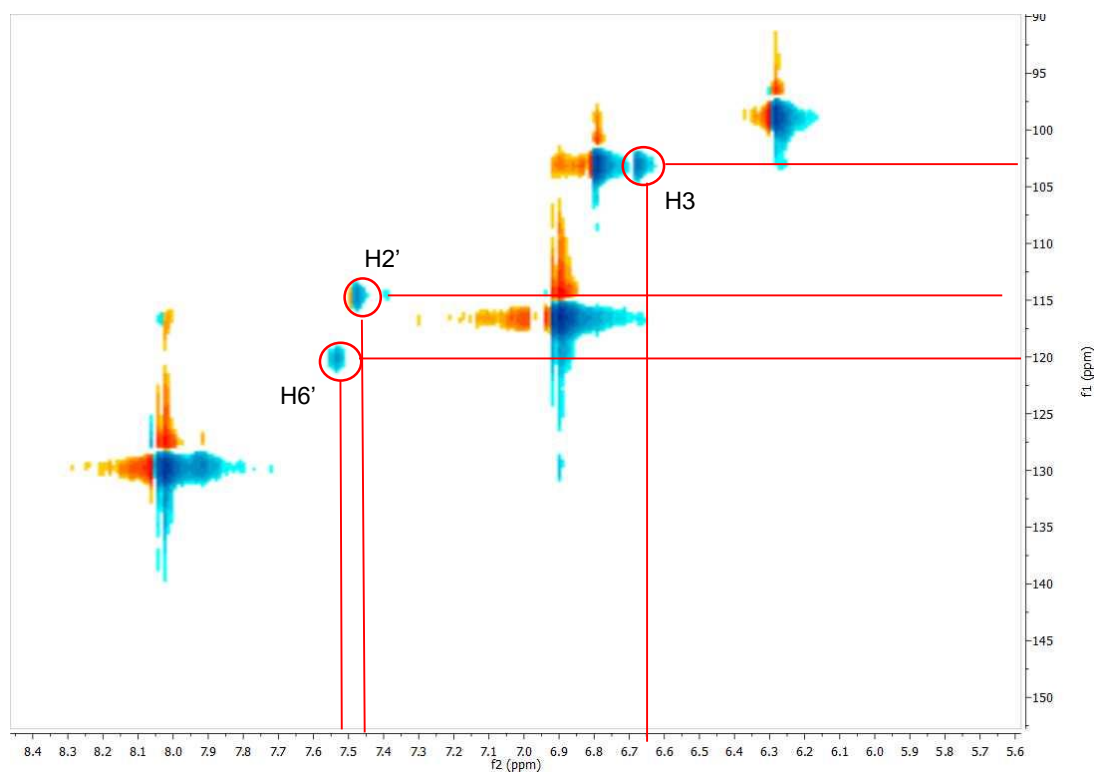


Figura 25. Expansão do espectro de correlação heteronuclear HSQC de Jm-1 mostrando as correlações dos hidrogênios da orientina (DMSO, 400 e 100 MHz).

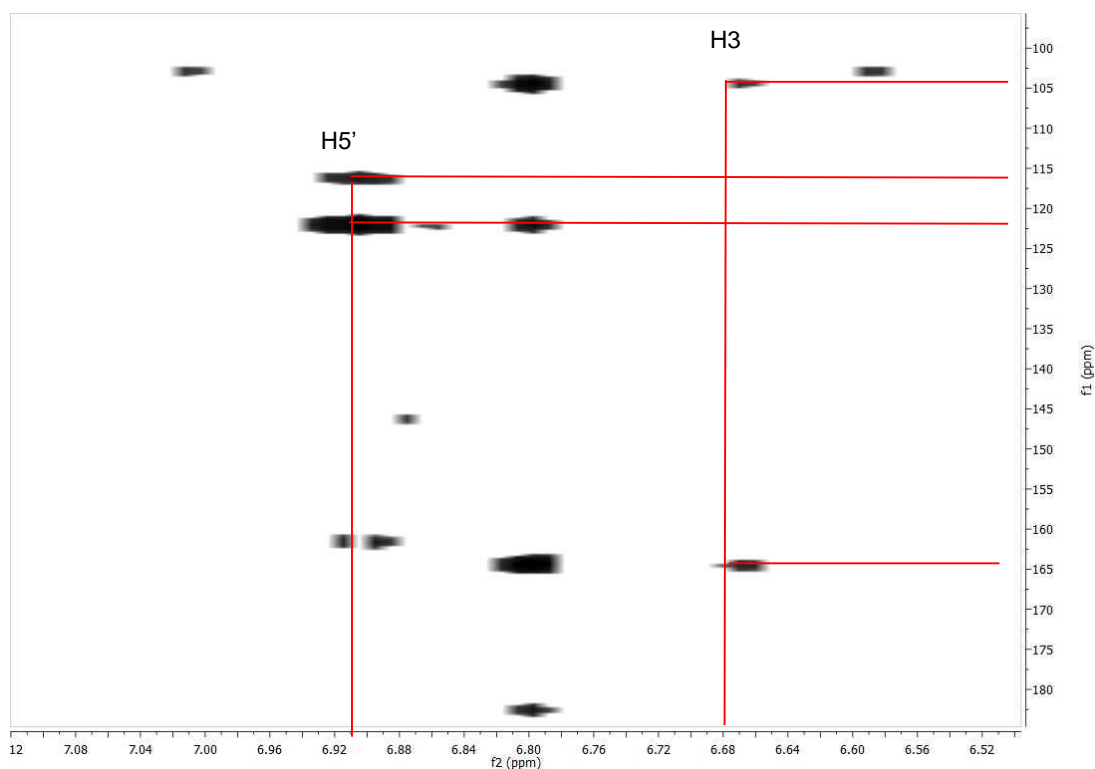


Figura 26. Expansão do espectro de correlação heteronuclear HMBC de Jm-1 mostrando as correlações dos hidrogênios da orientina (DMSO, 400 e 100 MHz).

Tabela 2 - Dados espectroscópicos de Jm-1 (vitexina e orientina) comparados com a literatura (ZHOU et al., 2005 e WEN et al., 2007).

Posição nº	Vitexina		Orientina	
	RMN ¹ H e ¹³ C		RMN ¹ H e ¹³ C	
	$\delta^{13}\text{C}$ ($\delta^{1}\text{H}$) Jm-1	$\delta^{13}\text{C}$ ($\delta^{1}\text{H}$) literatura	$\delta^{13}\text{C}$ ($\delta^{1}\text{H}$) Jm-1	$\delta^{13}\text{C}$ ($\delta^{1}\text{H}$) literatura
2	164,4	164,98	164,5	164,16
3	102,9 (6,8)	102,51 (6,94)	103,07(6,67)	102,41(6,65)
4	182,5	182,73	-	182,03
5	160,9	155,64	-	160,47
6	98,7 (6,28)	98,45 (6,44)	-	98,31(6,25)
7	163,1	162,31	-	162,80
8	104,9	104,56	-	104,65
9	156,4	160,28	-	156,01
10	104,4	104,07	104,4	103,99
1'	122,1	122,07	-	121,97
2'	129,7(8,0)	128,99 (8,26)	114,63(7,47)	114,07 (7,44)
3'	116,8 (6,8)	115,01 (7,05)	-	145,95
4'	161,5	161,32	-	149,9
5'	116,8 (6,8)	115,01 (7,05)	116,45 (6,90)	115,78(6,90)
6'	129,7(8,0)	128,99 (8,26)	120,13 (7,53)	119,45 (7,50)
1''	74,1	73,93	-	73,53 (4,72)
2''	71,4	71,03	-	70,90
3''	79,2	79,01	-	78,88
4''	71,4	70,20	-	70,83
5''	82,7	81,29	-	82,04
6''	61,8	61,36	-	61,76

7.2 Validação de metodologia por HPLC

O processo de validação deve garantir através de estudos experimentais que a metodologia proposta atenda às exigências de suas aplicações, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos (ICH, 2005). Dentre as diversas técnicas utilizadas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido um método de escolha para a separação e quantificação de compostos fenólicos em plantas. A técnica é crucial e confiável para a caracterização destes compostos devido à sua precisão e importância econômica (PAREJO et al., 2004). Assim, um método simples de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido para identificar e quantificar a flavona vitexina no extrato bruto de *J. mutabilis* (Jm-EEB).

O método foi desenvolvido para obter uma eluição do padrão em um tempo de retenção mínimo, mas garantindo boa resolução na separação dos picos (Figura 27), o que foi possível utilizando um tempo de 50 minutos de análise e com fase móvel constituída de ácido fórmico 0,1% e acetonitrila no modo gradiente de eluição. Xavier-Santos (2018) utilizou esses mesmos solventes (ácido fórmico 0,5% e acetonitrila) para quantificar vitexina e outros flavonoides C-glicosilados de *Jatropha gossypifolia*, tendo feito isto com êxito.

Na Figura 28, a vitexina no extrato de *J. mutabilis* (Jm-EEB) elui em um tempo de retenção de 28,9 minutos. No entanto, observa-se que o pico do composto majoritário de Jm-EEB elui em um tempo de retenção de 30,3 minutos e se trata da isovitexina, conforme comparação com o padrão, sendo que sua validação não foi possível devido a pouca quantidade de padrão de isovitexina. No geral, o método mostra uma boa separação entre esses dois picos, possibilitando a validação da quantificação de vitexina em Jm-EEB, e futuramente da quantificação de isovitexina.

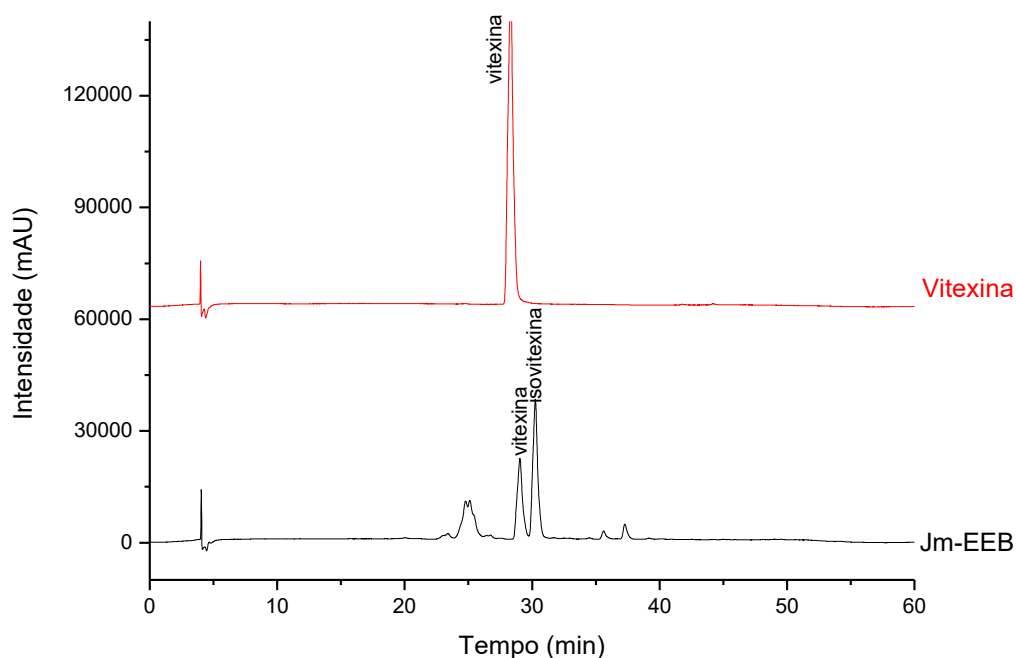


Figura 27. Cromatograma obtido por CLAE-DAD de vitexina e do extrato etanólico de *J. mutabilis* (Jm-EEB). Condições cromatográficas: Gradiente de eluição de acetonitrila (A) e ácido fórmico 0,1% (B) (0,01-40 min, 90-72%B; 40,0-50,0 min, 72-90%), Fluxo de 0,4 mL/min das fases móveis, volume de injeção de amostra de 10 μ L, 37°C, 336 nm.

A RDC (2017) da ANVISA, sobre o parâmetro seletividade, informa que para insumos farmacêuticos ativos de origem vegetal e medicamentos que os contenham, deve-se demonstrar a capacidade do método de distinguir o material de interesse de outras espécies vegetais semelhantes. A especificidade consiste na capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da amostra. Quando se trabalha com uma amostra complexa, como os extratos vegetais, deve-se observar se os compostos que se deseja avaliar não estão co-eluído em um mesmo tempo de retenção. Assim, este parâmetro deve garantir que o pico da resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI et al., 2004).

Neste trabalho, a especificidade foi demonstrada através da análise de uma solução do extrato *Mimosa Tenuiflora* (Fabaceae) na concentração de 700 μ g/mL sob as mesmas condições cromatográficas de vitexina (substância de referência, 32 μ g/mL) e extrato de Jm-EEB (700 μ g/mL). Uma comparação entre os cromatogramas foi realizada através da sobreposição dos mesmos (Figura 28), observando-se os tempos de retenção das substâncias de interesse. Observa-se que na espécie

Mimosa Tenuiflora não houve eluição de nenhum pico no mesmo tempo de retenção vitexina, caracterizando a especificidade do método analítico. Assim, o método desenvolvido mostrou-se específico para determinação de vitexina em Jm-EEB, pois foi capaz de detectar pico de vitexina no Jm-EEB com pureza. A sobreposição dos cromatogramas de vitexina e *M. Tenuiflora* indicaram a ausência de interferente eluindo no mesmo tempo de retenção.

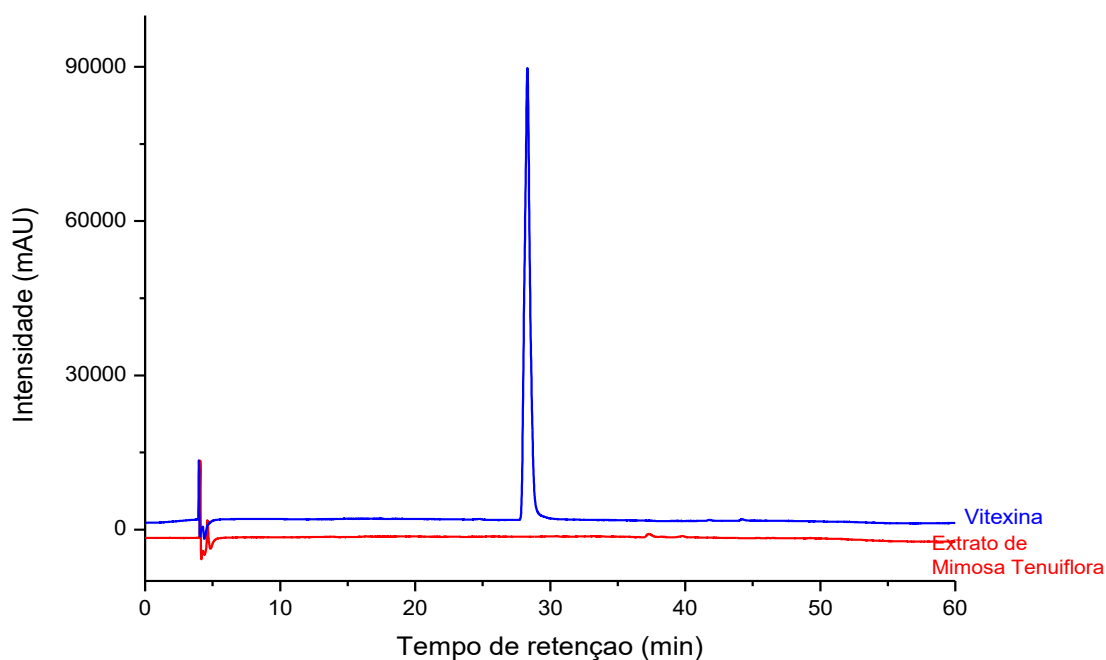


Figura 28. Cromatograma obtido por CLAE-DAD da avaliação da especificidade do método. Condições cromatográficas: Gradiente de eluição de acetonitrila (A) e ácido fórmico 0,1% (B) (0,01-40 min,90-72%B; 40,0-50,0 min, 72-90%), Fluxo de 0,4 mL/min das fases móveis, volume de injeção de amostra de 10 μ L, 37°C, 336 nm.

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (BRASIL, 2017). Este parâmetro foi avaliado através da construção de duas curvas de calibração, uma para o padrão de vitexina e outra para o extrato (Jm-EEB).

Os resultados estão plotados nas figuras 29 e 30, em que esses gráficos mostram que “y” é a área (mUA) e “x” é a concentração (μ g/mL).

A linearidade do método foi analisada usando três curvas de calibração obtidas com soluções padrão de vitexina em oito diferentes concentrações (2 – 256 µg/mL). Para o extrato (Jm-EEB), três curvas de calibração foram obtidas com soluções do extrato em seis diferentes concentrações (400 – 900 µg/mL). O método mostrou-se linear nessas faixas e o estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados forneceu equações da reta $y = 76726x - 110289$ (vitexina) e $y = 769,25x + 114449$ (vitexina no Jm-EEB). Os coeficientes de correlação (R^2) foram 0,99938 (vitexina) e 0,98796 (vitexina no Jm-EEB), demonstrando concordância entre as concentrações utilizadas e as áreas absolutas dos picos obtidas. O coeficiente de correlação (R^2) permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (INMETRO, 2003).

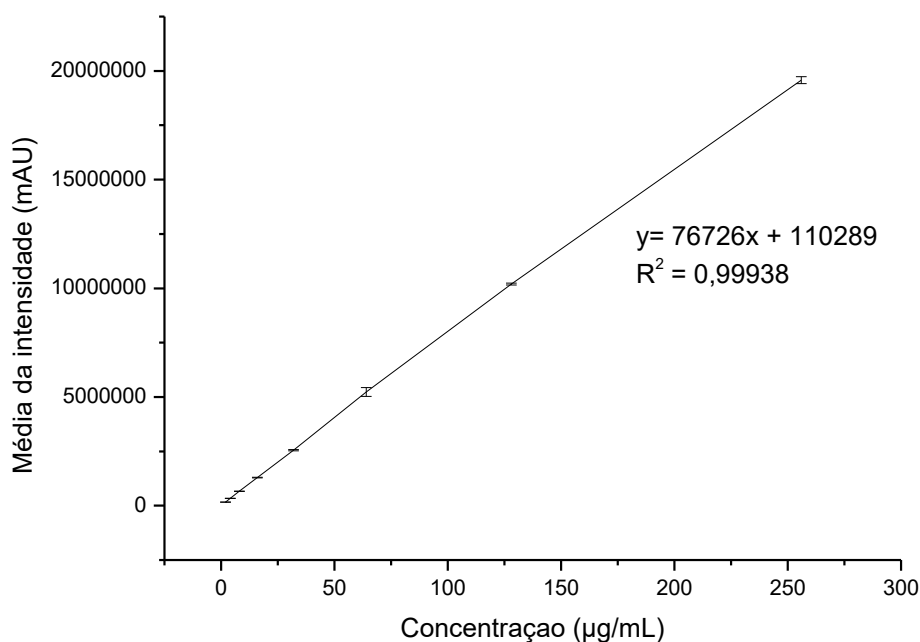


Figura 29. Curva de calibração construída a partir dos resultados do teste de linearidade para vitexina nas concentrações de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 µg/mL.

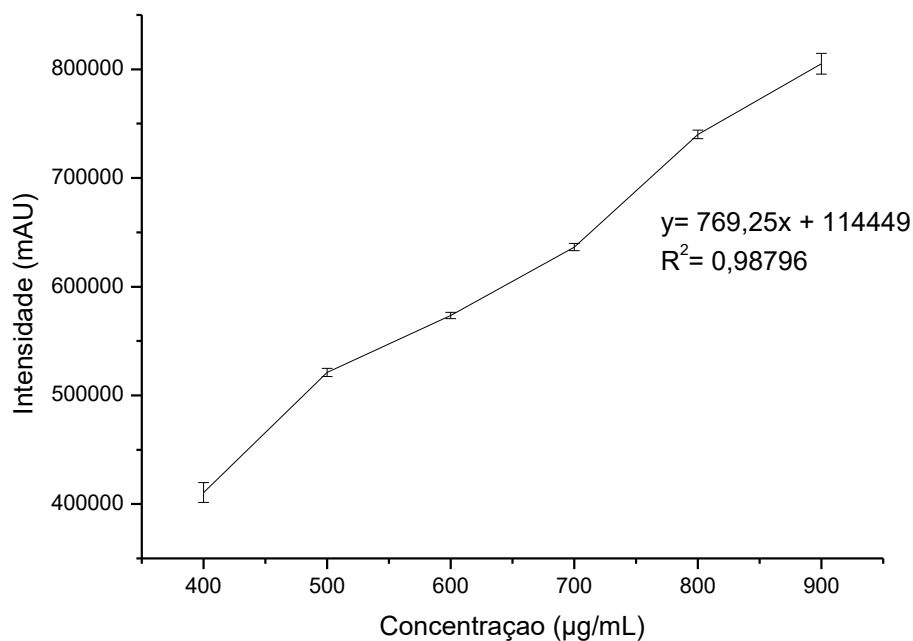


Figura 30. Curva de calibração construída a partir dos resultados do teste de linearidade para vitexina no Jm-EEB com concentrações do extrato de 400, 500, 600, 700, 800 e 900 µg/mL.

Tabela 3 - Resultados obtidos no teste de linearidade de vitexina.

Concentração (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
2	166387	166914	167349	166883.3	481.7	0.3
4	332327	341282	340759	338122.6	5026.0	0.5
8	651303	669497	672283	664361.0	11394.0	0.7
16	1268468	1298219	1296447	1287710.0	16688.7	1.3
32	2516862	2516862	2562310	2550250.0	29280.5	1.1
64	5342901	5356778	4992444	5230710.0	206459.0	3.9
128	10154250	10206973	10241341	1020090.7	43866.7	0.4
256	19399519	19691853	19630209	1957390.7	154097.9	0.8

Através da análise de variância (ANOVA) pode-se verificar a significância estatística da curva e a linearidade do método. Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ (0,000175) foi menor que o F_{tabelado} (3,46) demonstra-se que não houve falta de ajuste na faixa de concentração estudada a um nível de confiança de 95%. Quanto a validade da regressão, comprova-se a linearidade observando um $F_{\text{calculado}}$ (15921) maior que o F_{tabelado} (2,65).

O limite de detecção (LD) corresponde a quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Os LD e LQ são calculados através das seguintes fórmulas, respectivamente, $LD = (3,3 \times \sigma)/IC$ e $LQ = (10 \times \sigma)/IC$, em que IC é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão (BRASIL, 2017).

Assim, com a equação obtida com a curva de calibração foram calculados os limites de detecção e quantificação, obtendo-se valores de 4,7 $\mu\text{g/mL}$ e 14,4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estes baixos valores demonstram boa sensibilidade do método para quantificação de vitexina no extrato.

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado (BRASIL, 2017). A precisão do método foi demonstrada através da repetibilidade, onde se analisou em curto intervalo de tempo amostras de mesma concentração do extrato (700 $\mu\text{g/mL}$), preparadas sob as mesmas condições e pelo mesmo analista, e da precisão intermediária em que soluções do extrato (700 $\mu\text{g/mL}$) foram analisadas em dois dias diferentes e por dois diferentes analistas.

Os resultados da repetitividade e da precisão intermediária (Tabela 4) demonstram que o método proposto apresenta boa precisão com valores baixos de coeficientes de variação (desvio padrão relativo).

Tabela 4 - Resultados obtidos para precisão intra e intermediária para a vitexina no extrato.

	Dia 1		Dia 2		F
	Concentração de vitexina ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	Concentração de vitexina ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	
Analista 1	7.8	2.9	9.8	11.9	F_{cal} 0.4 F_{cri} 4.3
Analista 2	8.3	1.3	10.0	12.7	

A exatidão de um método analítico avalia o grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. É expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2017). Este parâmetro foi avaliado através da adição de concentração conhecida de vitexina em soluções de extrato nas concentrações baixa, média e alta (400, 700 e 900 $\mu\text{g/mL}$), sendo expressa pela porcentagem de recuperação da vitexina. A Tabela 5 mostra a concordância entre os resultados encontrados na análise, confirmando a exatidão do método.

Tabela 5 - Resultados obtidos no teste de exatidão com valores médios de recuperação.

Concentração do EEB	Concentração teórica de vitexina ($\mu\text{g/mL}$) \pm Desvio relativo (%)	Concentração experimental de vitexina ($\mu\text{g/mL}$) \pm Desvio relativo (%)	% recuperação	Desvio padrão	CV (%)
Baixa (400 $\mu\text{g/mL}$)	11,4 \pm 0,7	13,4 \pm 0,5	117,6	0,3	0,2
Média (700 $\mu\text{g/mL}$)	13,4 \pm 2,3	15,2 \pm 3,4	113,1	6,5	5,7
Alta (900 $\mu\text{g/mL}$)	15,4 \pm 0,7	17,2 \pm 1,0	111,5	1,5	1,3

Os testes revelaram que pequenas e deliberadas modificações nas condições cromatográficas resultaram em diferenças na quantificação da vitexina no extrato (Tabela 6), demonstrando que o método não foi robusto já que na análise de variância (ANOVA) o $F_{calculado}$ foi maior que o $F_{crítico}$, para variação de temperatura e fluxo.

Tabela 6 - Resultados obtidos na avaliação da robustez do método para quantificação de vitexina no extrato (Jm-EEB).

Condições	Média da concentração de vitexina ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
Normal	7,72	0,03	0,4
Temperatura 36 °C	7,79	0,08	1,0
Temperatura 38 °C	7,88	0,06	0,7
Fluxo 0,3 mL/min	10,69	0,05	0,4
Fluxo 0,5 mL/min	6,07	0,01	0,1

7.3 Caracterização do complexo

7.3.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Uma das ferramentas analíticas úteis e que representa uma das mais poderosas para caracterização de complexos de inclusão em solução é a espectroscopia de RMN (SCHNEIDER et al., 1998). Neste estudo, ela forneceu informações estruturais sobre a interação do flavonoide com a β -CD através da variação de deslocamentos químicos e correlação entre hidrogênios dessas substâncias.

O espectro de RMN ^1H da β -CD e do complexo vitexina/ β -CD estão ilustrados na Figura 31. Nesta figura observam-se diferenças nos deslocamentos químicos dos sinais de hidrogênio da ciclodextrina livre e complexada, conforme Tabela 7. Uma evidência que confirma a complexação é a mudança nos deslocamentos químicos dos hidrogênios da molécula hospedeira (SCHNEIDER, 1998). Greatbank e Pickford (1987) relatam que quando $\Delta\delta\text{H}_3 > \Delta\delta\text{H}_5$ ocorre a inclusão parcial do hóspede dentro da cavidade e quando $\Delta\delta\text{H}_3 \leq \Delta\delta\text{H}_5$, a inclusão é total. De acordo com a Tabela 7, observa-se que $\Delta\delta\text{H}_3 > \Delta\delta\text{H}_5$ comprovando que ocorre a inclusão parcial do flavonoide na cavidade da β -ciclodextrina.

Tabela 7. Deslocamentos químicos de β -CD livre e complexada.

H	δ β-CD	δ vitexina/β-CD	$\Delta\delta$ vitexina/β-CD- δ β-CD
1	4,952	4,982	0,03
2	3,612	3,560	-0,052
3	3,855	3,883	0,028
4	3,470	3,500	0,03
5	3,764	3,790	0,026
6	3,745	3,767	0,022

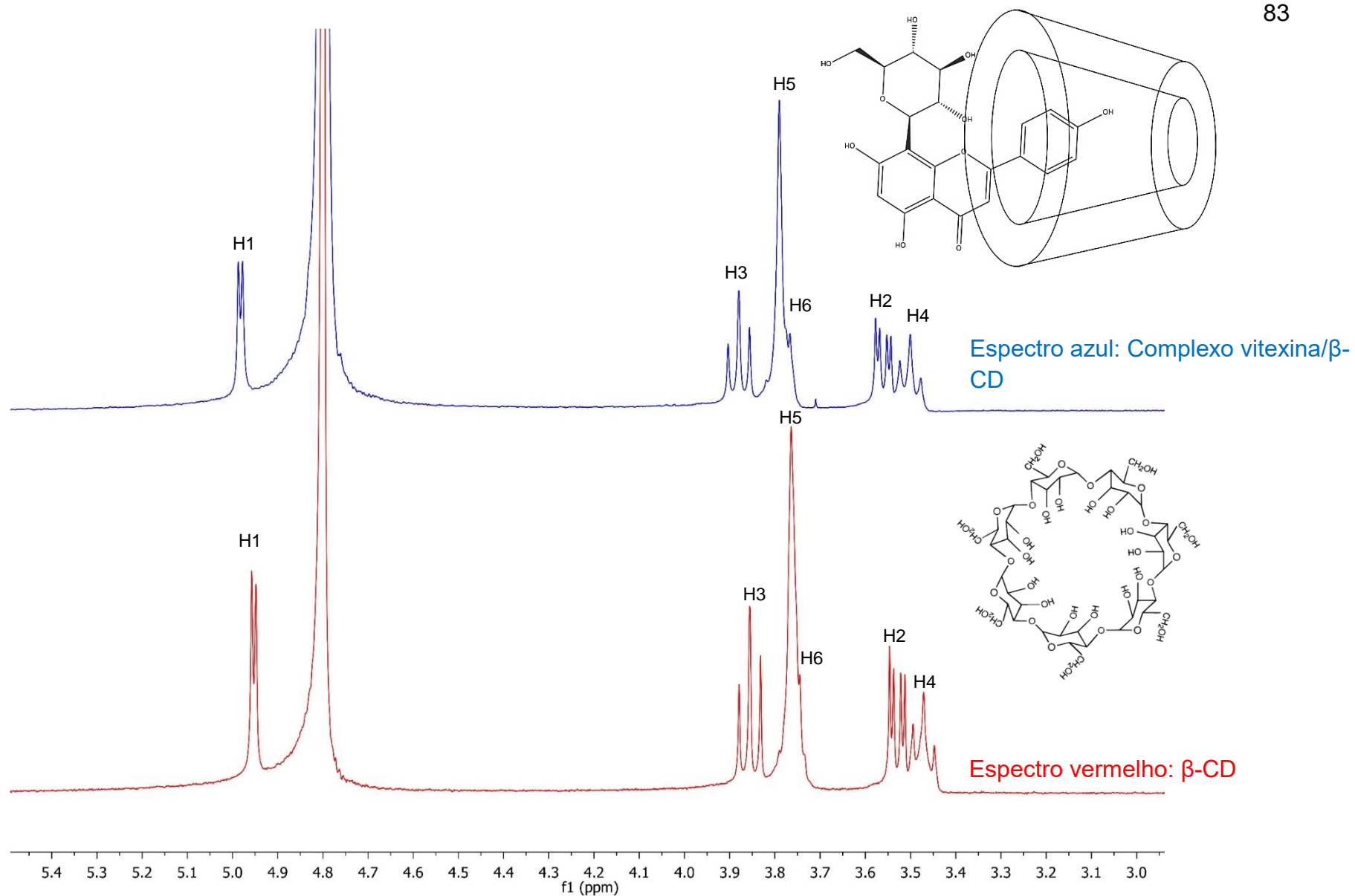


Figura 31. Espectros de RMN ^1H da β -CD (picos em vermelho) e do complexo vitexina/ β -CD (picos em azul) (D_2O , 400 MHz).

Espectros de ROESY (*Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy*) foram obtidos com a finalidade de obter informações da interação entre a β -CD e a vitexina. Foi observado uma proximidade entre os hidrogênios simétricos do anel B da flavona e o H3 do oligossacarídeo, conforme Figuras 32 e 33. Essa interação indica que o anel B da vitexina está inclusa na cavidade da molécula hospedeira, já que existe interação com o próton da cavidade interna da β -CD (H3) (GREATBANK, PICKFORD, 1987).

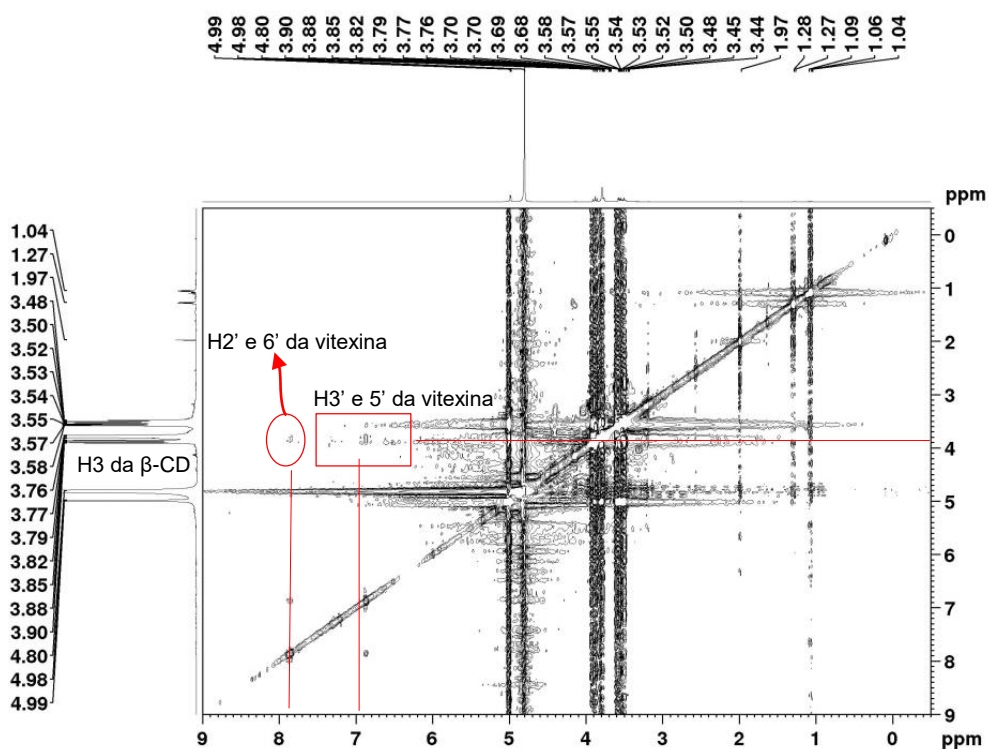


Figura 32. Espectro do bidimensional ROESY do complexo vitexina/ β -CD solubilizado em D_2O .

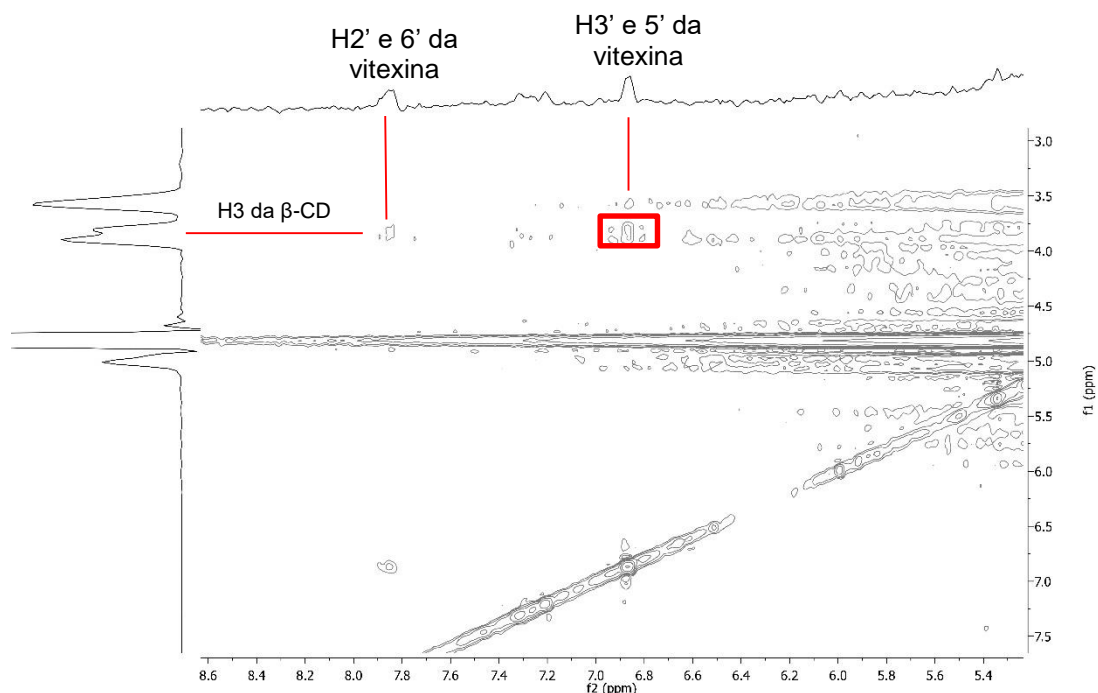


Figura 33. Expansão do espectro do bidimensional ROESY do complexo vitexina/ β -CD solubilizado em D_2O .

7.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 34 apresenta as fotomicrografias da β -CD, vitexina, mistura física (MF) e complexo (vitexina/ β -CD). Para a β -CD livre (Figura 34A), observaram-se superfícies retangulares de tamanhos variados e com fragmentos de cristais aderidos, conforme já foi apresentado por Hădărugă (2012) e Dandawate e colaboradores (2014). A amostra de vitexina (Figura 34B) apresenta-se como esferas de tamanhos variados e cristais, conforme já relatado por Zu e colaboradores 2012. Na mistura física (Figura 34C), distinguem-se bem os flavonoides (esféricos) da β -CD (retângulos). No entanto, na amostra referente ao complexo vitexina/ β -CD (Figura 34D), observam-se agregados cristalinos com alterações nos tamanhos das partículas e na morfologia bem diferentes do material de partida livres. Assim, a morfologia esférica já não se apresenta mais, sugerindo a formação do complexo.

Segundo Lyra e colaboradores (2010), quando se forma um complexo, o estado cristalino resultante é diferente do obtido pela simples mistura da molécula hóspede com as CDs.

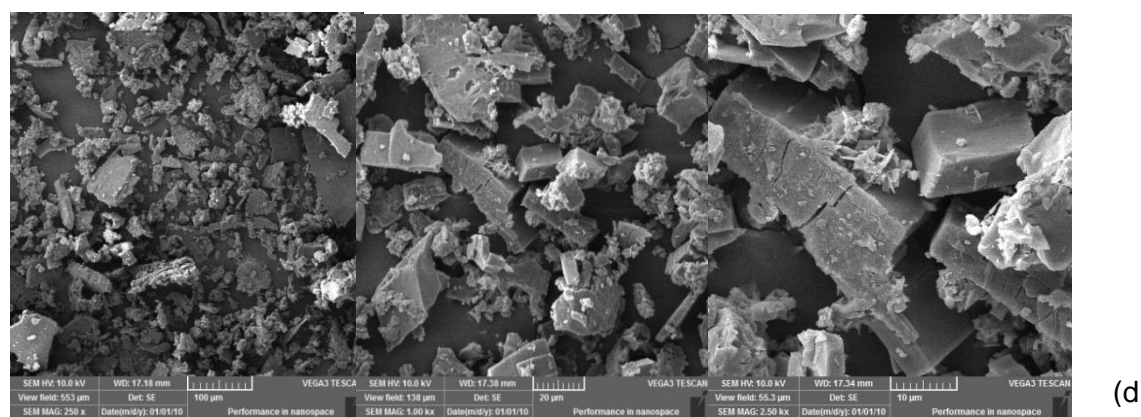
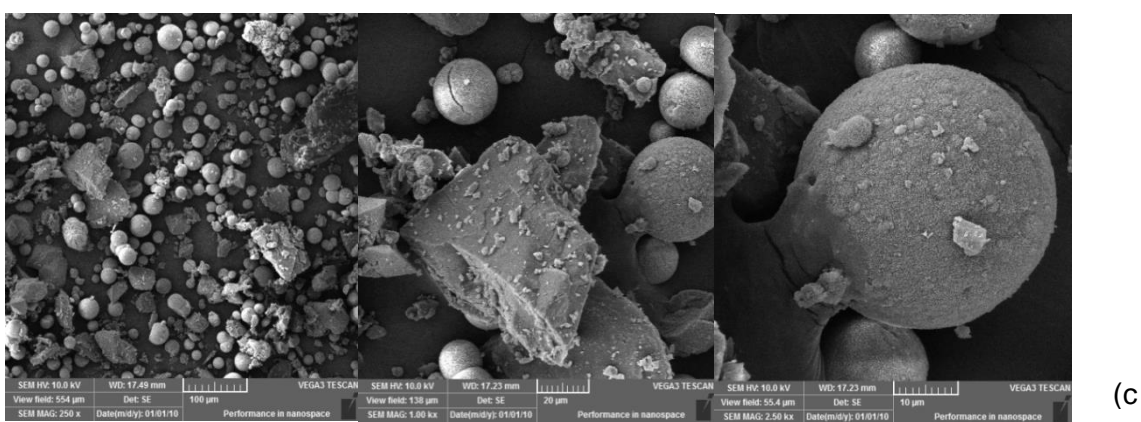
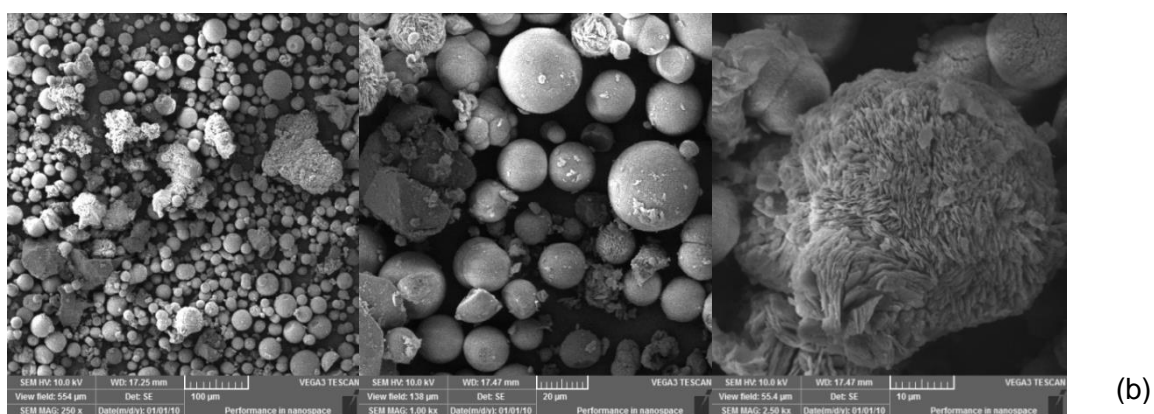
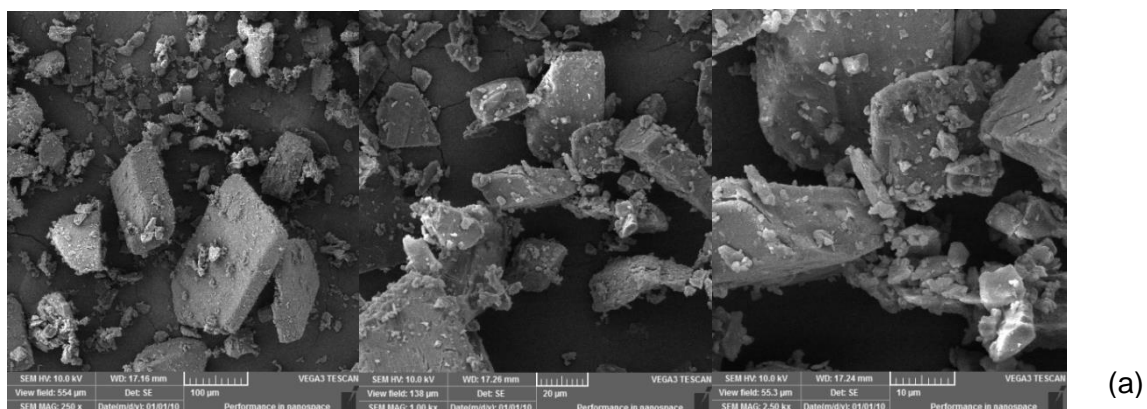


Figura 34. Fotomicrografias da β -CD (a), vitexina (b), MF (c) e do complexo vitexina/ β -CD (d).

7.3.3 Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)

O IV-TF é bastante utilizado para caracterizar a formação de complexos de inclusão com CDs através da detecção de alterações na forma e na posição das faixas de absorvância, através do espectro vibracional dos diferentes grupos funcionais das moléculas de fármacos complexados ou livres (LYRA et al. 2010).

A Figura 35 mostra os espectros IV-TF de β -CD (a), vitexina (b), mistura física (c) e vitexina/ β -CD (d). O espectro do oligossacarídeo revela absorções típicas (EGYED, 1990) da mesma. O sinal em torno de 1150 cm^{-1} é característico de estruturas de sacarídeos, sendo atribuído à vibração do anel piranose e ao estiramento assimétrico das ligações C-O-H (EGYED, 1990). A banda em torno de 3400 cm^{-1} refere-se ao grupo funcional OH.

O espectro de vitexina demonstra bandas de absorção correspondentes aos grupos funcionais OH, C=C (aromático), H-C (aromático), O-C (aromático) e H-C (aromático parassubstituído fora do plano), sendo elas respectivamente $3200\text{-}3650\text{ cm}^{-1}$, $1450\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, $3050\text{-}3150\text{ cm}^{-1}$, $1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ e 832 cm^{-1} , conforme descrito por Pavia e colaboradores (2010). A absorção de carbonila conjugada e com ligação de hidrogênio intramolecular ocorre aproximadamente a 1665 cm^{-1} e sinais de tamanho médio entre 1600 e 1500 cm^{-1} indica também a presença de grupos aromáticos nesta molécula (BIANCO, SANTOS, 2003). O sinal em torno de 1150 cm^{-1} está relacionado à molécula de açúcar presente na vitexina.

O espectro da mistura física demonstra ser uma sobreposição das substâncias envolvidas, sendo que em algumas faixas predomina o flavonoide e em outras o oligossacarídeo. O mesmo ocorre com o complexo em que ora predomina as bandas de β -CD, ora de vitexina, sendo que a principal diferença entre a mistura física e vitexina/ β -CD está no sinal em 1155 cm^{-1} (Figura 36) que aparece no complexo mais alargado. Nesta região esse sinal é característico da vibração do anel piranose e ao estiramento assimétrico das ligações C-O-H da estrutura glicosídica da β -CD. Quanto aos flavonoides está relacionada a ligação C-O de aromático, indicando uma alteração da estrutura nesses grupos. O sinal em 832 cm^{-1} presente na flavona é referente ao estiramento C-H (aromático) parassubstituído fora do plano (PAVIA et al., 2010) e a ausência deste sinal em vitexina/ β -CD confirma a inclusão do anel B da vitexina na cavidade de β -CD, conforme já constatado no ROESY.

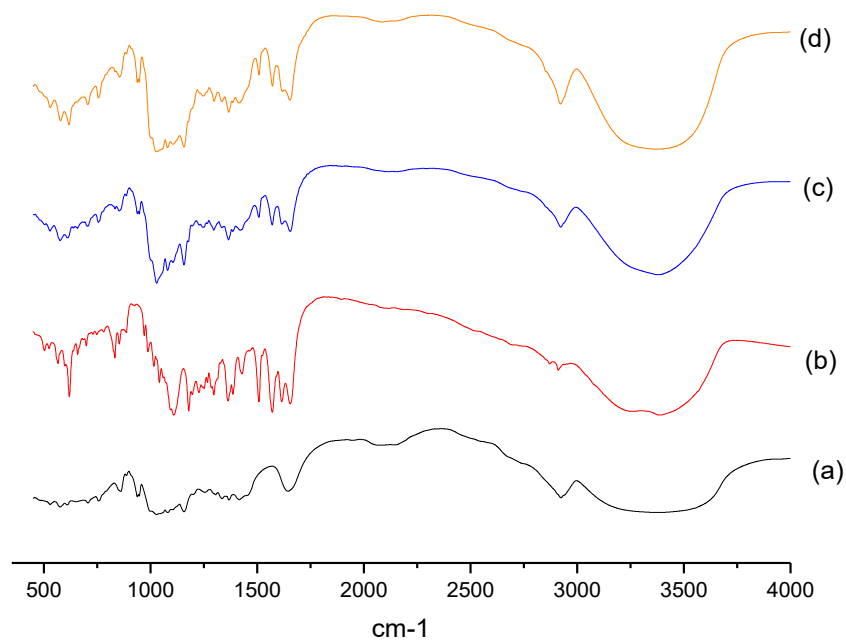


Figura 35. Espectros de IV-TF para (a) β -CD, (b) vitexina, (c) mistura física e (d) vitexina/ β -CD.

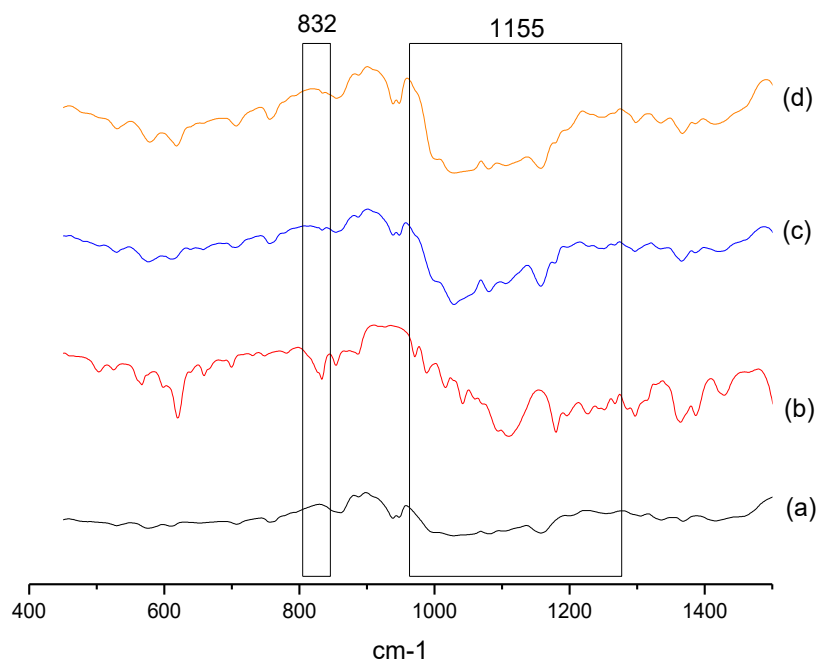


Figura 36. Expansão do espectro de IV-TF para (a) β -CD, (b) vitexina, (c) mistura física e (d) complexo de inclusão vitexina/ β -CD.

7.3.4 Estudo de dissolução *in vitro*

O perfil de dissolução relaciona a porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo e representa uma técnica relativamente rápida e barata para avaliar formas farmacêuticas sólidas antes do teste clínico. Permite, também, a obtenção de parâmetros cinéticos, que são importantes para determinar a velocidade e eficiência do processo, além do tempo necessário para que determinadas porcentagens do fármaco se dissolvam, possibilitando, desta forma, conclusões a respeito das características biofarmacêuticas *in vitro* de determinada amostra (STORPIRTIS, 1999).

Nos 3 primeiros minutos (Figura 37) observa-se que a taxa de dissolução da vitexina livre é 16,6 % e do complexo vitexina/ β -CD é 47,2%, ou seja, uma diferença de aproximadamente 30,6%, mostrando que nos minutos iniciais a vitexina está dissolvida em maior quantidade para o complexo vitexina/ β -CD do que para vitexina livre. Essa diferença de aproximadamente 30 % se mantém nos 6 minutos. Nos 10 minutos a referida diferença aumenta para 43 %.

Para a vitexina livre observa-se que nos primeiros 20 minutos (Figura 37) houve uma solubilização de 60% desta flavona, atingindo uma taxa de dissolução de 88,2% de vitexina solubilizada nos 60 minutos. Observa-se um perfil diferente para o complexo de inclusão vitexina/ β -CD, sendo observado que nos primeiros 20 minutos ocorre a solubilização de 73,3 % de vitexina, ou seja, 13,3 % a mais quando comparado com ela livre. No geral, há um aumento da solubilidade da vitexina nos primeiros 30 minutos para o complexo vitexina/ β -CD do que para a vitexina livre. Isso mostra que na solução do complexo vitexina/ β -CD há uma maior concentração de vitexina dissolvida quando comparada com ela livre, nos primeiros 30 minutos.

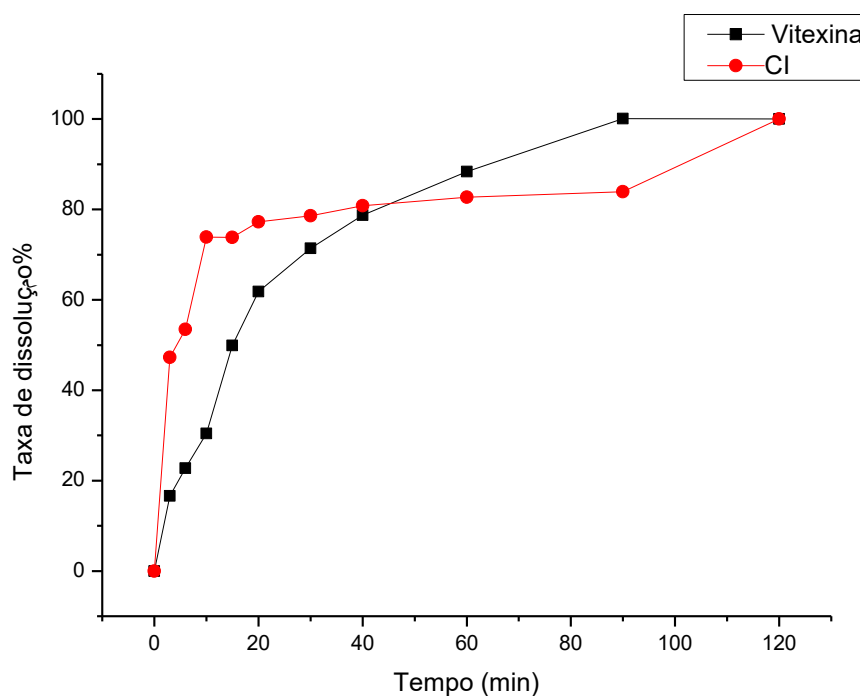


Figura 37. Estudo de dissolução *in vitro* de vitexina e complexo de inclusão vitexina/ β -CD numa solução salina acidificada (pH 1,5), 37°C.

7.4 Avaliação da atividade expectorante em camundongos

A quantificação do vermelho de fenol é simples e possibilita uma triagem de drogas que influenciam as secreções traqueobrônquicas devido este marcador ser secretado no lúmen traqueal. Nesse caso, os expectorantes atuam aumentando a secreção de vermelho de fenol no lúmen traqueal (ENGLER, 1984).

A abordagem experimental utilizada baseia-se no fato de que parte do corante (vermelho de fenol) injetado por via intraperitoneal é absorvido sistemicamente e então secretado no trato respiratório, onde pode ser coletado e quantificado. Este método proporciona a vantagem de avaliar a função secretora do sistema respiratório como um todo. A concentração de vermelho de fenol no fluido do trato respiratório é capaz de atuar como um marcador para secreção de mucina e água, e que essa secreção pode ser influenciada pela administração de vários medicamentos, inclusive expectorantes (KAGAN, 2009).

A partir da secreção de vermelho de fenol nas vias aéreas foi possível quantificá-lo no lavado broncoalveolar (LBA) dos camundongos, avaliando o potencial expectorante das amostras administradas. Para o complexo nas doses de 0,2, 1 e 5

mg/kg, a concentração do marcador quantificado foi de $4,26 \pm 0,50$, $3,95 \pm 0,40$ e $4,82 \pm 0,55$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. De modo semelhante, foi obtida uma concentração de $3,91 \pm 0,27$ $\mu\text{g/mL}$ do vermelho de fenol no LBA quando os animais foram tratados com Guaifenisina (100 mg/kg). Para os controles negativos a concentração de vermelho de fenol foi de $3,00 \pm 0,37$ e $2,09 \pm 0,15$ para a água e β -CD, respectivamente. As comparações entre os dados de vitexina e CI foram possíveis, tendo em vista que uma suspensão de vitexina em água foi preparada e todo o volume foi utilizado no experimento garantindo que toda a massa da vitexina foi administrada, concomitante a isso, ao administrar a suspensão de vitexina em solução aquosa nos animais, a mesma era agitada.

Na Figura 38 é mostrada a concentração de vermelho de fenol secretada e obtido pelo LBA de camundongos, sendo observado que o efeito do complexo não tem um padrão de resposta dose-dependente. Não houve diferença significativa entre os animais que receberam água e os tratados com a vitexina nas doses estabelecidas. Por outro lado, houve diferença significativa entre as doses do complexo e os animais que receberam apenas β -CD ($p < 0,05$). É importante observar que a dose administrada da guaifenisina (100 mg/kg) foi aproximadamente 100 vezes maior do que as doses de vitexina (0,2, 1 e 5 mg/kg) no complexo, sendo um indicativo de que a vitexina complexada com o oligossacarídeo mostra ser um expectorante promissor, pois em baixas doses conseguiu secretar quantidade semelhante de vermelho de fenol em comparação com a guaifenisina. Isso sugere que o complexo vitexina/ β -CD pode aumentar o volume de secreção aquosa das vias aéreas, diminuir a viscosidade do muco e, posteriormente, atuar melhorando a “clearance” mucociliar. No entanto, são necessários estudos mais específicos para determinar o mecanismo de ação.

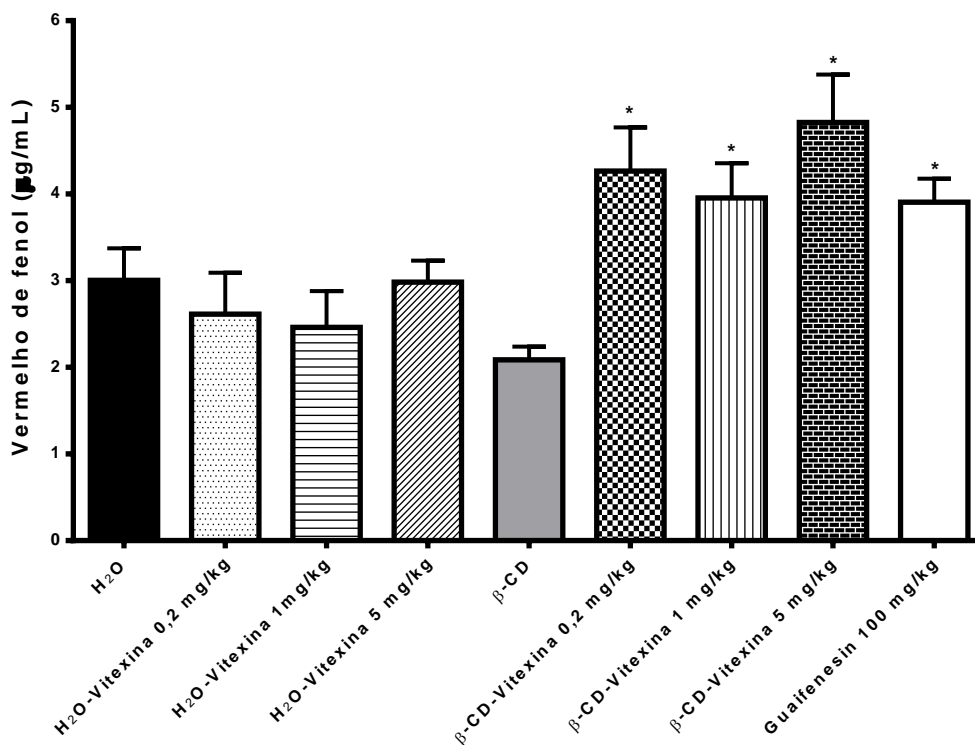


Figura 38. Quantificação de vermelho de fenol (n=5) no LBA para os controles negativos (água e β-CD), vitexina, complexo vitexina/β-CD e guaifenesina. Dados expressos em média ± E.P.M. e *p<0,05 (ANOVA one-way com pós teste de Tukey).

Quando se trata do complexo, os resultados sugerem que o oligossacarídeo melhora a biodisponibilidade da vitexina em meio aquoso. As ciclodextrinas têm sido bastante utilizadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, particularmente devido às suas propriedades complexantes, as quais proporcionam incremento da solubilidade e conseqüente aumento da taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis, estabilidade e redução de irritações (gástrica, dérmica ou ocular). (GUEDES et al., 2008).

Em estudo realizado por Lin e colaboradores (2008) foi observado que outra flavona, a narigenina (Figura 39), apresenta atividade expectorante, aumentando significativamente a secreção de vermelho de fenol da traqueia de camundongo nas doses de 30-67 mg/kg (via oral), mostrando o potencial dessa classe de metabólitos secundários sobre as vias aéreas.

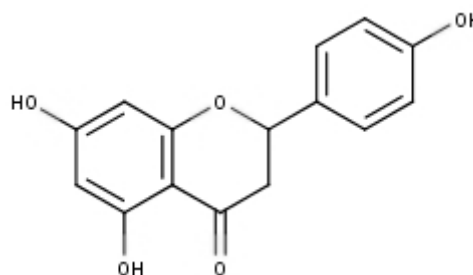


Figura 39. Estrutura da narigenina.

Estudos propõem os mecanismos de ação dos expectorantes, demonstrando que eles atuam como irritantes inespecíficos dos nervos aferentes vagais na mucosa gástrica que desencadeiam reflexos colinérgicos parassimpáticos centrais para estimular a secreção gástrica e brônquica. Nos brônquios, estes reflexos colinérgicos podem estimular o transporte de células secretora para produzir secreção com diminuição da viscosidade. A guaifenesina apesar de não ter ação mucolítica atua diminuindo a tensão superficial do muco bronquial (YUTA, 2005).

Os fármacos que aumentam o volume de secreções são conhecidos como possuidores de atividades segretagoga. Quando uma substância apresenta a propriedade de aumentar, de forma consistente, as secreções da árvore respiratória, isso representa uma vantagem no tratamento clínico de doenças do sistema respiratório (DISSE, ZIEGLER, 1987).

7.5 Atividade antitussígena

O agente tussígeno, ácido cítrico, desencadeia a tosse através de estímulo às fibras C ou ainda pela ativação das fibras vagais mielinizadas ($A\delta$), sendo considerada uma metodologia efetiva para modelos experimentais (TANAKA, MARUYAMA, 2005).

Neste estudo, os animais foram expostos à nebulização com ácido cítrico (0,4 M) sem tratamento, e transcorridas 23 horas e 30 minutos os grupos foram tratados com as amostras. Após 24 horas foram submetidos novamente à nebulização com ácido cítrico, sendo possível calcular médias de redução do número de tosse. A referida redução foi de $3,56 \pm 0,83$, $3,75 \pm 0,88$, $2,56 \pm 0,83$ para a vitexina nas concentrações de 0,2, 1 e 5 mg/kg, respectivamente. Para o complexo nas concentrações de vitexina em 0,2, 1 e 5 mg/kg, as reduções foram $3,17 \pm 1,02$, $3,50 \pm 1,02$ e $4,00 \pm 1,02$, respectivamente. Para os controles água, β -CD e codeína (30 mg/kg) os resultados foram $0,83 \pm 1,02$, $1,00 \pm 1,02$ e $3,00 \pm 0,88$, respectivamente.

A Figura 40 mostra que tanto a vitexina suspensa em água quanto o complexo vitexina/ β -CD contendo esta flavona reduziram a frequência da tosse nos animais, nas três doses testadas (0,2, 1 e 5 mg/kg), não apresentando efeito dose-dependente. Observa-se que houve diferença significativa entre a frequência de tosse antes e depois dos tratamentos com vitexina, vitexina/ β -CD e codeína ($p < 0,05$).

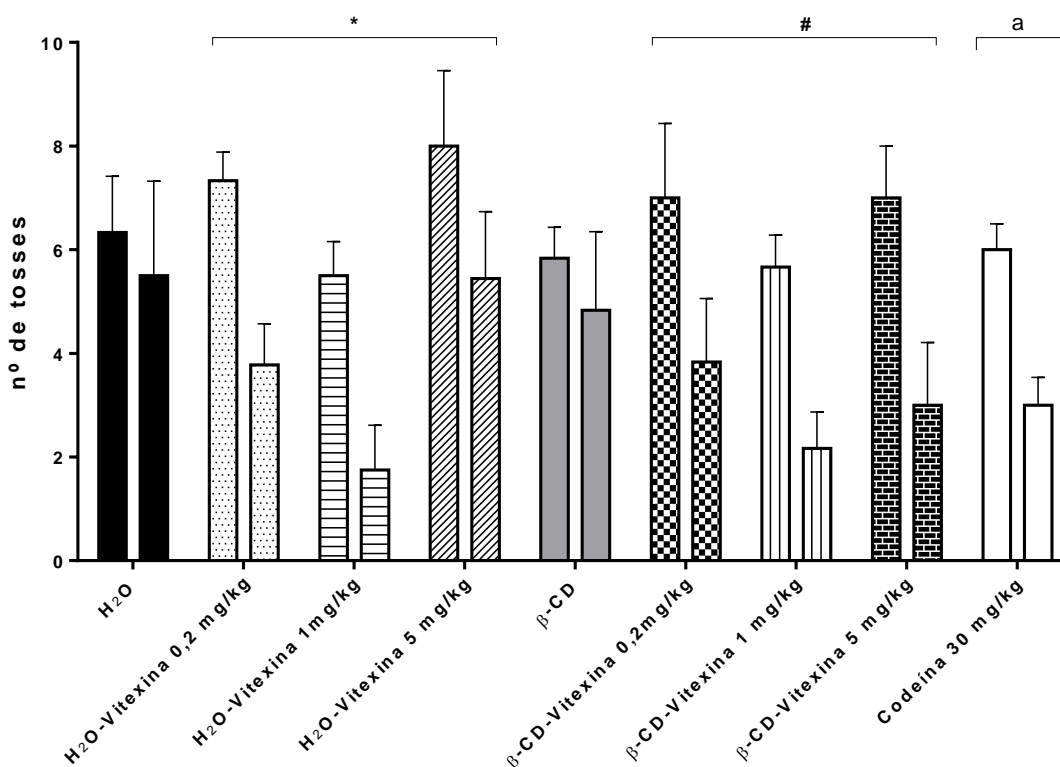


Figura 40. Frequência de tosse a partir da exposição do ácido cítrico (0,4 M) após administração dos tratamentos: controles negativos (água e β -CD), vitexina, complexo (vitexina/ β -CD) e codeína. Dados expressos em média \pm E.P.M. e $n = 5$; *, #, a ($p < 0,05$) (ANOVA two-way com pós teste de Sidak).

A inalação de aerossóis de ácido cítrico ativa as fibras C ou A δ das vias aéreas e induz reflexos de tosse, sendo efetiva a análise de substâncias antitussígenas através da metodologia utilizando este ácido como tussígeno (TANAKA, MARUYAMA, 2005). O ácido cítrico também desencadeia reflexos da tosse através da estimulação de mastócitos mediada pelas vias de leucotrienos e/ou histaminas com ação sobre as

fibras C. Além disso, a ativação das fibras C pode ser mediada por taquicininas, pois substância P é conhecida por estimular mastócitos (LAI et al., 2009).

As fibras C são os nociceptores vagais mais numerosos nos brônquios e pulmões e expressam os canais iônicos da membrana, incluindo o TRPV1. Os receptores de potencial transiente (TRP) são proteínas do canal iônico, algumas das quais são expressas nos terminais nervosos sensoriais das vias aéreas. Estes receptores conduzem cátions Ca^{2+} , quando ativados eles podem despolarizar células, ativando o nervo sensorial e produzindo potencial de ação para desencadear reflexos, como a tosse. TRPV1 é um canal catiônico presente no músculo liso e epitélio do trato respiratório, e um dos agentes que o ativam é o ácido cítrico (SADOFSKY et al., 2014; HUNTER et al. 2016; BONVINI, 2015; RODRIGUES, GALVÃO, 2017). Isso sugere que possivelmente o potencial da vitexina como antitussígeno demonstrado nesse estudo possa estar relacionado à atividade sobre o receptor TRPV1.

A tosse é um reflexo protetor normal da árvore traqueobrônquica, sendo responsável pela manutenção da via aérea livre de secreção e corpos estranhos (FREITAS, PARREIRA, IBIAPINA, 2010). Os nervos vagais que são ativados para produzir o reflexo da tosse podem ser estimulados por uma diversidade de alterações, incluindo produção excessiva de muco, processos inflamatórios, substâncias inaladas irritantes, dentre outros. Assim, a tosse torna-se um sintoma típico comum de doenças como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, infecções do trato respiratório, sinusite, rinite e tantas outras (SIMPSON, AMIN, 2006).

Tendo em vista a importância de sintomas como tosse, conforme descrito acima, e excesso de produção de muco, torna-se relevante a busca por substâncias com potencial para controlá-los. Além disso, a pesquisa ao qual tomou-se como referência para o desenvolvimento deste estudo, Venturini e colaboradores (2018), demonstraram com exclusividade, que a vitexina (0,2, 1 e 5 mg/kg) reduz a hipersensibilidade induzida pela OVA na migração de eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares no LBA. Mostrou ainda pela análise histológica dos pulmões que esta flavona suprimiu a infiltração de leucócitos, a produção de muco e o edema pulmonar. Os autores do referido estudo concluíram que a vitexina tem potencial para o tratamento de hipersensibilidade alérgica. Isso corrobora com as atividades expectorantes e antitussígenas encontradas nesta pesquisa.

Portanto, as relações acima acerca dos mecanismos de ação da vitexina merecem estudos mais detalhados, porém deve-se reconhecer o potencial desse metabólito secundário para reduzir a tosse e promover atividade expectorante.

7.6 Toxicidade utilizando *Artemia salina*

O ensaio permite a avaliação da toxicidade aguda, sendo considerado essencial como um teste preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (CAVALCANTE et al., 2001).

No ensaio de toxicidade com *Artemia salina* não foi possível calcular a DL_{50} , pois na maior concentração utilizada (1000 $\mu\text{g/mL}$) as larvas estavam todas vivas tanto para a vitexina quanto para o complexo e o controle negativo. A toxicidade das amostras pode ser determinada, tendo em vista a classificação seguindo os critérios estabelecidos por Meyer et al. (1982), ao qual determina que quando a DL_{50} for menor que 1000 $\mu\text{g/mL}$ considera-se tóxica e quando $DL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ considera-se não tóxica.

Além disso, Choo e colaboradores (2012) realizando estudos com indução de diabetes em ratos e camundongos mostraram que a vitexina não apresentou sinais de toxicidade na dose mais alta de 2g/kg.

8. Conclusão

Vitexina foi isolada de *Jatropha mutabilis* e um método desenvolvido por CLAE-DAD para quantificação desta flavona na referida espécie apresentou ser simples, linear, preciso, exato e específico. A formação do complexo de vitexina com β -CD pôde ser evidenciado através das técnicas de RMN/ROESY, IV-TF, MEV e dissolução *in vitro*, caracterizando a inclusão parcial da vitexina através do anel B na cavidade desse oligossacarídeo. O complexo formado vitexina/ β -CD apresentou atividade expectorante utilizando o LBA da traqueia de camundongo e vermelho de fenol como marcador, sugerindo melhora na biodisponibilidade da substância. Vitexina e o complexo vitexina/ β -CD também reduziram a frequência de tosse em camundongos expostos ao ácido cítrico. O estudo confirma o potencial farmacológico da vitexina sobre reações de doenças do sistema respiratório, demonstrando ação expectorante para o complexo vitexina/ β -CD, e antitussígena para vitexina e complexo vitexina/ β -CD, em baixas doses de vitexina (0,2, 1 e 5 mg/Kg). Todos esses dados são descritos pela primeira vez.

9. Referências

ALBUQUERQUE, U.P. et. al. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, 114, 325–354, 2007.

ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R.; Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, **Taylor & Francis**, Nova Yorque, 2006.

ASEM, A. Historical record on brine shrimp *Artemia* more than one thousand years ago from Urmia Lake, Iran. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**, 113–114, 2008.

BIANCO, E.M.; SANTOS, C.A.M. Substances isolated from leaves of *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpinaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 13 (2), 93-99, 2003.

BONVINI S.J.; BIRRELL M.A.; SMITH, J.A.; BELVISI, M.G. Targeting TRP channels for chronic cough: from bench to bedside. **Archive Pharmacology**, 388, 401-420, 2015.

BORGHI, S.M.; CARVALHO, T.T.; STAURENGO-FERRARI, L.; HOHMANN, M.S.; PINGE-FILHO, P.; CASAGRANDE, R.; VERRI JR. W.A. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. **Journal of Natural Products**, 76, 1141–1149, 2013.

BRASIL, Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução n 899 de 29 maio de 2003 que determina a publicação do **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Diário Oficial da União. Brasília-DF, 2003.

BRASIL, 25 jul. 2017. Resolução RE n° 166 de 24 de jul de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Diário Oficial da União. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, 56 (11), 317, 1998.

BRITTO, M.A.F.O.; NASCIMENTO JR., C.S.; SANTOS, H.F. Análise estrutural de ciclodextrinas: Um estudo comparativo entre métodos teóricos e clássicos e quânticos. **Química Nova**, 27 (6), 882-888, 2004.

CAN, O.D.; DEMIR OZKAY, U.; UCEL, U.I. Anti-depressant-like effect of vitexin in BALB/c mice and evidence for the involvement of monoaminergic mechanisms, **European Journal of Pharmacology**, 699, 250–257, 2013.

CANNING, B.J.; CHANG, A.B.; BOLSER, D.C.; SMITH, J.A.; MAZZONE, S.B.; MCGARVEY, L. Anatomy and neurophysiology of cough: CHEST Guideline and Expert Panel Report. **Chest**. 146(6), 1633-48, 2014.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach. **Química Nova**. 23, 120-136, 2001.

CHOO, C.Y.; SULONG, N.Y.; MANA, F.; WONG, T.W. Vitexin and isovitexin from the Leaves of *Ficus deltoidea* with *in-vivo* α -glucosidase inhibition. **Journal of Ethnopharmacology**. 142, 776–781, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: UNICAMP, 2006.

CONNORS, K.A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. **Chemical Reviews**, 97, 1325-1357, 1997.

COSTA, E.C. Estudo fitoquímico e biológico *in vitro* de *Jatropha mutabilis* (POHL) BAILL (EUPHORBIACEAE). **Dissertação** (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido), Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), 2014.

COSTA, E.C.; OLIVEIRA, A.P.; ALMEIDA, J.; SIQUEIRA-FILHO, J.; ARAÚJO, E. Chemical Composition of Essential Oil from the Leaves of *Jatropha mutabilis* (Pohl) Baill (Euphorbiaceae). **TEOP** 17, (6), 1156 – 1160, 2014.

CUI, G.Y., TAN, R.X. Lignans and tannins from *Alchornea davidii* (Euphorbiaceae) and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**. 32, 99–102, 2004.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Use of cyclodextrins in the formation of inclusion complexes of pharmaceutical interest. **Journal of Applied Basic Pharmaceutical Sciences**, 28 (1), 1-9, 2007.

DASS, C.R.; JESSUP, W. APOLIPOPOTIENS A-I. Cyclodextrins and liposomes as potential drugs for the reversal of atherosclerosis. A Review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 52, 731–761, 2000.

DANDAWATE, P.; VEMURI, K.; SWAMY, K.V.; KHAN, E.M.; SRITHARAN, M.; PADHYE, S. Synthesis, characterization, molecular docking and anti-tubercular activity of Plumbagin–Isoniazid Analog and its β -cyclodextrin conjugate. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 24, 5070–5075, 2014.

DEDAVID, B.A.A.; GOMES, C.I; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores, **Porto Alegre: EDIPUCRS**, 2007.

DEL DONNO, M.; BITTESNICH, D.; CHETTA, A.; OLIVIERI, D.; LOPEZ-VIDRIERO, M.T. The effect of inflammation on mucociliary clearance in asthma: an overview. **Chest**, 118, 1142–1149, 2000.

DEL VALLE, E.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, 39, 1033–1046, 2004.

DEMIR OZKAY, U., CAN, O.D. Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 109, 23–30, 2013.

DE OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, 34 (7), 1224-1230, 2011.

DE MELO, G.O.; MUZITANO, M.F.; LEGORA-MACHADO, A.; ALMEIDA, T.A.; DE OLIVEIRA, D.B.; KAISER, C.R.; KOATZ, V.L.; COSTA, S.S. C-glycosylflavones from the aerial parts of *Eleusine indica* inhibit LPS-induced mouse lung inflammation. **Planta Medica**, 71 (4), 362–363, 2005.

DISSE, B.G.; ZIEGLER, H.W. Pharmacodynamic mechanism and therapeutic activity of ambroxol in animal experiments. **Respiration**. 51, 15-22, 1987.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista Ciências Farmacêutica Básica Aplicada**. 28 (3), 241- 249, 2007.

EGYED, O. Spectroscopic studies on β -cyclodextrin. **Vibrational Spectroscopy**, 1 (2), 225-227, 1990.

ENGLER, H.; SZELENYL, I. Tracheal Phenol Red Secretion, a new method for screening mucosecretolytic compounds. **Journal of Pharmacological Methods**, 11, 151-157, 1984.

EPSTEIN SHOCHET, G.; DRUCKER, L.; PASMNIK-CHOR, M.; POMERANZ, M.; FISHMAN, A.; TARTAKOVER MATALON, S.; LISHNER, M. First trimester human placental factors induce breast cancer cell autophagy, **Breast Cancer Res. Treat.** 149, 645–654, 2015.

FUMAGALI, E. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18 (4), 627-641, 2008.

Frazier, J. M. *In vitro* Toxicity testing. Applications to safety evaluation. **New York, Marcel Dekker, Inc.**, 300, 1992.

FREITAS, F.S.; PARREIRA, V.F.; IBIAPINA, C.C. Aplicação clínica do pico de fluxo da tosse: uma revisão de literatura. **Fisioterapia em Movimento**, Curitiba, 23 (3), 495-502, 2010.

GUEDES, F.L.; ALVES, G.M.C.; SANTOS, F.L.A.; LIMA, L.F; ROLIM, L.A.; ROLIM-NETO, P.J. Cyclodextrins: as a technological adjuvant to improve the bioavailability of drugs. **Brazilian Journal of Pharmacy**, 89(3), 220-225, 2008.

GONG, J.; CHEN, M.; ZHENG, Y.; WANG, S.; WANG, Y. Polymeric micelles drug delivery system in oncology. **Journal of Controlled Release**, 159, 312–23, 2012.

GRACE, M.S.; DUBUIS, E.A.; BIRRELL, M.A.; BELVISI, M.G.; WIDDICOMPE, J.G. Afferent receptors in the airways and cough. **Respiration Physiology**, 5–15, 1998.

GREATBANK, D.; PICKFORD, R. Cyclodextrins as chiral complexing agents in water, and their application to optical purity measurements. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 25 (3), 208-215, 1987.

HĂDĂRUGĂ, N.G. *Ficaria verna* Huds. extracts and their β -cyclodextrin supramolecular systems. **Chemistry Central Journal**, 6, 16, 2012.

HE, M.; MIN, J.W.; KONG, W.L.; HE, X.H.; LI, J.X.; PENG, B. W. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**, 115, 74–85, 2016.

HOUTMEYERS, E., GOSSELINK, R., GAYAN-RAMIREZ, G., DECRAMER, M. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. **European Respiratory Journal**, 13(5), 1177–1188, 1999.

HUNTER, D., DEY, R., BATCHELOR, T. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) treatment alters transient receptor potential Vanilloid 1 (TRPV1) mRNA expression in A-Delta nodose airway neurons during a critical period of development. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 193, 2016.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

ICH; Validation of Analytical Procedures: **Text and Methodology Q1A(R2); International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, Geneva, 2005.

JANSOOKA, P.; OGAWAB, N.; LOFTSSONC, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical. **Applications International Journal of Pharmaceutics**, 535, 272–284, 2018.

JE, H.G.; HONG, S.M.; JE, H.D.; SOHN, U.D.; CHOI, Y.S.; SEO, S.Y.; MIN, Y.S.; CHUNG, S.J.; SHIN, Y.K.; LEE, T.J.; PARK, E.S.; JEONG, J.H. The inhibitory effect of vitexin on the agonist-induced regulation of vascular contractility, **Die Pharmazie**, 69, 224–228, 2014.

KAMEI, J.; HAYASHI, S.S.; TAKAHASHI, Y.; NOZAKI, C. Role of cyclin-dependent kinase 5 in capsaicin-induced cough. **European Journal of Pharmacology**, 566, 181–184, 2007.

KAMEI J.; NAKANISHI, Y.; ISHIKAWA, Y.; HAYASHI, S.S.; ASATO, M.; OHSAWA, M. Possible involvement of tetrodotoxin-resistant sodium channels in cough reflex. **European Journal of Pharmacology**, 652, 117–120, 2011.

KAMEI, J.; NAKANISHI, Y.; ASATO, M.; IKEDE, H. Fentanyl enhances the excitability of rapidly adapting receptors to cause cough via the enhancement of histamine release in the airways. **Cough**, 9 (3), 1-6, 2013.

KIM, H.; HYUN-WON KIM, H.-W.; JUNG, S. Aumento na Solubilidade aquoso de algumas Flavonas por complexação com ciclodextrinas. **Bulletin Korean Chemical Society**, 29, 3, 2008.

KRCATOVIC, E.; RUSAK, G.; BEZIC, N.; KRAJACIC, M. Inhibition of tobacocomosaic virus infection by quercetin and vitexin, **Acta Virologica** 52, 119–124, 2008.

KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial crops and products**, 2 (8), 1–10, 2008.

KNOWLES, M.R.; BOUCHER, R.C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. **Journal of Clinical Investigation**, 109 (5), 571–577, 2002.

LAI, Y.L.; WU, L.L.; LIN, T.Y.; LIN, C.H. The role of mast cells in citric acid-induced airway constriction and cough. **Chinese Journal of Physiology**, 52, 5, p. 332-338, 2009.

LANÇAS, F.M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, 1, 2, 2009.

LEAL, C.K.A.; AGRA, M.F. Estudo Farmacobotânico comparativo das folhas de *Jatropha molissima* (Pohl) Baill. e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, 24 (1), 5-13, 2005.

LEITE, A.C.; CABRAL, E.C.; DOS SANTOS, D.A.P.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F. Isolamento do alcaloide ricinina das folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) através de cromatografia em contracorrente. **Química Nova**, 28 (6), 983-985, 2005.

LI, J.; OU-LEE, T.M.; RABA, R.; AMUNDSON, R.G.; LAST, R.L. Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. **The Plant Cell**, 5, 171-179, 1993.

LIMA, A.A.N.; SOBRINHO, J.L.S.; CORRÊA, R.A.C.; ROLIM-NETO, P.J. Alternative Technologies to Improve Solubility of Poorly Water Soluble Drugs. **Latin American Journal of Pharmacy**, 27(5), 789-797, 2008.

LIMA, M.A.A.; LIMA, J.Q.; ARRIAGA, A.M.C.; ANDRADE-NETO, M.; SANTIAGO, G.M.P.; BEZERRA, B.P.; FERREIRA, Y.S.; VERAS, H.N.H.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Sebastiania macrocarpa* Muell. Arg. (Euphorbiaceae). **Química Nova**, 32 (2), 348-353, 2009.

LIN, B.Q.; LI, P.B.; WANG, Y.G.; PENG, W.; WU, Z.; SU, W.W.; JI, H. The expectorant activity of naringenin. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, 21 (2), 259–263, 2008.

LIU, L. H.; WANG, L. S.; LIU, X. M. Comparison of antitussive, expectorant and antiasthmatic activities of different extracts from *Ficus microcarpa*. **Journal of Medicinal Plants Research**, 3 (8), p. 596-599, 2009.

LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; FONTES, D. A. F.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P.J. Analytical tools applied to the characterization of drug-cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, 31(2), 117-124, 2010.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, 329, 1–11, 2007.

MARTINEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, 6, 271-278, 2002.

MCCOOL, F.D. Global physiology and pathophysiology of cough: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. **Chest.**, 129 (1), 2006.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E., MCLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, 45, 31-34, 1982.

MOREIRA, F.P.M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A.B.P.; CARO, M.S.B.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Flavonoids and triterpens of *Baccharis pseudotenuifolia*-bioactivity on *Artemia salina*. **New Chemistry**, 26 (3), 309-311, 2003.

NGUYEN, T.A., BENGUO LIU, B., JIAN ZHAO, J., THOMAS, D.S., HOOK, J.M. Uma investigação sobre a estrutura supramolecular, solubilidade, estabilidade e atividade antioxidante do complexo de inclusão de rutina/ciclodextrina. **Food Chemistry**, 136, 186–192, 2013.

OLIVEIRA, D. G. A família Euphorbiaceae Juss. em um fragmento de Caatinga em Sergipe. **Scientia Plena**, 9, 2013.

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; CODINA, C. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C18 column. **Analytica Chimica Acta**, 512, 271-280, 2004.

PARRA, A.L.; YHEBRA, R.S.; SANDIÑAS, I.G.; BUELA L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium letal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, 8, 395-400, 2001.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introduction to spectroscopy. São Paulo: **Cengage Learning**, 2010.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Jornal de Biotecnologia e Biodiversidade**, 3 (4), 146-152, 2012.

PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, 63 (7), 2000.

PIRES, Y. M. S.; ALMEIDA, L. R.; MEIRELLES, L. M. A. Perfil de dissolução do tenoxicam em complexos de inclusão de beta-ciclodextrinas, **Jornal eletrônico de farmácia**, 13, 64-70, 2016.

RAGONE, M.I.; SELLA, M.; CONFORTI, P.; VOLONTE, M.G.; CONSOLINI, A.E. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedron) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum, **Journal of Ethnopharmacology**. 113, 258–266, 2007.

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

RODRIGUES, M.S.; GALVÃO, I.M. Aspectos fisiopatológicos do reflexo da tosse: uma revisão de literatura. **Revista de Medicina** (São Paulo), 96(3), 172-176, 2017.

ROGERS, D.F. Fisiologia da secreção do muco das vias aéreas e fisiopatologia da hipersecreção. **Respiratory Care**, 52, 9, 2007.

ROSA, S.I.; RIOS-SANTOS, F.; BALOGUN, S.O.; MARTINS, D.T. Vitexin reduces neutrophil migration to inflammatory focus by down-regulating pro-inflammatory mediators via inhibition of p38, ERK1/2 and JNK pathway. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, 23, 9–17, 2016.

SABANDAR, C.W.; AHMAT, N.; JAAFAR, F.M.; SAHIDIN, I. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. **Phytochemistry**, 85, 7–29, 2013.

SALI, N.; CSEPREGI, R.; KŐSZEGI, T.; SÁNDORKUNSÁGI-MÁTÉ, S.; SZENTE, L.; POÓR, M. Complex formation of flavonoids fisetin and geraldol with β -cyclodextrins. **Journal of Luminescence**, 194, 82-90, 2018.

SANTOS, M.J.; MACHADO, I.C.; LOPES, A.V. Biologia reprodutiva de duas espécies de *Jatropha L.* (Euphorbiaceae) em Caatinga, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 28 (2), 361-373, 2005.

SANTOS, P.M.L.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R.M. Flavonoides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15 (4), 321-325, 2005.

SCHNEIDER, H.; HACKET, F.; RUEDIGER, V.; IKEDA, H. NMR Studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Chemical Reviews**, 98(5), 1755-1785, 1998.

SCHICKANEDER, H.; ENGLER, H.; SZELENYL, I. 2-[(3-Pyridinylmethyl) thiopyrimidine Derivatives: New Bronchosecretolytic Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, 30 (3), 547-551, 1987.

SÉCHER, T.; GUILLEMINAULT, L.; AMANAM, I.; HEUZÉ-VOURC'H, N. Anticorpos terapêuticos: uma nova era no tratamento de doenças respiratórias? **Pharmacology & Therapeutics**, 189, 149-172, 2018.

SPRICIGO, R.; BOTELHO K.C.A.; CONSIGLIERI, V.O.; SERRA, C.H.R. Obtainment and evaluation of inclusion complexes of furosemide with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Effects on Drug Dissolution Properties. **Latin American Journal of Pharmacy**, 27 (5), 645-53, 2008.

STORPIRTIS, S. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 35, 1, 1-16, 1999.

SADOFSKY, L.R.; SREEKRISHNA, K.T.; LIN, Y., SCHINAMAN, R. Unique responses are observed in transient receptor potential Ankyrin 1 and Vanilloid 1 (TRPA1 and TRPV1) co-expressing cells. **Cells**, 3, 616-26, 2014.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 37 (1), 2001.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6.ed. Porto Alegre: **Editora da UFRGS**: Florianópolis: Editora da UFSC, 1104p, 2010.

SIMÕES, C.M.A; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P. Farmacognosia: Do produto ao medicamento. Porto alegre: **Artmed**, 2017.

SIMPSON, C.B.; AMIN, M.R. CHRONIC COUGH: State of the art review. **Otolaryngol head Neck surg**, 134, 693-700, 2006.

SPINO, A. Non-pharmacological techniques for the extremes of the cough spectrum. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, 2018.

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chemicals Reviews**, 98, 1743-1753, 1998.

TAYLOR-CLACK, T.E. Role of reactive oxygen species and TRP channels in the cough reflex. **Cell Calcium**, 60, 155–162, 2016.

TANAKA, M., MARUYAMA, K. Mechanisms of Capsaicin and Citric Acid Induced Cough Reflexes in Guinea Pigs. **Journal of Pharmacological Sciences**, 99, 77-82, 2005.

TANAKA, J.C.A.; SILVA, C.C.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M.A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* MART. (TILIACEAE). **Química Nova**, v. 28, n. 5, 834-837, 2005.

TOMMASINI, S.; RANERI, D.; FICARRA, R.; CALABRÒ, M.L.; STANCANELLI, R.; FICARRA, P. Melhoria na solubilidade e taxa de dissolução de flavonóides por complexação com β -ciclodextrina. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 16, 379-387, 2004.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chemical Reviews**, 98, 2045–2076, 1998.

VENTURINI, C.G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, 31, 360-368, 2008.

VENTURINI, C.L.; MACHO, A.; ARUNACHALAM, K.; DE ALMEIDA, D.A.T.; ROSA, S.I.G.; BALOGUN, S.O.B.; DAMAZO, A.S.; MARTINS, D.T.O. Vitexin inhibits inflammation in murine ovalbumin-induced allergic asthma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 97, 143-151, 2018.

WANG, X.S.; HU, X.C.; CHEN, G.L.; YUAN, X.; YANG, R.N.; LIANG, S.; REN, J.; SUN, J.C.; KONG, G.Q.; GAO, S.G.; FENG, X.S. Effects of vitexin on the pharmacokinetics and mRNA expression of CYP isozymes in rats. **Phytotherapy Research**, 29 (3), 366–372, 2015.

WANG, J.; CAO, Y.; SUN, B.; WANG, C. Caracterização físico-química e de liberação de complexos de inclusão de óleo de alho- β -ciclodextrina. **Food Chemistry**, 127, 1680-1685, 2011.

WEN, P.; HAN, H.; WANG, R.; WANG, N.; YAOET, X. C-glycosylflavones and aromatic glycosides from *Campylotropis hirtella* (Franch.) Schindl. **Asian Journal of Traditional Medicines**, 2 (4), 2007.

XAVIER-SANTOS, J.B.; FÉLIX-SILVA, J.; PASSOSA, J.G.R.; GOMESA, J.A.S.; FERNANDES, J.M.; GARCIA, V.B.; ARAUJO-JUNIOR, R.F. Desenvolvimento de um gel antiinflamatório tópico eficaz e seguro contendo extrato de folhas de *Jatropha gossypifolia*: resultados de um ensaio pré-clínico em camundongos. **Journal of Ethnopharmacology**, 227, 268–278, 2018.

XUE, H.F.; YING, Z.M.; ZHANG, W.J.; MENG, Y.H.; YING, X.X.; KANG, T.G. Hepatic gastric, and intestinal first-pass effects of vitexin in rats. **Pharmaceutical Biology**, 52 (8), 967–971, 2014.

YANG, S.H.; LIAO, P.H.; PAN, Y.F.; CHEN, S.L.; CHOU, S.S.; CHOU, M.Y. The novel *p53*-dependent metastatic and apoptotic pathway induced by vitexin in human oral câncer OC2 cells, **Phytotherapy Research: PTR**. 27, 1154–1161, 2013.

ZHANG, Y.; TIE, X.; BAO, B.; WU, X. Metabolism of flavone C-glucosides and *p*-coumaric acid from antioxidant of bamboo leaves (AOB) in rats. **British Journal of Nutrition**, 97 (3), 484–494, 2007.

ZHOU, X.; PENG, J.; FAN, G.; WU, Y. Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. **Journal of Chromatography A**, 1092, 216–221, 2005.

ŻYŻELEWICZ, D.; ORACZ, J.; KACZMARSKA, M.; BUDRYN, G.; GRZELCZYK, J. Preparation and characterization of inclusion complex of (+)-catechin with β -cyclodextrin. **Food Research International**, 113, 263–268, 2018.

ZHU, Q.; MAO, L.N.; LIU, C.P.; SUN, Y.H.; JIANG, B.; ZHANG, W.; LI, J.X. Antinociceptive effects of vitexin in a mouse model of postoperative pain. **Scientific Reports**, 6, 19266, 2016.

ZU, Y.; ZHANG, Q.; ZHAO, X.; WANG, D.; LI, W.; SUI, X.; ZHANG, Y.; JIANG, S.; WANG, Q.; GU, C. Preparation and characterization of vitexin powder micronized by a supercritical antisolvent (SAS) process. **Powder technology**, 228, 47-55, 2012.

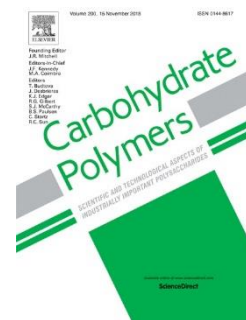
10. Apêndice

Submissão 1:

Submetido a revista Carbohydrate Polymers

Fator de impacto 5.158

Qualis em Biotecnologia: A1



Carbohydrate Polymers

Elsevier Editorial System(tm) for
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Inclusion of vitexin in β -cyclodextrin: Preparation, characterization and expectorant and antitussive activities

Article Type: Research Paper

Keywords: Flavonoids
Solubility
Expectorating action
Antitussive

Corresponding Author: Ms. Eliatania Clementino Costa,

Corresponding Author's Institution: IF sertão Pernambucano

First Author: Eliatania Clementino Costa

Order of Authors: Eliatania Clementino Costa; Pedro Modesto Nascimento Menezes; Ana Paula de Oliveira; James Amalda da Silva; Larissa Araújo Rolim; Xirley Pereira Nunes

Abstract: The study aimed to include the isolated vitexin of *Jatropha mutabilis* in the β -cyclodextrin cavity to improve the solubility of this flavone. Its characterization was performed by techniques such as 1H NMR/ROESY, FT-IR and SEM. In addition, the following activities were evaluated in the animal models: expectorant, phenol red dosage in bronchoalveolar lavage and antitussive, cough induced by citric acid. In relation to the pharmacological activity, it was observed that inclusion complex (IC) in the equivalent doses of 0.2, 1 and 5 mg/kg of flavone presented higher expectorant activity when compared to vitexin ($p > 0.05$), suggesting increased bioavailability. In antitussive activity, both vitexin and complex had similar effects, and dose independent. In the toxicity test using *Artemia salina*, vitexin and IC were considered non-toxic. Finally, the study demonstrates the potential of the complex as an expectorant and vitexin as antitussive, and these data are described for the first time.

Suggested Reviewers: Pedro José Rolim Neto
Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade federal de pernambuco
prolim@hotmail.com
Experience in the field.

Helena Cabral-Marques
Research Institute for Medicines, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
hcmарques@ff.ulisboa.pt
has recently published a review and experience in the.

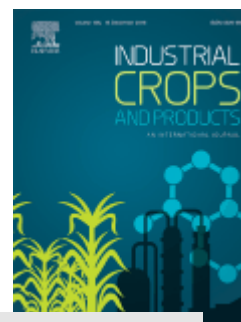
Thorsteinn Loftsson
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Iceland

Submissão 2:

Submetido a revista: Industrial Crops and Products

Fator de impacto 3.849

Qualis em Biotecnologia: A2



Elsevier Editorial System(tm) for Industrial
Crops and Products
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Validation of method by HPLC for vitexin determination and in vitro evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic activities of *Jatropha mutabilis* (Euphorbiaceae) extracts

Article Type: Research Paper

Section/Category: Non-food bioactive products

Keywords: *Jatropha mutabilis*; vitexin; HPLC; antioxidant; antibacterial; cytotoxic

Corresponding Author: Ms. Eliatania Clementino Costa,

Corresponding Author's Institution: IF sertão Pernambucano

First Author: Eliatania Clementino Costa

Order of Authors: Eliatania Clementino Costa; Ana Paula Oliveira; Amanda leite Guimarães; James Amalda da Silva; Xirley Pereira Nunes; Edigênia Cavalcante da Cruz Araújo; Larissa a Araújo Rolim

Abstract: *Jatropha mutabilis* (Pohl) Baill is an endemic species of the caatinga biome little studied in terms of chemical composition, although the *Jatropha* genus is known for the presence of flavonoids, such as vitexin, orientin, isovitexin and isoorientin. Thus, the present study developed an analytical methodology for the quantification of vitexin in this species extract through HPLC-DAD, presenting specificity, linearity, precision and accuracy. The total contents of phenolics and flavonoids were evaluated by the methods of Folin-Ciocalteu and aluminum chloride, respectively. The antioxidant activity was analyzed by the methods of sequestration of the DPPH radical and inhibition of β -carotene auto-oxidation. The antibacterial effect was evaluated by microdilution method. Cytotoxicity analysis was performed against HepG2 and HL-60 tumor cell lines. The most significant total phenolic content was 255.5 ± 21.8 mg EqAG/g for Jm-AcE which was most effective in free radical sequestration DPPH with the lowest IC50 value 18.9 ± 3.3 . The highest total flavonoid content was 165.5 ± 15.6 mg EqC/g for Jm-Hex, which showed the highest effect in preventing the oxidation of β -carotene with $63.6 \pm 6.7\%$ of activity. Jm-EE and Jm-AcE show antibacterial activity with MBC in the ranging from 390.6 to 6250 $\mu\text{g/mL}$. Only the Jm-AcE and Jm-Cl fractions were able to inhibit the proliferation of HL-60 cell lines and were considered active. The species demonstrated antioxidant, antibacterial and cytotoxic potential, and these results are described for the first time.

Suggested Reviewers: Liv Soares Severino
liv@cnpa.embrapa.br
He is part of the group of researchers associated with the journal

Valtcho D. Zheljaskov
Valtcho.jeliaskov@oregonstate.edu