UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Síntese de derivados solúveis de β escina e algumas
avaliações físico-químicas e biológicas

Carolina de Barros Franco Araújo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz

São Paulo
2008

Carolina de Barros Franco Araújo

Síntese de derivados solúveis de β escina e algumas avaliações
físico-químicas e biológicas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2008.

Aos meus pais, por tudo que sou;
ao meu irmão, pela amizade
eterna; ao meu marido, pelo
carinho, paciência e apoio
incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz, professor e orientador, pela disponibilidade, em todos os momentos, e pela confiança depositada.

Prof. Dr. Jayme A. A. Sertié, do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais – ICB/USP, pela orientação da metodologia de determinação da atividade antiinflamatória.

Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares, do Depto. de Química Analítica – IQ/USP, por esclarecer e ensinar sobre as análises de eletroforese.

Guiomar Wiesel, do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais – ICB/USP, pela grande colaboração no trabalho com os animais.

Luiz Antônio Zanolli Filho, do Depto. de Química Analítica – IQ/USP, pela realização das análises de eletroforese.

Yukiko, por me abrir os caminhos que possibilitaram que este trabalho fosse realizado.

Aos Funcionários da FCF o meu agradecimento pela compreensão e paciência nas dificuldades encontradas.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Químico-Farmacêutica (Síntese Orgânica Aplicada), pela ajuda, sempre que precisei.

Aos amigos e familiares, pela motivação e paciência.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Araujo, Carolina de Barros Franco; Síntese de Derivados Solúveis de β Escina e Algumas Avaliações Físico-Químicas e Biológicas.

Palavras-chave: β Escina, antiinflamatório, anidrido, solubilidade, efeitos farmacológicos

β Escina, o principal princípio ativo das sementes da Castanha-da-Índia, *Aesculus hippocastanum* (*Hippocastanaceae*), tem demonstrado evidências satisfatórias nas respostas clínicas significativas dos casos de insuficiência venosa crônica (IVC), hemorróidas e edemas pós-operatórios. (SIRTORI C.R., 2001). Suas características físico-químicas e farmacológicas permitem seu uso tanto medicamentoso quanto cosmético. Como produto de uso farmacêutico, possui grande utilidade e várias apresentações, em diferentes formas farmacêuticas.

A β Escina é uma mistura de saponinas, substâncias de elevado peso molecular, formada por uma parte hidrofóbica denominada aglicona ou sapogenina e uma parte hidrofílica constituída por um ou mais açúcares. (TREASE G.E. et al., 1996). Ocorre na natureza na forma *beta*, que é praticamente insolúvel em água e em óleo. (MARTINDALE, 2003). Por ser praticamente insolúvel em água, sua manipulação e incorporação em formas farmacêuticas líquidas e semi-sólidas são dificultadas. Além disso, esta característica pode ser responsável por uma redução da sua absorção e conseqüente biodisponibilidade.

O trabalho proposto foi a modificação da molécula da β Escina, através da sua esterificação, processo químico que altera a estrutura molecular de uma droga, e conseqüentemente sua farmacocinética. (KOROLKOVAS A. et al., 1988). Através da reação com grupamentos anidridos: ftálico e succínico, aumentamos a solubilidade dos derivados da β Escina em água, que pôde ser verificada através do estudo comparativo de solubilidades em vários solventes orgânicos, realizado entre as moléculas modificadas e a molécula original.

O resultado deste estudo de solubilidade, aliado aos testes farmacotécnicos com bases aquosas, nos mostra uma melhora no comportamento dos produtos

desenvolvidos, quando em solventes ou bases aquosas, apresentando-se como materiais de fácil incorporação, e formulações finais de maior transparência.

Através de análise por eletroforese capilar micelar dos derivados desenvolvidos, pudemos verificar a ocorrência das reações com os anidridos succínico e ftálico, o que confirma a realização da síntese proposta.

A avaliação por cromatografia em camada delgada teve como objetivo comparar qualitativamente as moléculas desenvolvidas com a molécula original. Esta análise confirma as alterações na β Escina de partida.

Para avaliação da eficácia farmacológica dos produtos desenvolvidos, foi utilizada a metodologia da dermatite induzida pelo óleo de cróton, que demonstra o efeito antiinflamatório das substâncias por comparação entre pesos de orelhas de camundongos (SERTIÉ J.A.A., et al 1991). O experimento realizado mostrou resultado satisfatório quando comparados os efeitos antiinflamatórios produzidos pelas moléculas desenvolvidas e pela molécula original, chegando a apresentar melhores resultados para os derivados ftálicos.

ABSTRACT

Araujo, Carolina de Barros Franco; Synthesis of β Escin Soluble Derivatives and some Physical, Chemical and Biological Analysis.

Key words: β Aescin, anti-inflammatory, anidride, solubility, pharmacological effects

β Aescin, the major active from *Aesculus hippocastanum* (Hippocastanaceae), the Horse-Chestnut tree, has shown satisfactory evidence for a clinically significant activity in chronic venous insufficiency (CVI), hemorrhoids and post-operative oedema. (SIRTORI C.R., 2001). Its physico-chemical and pharmacological characteristics allow both cosmetic and pharmaceutical uses. As a pharmaceutical product, it has great utility in several presentations, on various pharmaceutical forms.

The β Aescin is a mixture of saponins, high molecular weight substances, composed by a hidrophobic chain, called aglicone or sapogenin, and a hydrophilic chain, that may contain one or more sugar molecules. (TREASE G.E. et al., 1996). It occurs as *beta* form that is practically insoluble in water and oils. (MARTINDALE, 2003). For being practically insoluble in water, its handling and incorporation in liquid and semi-solid pharmaceutical forms are very difficult. Moreover, this feature can be responsible for a reduction in their absorption and consequent bioavailability.

The present work has the purpose of doing chemical modifications to the β Aescin molecule. The main chemical reaction used was the estherification, a chemical process that modifies the molecular structure of a drug, and consequently its pharmacokinetics. (KOROLKOVAS A. et al., 1988). The reaction with anhydride groups: phtalic and succinic, increased the solubility of the derivatives, which could be verified by a comparative study of solubility in various organic solvents, between the derivatives and the original molecule.

The result of this study and the pharmacotecnic tests show us the improvement of the derivatives when solved in aqueous bases, showing up an easy incorporation material, and formulations of greater transparency.

Through micellar capillary electrophoresis analysis of the derivatives developed, we could verify the occurrence of reactions with succinic and phthalic anhydrides, which confirms the proposed synthesis.

A thin layer chromatography had the objective of qualitative comparison of developed molecules and the original. This analysis confirms the changes occurred at the β Aescin.

For pharmacological effectiveness evidence, the chosen methodology was the croton oil induced dermatitis, which demonstrates the anti-inflammatory effect of the substances by comparing weight of a tissue, such as ear tissue, of mice. (SERTIÉ J.A.A. et al., 1991). The experiment conducted showed satisfactory results, when compared the anti-inflammatory effects produced by the developed molecules and the original molecule, presenting better results for phthalic derivatives.

SUMÁRIO

	FOLHA DE ROSTO.....	i
	FOLHA DE APROVAÇÃO.....	ii
	DEDICATÓRIA.....	iii
	AGRADECIMENTOS.....	iv
	RESUMO.....	v
	ABSTRACT.....	vii
	SUMÁRIO.....	ix
	LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xi
	JUSTIFICATIVA.....	xiii
1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Plantas Medicinais	01
1.1.1	Histórico.....	01
1.1.2	Uso Popular.....	02
1.1.3	Utilização Científica.....	03
1.1.4	Modificação química.....	05
1.2	Castanha da Índia.....	08
1.3	β Escina.....	11
1.3.1	Uso Cosmético da β Escina.....	15
1.4	Triterpenos / Saponinas.....	16
1.4.1	Biossíntese dos Triterpenos / Saponinas.....	18
1.4.2	Classificação.....	22
1.4.2.1	Classificação da Molécula da β Escina.....	23
1.4.3	Ocorrência.....	24
1.4.4	Propriedades Gerais.....	24
1.4.4.1	Formação de Espuma Estável.....	24
1.4.4.2	Propriedades Biológicas e Farmacológicas.....	24
1.5	Insuficiência Venosa Crônica (IVC).....	25
2	OBJETIVOS.....	28
3	MATERIAIS .E MÉTODOS.....	29
3.1	Materiais	29
3.1.1	Matérias-primas, Reagentes e Solventes.....	29

3.1.2	Equipamentos.....	29
3.1.3	Animais.....	30
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	36
4.1	Síntese Química dos derivados.....	36
4.1.1	Síntese Química da succinil escina.....	36
4.1.2	Síntese Química da ftaloil escina.....	36
4.2	Determinação da Solubilidade	37
4.3	Teste em Base Farmacotécnica.....	37
4.4	Cromatografia de Camada Delgada.....	37
4.5	Eletroforese Capilar.....	38
4.6	Determinação da Atividade Antiinflamatória.....	38
4.6.1	Tratamento dos Animais.....	38
4.6.2	Atividade antiinflamatória.....	39
5	RESULTADOS.....	40
5.1	Síntese Química dos derivados solúveis da β Escina	40
5.1.1	Síntese Química da succinil escina.....	40
5.1.2	Síntese Química da ftaloil escina.....	40
5.2	Determinação da Solubilidade.....	41
5.3	Teste em Base Farmacotécnica.....	42
5.4	Cromatografia de Camada Delgada.....	43
5.5	Eletroforese Capilar Micelar.....	44
5.6	Determinação da Atividade Antiinflamatória	46
6	DISCUSSÃO.....	47
7	CONCLUSÃO.....	49
7.1	Perspectivas Futuras.....	49
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
9	ANEXOS.....	55
9.1	ANEXO A - Características físico-químicas dos reagentes e solventes utilizados.....	55
9.2	ANEXO B - Currículo Lattes.....	66
9.3	ANEXO C - Cópia da Ficha do Aluno.....	71
9.4	ANEXO D - Cópia do Aval do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	73

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 01 – Estrutura química da β Escina.....	xiii
Figura 02 – Síntese da molécula de butilescopolamina, a partir da escopolamina...	05
Figura 03 – Síntese da molécula de codeína, a partir da morfina.....	06
Figura 04 – Síntese da molécula de troxerrutina, a partir da molécula do rutosídeo.....	07
Figura 05 – Síntese da molécula de dietilestilbestrol dipropionato, a partir do dietilestilbestrol base.....	07
Figura 06 – Árvore da Castanha da Índia (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.).....	08
Figura 07 – Frutos (07.01) e Sementes (07.02) da Castanha da Índia (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.).....	09
Figura 08 – Folhas (08.01) e Casca (08.02) da Castanha da Índia (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.).....	10
Figura 09 – Estrutura química da β Escina.....	12
Figura 10 – Mecanismos de ação da β Escina.....	14
Figura 11 – Rota biossintética que leva aos vários tipos de agliconas triterpenóides.....	19
Figura 12 – Núcleos mais comuns das saponinas triterpênicas	20
Figura 13 – Estruturas moleculares de saponinas triterpênicas, derivadas dos produtos primários da ciclização do esqualeno 2,3-epóxido	21
Figura 14 – Tipos de estruturas encontradas nas três principais classes de Saponinas.....	22
Figura 15 - Saponinas monodesmosídicas e bidesmosídicas.....	22
Figura 16 – Estrutura química da β Escina.....	23
Figura 17 – Separação teórica de alguns cátions.....	32
Figura 18 – Ilustração esquemática do princípio de separação por eletroforese capilar.....	34
Figura 19 - Esquema ilustrativo da metodologia de Dermatite Induzida por Óleo de Cróton para análise do efeito antiinflamatório dos derivados solúveis da β Escina.....	35

Figura 20 – Esquema da síntese química da succinil escina.....	40
Figura 21 – Esquema da síntese química da ftaloil escina.....	40
Figura 22 – Teste da incorporação dos derivados em bases farmacotécnicas.....	42
Figura 22.1 – β Escina x Ftaloil Escina 1:7.....	42
Figura 22.2 – β Escina x Ftaloil Escina 1:3.....	42
Figura 22.3 – β Escina x Succinil Escina 1:7.....	42
Figura 22.4 – β Escina x Succinil Escina 1:3.....	42
Figura 23 – Cromatografia dos derivados ftálico 1:3 e ftálico 1:7.....	43
Figura 24 – Cromatografia dos derivados succínico 1:3 e succínico 1:7.....	43
Figura 25 – Prováveis substituições ocorridas nas reações de esterificação da β Escina original.....	47

GRÁFICOS

Gráfico 01 – Eletroforese Capilar – Molécula Original – β Escina.....	44
Gráfico 02 – Eletroforese Capilar – Succinil Escina 1:3.....	44
Gráfico 03 – Eletroforese Capilar – Succinil Escina 1:7.....	45
Gráfico 04 – Eletroforese Capilar – Ftaloil Escina 1:3.....	45
Gráfico 05 – Resposta Inflamatória – Dermatite induzida por Óleo de Cróton em orelha de camundongo.....	46
Gráfico 06 – Média e Desvio Padrão encontrados na análise de Dermatite Induzida por Óleo de Cróton em orelha de camundongo.....	46

TABELAS

Tabela 01 – Glicotransferases triterpênicas catalisando a formação dos 3-O-monoglicosídeos.....	21
Tabela 02 – Flebotônicos ou venotônicos mais utilizados.....	27
Tabela 03 – Estudo comparativo de solubilidade da β Escina e dos seus derivados.....	41

JUSTIFICATIVA

A β Escina, com sua estrutura molecular representada na Figura 01, é o principal princípio ativo da árvore da Castanha-da-Índia, o *Aesculus hippocastanum* (*Hippocastanaceae*). Está presente principalmente nas sementes, mas também pode ser encontrada em outras partes, como folhas, cascas e frutos, em menores concentrações.

Este fármaco, foco do nosso estudo, tem demonstrado evidências satisfatórias nas respostas clínicas significativas dos casos de insuficiência venosa crônica (IVC), hemorróidas e edemas pós-operatórios. Em estudos controle, a β Escina tem demonstrado ser tão eficaz quanto as terapias de compressão nos tratamentos alternativos da insuficiência venosa crônica (IVC). (SIRTORI C.R., 2001)

R= Ácido Tiglico (Ácido cis-2-Metil-2-butenóico) ou Ácido Angélico (trans-2-Metil-2-butenóico)

Figura 01 – Estrutura química da β Escina

Os benefícios terapêuticos têm suporte em uma série de experimentos com modelos animais, indicativos de propriedades antiinflamatórias, venotônicas e antiedematosas, relacionadas principalmente ao mecanismo de ação molecular do ativo, que permite a entrada de íons aos capilares, aumentando o tônus venoso, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*. Outro mecanismo, a liberação de prostaglandinas $\text{PGF}_{2\alpha}$ dos capilares, antagonista do 5-HT e da histamina, que reduz o catabolismo dos mucopolissacarídeos teciduais, tem destacado os vários mecanismos de

atuação da β Escina e suas atividades terapêuticas. A alta tolerância à β Escina sugere indicações terapêuticas definitivas com benefícios clínicos para pacientes com condições clínicas que resultam em insuficiência venosa crônica (IVC), hemorróidas e formação de edemas periféricos (FERRUCCIO B. et al., 1977)

Pelo menos três tipos de ação farmacodinâmicas foram atribuídas à β Escina: propriedades anti-edematosas, atividade antiinflamatória e propriedades venotônicas. Todas estas propriedades se devem a um mecanismo molecular identificado como permeabilidade vascular seletiva, que permite uma maior sensibilidade dos canais de cálcio aos íons, resultando em um aumento do tônus venoso e arterial. (SIRTORI C.R., 2001).

A β Escina age também como antioxidante inibindo a collagenase e a elastase enzimáticas, tornando os tecidos e estruturas de suporte da pele mais saudáveis. Outro uso citado para a β Escina, devido aos seus mecanismos, é em formulações cosméticas para celulite.

Tais propriedades propiciam seu uso tanto medicamentoso quanto cosmético, oral e tópico.

A β Escina é uma mistura de saponinas. Ocorre na natureza na forma beta, que é praticamente insolúvel em água. (MARTINDALE, 2003). O elevado número de hidroxilas leva à formação de ligações de hidrogênio fortes entre grupos hidroxilas intra- e inter-moleculares, impedindo sua solubilização em água.

É um fármaco de grande utilidade e com várias apresentações, em diferentes formas farmacêuticas, como flebotônicos e estimulantes da circulação sanguínea. Por ser praticamente insolúvel em água, sua manipulação e incorporação em formas farmacêuticas líquidas e semi-sólidas é muito dificultada.

Além disso, o fato da β Escina ser praticamente insolúvel em água sua absorção e biodisponibilidade podem ficar reduzidas. Um dos fatores que afetam diretamente a absorção dos fármacos é a sua solubilidade, pois há a mistura mais efetiva da

substância na fase aquosa do sítio de absorção. Fármacos em soluções aquosas são mais rapidamente absorvidas do que aquelas em soluções oleosas, suspensões ou formas farmacêuticas sólidas. (GILMAN A.G. et al., 2001)

A esterificação da β Escina é o ponto de partida para o desenvolvimento de tecnologia para obtenção de derivados da molécula com melhores aplicações farmacotécnicas e farmacológicas. A esterificação de uma molécula altera sua estrutura molecular, e conseqüentemente sua farmacocinética. (KOROLKOVAS A. et al., 1988). É uma reação química de condensação de ácidos carboxílicos com álcoois, que resulta na formação de ésteres. (SOLOMONS T.W.G. et al., 2005). Tal reação reduz o número de hidroxilas ligados aos açúcares da β Escina, e, conforme explicado anteriormente, melhora sua solubilização em água. Através da introdução de grupamentos anidridos (ftálico e succínico), aumentamos a solubilidade das moléculas e conseqüentemente sua absorção e biodisponibilidade.

Análises instrumentais, eletroforese capilar micelar e cromatografia de camada delgada, foram realizadas para evidenciar a síntese proposta. Para avaliação da eficácia farmacológica dos produtos desenvolvidos, foi utilizada a metodologia da dermatite induzida pelo óleo de cróton. (SERTIÉ J.A.A. et al., 1991), e sua solubilidade pôde ser avaliada nos testes de determinação da solubilidade e testes em bases farmacotécnicas.

Baseado nas justificativas descritas, o trabalho realizado propõe o desenvolvimento de derivados solúveis da β Escina. Ao propor a modificação química da β Escina original, espera assim, auxiliar no aprimoramento de técnicas de produção de medicamentos e cosméticos que utilizam este ativo, ampliando o acesso e facilitando o uso de seus produtos finais.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Plantas Medicinais

1.1.1 – Histórico

A utilização das plantas como medicamento provavelmente seja tão antiga quanto o aparecimento do próprio homem. A necessidade do homem em criar medicamentos para curar ou aliviar seus males, partiu de princípios experimentais de contato direto com a natureza.

A evolução da arte de curar possui numerosas etapas, porém, torna-se difícil delimitá-las com exatidão, já que a medicina esteve por muito tempo associada a práticas mágicas, místicas e ritualísticas.

A preocupação com a cura de doenças, ao longo da história da humanidade, sempre se fez presente.

Embora a medicina egípcia se apoiasse muito em elementos mágicos e religiosos, sabe-se que já eram utilizados por exemplo o sene, as sementes do linho, o rícino e muitas outras plantas.

Na cultura chinesa, é célebre a obra denominada *Pent-Sao* constituída por vários livros onde existem referências a numerosos fármacos, entre os quais a efedra, que só entrou na terapêutica dos povos de cultura ocidental, já em finais do século XIX.

Os povos helênicos deram importante contribuição, ao receberem dos persas produtos orientais, e tiveram grandes médicos como Hipócrates, o “pai da medicina” e Galeno, criador de algumas das formas farmacêuticas precursoras das atuais, que ainda hoje são usadas.

Durante a Idade Média há uma parada, e até mesmo um retrocesso na evolução da Arte de Curar. Somente alguns chamados “ungüentos maravilhosos” eram preparados por magos. Alguns produtos vegetais considerados mágicos citados: a mandrágora, a arruda e até o alho.

Porém, foi neste período, que Paracelso (1493-1541) chamou a atenção para o fato de que os medicamentos poderiam ser tanto úteis quanto prejudiciais.

Os árabes quebraram esta estagnação terapêutica. Eles dominaram o comércio do oceano Índico e os caminhos das Índias e da África, e com isso, tiveram acesso a

muitas plantas dessas regiões, tais como o ruibarbo, a cânfora, a canela, o sândalo, a noz moscada e o cravinho.

Os europeus começaram então suas viagens para a África, Índia e Américas, e, a partir do contato com os índios, o charlatanismo e o empirismo da medicina e da farmácia da Idade Média cederam lugar à experimentação, e novos fármacos foram sendo introduzidos na terapêutica.

No século XVI os Jesuítas foram responsáveis pela divulgação dos medicamentos usados pelas populações indígenas do Brasil. O padre José de Anchieta citou a ação emética da ipecacuanha e as propriedades anti-sépticas e cicatrizantes do bálsamo copaíba. Ao padre Fernão Cardim deve-se a divulgação de outras plantas, como o jaborandi, o estramônio e o aloe. Além destes, a casca da quina começou a ser utilizada no combate ao paludismo, e as folhas de coca, tão conhecidas dos incas como euforizantes e estimulantes, começaram a ter seu uso divulgado.

No entanto, somente em finais do século XVIII, se começou a isolar e determinar a estrutura dos constituintes ativos dos produtos de origem natural dotados de propriedades medicinais.

No final do século XIX a teoria chave-fechadura de Emil Fischer forneceu explicação racional sobre o modo de ação dos fármacos, inclusive os fitoterápicos.

(CUNHA A.P.; DI STASI L.C., 1996; KOROLKOVAS A. et al., 1988)

1.1.2 - Uso Popular

Toda planta que é administrada ao homem ou animal exercendo sobre eles uma ação farmacológica é denominada de planta medicinal.

As plantas medicinais sempre foram objeto de estudo na tentativa de descobrir novas fontes de obtenção de princípios ativos. Os alquimistas, na tentativa de descobrir o "elixir da vida eterna", contribuíram e muito na evolução da arte de curar.

No Brasil, o conhecimento das propriedades medicinais das plantas, dos minerais e de certos produtos de origem animal é uma das maiores riquezas da cultura indígena. Uma sabedoria tradicional que passa de geração em geração.

Os índios preparam seus "remédios" com plantas retiradas da floresta, pedindo permissão à "mãe natureza" e realizando rituais para purificação do corpo e

da alma, da mesma forma como os benzedores, curandeiros e xamãs, com o conhecimento herdado dos magos e feiticeiros do passado.

Os índios denominam de espírito inteligente o que hoje, graças aos estudos farmacológicos, sabe-se que nada mais é do que o princípio ativo, produzido pelos vegetais.

Um exemplo do uso destes “remédios” pelos índios é o curare, mistura de ervas guardada em sigilo pelos índios e usada na ponta das flechas como veneno para imobilizar a presa. Causa paralisia dos músculos interferindo na transmissão de impulsos nervosos entre o nervo e o músculo, impedindo a contração muscular, e conseqüentemente provocando morte por asfixia. Por volta de 1940, seu princípio ativo foi isolado, o d-tubocurarine, e hoje é utilizado por indústrias farmacêuticas na produção de relaxantes musculares e anestésicos cirúrgicos.

A evolução e o uso de plantas medicinais pelo homem estão associados à sua evolução antropológica, da época em que era um simples nômade até tornar-se um espécime sedentário. Com a fixação de moradia, surgiram as mais variadas necessidades e outras se acentuaram, assim, o uso ficou comprovado através da experimentação, observação e necessidade, através de erros e acertos.

Através dos dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), constata-se que o uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido muito significativo nos últimos anos, sendo que este uso tem sido incentivado pela própria OMS, que, em 1978, reconheceu a importância das plantas medicinais e das preparações galênicas na cura de doenças, recomendando a difusão mundial do conhecimento da fitoterapia.

(CUNHA A.P.; DI STASI L.C., 1996; SOARES B.G. et al., 2007)

1.1.3 - Utilização Científica

Além do metabolismo primário, as plantas produzem também substâncias resultantes do metabolismo secundário. Este metabolismo secundário se diferencia do primário, basicamente por não apresentar reações e produtos comuns à maioria das plantas, sendo portanto específico de determinados grupos.

Os compostos secundários podem ter utilidade para o homem, medicinal ou tóxica e, para a planta, existe uma interação com o ambiente no sentido de proteção contra predadores, auto-defesa ou como atrativo de polinizadores.

Plantas aromáticas são assim denominadas pois armazenam óleos essenciais em células secretoras individuais ou formando estruturas como dutos ou canais, tricomas glandulares e outras. Tais estruturas secretoras podem encontrar-se distribuídas por todo o vegetal.

Apesar de muitas plantas serem úteis ao homem, existem algumas que produzem substâncias que exercem efeitos tóxicos e por isso são denominadas de plantas tóxicas ou venenosas.

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelos homens das cavernas, até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial utilizada pelo homem moderno.

As novas tendências globais de preocupação com a biodiversidade e as idéias de desenvolvimento sustentável trouxeram novos ares aos estudos de plantas medicinais brasileiras, que acabaram despertando um interesse geral na fitoterapia.

A busca por novos fitoterápicos vislumbra a prospecção de potenciais produtos naturais de uso farmacológico.

O emprego correto das plantas para fins terapêuticos requer o uso de plantas selecionadas por sua eficácia e segurança terapêuticas, cientificamente validadas como medicinais.

Considera-se validada, a planta que respondeu positivamente à aplicação de um conjunto de ensaios capazes de comprovar a existência da propriedade terapêutica que lhe é atribuída. Este é o caminho para que se possa fazer o correto aproveitamento das plantas medicinais e seus derivados. Levando-se em conta as plantas já validadas, temos hoje medicamentos bem difundidos, e com evidências clínicas positivas, como por exemplo para gastrite (espinheira santa, alcaçuz), dor e reumatismo (erva baleeira, curcuma), bronquite (guaco, poejo), ansiedade e insônia (passiflora, melissa), dor de cabeça (gengibre, tanaceto) entre outros.

1.1.4 - Modificação química

A modificação química de produtos fitoterápicos é uma prática comum no estudo da fitoterapêutica. Tais procedimentos podem propiciar melhorias ao produto, tanto farmacotécnicas quanto farmacológicas. No aspecto farmacológico, as melhorias ocorrem aprimorando os efeitos terapêuticos, melhorando sua biodisponibilidade e/ou reduzindo os efeitos colaterais.

Existe ainda o aspecto econômico. A modificação molecular de fármacos propicia a produção mais econômica de fármacos, ou ainda, fármacos mais potentes, que, podendo ser utilizados em menores doses, se tornam mais econômicos para o usuário final.

Alguns exemplos podem ser citados:

A escopolamina é um alcalóide extraído de várias solanáceas: *Datura fastuosa*, *D. metel*, *Hyoscyamus niger*, *Duboisia myoporoides*. (KOROLKOVAS A. et al., 1988).

A reação da escopolamina com butilbrometo, em presença de acetonitrila, resulta na molécula de butilbrometo de escopolamina (KLEEMANN A. et al., 1978).

A reação demonstrada na Figura 02 é uma adição molecular, processo de associação molecular que consta da síntese e ensaio de análogos mais complexos do protótipo. A adição molecular é a associação de grupamentos diferentes mediante formação de ligações fracas, como a atração eletrostática ocorrida nesta reação (KOROLKOVAS A. et al., 1988). A adição do butilbrometo à molécula original, reduz significativamente sua toxicidade. (MERK, 2001)

Figura 02 – Síntese da molécula de butilescopolamina, a partir da escopolamina

A morfina é um dos alcalóides isolados das sementes imaturas da papoula, *Papaver somniferum*. (KOROLKOVAS A. et al., 1988).

A substituição de um hidrogênio na posição 3, pela reação da morfina com cloreto de trimetilfenilamônio e metanol, em presença de hidróxido de potássio (pH básico), resulta na molécula da codeína, conforme demonstrado na figura 03. (KLEEMANN A. et al., 1978).

O bloqueio da hidroxila fenólica resulta na diminuição da ação depressora no SNC e aumento da ação antitussígena e anticonvulsivante. (KOROLKOVAS A. et al., 1988).

Figura 03 – Síntese da molécula de codeína, a partir da morfina

Outro exemplo que pode ser citado é a troxerrutina, hemostático derivado da rutina, substâncias do grupo da vitamina P, com atividade clássica na capilaridade e resistência de microvasos. (VIDAL CONDE W., 2001)

Sua síntese, a partir da molécula do rutosídeo, se dá pela adição de cloroetanol à molécula original, em meio básico. (KLEEMANN A. et al., 1978).

A modificação da molécula do rutosídeo para síntese da troxerrutina melhora sua estabilidade físico-química, uma vez que o rutosídeo se oxida facilmente em presença de luz, e é uma substância higroscópica, características melhoradas na molécula da troxerrutina. Além disso, 1g do rutosídeo dissolve em 8 litros de água, enquanto a troxerrutina se apresenta solúvel em água. (MERK, 2001) A síntese da troxerrutina está demonstrada na Figura 04.

Figura 04 – Síntese da molécula de troxerrutina, a partir da molécula do rutosídeo

Nos esteróides, também se observa a modificação química de moléculas. Um exemplo é a síntese do dietilestilbestrol propionato, partindo do dietilestilbestrol base, a partir da reação deste com anidrido propiônico, em presença da piridina, conforme Figura 05. (KLEEMANN A. et al., 1978).

A carga eletrostática de uma molécula ionizada atrai dipolos de água e leva a um complexo polar, relativamente solúvel em água e insolúvel em lipídeos. A difusão lipídica depende da lipossolubilidade relativamente alta, portanto, a ionização das moléculas de fármacos pode reduzir acentuadamente sua capacidade de permear membranas. (KATZUNG B.G, 1998).

Figura 05 – Síntese da molécula de dietilestilbestrol dipropionato, a partir do dietilestilbestrol base

1.2 - Castanha da Índia

A Castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum* L.) é uma planta nativa do Irã, Norte da Índia, Sul da Ásia, Sudeste da Europa e Estados Unidos. É também muito cultivada em parques, jardins e ruas de grandes cidades. Sua árvore pode ser vista na Figura 06. As partes da planta utilizadas na medicina são as sementes (Figura 07.02) e as cascas (Figura 08.02) de galhos jovens. A fruta da Castanha da Índia (Figura 07.01) é como uma cápsula pequena, arredondada e espinhosa, cuja casca se torna grossa à medida que ela amadurece. A fruta contém em seu interior de duas a quatro grandes sementes. Estas sementes são arredondadas e lisas, e possuem formato amendoado. (SIRTORI C.R., 2001)

Figura 06 – Árvore da Castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum* L.)
Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Common_Horse-chestnut

As sementes da Castanha da Índia contêm uma mistura de saponinas, de onde dois produtos cristalinos principais podem ser isolados: escina e prosapogenina. Vários outros produtos já foram isolados das sementes da planta: bioflavonóides, como, por exemplo, a quercetina e o campferol e seus derivados diglicosídeos, bem como antioxidantes, proantocianidinas e as cumarinas esculina e fraxina. No entanto, todos estes produtos podem ser encontrados em diferentes espécies de plantas. Em 1960, Lorenz e Marek concluíram que as atividades anti-edematosas, anti-exudativas e vasoprotetoras do extrato da Castanha da Índia, se devem exclusivamente à presença da escina. (SIRTORI C.R., 2001)

(07.01)

(07.02)

Figura 07 – Frutos (07.01) e sementes (07.02) da Castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum* L.)

Fonte:

(07.01) <http://trishasointments.co.nz/ingredients.html>

(07.02) www.ubcbotanicalgarden.org/potd/2006/08/xanthoceras_sorbifolia_and_aesculus_hippocastanum.php

A escina responde pelo total de saponinas presentes nas sementes, na forma de derivados triterpenóides. Já foi estudada a potente ação antiinflamatória da escina isolada, principalmente nos primeiros estágios da inflamação induzida. Modelos experimentais mostram seus efeitos inibitórios da hialuronidase, anti-exudativo, bem como sua atividade preventiva no aparecimento de edemas. (WOLLINA U. et al., 2006)

O conteúdo de escina encontrado nas sementes da Castanha da Índia, normalmente está dividido em α Escina e β Escina, os quais são compostos por mais de 30 derivados triterpênicos da protoaescigenina e do barringtonol C. Estes compostos são mais comumente encontrados em cotilédones das sementes, chegando a constituir 28% do peso das sementes secas. Porém, outras estruturas da planta também apresentam alguma concentração destes compostos, como tegumento, cascas, brotos, folhas e pericarpo imaturo dos frutos. (WILKINSON J.A. et al., 1999)

Um grande número de flavonóides (principalmente derivados de quercetina e do campferol) já foi isolado. A maioria destes compostos também é encontrada nas sementes, porém, também podem ser detectados no pericarpo dos frutos, cascas, brotos e folhas. (WILKINSON J.A. et al., 1999)

Além das estruturas já citadas, epicatequinas e traços de proantocianidinas A_2 foram citadas em estudos da Castanha da Índia. Estes compostos são encontrados basicamente nas cascas, folhas, brotos e pericarpos de frutos, além do tegumento das sementes. (WILKINSON J.A. et al., 1999)

As sementes da Castanha da Índia contêm descritos ainda outros componentes como gomas (40–50% do peso), açúcares, proteínas (especificamente as globulinas,

hipocastaninas, contendo L-lisina e L-triptofano), gorduras vegetais (em sua maioria ácidos oléico, linoléico, linolênico, esteárico e palmítico) e purinas (adenosina, adenina e guanina) (WILKINSON J.A. et al., 1999)

As cascas da Castanha da Índia, assim como suas sementes, possuem descrita a presença da escina. Glicosídeos cumarínicos, incluindo a esculina, escopolina e fraxina, e suas respectivas agliconas, esculetina, escopoletina e fraxetina, também estão presentes nas cascas da Castanha da Índia, ao contrário de seus tecidos, onde tais compostos não são encontrados. O flavonóide quercetina e sua respectiva aglicona também são encontrados nas cascas da planta. Outros compostos, incluindo alantoína, esteróis, leucocianidinas, leucodelfinidinas, taninos catecóis e alcanos, também já têm descrita sua ocorrência nesta parte da planta. (WILKINSON J.A. et al., 1999)

Assim como as cascas, as folhas da Castanha da Índia (Figura 08.01) possuem glicosídeos cumarínicos, escopolina, fraxina e esculina. Uma quantidade de glicosídeos flavonóides da quercetina (quercetina, rutina, isoquercetina e quercetina-3-arabinosídeo) e os glicosídeos correspondentes do campferol, também foram detectados nos tecidos das folhas da Castanha da Índia. Além destes, a escina também foi encontrada (apesar de quantidades remotas), bem como leucoantocianinas, *cis,trans*-poliprenóis, aminoácidos, gorduras vegetais e esteróis (sitosterol, estigmasterol e campesterol). (WILKINSON J.A. et al., 1999)

(08.01)

(08.02)

Figura 08 – Folhas (08.01) e casca (08.02) da Castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum* L.)

Fonte:

(08.01) www.english-country-garden.com/trees/horse-chestnut.htm

(08.02) www.cas.vanderbilt.edu/bioimages/image/a/aehi-br11952.htm

As propriedades da Castanha da Índia se devem principalmente aos saponosídeos, hidroxycumarinas e derivados flavônicos que atuam sobre a

fragilidade capilar e como vasoconstritores periféricos. Desta forma, ativa a circulação sangüínea e favorece o retorno venoso prevenindo acidentes vasculares, estase venosa, espasmos vasculares e tromboflebitas. (GUILLAUME M. et al., 1994)

Tradicionalmente, as sementes da Castanha da Índia são utilizadas no tratamento de varizes, hemorróidas, flebitas, diarreia, febre e hiperplasia prostática. (ACCAME M.E.C, 2001)

As cumarinas, especialmente o esculetosídeo, são substâncias protetoras da parede vascular. Possuem propriedades da vitamina PP, reduzindo a permeabilidade e aumentando a resistência dos capilares. (ACCAME M.E.C, 2001)

Os taninos (proantocianidinas) também possuem atividade venotônica e protetora vascular. (ACCAME M.E.C, 2001)

A Castanha da Índia é muito utilizada em associação com outros fármacos para combater problemas de fragilidade capilar cutânea, transtornos venosos e hemorróidas. (ACCAME M.E.C, 2001)

Portanto, a Castanha da Índia está indicada em tratamento crônico da insuficiência venosa de diversas origens, dor e sensação de pernas cansadas. É muito apropriada ao tratamento e prevenção de varizes venosas e síndrome protrombótica. (ACCAME, M.E.C, 2001)

É empregada tanto via oral como tópica, e seus efeitos adversos, pouco frequentes, são devido às saponinas. Possui ligeira atividade adstringente, associada à presença dos taninos, e pode causar ligeira irritação gástrica e alergias. A escina compete por ligação a proteínas plasmáticas, podendo deslocar outros fármacos, resultando em nefro e/ou hepatotoxicidade em pacientes com alterações nestes órgãos. A presença das cumarinas pode potencializar a atividade de anticoagulantes via oral. (ACCAME M.E.C, 2001)

1.3 – β Escina

A Escina é uma mistura de saponinas, substâncias de elevado peso molecular, formada por uma parte lipofílica denominada aglicona ou sapogenina e uma parte hidrofílica constituída por um ou mais açúcares (TREASE G.E. et al., 1996), provenientes da semente da árvore da Castanha da Índia, *Aesculus hippocastanum*. É naturalmente encontrada sob a forma de β Escina, que é praticamente insolúvel

em água. (MARTINDALE, 2003). Sua estrutura molecular pode ser observada na Figura 09.

R= Ácido Tiglico (Ácido cis-2-Metil-2-butenoico) ou Ácido Angélico (trans-2-Metil-2-butenoico)

Figura 09 – Estrutura química da β Escina

Tem sido usada na prevenção e tratamento de vários distúrbios vasculares periféricos. (SIRTORI C.R., 2001; MATSUDA, H. et al. 1997; FERRUCCIO B. et al., 1977)

Mostrou evidência satisfatória e atividade clínica significativa na Insuficiência Venosa Crônica (IVC), hemorróida e edema pós-operatório. Em estudo controle, a β Escina foi efetiva em terapia de compressão, como terapia alternativa a medicamentos na IVC. Os benefícios terapêuticos têm suporte em investigações experimentais em animais, indicando claro efeito anti-edematoso, antiinflamatório e venotônico, relacionado principalmente ao seu mecanismo de ação molecular, permitindo ampla entrada de íons nos capilares, aumentando a tensão venosa, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. (FERRUCCIO B. et al., 1977).

Pelo menos três tipos de ação farmacodinâmicas foram atribuídas à β Escina: propriedades anti-edematosas, atividade antiinflamatória e propriedades venotônicas. Todas estas propriedades se devem a um mecanismo molecular identificado como permeabilidade vascular seletiva, que permite uma maior sensibilidade dos canais de cálcio aos íons, resultando em um aumento do tônus venoso e arterial. (SIRTORI C.R., 2001)

Outro mecanismo relacionado seria a liberação de prostaglandinas (produtos endógenos, do metabolismo do ácido araquidônico, com potente ação

vasodilatadora e anti-agregante plaquetária) (ARAÚJO M., 2003) das veias, antagonistas de 5-HT e histamina.

A excelente tolerabilidade da β Escina indica que este tratamento traz benefícios claros a pacientes com condições que resultem em IVC, hemorróidas ou edemas periféricos. (SIRTORI C.R., 2001)

A β Escina é um flebotônico fitoterápico tanto por via sistêmica (oral-parenteral) como tópica. Por sua ação sobre veias e capilares, diminui a hiper-permeabilidade vascular, melhorando a hemodinâmica, a linfocinese e reduzindo o edema dos membros inferiores em pacientes com varizes ou submetidos a cirurgia. Atua diminuindo o número e o diâmetro dos poros na parede dos vasos capilares, com ação normalizadora sobre a permeabilidade capilar, inibindo a transudação, o que evita a formação de processos exsudativos; agindo seletivamente sobre os mesmos processos, quando já formados, caracterizando assim, poderosa ação antiinflamatória e anti-edematosa. (GUILLAUME M. et al., 1994)

Qualquer lesão no endotélio resulta em ativação da fosfolipase A_2 , responsável pela liberação de precursores dos mediadores inflamatórios, levando à adesão de neutrófilos ao local. A β Escina inibe o aumento da atividade da fosfolipase A_2 nas células endoteliais hipo-oxigenadas bem como a adesão de leucócitos ao endotélio hipo-oxigenado. (WETZEL D. et al., 2002)

A β Escina também reduz a atividade das enzimas lisossomais através da estabilização das membranas dos lisossomos, limitando a liberação destas enzimas, o que permite a estabilização da matriz de proteoglicanos, alterada nos processos varicosos. Através deste mecanismo, o edema é reduzido ao reduzir-se a filtração transcilar de água e proteínas. Por outro lado, a β Escina é capaz de melhorar o tônus venoso melhorando o retorno sanguíneo ao coração, efeito que poderia estar relacionado ao aumento da síntese de $PGF_{2\alpha}$ com a ativação de receptores alfa adrenérgicos. (ACCAME M.E.C., 2001)

Sua ação também pode ser notada nas veias do plexo hemorroidário. O mecanismo de ação também é a venoconstrição por redução da permeabilidade capilar.

As hemorróidas são também varizes, porém em localização muito mais delicada (e dolorosa) que as dos membros inferiores. Também podem ser tratadas com a β Escina.

A Figura 10 mostra esquematicamente os principais mecanismos de ação da β Escina.

Figura 10 – Mecanismos de ação da β Escina. (SIRTORI C.R., 2001)

Também possui mecanismo de ação anti-radical, inibindo peroxidação lipídica *in vitro*. *In vivo*, limita a ação oxidativa de radicais oxigenados livres em células e tecidos. (GUILLAUME M. et al., 1994)

Esta ação se deve à inibição do aumento dos níveis séricos de glicose, que provoca uma reação enzimática, glicose-oxidase, que induz edema e inflamação. (YOSHIKAWA M. et al., 1998)

Existe ainda a indicação da β Escina em escleroterapia. A escleroterapia continua sendo um procedimento muito realizado pelos cirurgiões vasculares brasileiros. Porém, este procedimento pode acarretar várias complicações: hiperpigmentações, aparecimento de telangiectasias secundárias mais finas que as originais, edema temporário, flebite – tromboflebite, trombose venosa profunda, entre outras. Há várias formas de se evitar a formação de microtrombos na escleroterapia. Dentre elas podemos citar o uso de vasoconstritores tópicos pré-

escleroterapia, compostos, por exemplo, por digitoxina 0,05%, benzopirona 2% e β Escina 0,5%. (CORREIA M.E. et al., 2003)

A utilização da β Escina pode ser por via oral, retal, tópica e intravenosa. Usada por via oral, as doses usuais são de 60mg a 180mg por dia. Em terapias crônicas mantém-se uma dose de 60mg por dia. Topicamente, aplica-se nas regiões afetadas de duas a três vezes ao dia, em soluções de 0,2% a 1% (MARTINDALE, 2003).

A especialidade farmacêutica que contém a β Escina é o Reparil, que estimula a circulação local, impedindo a formação de coágulos. O salicilato de dietilamina, penetrando no tecido, complementa a ação antiinflamatória, exercendo efeito analgésico local. O Reparil age rapidamente e elimina os sintomas de tensão, rubor, calor e dor. (DEF, 2004/2005)

De um modo geral, Reparil é muito bem tolerado; entretanto, nas úlceras varicosas e eczemas recomenda-se aplicar exclusivamente ao redor da lesão. Mesmo tendo uma mínima absorção sistêmica, Reparil deve ser usado com cuidado em lactantes e lactentes, além de pacientes com problemas renais e hepáticos. (DEF, 2004/2005)

1.3.1 - Uso Cosmético da β Escina

A β Escina possui a capacidade de diminuir a tensão superficial e formar emulsões O/A. Sua capacidade foi comparada com o decagliceril-monolaurilester - DGML, porém não mostrou-se tão eficiente quanto este. A β Escina foi considerada um emulsionante auxiliar. (PEKDEMIR T. et al., 1999).

É usada na produção de produtos cosméticos e para cuidados da pele de alta qualidade (COSTANTINI A., 1999)

A β Escina age também como antioxidante inibindo a colagenase e a elastase enzimáticas, tornando os tecidos e estruturas de suporte da pele mais saudáveis.

Outro uso citado para a β Escina, devido aos seus mecanismos, é em formulações cosméticas para celulite.

Existem três plantas que são as mais utilizadas no tratamento da celulite: Ivy (*Hedera helix*), Castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum*) and Gilbarbeira (*Ruscus aculeatus*). (DWECK A.C., 2000)

Saponinas esteroidais, triterpenos e sapogeninas de origem fitoterápica (*Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum*, *Ruscus aculeatus*) são amplamente utilizados por serem eficazes no tratamento e/ou prevenção da panniculopatia edemato-fibrosclerótica (chamada “celulite”). Até agora não foram elucidados os mecanismos pelos quais estes compostos são ativos. Avaliam-se os efeitos inibitórios destes constituintes fitoterápicos na atividade da elastase e da hialuronidase, sistemas enzimáticos envolvidos no retorno dos principais componentes da substância amorfa perivascular. A *Hedera helix* contém sapogeninas que somente inibem de forma não-competitiva a atividade da hialuronidase de maneira dose-dependente; ambas as saponinas Hederacoside C e α -Hederin são inibidores muito fracos. Os constituintes do *Aesculus hippocastanum* mostram bons efeitos inibitórios sobre a hialuronidase, e esta atividade está ligada principalmente à saponina presente na β Escina. Ao contrário, as ruscogeninas do *Ruscus aculeatus* se mostraram ineficazes na atividade inibidora da hialuronidase, com notável atividade anti-elastase. Os estudos destes compostos fornecem explicação bioquímica para a eficácia destes extratos no tratamento do liposclerose. Uma vez que se recupera a integridade do ácido hialurônico e da elastina (e de suas interações funcionais com os proteoglicanos) pode-se reconstruir a matriz extracelular na qual o sistema microvascular do tecido adiposo está inserido. (DWECK A.C., 2000)

1.4 - Triterpenos / Saponinas

Uma das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica. O metabolismo nada mais é do que o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. No caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário.

Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas.

Em contrapartida, o metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as

plantas. Embora o metabolismo secundário nem sempre seja necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, ele desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente. Um dos principais componentes do meio externo cuja interação é mediada por compostos do metabolismo secundário são os fatores bióticos. Desse modo, produtos secundários possuem um papel contra a herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e microorganismos simbiotes. Produtos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados a mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição a UV e deficiência de nutrientes minerais (PERES L.E.P.).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides.

Entre os terpenos está uma importante classe de substâncias tanto para vegetais quanto para animais. Trata-se dos esteróides, os quais são componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteróides em mamíferos (testosterona, progesterona), plantas (brassinosteróides) e insetos (ecdisteróides).

Uma outra classe importante de terpenos são as saponinas. Nas plantas, as saponinas desempenham um importante papel na defesa contra insetos e microorganismos. A produção industrial de hormônios animais a partir de saponinas vegetais causou uma significativa mudança no comportamento da sociedade contemporânea, pois foi a base da produção dos anticoncepcionais (PERES L.E.P.)

As saponinas (do latim *sapone*, sabão), fazem parte do grupo dos terpenos, mais especificamente dos triterpenos. São substâncias de elevado peso molecular, formadas por uma parte hidrofóbica, denominada aglicona ou sapogenina, e uma parte hidrofílica, constituída por um ou mais açúcares. Possuem a propriedade de reduzir a tensão superficial da água, devido ao seu comportamento anfifílico, formando espuma, caracterizando a sua ação como detergente e emulsificante. Plantas contendo saponinas foram empregadas ao longo dos anos em várias partes do mundo como sabão; na Europa, as raízes de *Saponacea officinalis* (*Caryophyllaceae*) e na América do Sul, a *Quillaja saponaria* (*Rosaceae*) (TREASE G.E. et al., 1996).

Sua elucidação estrutural, bem como seu isolamento, são complexos, devido a vários motivos, dentre eles a dificuldade de se determinar os carbonos das ligações

interglicosídicas, ou pela formação de misturas complexas com estruturas formadas por açúcares e agliconas diversas, ou se a cadeia de açúcar é linear ou ramificada (SIMÕES C.M.O. et al., 2003).

As saponinas são de grande emprego farmacêutico como adjuvante de formulações, componentes ativos em extratos vegetais e matéria-prima para síntese de esteróides (TREASE G.E. et al., 1996)

1.4.1- Biossíntese dos Triterpenos / Saponinas

Os terpenos são montados através da justaposição sucessiva de unidades de cinco carbonos denominado isopentenilpirofosfato (IPP). O IPP é derivado do ácido mevalônico ou mevalonato e dá origem a todos os outros terpenos. Vale lembrar que, enquanto os monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅) e diterpenos (C₂₀) são montados pela adição de uma molécula C₅ de cada vez, os triterpenos (C₃₀) são o resultado da junção de duas moléculas C₁₅ (FPP), e os tetraterpenos de duas moléculas C₂₀ (GGPP).

As saponinas, de acordo com o núcleo fundamental da aglicona, denominam-se esteroidais ou triterpênicas. Possuem caráter ácido, básico ou neutro. São consideradas ácidas quando possuem a presença de um grupamento carboxila na aglicona ou na cadeia de açúcares. As básicas decorrem da presença de um nitrogênio, em geral sob forma de uma amina secundária ou terciária, como nos glicosídeos nitrogenados esteroidais. (SIMÕES C.M.O. et al., 2003).

As saponinas triterpênicas e as esteroidais são formadas de seis unidades isoprênicas, e têm origem biossintética comum, derivada do esqualeno. Enquanto triterpenos verdadeiros possuem 30 átomos de carbono, os esteróides possuem apenas 27 átomos de carbono, em virtude da quebra oxidativa de três grupamentos metila do intermediário C₃₀. (HOSTETTMANN K. et al., 1995).

A molécula de esqualeno é oxidada por uma esqualeno-oxidase (esqualeno-monooxigenase) e se transforma em esqualeno-2,3-epóxido. Este último composto é então transformado pela família das 2,3-oxidosqualeno-ciclases (triterpeno-sintases) em triterpenos tetra ou pentacíclicos, precursores imediatos das saponinas esteroidais, alcalóides triterpênicos e triterpenos verdadeiros. (Figura 11). (KALINOWSKA M. et al., 2005).

Figura 11 – Rota biossintética que leva aos vários tipos de agliconas triterpenóides: SQM – esqualeno monooxidase; CS – cicloartenol sintetase; β -AS – β -amirin sintetase; α -AS – α -amirin sintetase; LS – lupeol sintetase; DS – damaradienol sintetase; IS – isomultiflorenol sintetase. (KALINOWSKA M. et al., 2005)

Para síntese das saponinas triterpênicas verdadeiras C_{30} , o esqualeno 2,3-epóxido é ciclizado e se transforma em um dos vários compostos penta ou tetracíclicos, como o α -amirin, β -amirin, lupeol, isomultiflorenol ou damaradienol. (Figura 11) (KALINOWSKA M. et al., 2005)

Os triterpenos pentacíclicos podem ser divididos em três grupos principais: α -amirin (ursanos), que apresentam uma metila em C_{20} e outra em C_{19} , β -amirin (oleanos), que apresentam duas metilas em C_{20} , e lupeol, que diferem das anteriores na estereoquímica dos anéis D/E, que é trans, além do quinto anel possuir cinco carbonos, não sendo hexagonal como as outras duas saponinas triterpênicas. (Figura 12) (SIMÕES C.M.O. et al., 2003)

Dentre as saponinas tetracíclicas incluem-se aquelas que com núcleo damarano e isomultiflorano, e são de distribuição mais restrita. As de núcleo damarano podem ser encontradas no *Panax ginseng*. (SIMÕES C.M.O. et al., 2003)

Figura 12 – Núcleos mais comuns das saponinas triterpênicas (SIMÕES C.M.O. et al., 2003)

A presença das triterpeno-sintetases pode ser vista em funções catalíticas e fermentativas das plantas, confirmadas por estudos de enzimologia. Alguns exemplos são: β -amirin sintetase do *Panax ginseng* (KUSHIRO T. et al., 1998), α -amirin sintetase da ervilha de jardim, *Pisum sativum* (MORITA M. et al., 2000), lupeol sintetase do *Taraxacum officinale* (SHIBUYA M. et al., 1999) ou isomultiflorenol sintetase do *Luffa cylindrica* (HAYASHI H. et al., 2001).

Reações subseqüentes nos produtos primários da ciclização, ou seja, o α -amirin, β -amirin, lupeol, isomultiflorenol e dammaradienol, conduzem à produção de uma grande variedade das agliconas das saponinas triterpênicas presentes nas plantas. (KALINOWSKA M. et al., 2005)

Uma grande variedade de saponinas triterpênicas tem sido isolada, e diferem na estrutura tanto da aglicona quanto do carboidrato, contendo, muitas vezes, dez ou mais unidades de monossacarídeos, quase sempre na forma de cadeias

ramificadas. Algumas saponinas triterpênicas são bi- ou tridesmosídicas, i.e. contém, além da molécula de açúcar geralmente ligada ao grupamento C₃ hidroxila da aglicona, uma ou duas moléculas adicionais de carboidratos, ligadas aos grupamentos hidroxila ou carboxila, localizados em alguma outra posição. (KALINOWSKA M. et al., 2005)

Acredita-se que a cadeia de açúcar seja sintetizada por adições sequenciais de monossacarídeos à aglicona. Existem apenas algumas citações da ocorrência de glicotransferases específicas (GTases), catalisando a formação de derivados de monossacarídeos de várias agliconas triterpênicas (Tabela 01, Figura 13). (KALINOWSKA M. et al., 2005)

Espécie	Açúcar Receptor	Açúcar Doador
<i>Calendula officinalis</i>	Ácido Oleanóico	UDPGlcUA
<i>Pisum sativum</i>	β-amirin	UDPGlc
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Ácido 24-Hidroxi-glicirretinico	UDPGlcUA
<i>Gypsophila paniculata</i>	Ácido β-Glicirretinico	UDPGlcUA
<i>Glycine max</i>	Soiasapogenoles	UDPGlcUA

Tabela 01 – Glicotransferases triterpênicas catalisando a formação dos 3-O-monoglicosídeos. (KALINOWSKA M. et al., 2005)

Figura 13 – Estruturas moleculares de saponinas triterpênicas, derivadas dos produtos primários da ciclização do esqualeno 2,3-epóxido (KALINOWSKA M. et al., 2005)

1.4.2 - Classificação

As saponinas são classificadas de acordo com o núcleo fundamental da aglicona, sendo denominadas desta forma como saponinas esteroidais, triterpênicas ou alcalóides esteroidais (Figura 14) (HOSTETTMANN K. et al., 1995)

Da mesma forma, o número de cadeia de açúcares ligados à aglicona, permite a classificação como monodesmosídicas, quando possuem uma cadeia de açúcar ligada ao C-3 e bidesmosídica, quando duas cadeias de açúcar estão ligadas a sapogenina, geralmente uma ligação éter em C-3 e uma ligação éster em C-28 (Figura 15) (SIMÕES C.M.O. et al., 2003; HOSTETTMANN K. et al., 1995). As saponinas tridesmosídicas possuem três ligações de cadeias de açúcar, porém são raramente encontradas (HOSTETTMANN K. et al., 1995)

A cadeia de açúcar pode apresentar-se linear ou ramificada. Os monossacarídeos comumente encontrados são D- glicose, D- galactose, L-ramnose, L-arabinose, D-xilose, D-frutose os ácidos glicurônico e galacturônico. Os monossacarídeos podem ocorrer na forma de piranose ou furanose. As ligações entre os açúcares podem ser α ou β (SIMÕES, C.M.O. et al., 2003.)

Figura 14 – Tipos de estruturas encontradas nas três principais classes de Saponinas

Figura 15 - Saponinas monodesmosídicas e bidesmosídicas

1.4.2.1 - Classificação da Molécula da β Escina

Dentro desta classificação, a β Escina, como pode ser visto na Figura 16, de acordo com o núcleo fundamental da aglicona, é uma saponina triterpênica. Já quanto ao número de cadeia de açúcares ligados à aglicona, a β Escina se classifica como monodesmosídica. A cadeia de açúcar ligada ao C-3 apresenta-se ramificada, e os monossacarídeos encontrados são duas moléculas de D-glicose e uma molécula de ácido glicurônico. Os monossacarídeos ocorrem na forma de piranose, e as ligações entre os açúcares estão na forma β .

R= Ácido Tiglico (Ácido cis-2-Metil-2-butenoico) ou Ácido Angélico (trans-2-Metil-2-butenoico)

Figura 16 – Estrutura química da β Escina

1.4.3- Ocorrência

As saponinas esteroidais são encontradas em monocotiledôneas principalmente nas famílias *Liliaceae*, *Agavaceae*, *Dioscoreaceae*; já as triterpênicas nas dicotiledôneas pertencentes às famílias *Sapindaceae*, *Hippocastanaceae*, *Sapotaceae*, *Polygalaceae*, *Caryophyllaceae*, *Primulaceae* e *Araliaceae*. As saponinas pertencentes ao grupo dos alcalóides esteroidais são encontradas principalmente na família *Solanaceae*. (SIMÕES C.M.O. et al., 2003; BRUNETON J., 1999.)

1.4.4 - Propriedades Gerais

1.4.4.1 - Formação de Espuma Estável

Devido à sua constituição estrutural, formada por uma parte hidrofílica e outra parte lipofílica, as saponinas possuem a propriedade de formar espuma persistente e abundante mesmo sob ação de ácidos minerais diluídos, o que não ocorre com os sabões comuns. (SIMÕES C.M.O. et al., 2003.)

1.4.4.2 - Propriedades Biológicas e Farmacológicas

Diversas atividades biológicas foram associadas às saponinas, algumas atribuídas ao comportamento anfifílico de sua molécula como atividade ictiotóxica, hemolítica e de formar complexos com esteróis. Outras atividades foram observadas ao longo de novas pesquisas (SIMÕES C.M.O. et al., 2003.). Dentre elas podemos ressaltar as atividades antimicrobiana, hipocolesterolemiantes, antitumoral, moluscicida, pesticida, espermicida, inseticida, anti-helmíntica, expectorante, diurética, antiinflamatória, analgésica, antiúlcera, entre outras (HOSTETTMANN K. et al., 1995).

A ação hemolítica ocorre devido à diminuição da tensão superficial entre a fase aquosa e lipídica da membrana do eritrócito, ocasionando a ruptura da membrana. Quanto à ação ictiotóxica, pode ser demonstrada através de morte de peixes,

resultante dos danos causados nas brônquias, onde ocorre a regulação do balanço iônico e pressão osmótica (HOSTETTMANN K. et al., 1995).

1.5 - Insuficiência Venosa Crônica (IVC)

A insuficiência venosa crônica (IVC) é uma doença com importantes implicações sócio-econômicas. Os problemas crônicos venosos são um problema médico muito freqüente, que acontecem com diferentes graus de severidade, e em uma alta porcentagem da população adulta. Esta elevada incidência constitui um problema importante da saúde pública. Os sintomas (dor, incômodos inespecíficos, inchaços, peso nas pernas e câimbras) e os sinais (edema) da IVC são bem conhecidos, e afetam de 5-10% da população. As mudanças crônicas da macro e da microcirculação, que aparecem nestes pacientes causam a manifestação mais grave da IVC: a úlcera venosa, que afeta 1% da população. Além disso, esta doença também influi na qualidade de vida dos pacientes afetados. Do ponto de vista fisiopatológico, o refluxo venoso superficial ou profundo pode provocar hipertensão venosa, associada a uma deterioração das válvulas venosas. Tudo isso parece desempenhar papel essencial na evolução da IVC. (LOZANO F. et al. 2001)

A IVC refere-se a um conjunto de alterações físicas como edema, hiperpigmentação, a erisipela e a lipodermatoesclerose, que ocorrem na pele e no subcutâneo, principalmente nos membros inferiores, decorrentes da hipertensão venosa de longa duração, causada por insuficiência valvar e/ou obstrução venosa. (YAMADA B.F.A. et al.)

Estas alterações de fluxo sangüíneo causam extravasamento de fluidos e acúmulo peri-capilar de depósitos de fibrina (mangitos de fibrina) que alteram o metabolismo entre os compartimentos extra e intravascular. Os capilares encontram-se dilatados, alongados, tortuosos e com as paredes afiladas, e o endotélio apresenta superfície irregular e alargamento dos espaços interendoteliais. Pelo prolongado e aumentado extravasamento ocorre alargamento dos espaços peri-capilares. A estes processos segue-se a formação de tecido de granulação, proliferação de capilares e fibroblastos e, finalmente, cicatrização da ferida por formação de tecido cicatricial. Clinicamente este processo leva a lipodermatoesclerose, atrofia e na forma mais grave, e ulcerações, nas quais os

mecanismos compensatórios não são suficientemente capazes de reparar a lesão. (BARROS Jr.N., 2003)

Existem dois objetivos a serem alcançados no tratamento clínico das úlceras de estase – a melhora da drenagem venosa e o uso de curativos adequados, concomitantemente. Um não será eficaz sem o outro. Vários tipos de tratamento são conhecidos, sendo o mais racional e simples a higienização da úlcera e o repouso prolongado, com elevação dos membros para corrigir a hipertensão venosa, minimizando temporariamente a estase. (FIGUEIREDO M., 2003)

Flebotônicos ou venotônicos são drogas que agem promovendo a venoconstrição. Entre os mais conhecidos temos os derivados sintéticos da diidroergocristina, os derivados da rutina e os derivados da Castanha da Índia. (ARAÚJO M., 2003)

Os derivados sintéticos da diidroergocristina promovem o aumento do tônus da parede venosa com conseqüente aceleração do esvaziamento venoso. A associação de heparina ao mesilato de diidroergotamina tem sido utilizada, demonstrando ser mais eficaz que a heparina isoladamente na prevenção da estase venosa, importante fator predisponente à trombose venosa profunda dos membros inferiores. Os efeitos colaterais, especialmente a vasoconstrição arterial que ocorrem na intoxicação (ergotismo), limitam o seu uso clínico. Pode ocorrer isquemia intestinal e periférica. (ARAÚJO M., 2003)

Os derivados da rutina são derivados da flavona extraídos de plantas como *Ruta graveolens* (arruda comum), *Fagopyrum esculentum* (trigo sarraceno), *Sophora japonicae*, folhas de várias espécies de *Eucalyptus*. Quimicamente é a 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona-3-ramnoglicosídeo. A rutina aumenta o tônus venoso, e acredita-se que tenha associado a uma ação “impermeabilizante capilar”, semelhante à vitamina P, devido à inibição da hialuronidase. Tal ação impediria a passagem de proteínas que contribuiriam para a formação do edema. A troxerrutina é uma mistura que contém trihidroxietil-rutosídeo, e também mono, di, tetrahidroxietil-rutosídeo. É muito usada em preparações comerciais. “Oxerutina” é um termo usado para designar cinco tipos de diferentes o-(b-hidroxietil) rutosídeos com não menos que 45% de troxerrutina. (ARAÚJO M., 2003)

Os derivados da Castanha da Índia são conhecidos há muito tempo, e utilizados em grande número de preparações farmacêuticas comerciais. Origina-se da planta *Aesculus hippocastanum* que contém vários princípios ativos como

esculosídeo (esculina: 6-b-d-glucopiranosixolixi-7-hidroxycumarina), escina (mistura de saponinas) e a esculetina. Glicosídeos da flavona são também encontrados. Algumas espécies podem ser venenosas. Sua ação se faz notadamente nas veias do plexo hemorroidário, mas também ocorre nas veias dos membros inferiores. O princípio também é a venoconstrição. Atribui-se também um efeito de redução da permeabilidade capilar. É uma opção segura e efetiva para o tratamento em curto prazo da IVC. A utilização pode ser por via oral, retal, tópica e intravenosa. (ARAÚJO M., 2003)

Os flebotônicos ou venotônicos mais utilizados estão demonstrados na Tabela 02.

	<u>Grupo químico</u>	<u>Componente ativo</u>
Produtos Naturais	Flavonóides (g g-benzopironas)	Rutina Troxerrutina Hesperidina
	Cumarinas (a a-benzopironas)	Cumarina (benzopirona) Derivados
	Saponinas	β Escina
	Derivados do ergot	Diidroergotamina Diidroergocristina Diidroergocriptina
Produtos Sintéticos	-----	Diosmina Tribenosido Dobesilato de cálcio

Tabela 02 – Flebotônicos ou venotônicos mais utilizados. (ARAÚJO M., 2003)

2 - OBJETIVOS

Em função do exposto, o objetivo do trabalho é o desenvolvimento de derivados da β Escina, de maneira a obter moléculas mais solúveis em água, mantendo algumas propriedades terapêuticas e farmacológicas originais.

O desenvolvimento de tais derivados será realizado através de reações de esterificação com anidridos, em diferentes proporções, e de natureza randômica.

Após a modificação química os derivados serão comparados à molécula original por cromatografia de camada delgada em papel cromatográficos, e identificados por eletroforese capilar.

As análises físico-químicas serão baseadas em testes de solubilidade, e testes de incorporação em bases farmacotécnicas aquosas.

Para comprovação da atividade farmacológica dos derivados com a molécula original, será realizado teste *in vivo* utilizando a metodologia da dermatite induzida pelo óleo de cróton, segundo Sertié et al., e comparados os resultados das amostras.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

3.1.1- Matérias-primas, Reagentes e Solventes

- β Escina – lote 28074/M4 – fornecedor Deg, com teor de 98,27%
- Solventes: Etanol, metanol, clorofórmio, éter, óleo de soja, acetona, hexano, metoxipolietilenoglicol, glicerina e tolueno
- Anidrido Succínico de procedência Labsynth
- Anidrido Ftálico de procedência Labsynth
- Dimetilformamida de procedência Labsynth
- Tetraborato de sódio de procedência Labsynth
- Dodecilsulfato de sódio (SDS) de procedência Labsynth
- Cromatofolhas de alumínio (sílica gel TCL 20 x 20 cm, 60 F₂₅₄ da Merck)
- Óleo de Cróton de procedência Labsynth
- Etilacetato de procedência Labsynth
- Iodo de procedência Labsynth

3.1.2 - Equipamentos

- Balança Analítica precisa 205^A SCS
- Balança Semi-analítica Marte LC1
- Evaporador rotativo 802A – Fisatom
- Bomba de vácuo
- Agitador mecânico
- Equipamento de Eletroforese Capilar: modelo HP^{3D} CE – Agilent Technologies
- Sílica fundida (50 μ m de diâmetro interno x 48,5cm de comprimento total, 40cm até o detector)
- Vidraria procedente do Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

3.1.3 – Ensaio Biológico

Os animais utilizados para o estudo *in vivo* foram 144 camundongos da espécie Balb C, machos, pesando entre 20-30g.

3.2 - Métodos

3.2.1 - Síntese Química dos derivados solúveis da β Escina

Os derivados foram obtidos por reação de esterificação da molécula original β Escina com anidrido succínico e anidrido ftálico, separadamente, em proporções de 1:3 e 1:7 cada uma das amostras, seguindo o modelo utilizado por Alluis et al.

A esterificação é uma reação química de condensação de ácidos carboxílicos com álcoois, que resulta na formação de ésteres. (SOLOMONS T.W.G. et al., 2005). Para a síntese dos derivados solúveis da β Escina, escolhemos a reação com anidridos de ácidos carboxílicos. É o melhor método para formação de ésteres, pois evita a utilização de ácidos fortes como catalisadores. (SOLOMONS T.W.G. et al., 2005).

3.2.2 - Determinação da Solubilidade

A solubilidade de uma substância pura em dado solvente, à temperatura constante, é parâmetro característico da substância, podendo servir para fins de identificação e avaliação do seu grau de pureza (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988).

A solubilidade também determina seu grau de polaridade, que define sua afinidade aos tecidos orgânicos, bem como aos principais solventes utilizados na farmacotécnica.

Segundo a metodologia farmacopéica, as indicações de solubilidade referem-se à temperatura de 25°C, e para que uma substância seja considerada solúvel em determinado solvente, deve ser avaliada em proporção de 1:10 a 1:30. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988)

3.2.3 - Testes em Base Farmacotécnica

A incorporação dos derivados e da molécula original em bases farmacotécnicas serve como referência da solubilidade das moléculas, já que a base utilizada foi um gel aquoso e transparente, o gel de carbopol.

Quando comparados à molécula original incorporada, os produtos finais dos derivados evidenciam a sua solubilidade, através da transparência do gel obtido.

3.2.4 - Cromatografia de Camada Delgada

A cromatografia é um processo de separação, purificação ou identificação qualitativa de substâncias, baseada no princípio de distribuição diferencial em fases. O grau de separação é determinado pelas diferenças nos coeficientes de distribuição. A distribuição pode ocorrer por partição, devido à diferença de solubilidade relativa dos componentes em solventes imiscíveis ou por adsorção seletiva dos componentes da mistura líquida ou gasosa em superfície de fase sólida. (SOARES B.G. et al., 1988)

Para nosso trabalho, foi utilizada a cromatografia de camada delgada, exemplo de cromatografia em fase sólida. (SOARES B.G. et al., 1988)

Esta metodologia utiliza uma camada fina e uniforme de sólido, na forma de cromatofolhas de alumínio. A amostra a ser analisada é aplicada na base da cromatofolha, e esta, colocada verticalmente em recipiente contendo uma pequena camada de solvente. (SOARES B.G. et al., 1988)

O solvente ascende por capilaridade, carreando a amostra. A relação entre as velocidades do movimento da amostra e a frente do solvente, é chamada de R_f , razão entre a distância percorrida pela amostra a partir do ponto de aplicação até o meio da mancha, e a distância percorrida pelo solvente, a partir do ponto de aplicação da amostra até a frente do solvente. Os valores de R_f são importantes no estudo comparativo da amostra com a substância padrão. (SOARES B.G. et al., 1988)

3.2.5 - Eletroforese Capilar

Eletroforese Capilar é uma técnica amplamente utilizada, que dá respostas de alta resolução na separação e quantificação de íons orgânicos e inorgânicos.

Este procedimento se baseia no movimento dos íons sob influência de uma voltagem aplicada sobre a amostra. O grau de migração, ou mobilidade das moléculas, ou da solução ionizada, é determinado pelo tamanho da molécula, ou o número de cargas que ela carrega.

A mobilidade é determinada pela razão entre carga / massa, e segue a fórmula:

$$\mu E = (q / 6\pi) \eta r$$

onde μE – mobilidade

q – número de cargas

η – viscosidade da solução

r – raio do íon

A velocidade eletroforética está relacionada à mobilidade dos íons e à voltagem aplicada:

$$v = \mu E \cdot E$$

onde v – velocidade dos íons

μE – mobilidade

E – voltagem aplicada

Figura 17 – Separação teórica de alguns cátions

A aplicação de uma voltagem no capilar preenchido de eletrólitos causa o fluxo da solução, através do capilar. Este fluxo impulsiona os íons até o detector, e este movimento se deve à ionização da sílica do capilar quando em contato com a solução tampão. Frente a altos pHs, os grupamentos silanóis da sílica se dissociam

resultando em uma superfície carregada negativamente. Para manter a neutralidade, os cátions se aproximam da superfície. Quando a voltagem é aplicada, estes cátions migram para o catodo.

A maior vantagem do método proposto é o custo reduzido, e a simplicidade da preparação das amostras (apenas uma diluição), além de possuir maior resolução e resultado em menor tempo, se comparado à cromatografia líquida de alta performance convencional.

Porém, apenas soluções iônicas ou carregadas podem ser separadas pela eletroforese capilar, e isso é uma limitação do método.

O desenvolvimento da cromatografia eletrocinética solucionou este problema, pois segue os princípios da cromatografia, através da utilização de soluções que contém “carregadores” de íons. Com isso, essa metodologia pode separar tanto amostras neutras quanto carregadas.

O uso de soluções micelares de íons surfactantes popularizou o uso da técnica para a separação de moléculas pequenas e neutras.

(CAPILLARY ELECTROPHORESIS GUIDE BOOK, 1996)

3.2.5.1 - Eletroforese Capilar Micelar – Princípio da separação

Um capilar, ou sílica fundida, é preenchido com uma solução iônica surfactante, cuja concentração seja superior à concentração micelar crítica (CMC), para que haja a formação das micelas.

O uso de um surfactante aniônico, como o dodecilsulfato de sódio, forma micelas carregadas negativamente, e força a migração da micela para o eletrodo positivo, por eletroforese. O fluxo eletroosmótico migra para o pólo negativo, devido à carga da superfície do capilar.

O fluxo eletroosmótico é maior que a migração das micelas, em condições neutras ou básicas, portanto, micelas aniônicas formadas pelo dodecilsulfato de sódio migram para o eletrodo negativo, mais lentamente.

Figura 18 – Ilustração esquemática do princípio de separação por eletroforese capilar.

(CAPILLARY ELECTROPHORESIS GUIDE BOOK, 1996)

3.2.6 - Análise do efeito antiinflamatório dos derivados solúveis da β Escina

A metodologia utilizada foi o método experimental de “Dermatite induzida pelo Óleo de Cróton”, conforme demonstrado na Figura 19. Nesta metodologia a resposta inflamatória é avaliada pela diferença de peso das duas amostras retiradas das orelhas, e então calculado o percentual de inibição da irritação causada pelo óleo de cróton. (SERTIÉ J.A.A. et al., 1991)

O óleo de cróton é um irritante vascular que provoca infiltração leucocitária de polimorfonucleares causando edemas intercelulares. (MONTELLO M.S.A.G., 2002)

Os animais recebem na orelha direita a solução indutora de inflamação, solução de óleo de cróton. Após 30 minutos, a mesma orelha recebe a amostra do produto a ser avaliado. Um dos grupos recebe uma solução da molécula original (β Escina), e um grupo controle não recebe nenhuma amostra. A orelha esquerda recebe apenas o solvente utilizado. Após seis horas, os animais são sacrificados, e um fragmento de orelha de 6mm é retirado de ambas as orelhas de cada animal, utilizando-se um instrumento cirúrgico utilizado em cirurgias de catarata. O peso dos fragmentos de orelha retirados indica o processo inflamatório inibido pela amostra testada. O cálculo é feito pela diferença de pesos entre as amostras de orelha, ou seja, quanto maior a diferença de peso entra as orelhas direita e esquerda de cada animal, maior o processo inflamatório. (SERTIÉ J.A.A. et al., 1991)

O mecanismo pelo qual a β Escina produz seu efeito antiinflamatório não foi investigado, mas a farmacologia citada para a dermatite provocada pelo óleo de cróton indica, geralmente, uma sensibilidade aos inibidores da ciclooxygenase. (BERKENKOPF J. et al., 1985)

Figura 19 - Esquema ilustrativo da metodologia de Dermatite Induzida por Óleo de Cróton para análise do efeito antiinflamatório dos derivados solúveis da β Escina

4 - PARTE EXPERIMENTAL

4.1 - Síntese Química dos derivados

Esta parte experimental do trabalho foi realizada no Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (FCF/USP), que conta com espaço físico e equipamentos necessários e adequados para a realização do estudo.

4.1.1 - Síntese Química da Succinil Escina

Foi realizada uma síntese randômica dos derivados, cujo conjunto possui atividades antiinflamatórias, conforme descrito.

O processo de esterificação da β Escina com o anidrido succínico ocorreu em balão de fundo redondo: um balão contendo 1g da β Escina (1 Mol) e 0,6361g de anidrido succínico (7 moles) e outro balão contendo 1g da β Escina (1 mol) e 0,2726g de anidrido succínico (3 moles). Ambos sob agitação mecânica, a 70°C por 24h. O solvente utilizado foi a dimetilformamida (DMF), 25ml. O solvente foi retirado utilizando-se rotoevaporação a vácuo. O resíduo da rotoevaporação foi utilizado para realização das outras análises.

A síntese química da Succinil Escina é demonstrada na Figura 20.

4.1.2 - Síntese Química da Ftaloil Escina

Foi realizada uma síntese randômica dos derivados, cujo conjunto possui atividades antiinflamatórias, conforme descrito.

O processo de esterificação da β Escina com o anidrido ftálico ocorreu em balão de fundo redondo: um balão contendo 1g da β Escina (1 mol) e 0,9415g de anidrido ftálico (7 moles) e outro balão contendo 1g da β Escina (1 mol) e 0,4035g de anidrido ftálico (3 moles). Ambos sob agitação mecânica, a 70°C por 24h. O solvente utilizado foi a dimetilformamida (DMF), 25ml. O solvente foi retirado utilizando-se rotoevaporação a vácuo. O resíduo da rotoevaporação foi utilizado para realização das outras análises.

A síntese química da Ftaloil Escina é demonstrada na Figura 21.

4.2 - Determinação da Solubilidade

As amostras preparadas da β Escina modificada foram submetidas a testes de solubilidade em proporções de 1:10.

Foram colocadas em vidros de relógio com cada solvente, e analisadas visualmente quanto à solubilidade.

As reações foram realizadas em vidraria do Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada – Depto Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (FCF/USP).

4.3 - Testes em Base Farmacotécnica

Esta parte experimental do trabalho foi realizada no Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (FCF/USP), que conta com espaço físico e equipamentos necessários e adequados para a realização do estudo.

Foi realizado teste de incorporação em base farmacotécnica aquosa, que demonstrou a diferença das características dos produtos finais, utilizando-se 2% de cada amostra (molécula original e derivados) em gel de carbopol, conforme demonstrado nas Figuras 22, 22.1, 22.2, 22.3 e 22.4.

4.4 – Cromatografia de Camada Delgada

A cromatografia de camada delgada foi realizada no Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (FCF/USP), que conta com espaço físico e equipamentos necessários e adequados para a realização do estudo.

A metodologia utilizada para a realização da análise foi baseada na metodologia do fabricante da β Escina:

- Solução analisada: 0,1g de amostra em 20ml de metanol
- Fase móvel: 70v. de etilacetato, 15v. de metanol e 15v. de água
- Revelador: iodo
- Metodologia: ao papel cromatográfico foi aplicado 10 μ l de cada solução preparada com cada amostra, em linha de 15mm de altura, e não mais de 5mm de

extensão. O papel foi colocado em câmara cromatográfica saturada com a solução da fase móvel, de altura máxima de 15mm. Depois de embebido pela fase móvel, o papel foi colocado em frasco contendo iodo para revelação. O resultado do experimento pode ser verificado nas Figuras 23 e 24.

4.5 – Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar foi realizada no Laboratório de Eletroforese Capilar, Departamento de Química Analítica (IQ/USP), Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares, e com a colaboração de Luiz Antônio Zanolli Filho. Os resultados estão demonstrados nos Gráficos 01, 02, 03 e 04.

As amostras foram separadas pela Eletroforese Capilar Micelar, nas seguintes condições:

- Equipamento: Eletroforese capilar modelo HP^{3D} CE – Agilent Technologies
- Capilar: Sílica fundida (50 μm de diâmetro interno x 48,5 cm de comprimento total, 40 cm até o detector).
- Eletrólito: 10 mmol L⁻¹ Tetraborato de sódio, 20 mmol.L⁻¹ dodecilsulfato de sódio (SDS), pH 9,2.
- Injeção: 50mbar / 3s, tensão aplicada: 30 kV.
- Amostras: Diluídas em solução 10mM de SDS (aproximadamente 10mg/2ml)

4.6 - Determinação da Atividade Antiinflamatória

4.6.1 - Tratamento dos Animais

Foram utilizados camundongos da espécie Balb C, machos, pesando entre 20-30g, com livre acesso à água.

A dieta normal foi de Nuvilab CR-1 (Nuvital).

Ficaram confinados em gaiolas específicas por 3 dias, contendo 8 animais cada uma.

4.6.2 – Atividade antiinflamatória

Análises de ação em pele de camundongo foram realizadas no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Prof. Dr. Jayme A. A. Sertié (ICB/USP) e com a colaboração de Guiomar Wiesel.

A metodologia utilizada para esta análise foi validada pelo Prof. Dr. Jayme A. A. Sertié, conforme demonstrado na Figura 19.

Foram utilizados 3 grupos de oito animais para cada amostra.

Os animais receberam na orelha direita, a solução indutora de inflamação – solução de óleo de cróton - 200µl de óleo de cróton dissolvidos em 20µl de DMF / água (7:3).

Após 30 minutos, a mesma orelha recebeu as amostras.

Cada grupo recebeu uma amostra de 2% de cada derivado, diluído em acetona.

Um dos grupos recebeu uma solução a 2% em acetona da molécula original (β Escina), e um grupo controle não recebeu nenhuma amostra.

A orelha esquerda recebeu apenas o solvente utilizado.

Após seis horas, os animais são sacrificados, e um fragmento de orelha de 6mm é retirado de ambas as orelhas de cada animal.

O cálculo é feito pela diferença de pesos entre as amostras de orelha, ou seja, quanto maior a diferença de peso, maior o processo inflamatório. (SERTIÉ J.A.A. et al., 1991)

5 - RESULTADOS

5.1 - Síntese Química dos derivados solúveis da β Escina

5.1.1 - Síntese Química da Succinil Escina

R= Ácido Tiglico (Ácido cis-2-Metil-2-butenóico) ou Ácido Angélico (trans-2-Metil-2-butenóico)

Figura 20 – Esquema da síntese química da succinil escina

5.1.2 - Síntese Química da Ftaloil Escina

R= Ácido Tiglico (Ácido cis-2-Metil-2-butenóico) ou Ácido Angélico (trans-2-Metil-2-butenóico)

Figura 21 – Esquema da síntese química da ftaloil escina

5.2 - Determinação da Solubilidade

	<i>β Escina</i>	<i>Succinil Escina 1:3</i>	<i>Succinil Escina 1:7</i>	<i>Ftaloil Escina 1:3</i>	<i>Ftaloil Escina 1:7</i>
<i>Etanol</i>	+/-	+	+/-	+/-	+
<i>Água</i>	-	+	+/-	+	+
<i>Metanol</i>	+/-	+	+	-	+
<i>Acetona</i>	-	+	+	+/-	+
<i>Clorofórmio</i>	+/-	+	-	-	+
<i>Hexano</i>	+/-	+	+	-	+/-
<i>Óleo Oliva</i>	-	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>Éter</i>	-	+	+	+	+
<i>Propilenoglicol</i>	-	+	+	+	+
<i>DMF</i>	+	+	+	+	+
<i>Glicerina</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+
<i>Tolueno</i>	+/-	+/-	+/-	-	+/-
<i>Água pH 3,0</i>	-	+/-	-	+/-	+
<i>Água pH 10,0</i>	+	+	-	+/-	+

Tabela 03 – Estudo comparativo de solubilidade da β Escina e dos seus derivados, realizado com a substância diluída a 1:10 em cada solvente.

{
 + = solúvel
 +/- = pouco solúvel
 - = insolúvel

5.3 - Teste em Base Farmacotécnica

Figura 22 – Teste da incorporação dos derivados em base farmacotécnica. Os produtos finais da incorporação dos derivados ftálico 1:3, succínico 1:3 e succínico 1:7 são transparentes, e demonstram a solubilidade dos derivados. O produto final do derivado ftálico 1:7 não demonstra a mesma solubilidade, mas quando comparado ao produto final contendo a molécula original, se mostra mais apropriado à incorporação em bases aquosas.

Figura 22.1 – Comparação dos produtos finais: β Escina x Ftaloil Escina 1:7

Figura 22.2 – Comparação dos produtos finais: β Escina x Ftaloil Escina 1:3

Figura 22.3 – Comparação dos produtos finais: β Escina x Succinil Escina 1:7

Figura 22.4 – Comparação dos produtos finais: β Escina x Succinil Escina 1:3

5.4 - Cromatografia de Camada Delgada

Figura 23 – Cromatografia dos derivados ftálico 1:3 (esquerda) e 1:7(direita), comparados com a molécula original β Escina ao centro

Figura 24 – Cromatografia dos derivados succínicos 1:3 (esquerda) e 1:7(direita), comparados com a molécula original β Escina ao centro

5.5 - Eletroforese Capilar Micelar

Gráfico 01 – Eletroforese Capilar Micelar – Molécula Original – β Escina = Pico em 6,137 minutos

Gráfico 02 – Eletroforese Capilar Micelar – Succinil Escina 1:3
Pico em 6,251 minutos – estrutura principal;
Pico em 2,803 minutos = solvente
Pico em 4,292 minutos = substituintes

Gráfico 03 – Eletroforese Capilar Micelar – Succinil Escina 1:7
 Pico em 6,069 minutos – estrutura principal;
 Pico em 2,810 minutos = solvente
 Pico em 4,279 minutos e 5,318 minutos = substituintes

Gráfico 04 – Eletroforese Capilar Micelar – Ftaloil Escina 1:3
 Pico em 6,732 minutos – estrutura principal;
 Pico em 2,806 minutos = solvente
 Pico em 4,680 minutos = substituintes

5.6 - Determinação da Atividade Antiinflamatória

Gráfico 05 – Resposta Inflamatória – Dermatite induzida por Óleo de Cróton em orelha de camundongo (média do grupo da diferença em mg de peso entre as orelhas esquerda e direita do camundongo)

Gráfico 06 – Média e Desvio Padrão encontrados na análise de Dermatite Induzida por Óleo de Cróton em orelha de camundongo

6 - DISCUSSÃO

A síntese dos derivados foi realizada sob agitação e à temperatura de 70°C, segundo procedimento realizado por Alluis et al., com a finalidade de preservar a estrutura molecular da β Escina, que contém açúcares ligados à molécula fundamental da aglicona.

A posição de introdução dos radicais anidridos, segundo Alluis et al., ocorre de acordo com a temperatura utilizada, e com a concentração molar dos substituintes. A 70°C, utilizando 7 moles dos anidridos, as substituições ocorreram provavelmente nos carbonos 2, 3 e 4 das moléculas de D-glicose, e nos carbonos 2, 3 e 4 da molécula de ácido glicurônico. Reduzindo a concentração de anidridos para 3 moles, a substituição, segundo Alluis et al., ocorre apenas nos carbonos 2 e 3 da molécula de D-glicose, e nos carbonos 2, 3 e 4 da molécula de ácido glicurônico. Tais substituições estão evidenciadas na Figura 25.

Figura 25 – Prováveis substituições ocorridas nas reações de esterificação da β Escina original:
 { - 7 moles: subst. em R' e R'' ;
 { - 3 moles: subst. apenas em R'

O resultado das reações de esterificação é uma mistura randômica, que pode ser demonstrada através da eletroforese capilar micelar e da cromatografia de camada delgada (Figuras 23 e 24). O produto original (Gráfico 01), apresentou o pico principal em torno de 6,100 minutos, que pode ser observado em todas as amostras. Podemos notar a substituição dos hidrogênios das hidroxilas das moléculas dos açúcares ligados ao núcleo fundamental da aglicona pelas moléculas de anidrido, através dos picos de 4,500 a 5,000 minutos, aproximadamente, sendo

que nas amostras cuja reação ocorreu com 7 moles de anidrido, os substituintes aparecem em dois picos separados, porém, bem próximos. Tal resultado pode ser visto nos Gráficos 02, 03 e 04. Depois de repetidas avaliações, os resultados obtidos para a eletroforese do derivado ftálico 1:7 foram atípicos. Houve um deslocamento para a esquerda, no eixo do tempo, o que pode significar que, as diversas substituições tornaram o produto muito pesado para uma leitura através do método micelar.

Os derivados apresentam diferenças de solubilidade, que são evidenciadas na Tabela 03. Vários solventes foram utilizados, demonstrando aprimoramento do comportamento de solubilidade dos derivados em relação à molécula original. Nota-se resultados positivos em relação à glicerina, propilenoglicol e água, comumente utilizados na produção de medicamentos e cosméticos para uso tópico.

Tais resultados levaram à melhora do comportamento farmacotécnico dos derivados, que são demonstrados nas Figuras 22, 22.1, 22.2, 22.3 e 22.4.

Além disso, os derivados apresentaram bom comportamento em atividade farmacológica antiinflamatória, quando comparados à molécula original, que pode ser avaliada no Gráfico 05. Os derivados ftálicos obtiveram bons resultados de antiinflamação, provavelmente devido à presença do anel benzóico da molécula do anidrido ftálico, que confere polaridade específica ao derivado. Tal polaridade pode aumentar a facilidade de permeabilidade celular do derivado, obtendo, portanto, resultado mais eficaz na redução da inflamação localizada.

7 – CONCLUSÃO

O presente trabalho nos permite chegar às seguintes conclusões:

- os derivados da β Escina apresentam boas características de solubilidade em água, que nos permitem a utilização dos mesmos em várias formas farmacêuticas aquosas semi-sólidas e líquidas.
- os resultados dos testes de inflamação nos mostram que as características farmacológicas antiinflamatórias da β Escina são mantidas no caso dos derivados succínicos, e melhoradas no caso dos derivados ftálicos.
- em função dos resultados obtidos nos testes *in vivo* podemos dizer que os derivados obtidos nos permitem a utilização de menores doses, obtendo-se efeitos antiinflamatórios satisfatórios.

Assim, podemos concluir que os derivados sintetizados da β Escina possuem propriedades farmacotécnicas e farmacológicas mais interessantes que o fármaco original.

7.1- Perspectivas futuras

Como perspectivas futuras, sugerimos a introdução de outros anidridos de maior cadeia, como por exemplo o palmítico ou o oléico, que melhoram a lipossolubilidade da molécula aumentando a sua permeabilidade a membranas, o que acarretaria no aprimoramento dos resultados terapêuticos para medicamentos de uso oral.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCAME, M.E.C. Terpenos III: triterpenos y esteróides. **Panorama Actual del Medicamento**, v.25, n.240, p.124-130, 2001.

ALLUIS, B.; PÉROL, N.; EL HAJJÍ, H.; DANGLES, O. Water-Soluble Flavonol (=3-Hydroxy-2-phenyl-4H-1benzopyran-4-one) Derivatives: Chemical Synthesis, Colouring and Antioxidant Properties. **Helvetica Chimica Acta**, Weinheim, v.83, p. 428-443, 2000.

ALTRIA, K.D., ed. **Capillary electrophoresis guidebook**: principles, operation and applications. Totowa: Humana Press, 1996. p.3-13, 125-155. (Methods in molecular biology, v.52).

ARAÚJO, M. Farmacoterapia nas doenças vasculares periféricas. In: PITTA, G.B.B., CASTRO, A.A., BURIHAN, E., eds. **Angiologia e cirurgia vascular**: guia ilustrado. Maceió: UNCISAL/ECMAL & LAVA, 2003. pt.14, cap.73. Disponível em: http://www.lava.med.br/livro/pdf/marcelo_farmacoterapia.PDF. Acesso em: 29 maio 2005.

BARROS Jr., N. Insuficiência venosa crônica. In: PITTA, G.B.B.; CASTRO, A.A., BURIHAN, E., eds. **Angiologia e cirurgia vascular**: guia ilustrado. Maceió: UNCISAL/ECMAL & LAVA, 2003. Insuficiência venosa crônica. pt.6, cap.27. Disponível em: http://www.lava.med.br/livro/pdf/newton_ivc.PDF. Acesso em: 29 maio 2005.

BERKENKOPF, J.; CASMER, C.; WATNICK, A. Drug activities in arachidonic-acid and croton-oil induced inflammations. **Agents and Actions**, v.16, n.6, p.601-602, 1985. [Meeting Abstracts].

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. 2.ed. Paris: Lavoisier Publishing; Secaucus: Intercept, 1999. 1119p.

CORREIA, M.E.; OLIVEIRA, A. Complicações de escleroterapia de varizes. In: PITTA, G.B.B.; CASTRO, A.A.; BURIHAN, E., eds. **Angiologia e cirurgia vascular**: guia ilustrado. Maceió: UNCISAL/ECMAL & LAVA, 2003. pt.6, cap.21. Disponível em: http://www.lava.med.br/livro/pdf/eletice_escleroterapia.PDF. Acesso em: 17 maio 2007.

COSTANTINI, A. Escin in pharmaceutical oral dosage forms: quantitative densitometric HPTLC determination. **Farmaco**, v.54, p.728-732, 1999.

CUNHA, A.P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia**. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf. Acesso em: 15 abr. 2007.

DEF 2004/2005: dicionário de especialidades farmacêuticas. 33.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2004. pag 691.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais**: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. pag 230

DWECK, A.C. Functional botanicals: their chemistry and effects. In: INTERNATIONAL COSMETIC EXPO™, Miami, 2000. Disponível em: http://www.dweckdata.com/Published_papers/ICE2000.pdf Acesso em: 28 ago. 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV. Parte I. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda, 1988. p. V.2.21, IV.2

FERRUCCIO, B.; OMINI, C.; LONGIAVE, D. The mode of action of aescin and the release of prostaglandins. **Prostaglandins**, v.14, n.2, p.241-249, 1977.

FIGUEIREDO, M. Úlcera varicosa. In: PITTA, G.B.B.; CASTRO, A.A.; BURIHAN, E., eds. **Angiologia e Cirurgia Vascular**: guia ilustrado. Maceió: UNCISAL/ECMAL & LAVA, 2003. pt.6, cap.29. Disponível em: http://www.lava.med.br/livro/pdf/marcondes_ulcera.PDF. Acesso em: 29 maio 2006.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E., eds. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10.ed. New York: MacGraw-Hill, 2001. pag. 3-29.

GUILLAUME, M.; PADIOLEAU, F. Veinotonic effect, vascular protection, antiinflammatory and free radical scavenging properties of horse chestnut extract. **Arzneimittel Forschung**, v.44, n.1, p.25-35, 1994.

HAYASHI, H.; HUANG, P.; INOUE, K.; HIRAOKA, N.; IKESHIRO, Y.; YAZAKI, K.; TANAKA, S.; KUSHIRO, T.; SHIBUYA, M.; EBIZUKA, Y. Molecular cloning and characterization of multiflorenol synthase, a new triterpene synthase from *Luffa cylindrica*, involved in biosynthesis of bryonolic acid. **Eur. J. Biochem.**, n.268, p.6311–6317, 2001.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Saponins**. Cambridge, New York: Cambridge University Press, 1995. 548p. (Chemistry and pharmacology of natural products).

KALINOWSKA, M.; ZIMOWSKI, J.; PACZKOWSKI, C.; WOJCIECHOWSKI, Z.A.; The formation of sugar chains in triterpenoid saponins and glycoalkaloids. **Phytochemistry Reviews**, n.4: 237–257, 2005.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1998. p.4.

KLEEMANN, A.; ENGEL, M.J. **Pharmazeutische wirkstoffe syntheses**. Stuttgart: George Thieme Verlag, 1978. p.67, 117, 149 e 498.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALIER, J.H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. p.162-163, 308, 402, 699.

KUSHIRO, T.; SHIBUYA, M.; EBIZUKA, Y. Beta-amyrin synthase – cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. **Eur. J. Biochem.**, n.256, p.238–244, 1998.

LORENZ, D.; MAREK, M.L. Das therapeutische wirksame Prinzip der Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum*). **Arzneimittel Forschung**, v.10, p.263–72, 1960.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. p.13-22.

LOZANO, F.; JIMÉNEZ-COSSÍO, J.A.; ULLOA, J. La insuficiencia venosa crónica en España. **Angiologia**, v.53, n.1, p.5-16, 2001.

MARTINDALE: Guia Completo de Consulta Fármaco-Terapêutica. Barcelona: Pharma, 2003. p.1766.

MATSUDA, H.; LI, Y.; MURAKAMI, T.; NINOMIYA, K.; YAMAHARA, J.; YOSHIKAWA, M. Effects of escins Ia, Ib, IIa and IIb from horse chestnut, the seeds of *Aesculus hippocastanum* L., on acute inflammation in animals. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.20, n.10, p.1092–1095, 1997.

MERCK Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 11.ed. Rahway: Merck, 1989. p.581.

MERCK Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13.ed. Rahway: Merck, 2001. p.267, 431, 550, 1121, 1490, 1491, 1507, 1508, 1743.

MONTELLO, M.S.A.G. **Efeito da terapia com laser de baixa potência na dermatite induzida por óleo de cróton em orelha de camundongo**. São José dos Campos, 2002. 82p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Pesquisas e Desenvolvimento - Universidade do Vale do Paraíba.

MORITA, M.; SHIBUYA, M.; KUSHIRO, T.; MASUDA, K.; EBIZUKA, Y. Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*) – new alpha-amyrin-producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. **Eur. J. Biochem.**, n.267, p.3453–3460, 2000.

PEKDEMIR, T.; ISHIGAMI, Y.; UCHIYAMA, H. Characterization of aescin as a biosurfactant for environmental remediation. **Journal of Surfactants and Detergents**, v.2, n.3, p.337-341, 1999.

PERES, L.E.P. **Metabolismo Secundário**. Disponível em: <http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2008.

SERTIÉ, J.A.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T.T.; AZZOLINI, C.P.; PENNA, S.C. Pharmacological assay of *Cordia verbenaceae* III: oral and topical antiinflammatory activity and gastrotoxicity of a crude leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.31, n.2, p.239-247, 1991.

SHIBUYA, M.; ZHANG, H.; ENDO, A.; SHISHIKURA, K.; KUSHIRO, T.; EBIZUKA, Y. Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualene cyclases. **Eur. J. Biochem.**, n.266, p.302-307, 1999.

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**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. p.711-740.

SIRTORI, C.R. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. **Pharmacological Research**, v.44, n.3, p.183-193, 2001.

SOARES, B.G.; SOUZA, N.A.; PIRES, D.X., eds. **Química orgânica: teoria e técnicas de preparação, purificação e identificação de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. p.68-75.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química orgânica**. 8.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005-2006. 2v., p.114-119.

TREASE, G.E.; EVANS, W.C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14.ed. London: WB Saunders, 1996. p.293-294.

VIDAL CONDE, W. Tratamiento farmacológico de la hipertensión venosa (HTV). **Anales de Cirugía Cardíaca y Cirugía Vascular**, v.7, n.1, p.56-67, 2001. [III Mesa redonda do V Simposio de Angiologia y Cirugía Vascular Mataró, Espanha. Mataró, Espanha].

WETZEL, D.; MENKE, W.; DIETER, R.; SMASAL, B.; GIANNETTI, B.; BULITTA, M. Escin/diethylammonium salicylate/heparin combination gels for the topical treatment of acute impact injuries: a randomised, double blind, placebo controlled, multicentre study. **British Journal of Sports Medicine**, v.36, n.3, p.183-188, 2002.

WILKINSON, J.A.; BROWN, A.M.G. Horse chestnut – *Aesculus hippocastanum*: potential applications in cosmetic skin-care products. **International Journal of Cosmetic Science**, v.21, p.437–447, 1999.

WOLLINA, U.; ABDEL-NASER, M.B.; MANI, R. A Review of the microcirculation in skin in patients with chronic venous insufficiency: the problem and the evidence available for therapeutic options. **International Journal of Lower Extremity Wounds**, v.5, n.3, p.169-180, 2006.

YAMADA, B.F.A.; SANTOS, V.L.C.G. **Insuficiência crônica venosa**. São Paulo: Escola de Enfermagem/USP. Disponível em: <http://www.enfmedic.com.br/Download/Artigo%20IVC.pdf>. Acesso em: 30 maio 2006.

YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. Bioactive saponins and glycosides. XII. Horse chestnut: structures of escin IIIb, IV, V and VI and isoescins Ia, Ib and V, acylated polyhydroxyoleanene triterpene oligoglycosides, from seeds of horse chestnut tree (*Aesculus hippocastanum* L., Hippocastanaceae) **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.46, n.11, p.1764-1769, 1998.

9 - ANEXOS

9.1 - ANEXO A - Características físico-químicas dos reagentes e solventes utilizados na parte experimental

β ESCINA

Características	β Escina [11072-93-8]
Forma Física	Pó amorfo
Ponto de Fusão	222°C – 223°C
Nome Químico	β Escina
Principais Fontes	Sementes da árvore da Castanha da Índia (<i>Aesculus hippocastanum</i>)
Fórmula Molecular	$C_{54}H_{84}O_{23}$
Peso Molecular	1101,25
Rotação óptica	$[\alpha]_D^{27} - 23,7^\circ$ (c = 5 metanol)
Solubilidade	Praticamente Insolúvel em água
DL₅₀	oral: 134mg/kg em camundongos
Uso Terapêutico	Tratamento de distúrbios vasculares periféricos

ANIDRIDO SUCCÍNICO

Características	Anidrido Succínico [108-30-5]
Forma Física	Prismas ortómbicos
Ponto de Fusão	119,6°C
Ponto de Ebulição	261°C (760mmHg)
Nome Químico	Dihydro-2,5-furandione
Outras denominações	Ácido succínico anidrido, Oxido succinil, anidrido butanedióico
Fórmula Molecular	$C_4H_4O_3$
Peso Molecular	100,07
Composição Química	C 48,01%, H 4,03%, O 47,96%
Densidade	$d_4^{25} 1,503$
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Solúvel em clorofórmio, tetracloreto de carbono e álcool. Muito pouco solúvel em éter e água

Fonte: The Merck Index – 11ª Ed – pags 9, 11, 330, 407, 511, 581, 593, 594, 600, 630, 705, 741, 939, 1170, 1358, 1364, 1376, 1399, 1417, 1501, Catálogo Aldrich pag 1929

ANIDRIDO FTÁLICO

Características	Anidrido Ftálico [0085-44-9]
Forma Física	Sólido branco em forma de agulhas
Ponto de Fusão	130,8°C
Ponto de Ebulição	295°C
Nome Químico	1,3-Isobenzofurandione
Fórmula Molecular	C ₈ H ₄ O ₃
Peso Molecular	148,11
Composição Química	C 64,87%, H 2,72%, O 32,41%
Densidade	d ₄ ²⁵ 1,53
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Solúvel em 162 partes de água, melhor em água quente, com conversão para ácido ftálico, 125 partes de dissulfeto de carbono, solúvel em álcool e parcialmente solúvel em éter
Uso	Produção de ftaleínas e ftalatos, índigo sintético, resinas artificiais.

ETANOL

Características	Etanol [61-17-5]
Forma Física	Líquido inflamável, incolor, muito fluido. Odor agradável. Sabor ardente
Ponto de Fusão	- 114,1°C
Ponto de Ebulição	78,5°C
Nome Químico	Ethanol
Outras denominações	Álcool absoluto, álcool anidro, álcool desidratado
Fórmula Molecular	C ₂ H ₆ O
Peso Molecular	46,07
Composição Química	C 25,14%, H 13,13%, O 34,74%
Densidade	d ₄ ²⁰ 0,789
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Miscível com água e com vários solventes orgânicos
Toxicidade	Náusea, vômito, efeito “flushing”, excitação mental ou depressão, redução da percepção, coma, podendo levar à morte.
Uso	Na maioria das vezes como solvente em laboratórios e indústrias, em produtos farmacêuticos (rubefacientes, loções, tônicos, colônias), perfumaria, síntese orgânica.

N-N-DIMETILFORMAMIDA

Características	N-N-Dimetilformamida [68-12-2]
Forma Física	Líquido incolor a fracamente amarelado com fraco odor de amina
Ponto de Fusão	-61°C
Ponto de Ebulição	153°C (760mmHg)
Nome Químico	N-N-Dimetilformamida
Outras denominações	DMF, DMFA
Fórmula Molecular	C ₃ H ₇ NO
Peso Molecular	73,09
Composição Química	C 49,30%, H 9,65%, N 19,17%, O 21,89%
Densidade	d ₄ ²⁵ 0,9445
pH	6,7 (sol. 0,5 molar em água)
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Miscível com água e outros solventes orgânicos.
DL₅₀	Oral: 6,8 ml/kg em camundongos
Toxicidade	Vapor perigoso. Irritante para pele, olhos e mucosas. Em experimentos com animais provoca injúria no fígado por inalação prolongada de 100ppm
Uso	Solvente para líquidos e gases. Síntese de compostos orgânicos. Solvente para Orlon e fibras poliacrílicas similares. Têm sido conhecido como solvente universal.

ÓLEO DE SOJA

Características	Óleo de Soja [8001-22-7]
Forma Física	Óleo amarelo pálido a amarelo amarronzado. Odor e sabor característicos fracos.
Ponto de Solidificação	-10°C a -16°C
Índice de Saponificação	189 – 195
Densidade	d ₂₅ ²⁵ 0,916 – 0,922
Viscosidade	50,09 cp (25°C)
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Miscível com álcool absoluto, éter, clorofórmio, dissulfeto carbono.
Uso	Alimento no Oriente, também misturado ao óleo de oliva. Produção de margarina, doces, sopas.

HEXANO

Características	Hexano [110-54-3]
Forma Física	Líquido incolor muito volátil. Odor fraco e peculiar.
Ponto de Fusão	-95°C a -100°C
Ponto de Ebulição	69°C
Nome Químico	N-Hexano
Fórmula Molecular	C ₆ H ₁₄
Peso Molecular	86,17
Composição Química	C 83,62%, H 16,38%
Densidade	d ₄ ²⁰ 0,660
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Insolúvel em água, miscível com álcool, clorofórmio e éter.
DL₅₀	Oral: 49,0 ml/kg em ratos adultos jovens
Toxicidade	Pode ser irritante para o trato respiratório.
Uso	Usado na determinação de índice refrativo de minerais, preenchimento de termômetros, no lugar do mercúrio (colorido com tinta azul ou vermelha)

GLICERINA

Características	Glicerina [56-81-5]
Forma Física	Líquido xaroposo, sabor doce de sensação quente.
Ponto de Fusão	17,8°C
Ponto de Ebulição	290°C (760mmHg)
Nome Químico	1,2,3-Propanetriol
Outras denominações	Glicerol, Trihidroxipropanona
Fórmula Molecular	C ₃ H ₈ O ₃
Peso Molecular	92,09
Composição Química	C 39,12%, H 8,75%, O 52,12%
Densidade	d ₂₅ ²⁵ 1,262
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Miscível com água e álcool. Uma parte dissolve em 11 partes de etilacetato, em aproximadamente 500 partes de etiléter. Insolúvel em benzeno, clorofórmio.
DL₅₀	Oral: 20,0 ml/kg em ratos adultos jovens
Uso	Solvente, umectante, plastificante, emoliente, edulcorante. Produção de nitroglicerina, cosméticos, sabonetes líquidos, licores, lubrificantes. Nutriente na fermentação e produção de antibióticos.

METANOL

Características	Metanol [67-56-1]
Forma Física	Líquido fluido, venenoso, inflamável. Leve odor alcoólico, odor repulsivo.
Ponto de Fusão	-97,8°C
Ponto de Ebulição	64,7°C (760mmHg)
Nome Químico	Methanol
Outras denominações	Methyl alcohol, carbinol
Fórmula Molecular	CH ₄ O
Peso Molecular	32,04
Composição Química	C 37,48%, H 12,58%, O 49,93%
Densidade	d ₄ ²⁵ 0,7866
Densidade de vapor	1,11 (ar = 1)
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Miscível com água, etanol, éter, benzeno, cetonas e com a maioria dos solventes orgânicos
Toxicidade	Perigo na ingestão, inalação ou absorção percutânea. Dor de cabeça, fadiga, náusea, visão embaçada ou até a completa cegueira (podendo ser permanente), acidose, convulsão, midríase, colapso circulatório, falha respiratória, morte.
Uso	Solvente industrial, matéria prima para fabricação de formaldeído e metiléteres de ácidos orgânicos e inorgânicos. Solvente de polímeros e na fabricação de colesterol, estreptomina, vitaminas, hormônios entre outros.

ÓLEO DE CRÓTON

Características	Óleo de Cróton [8001-28-3]
Forma Física	Líquido viscoso amarelo pálido ou marrom amarelado.
Densidade	d ₂₅ ²⁵ 0,935 – 0,950
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Pouco solúvel em álcool. Livremente solúvel em clorofórmio, éter, óleos, ácido acético glacial.
Toxicidade	Venenoso
Uso	Indutor irritante e carcinogênico

CLOROFÓRMIO

Características	Clorofórmio [67-66-3]
Forma Física	Líquido não inflamável, pesado, muito volátil, sabor adocicado, odor característico.
Ponto de Fusão	-63,5°C
Ponto de Ebulição	61°C – 62°C
Nome Químico	Trichloromethano
Fórmula Molecular	CHCl ₃
Peso Molecular	119,39
Composição Química	C 10,05%, H 0,84%, Cl 89,10%
Densidade	d ₂₀ ²⁵ 1,484
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	1ml dissolve em aproximadamente 200ml de água. Miscível com álcool, benzeno, éter, tetracloreto de carbono, óleos.
DL₅₀	Oral: 2,18 ml/kg em ratos
Toxicidade	A inalação de grandes doses pode causar hipotensão, depressão respiratória e do miocárdio e morte. Banida pelo FDA em 1976 para uso cosmético e farmacêutico. Carcinogênico.
Uso	Solvente de gorduras, óleos, alcalóides, resinas, borracha. Agente de limpeza. Utilizado na indústria da borracha.

CLORETO FÉRRICO HEXAHIDRATADO

Características	Cloreto Férrico Hexahidratado [10025-77-1]
Forma Física	Cristais marrom-amarelados ou alaranjados. Leve odor de HCl.
Ponto de Fusão	Em torno de 37°C
Fórmula Molecular	<i>Trans</i> -[FeCl ₂ (H ₂ O ₄)]Cl.2H ₂ O
Densidade	D 1,82
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Facilmente solúvel em água, éter, clorofórmio e álcool.
pH	2,0 (solução aquosa a 0,1 molar)
DL₅₀	I.V.: 0,049 mg Fe em camundongos
Uso	Produção de outros sais de ferro, pigmentos, tintas. Catalisador de reações químicas. Reagente clínico (exames laboratoriais). Tingimento têxtil.

ÉTER

Características	Éter [2679-89-2]
Forma Física	Líquido fluido, muito volátil, altamente inflamável. Vapor mais denso que o ar. Odor adocicado.
Ponto de Fusão	-116,3°C
Ponto de Ebulição	34,6°C (760mmHg)
Nome Químico	Ethyl Ether
Outras denominações	1,1'-Oxybisethano
Fórmula Molecular	C ₄ H ₁₀ O
Peso Molecular	74,12
Composição Química	C 64,81%, H 13,60%, O 21,59%
Densidade	d ₄ ²⁰ 0,7134
Densidade de vapor	2,55 (ar = 1)
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Pouco solúvel em água. Miscível com álcoois alifáticos, benzeno, clorofórmio, óleos.
Toxicidade	Perigo de explosão. Levemente irritante à pele e mucosas. Inalação de altas concentrações pode causar inconsciência, paralisia respiratória e morte.
Uso	Anestésico. Solvente para óleos, gorduras, perfumes, alcalóides. Reagente de sínteses orgânicas. Veículo extrator de ativos de tecidos animais e vegetais.

TETRABORATO DE SÓDIO

Características	Tetraborato de Sódio [1330-43-4]
Forma Física	Cristais duros inodoros, grânulos ou pó cristalino.
Ponto de Fusão	75°C (aquecido rapidamente)
Nome Químico	Sodium Borate
Outras denominações	Sodium biborato, sodium pyroborato
Fórmula Molecular	B ₄ Na ₂ O ₇
Peso Molecular	201,27
Composição Química	B 21,5%, Na 22,84%, O 55,65%
Densidade	d 1,73
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Pouco solúvel em água
Toxicidade	Ingestão de 5g a 10g por crianças pode causar vômito, diarreia, choque e morte.
Uso	Solda de metais, preservativo antifúngico em madeira.

ACETONA

Características	Acetona [67-64-1]
Forma Física	Líquido volátil, altamente inflamável. Odor característico, sabor adocicado e acre.
Ponto de Fusão	- 94°C
Ponto de Ebulição	56,5°C
Nome Químico	2-Propanona
Outras denominações	Dimetil cetona
Fórmula Molecular	C ₃ H ₆ O
Peso Molecular	58,08
Composição Química	C 62,04%, H 10,41%, O 27,55%
Densidade	d ₂₅ ²⁵ 0,788
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Miscível com água, álcool, éter, dimetilformamida, clorofórmio e a maioria dos óleos.
DL₅₀	Oral: 10,7 ml/kg em ratos
Toxicidade	Uso tópico prolongado ou repetido pode causar eritema e ressecamento da pele. Inalação pode produzir dor de cabeça, fadiga, irritação brônquica.
Uso	Solvente de óleos, gorduras, borracha, plástico. Produção de clorofórmio, iodoformio, explosivos, filmes fotográficos, Solvente extrativo..

DODECILSULFATO DE SÓDIO

Características	Dodecilsulfato de Sódio [151-21-3]
Forma Física	Cristais, flocos ou pó brancos ou creme. Fraco odor de substâncias gordurosas. Sensação cremosa.
Nome Químico	Sulfuric acid monododecyl éster sodium salt
Outras denominações	SDS, Lauril Sulfato de Sódio
Fórmula Molecular	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S
Peso Molecular	288,38
Composição Química	C 49,98%, H 8,74%, Na 7,97%, O 22,19%, S 11,12%
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Um grama dissolve em 10ml de água (solução opalescente).
DL₅₀	Oral: 1288 mg/kg em ratos
Uso	Agente molhante, detergente, indústria têxtil. Ingrediente de pastas dentais. Separação eletroforética de proteínas e lipídeos.

TOLUENO

Características	Tolueno [108-88-3]
Forma Física	Líquido refrativo, inflamável, odor “benzeno-like”.
Ponto de Fusão	-95°C
Ponto de Ebulição	110,6°C
Nome Químico	Methylbenzeno
Outras denominações	Toluol, phenylmethano
Fórmula Molecular	C ₇ H ₈
Peso Molecular	92,13
Composição Química	C 91,25%, H 8,75%
Densidade	d ₄ ²⁰ 0,866
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Muito pouco solúvel em água, miscível com álcool, clorofórmio, éter, acetona, ácido acético glacial.
DL₅₀	Oral: 7,53 ml/kg em ratos
Toxicidade	Narcótico em altas concentrações.
Uso	Produção de ácido benzóico, benzaldeído, explosivos, tinturas e outros solventes orgânicos. Solvente de gomas, resinas. Extrativo de princípios de plantas.

ÁCIDO SULFÚRICO

Características	Ácido Sulfúrico [7664-93-9]
Forma Física	Líquido oleoso, claro, incolor, inodoro.
Ponto de Ebulição	~ 290°C
Nome Químico	Ácido Sulfúrico
Fórmula Molecular	H ₂ SO ₄
Peso Molecular	98,08
Composição Química	H 2,06%, S 32,69%, O 65,25%
Densidade	d ~ 1,84
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Miscível com água e álcool.
DL₅₀	Oral: 2,14 g/kg em ratos
Toxicidade	Altamente corrosivo. Inalação pode causar sérios danos ao trato respiratório. Contato com os olhos pode causar em perda da visão. Contato com a pele pode causar necrose. Ingestão pode causar a morte.
Uso	Produção de fertilizantes, explosivos, outros ácidos, papel, cola e purificação de petróleo.

ETILACETATO

Características	Etilacetato [141-78-6]
Forma Física	Líquido claro, volátil, inflamável. Odor característico de frutas.
Ponto de Fusão	-83°C
Ponto de Ebulição	77°C
Nome Químico	Acetic Acid Ethyl Éster
Outras denominações	Éter Acético
Fórmula Molecular	C ₄ H ₈ O ₂
Peso Molecular	88,10
Composição Química	C 54,53%, H 9,15%, O 36,32%
Densidade	d ₄ ²⁰ 0,898
Densidade de vapor	3,04 (ar = 1)
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Um ml dissolve em 10ml de água, miscível com álcool, clorofórmio, acetona e éter.
DL₅₀	Oral: 11,3 ml/kg em ratos
Uso	Flavorizante farmacêutico, essência artificial de frutas, solvente para nitrocelulose, produção de couro artificial, filmes fotográficos.

METOXIPOLIETILENOGLICOL

Características	Metoxipolietilenoglicol [9004-74-4]
Nome Químico	Poly ethyleno glycol methyl ether
Outras denominações	MPEG
Fórmula Molecular	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) _n OH
Densidade	1,094 (25°C)
Viscosidade	10,5 cSt (210°F)

ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL.

Características	Ácido Acético Glacial [64-19-7]
Forma Física	Líquido de odor acre. Inflamável.
Ponto de Fusão	16,7°C
Ponto de Ebulição	118°C
Nome Químico	Ácido acético Glacial
Fórmula Molecular	$C_2H_4O_2$
Peso Molecular	60,05
Composição Química	C 40,00%, H 6,71%, O 53,29%
Densidade	d_{25}^{25} 1,049
Solubilidade a 25°C (g/100g de solvente)	Miscível com água, álcool, glicerina, éter, tetracloreto de carbono.
pH	2,4 (solução aquosa 1,0 molar)
DL₅₀	Oral: 3,53 g/kg em ratos
Toxicidade	Ingestão pode causar severa corrosão do TGI e boca, com vômito, diarreia, colapso circulatório, uremia e morte. Exposição pode causar bronquite e erupção no esmalte dentário, pele e olhos
Uso	Produção de vários acetatos, acetato de celulose, plásticos, borracha. Acidulante e conservante em alimentos. Solvente de resinas, gomas, óleos voláteis e várias outras substâncias. Muito utilizado em sínteses orgânicas. Adjuvante farmacêutico.

9.2 - ANEXO B – Currículo Lattes

Dados Pessoais

Nome Carolina de Barros Franco Araujo
Filiação Virgílio de Barros Franco e Sônia Cordeiro de Barros Franco
Nascimento 25/06/1974 - São José dos Campos/SP - Brasil
Carteira de Identidade 23571783 ssp - SP - 28/09/2001
CPF 25945852899

Endereço residencial Rua José Francisco Alves, 24 apto 111
 Vila Ema - São José dos Campos
 12243060, SP - Brasil
 Telefone: 12 39136687

Endereço profissional - Autônoma
 - Brasil

Endereço eletrônico e-mail para contato : carolinabfa@usp.br
 e-mail alternativo : carolinabfa@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

2006 - Atual Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Síntese de Derivados Solúveis da Escina e Alguns Estudos Físico-Químicos e Biológicos
 Orientador: Bronislaw Polakiewicz

1998 - 2000 Especialização em Gestão Empresarial.
 Fundação Getúlio Vargas - RJ, FGV-RJ, Rio de Janeiro, Brasil

2003 - 2004 Especialização em Farmacologia Aplicada à Atenção Farmacêuticas.
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp, FCF - UNESP, Brasil

1993 - 1998 Graduação em Farmácia Bioquímica.
 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

2005 - 2006 Aperfeiçoamento em Síntese de Biomateriais p Aplicações Farmacêuticas.
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Síntese de Derivados Solúveis da Escina
 Orientador: Bronislaw Polakiewicz

Formação complementar

1999 - 2000 Gestão Empresarial.
 Fundação Getúlio Vargas - RJ, FGV-RJ, Rio de Janeiro, Brasil

2003 - 2004 Farmacologia Aplicada à Dispensação de Medicamentos.
 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Assoc. Fundo Aux. Mutuo - Pol. Militar - AFAM
Vínculo institucional
2001 - 2003 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: profissional ,
 Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades
2001 - 2003 Serviço Técnico Especializado
Gerência Técnica e administrativa

2. Autônoma - AUT**Vínculo institucional**

2007 - Atual Vínculo: autônoma , Enquadramento funcional: Auditora / Consultora ,
Carga horária: 30, Regime: Parcial

Atividades

2007 - Atual Serviço Técnico Especializado
Auditoria e Consultoria Técnica e da Qualidade em Farmácias Magistrais e Serviços de Saúde

3. Byoformula Farmácia de Manipulação - BYO**Vínculo institucional**

2003 - 2007 Vínculo: Profissional , Enquadramento funcional: Gerente Técnica e da Qualidade , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

2003 - 2007 Serviço Técnico Especializado
Desenvolvimento Farmacotécnico / Garantia e Controle da Qualidade

2003 - 2007 Treinamentos
Treinamentos em Gestão / Garantia da Qualidade , Treinamentos Farmacotécnicos

2003 - 2007 Outra atividade técnico-científica
Desenvolvimento Farmacotécnico em Farmácia de Manipulação

4. Terapêutica Farmácia de Manipulação - TERAP**Vínculo institucional**

1998 - 2001 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: profissional ,
Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

1998 - 2001 Serviço Técnico Especializado
Farmacêutica Técnica de Laboratório

5. Universidade Paulista - UNIP**Vínculo institucional**

2005 - Atual Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Professor Assistente ,
Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

2005 - Atual Graduação, Farmácia Bioquímica
Disciplinas Ministradas: Farmacotécnica , Tecnologia Farmacêutica, Cosmetologia, Química Farmacêutica

Áreas de atuação

1. Farmacotecnia
2. Análise e Controle de Medicamentos
3. Biomateriais
4. Cosmetologia
5. Síntese Orgânica Aplicada
6. Garantia da Qualidade

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem
Espanhol Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

Prêmios e Títulos

2006 3º Lugar Pôster - "Síntese de Moléculas Derivadas de Rutina com Potencial Fator de Proteção Solar (FPS) para Emprego em Dermocosméticos", Associação Brasileira de Cosmetologia

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Capítulos de livros publicados

1. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
Como prescrever Fórmulas Manipuladas em Odontologia In: Manual Odontológico de Formulações Manipuladas.1 ed.São Paulo : Editora Santos, 2007
2. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
Formas Farmacêuticas Utilizadas em Odontologia In: Manual Odontológico de Formulações Manipuladas.1 ed.São Paulo : Editora Santos, 2007
3. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
Formulações Manipuladas Aplicadas ao Tratamento de Pacientes com Distúrbios Cardiovasculares In: Manual Odontológico de Formulações Manipuladas.1 ed.São Paulo : Editora Santos, 2007
4. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
Fórmulas Cosmecêuticas Aplicadas à Odontologia In: Manual Odontológico de Formulações Manipuladas.1, 2007

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

1. BERNUSSO, Leandra de Cassia, Micke, G.A., Gargioni, Karine, Affonso, L.T.A., ARAUJO, Carolina de Barros Franco, Ruscinc, N., Tavares, M.F.M., Polakiewicz, Bronislaw
Characterization of Flavonoid Derivatives by Capillary Electrophoresis In: 11º Simpósio Latino-americano en Aplicaciones de La Electroforesis Capillary y Tecnologia del Microchip en Biotecnologia, Biomedicina, Biofarmacia e Indústria, 2005, Guarujá.
LACE. , 2005. p.118 - 118
2. BERNUSSO, Leandra de Cassia, Mello, K.G.P.C., Adati, Karina Honda, Affonso, L.T.A., Ruscinc, N., ARAUJO, Carolina de Barros Franco, Polakiewicz, Bronislaw
Reações de Quitosana com Aldeído Cinâmico para Aplicações Cosméticas In: 8º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2005, Águas de Lindóia.
ABPOL - Associação Brasileira de Polímeros. , 2005. p.96 - 97
3. BERNUSSO, Leandra de Cassia, Gargioni, Karine, Adati, Karina Honda, PEDRIALI, C. A., Affonso, L.T.A., Ruscinc, N., ARAUJO, Carolina de Barros Franco, Pitombo, R.N.M., Polakiewicz, Bronislaw
Some Aspects of the Liophilization Silk Fibroin-Chitosan Blend for Medical Applications In: III Liophilization Conference, 2005, São Paulo.
Freeze Drying. , 2005. p.13 - 14
4. ARAUJO, Carolina de Barros Franco, Ruscinc, N., PEDRIALI, C. A., Polakiewicz, Bronislaw
Synthesis of Soluble Derivatives of Beta Escina In: International Congress Of Pharmaceutical Sciences, 2005, Ribeirão Preto.
Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences. , 2005. v.41. p.417 - 417
5. ARAUJO, Carolina de Barros Franco, BERNUSSO, Leandra de Cassia, Polakiewicz, Bronislaw
Synthesis of Soluble Derivatives of Escin In: X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2005, São Paulo.
XL SUPFAB. , 2005.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo expandido)

1. BERNUSSO, Leandra de Cassia, Mello, K.G.P.C., Adati, Karina Honda, Affonso, L.T.A., Ruscinc, N., ARAUJO, Carolina de Barros Franco, Polakiewicz, Bronislaw
Reações de Quitosana com Aldeído Cinâmico para Aplicações Cosméticas In: Congresso Brasileiro de Polímeros, 2005, Águas de Lindóia.
ABPOL - Associação Brasileira de Polímeros. , 2005. p.731 - 731

Demais produções bibliográficas

1. ARAUJO, Carolina de Barros Franco, Ruscinc, N.
Synthesis of Soluble Derivatives of Escin, 2005. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. Polakiewicz, Bronislaw, ARAUJO, Carolina de Barros Franco, BERNUSO, Leandra de Cassia
Novos Derivados Solúveis de Escina, Processo para Obtenção, Composição Farmacêutica, Cosmética e usos destes derivados, 2007. (Outra produção técnica)
2. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
Cosmetologia dos Xampus, 2006. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
3. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
Farmacotécnica de Cápsulas, 2006. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
4. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
Medicamentos Transdérmicos, 2006. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
5. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
Menopausa, 2006. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
6. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
Qualidade de Vida na Terceira Idade, 2006. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
7. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
Câncer de Próstata - Prevenção, 2005. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
8. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
Controle da Qualidade em Farmácia de Manipulação, 2005. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
9. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
Cuidados com a Automedicação na Terceira Idade, 2005. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
10. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
Farmacotécnica, 2005. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)
11. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
Tecnologia Farmacêutica e de Cosméticos, 2005. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)
12. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
DST - Prevenção, 2004. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
13. ARAUJO, Carolina de Barros Franco
Gravidez Indesejada - Métodos Contraceptivos, 2004. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Orientações e Supervisões

Orientações e Supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Priscila Bernacca. **Farmácia de Manipulação - Histórico, Crescimento e Gestão**. 2007. Curso (Farmácia Bioquímica) - Universidade Paulista

Demais Trabalhos

1. ARAUJO, Carolina de Barros Franco, Polakiewicz, Bronislaw
Síntese de Derivados Solúveis de Escina, 2005.

Eventos

Participação em eventos

1. **Congresso Brasileiro de Cosmetologia**, 2006. (Congresso)
Síntese de Moléculas Derivadas de Rutina com Potencial Fator de Proteção Solar (FPS) para emprego em Dermocosméticos.
2. Apresentação de Pôster / Painel no(a) **5º Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas**, 2005. (Congresso)
Synthesis of Soluble Derivatives of Aescin.
3. **X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP**, 2005. (Congresso)
Synthesis of Soluble Derivatives of Escina.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Capítulos de livros publicados.....	4
Comunicações em anais de congressos e periódicos (proceedings e suplementos).....	6
Apresentações de Trabalhos (Congresso).....	1

Produção técnica

Curso de curta duração ministrado (outro).....	10
Desenvolvimento de material didático ou instrucional.....	2
Outra produção técnica.....	1

Orientações

Orientação concluída (trabalho de conclusão de curso de graduação).....	1
---	---

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	3
---	---

Demais trabalhos relevantes

Demais trabalhos relevantes.....	1
----------------------------------	---

Outras informações relevantes

- Participação em 4 Capítulos de Livro: "Manual Odontológico de Formulações Manipuladas" - Desenvolvimento de Projetos Sociais e com clientes da terceira idade, com Palestras Educativas e de Saúde - Experiência em docência em nível Universitário e orientação de TCC - Ministrante em Jornadas e Semanas Farmacêuticas Universitárias - Desenvolvimento de Programa Interno de Capacitação e Treinamento em assuntos técnicos e da qualidade, treinamento técnico continuado de farmacêuticos, equipes de laboratório de vendas - Auditorias da Qualidade e Consultorias Técnica e da Qualidade em farmácia de manipulação nas áreas de desenvolvimento farmacotécnico, controle e garantia da qualidade - Acompanhamento de não conformidades e reclamações de clientes para desenvolvimento de soluções farmacotécnicas e farmacológicas - Acompanhamento e Controle de Processos Produtivos com redução de índices de não-conformidade - Suporte farmacotécnico e de desenvolvimento de novos produtos e lançamentos para o setor de Marketing e atendimento técnico-científico a médicos - Coordenação Farmacotécnica e de Atenção Farmacêutica de Farmácia de Manipulação, avaliação técnica de receituário médico - Desenvolvimento e aprimoramento farmacotécnico de fórmulas cosméticas e medicamentosas e acompanhamento de produção de novos produtos para adequação do processo de fabricação - Estruturação do Setor Controle da Qualidade, atuando em desenvolvimento de especificação de insumos, implantação de métodos analíticos, e desenvolvimento de programa de qualificação de fornecedores - Atuação na Gestão e Garantia da Qualidade, monitorando índices da qualidade e produtividade, controle em processo, não-conformidade, reclamação de cliente, Pesquisa de Cliente Interno e Externo - Realização e Acompanhamento de Inspeção e Auditorias Internas e Externas de Sistema da Qualidade - Implantação e desenvolvimento de Sistema de Qualificação de Fornecedores - Gerenciamento e contratação de equipe técnica - Elaboração, implantação e acompanhamento de procedimentos e normas para a implantação de ISO 9002 e legislações vigentes- Atuação em logística - Controle de estoque e sistema de distribuição de medicamentos e insumos farmacêuticos

9.3 - ANEXO C - Cópia da Ficha do Aluno

Ficha Aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

9135 - 5256015/3 - Carolina de Barros Franco Araujo

Email: carolinabfa@usp.br
Data de Nascimento: 25/6/1974
Cédula de Identidade: RG - 23.571.783-6 - SP
Local Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico Bioquímico - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - - São Paulo - Brasil - 1997

Curso: Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área: Tecnologia Químico-Farmacêutica
Data da Matrícula: 4/7/2006
Início da Contagem de Prazo: 9/9/2005
Data Limite: 9/3/2008
Orientador(es): Prof(a). Dr(a). Bronislaw Polakiewicz - 04/07/2006 a --
Email: bronipol@usp.br
Proficiência em Línguas:
Exame de Qualificação: Aprovado em 07/08/2007
Data do Depósito do Trabalho:
Data máxima para aprovação da Banca:
Título do Trabalho:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Ocorrência: Última matrícula em 21/01/2008

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Sit. Matric.
FBT5737-5	Tecnologia de Síntese de Fármacos	9/9/2005	10/11/05	90	6	90.00	A	N	Concluída
FBT5715-5	Complementos de Matemática Aplicada para Biotecnologia	1/3/2006	27/4/2006	120	8	100.00	B	N	Concluída
FBF5764-2	Biossíntese de metabólitos secundários vegetais	9/10/2006	19/11/06	60	4	83.00	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Patente de invenção "Novos derivados solúveis de escinas, processo para obtenção de derivados solúveis de escinas, composição farmacêutica, composição cosmética e uso destes novos derivados de escinas", P.I. 0.605.546-0	6/2/2007	6/2/2007	-	4	0.00	-	-	-
FBT5784-2	Aplicação de Catálise de Transferência de Fase na Síntese de Fármacos	8/3/2007	20/6/2007	90	6	90.00	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de		Para Depósito de		Créditos obtidos	
	Qualificação		Dissertação/Tese			
Disciplinas:	25		25		Disciplinas:	28
Atividades Programadas:	0		0		Atividades Programadas:	0
Seminários:	0		0		Seminários:	0
Estágios:	0		0		Estágios:	0
Total:	25		25			28

Créditos Atribuídos à Dissertação : 71

<p>Conceito até 31/12/1996:</p> <p>A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J - Abandono Justificado; T - Transferência.</p> <p>Conceito a partir de 02/01/1997:</p> <p>A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.</p> <p>Um(1) crédito equivale a (15) horas de atividade programada.</p>	
---	--

Situação em: 13/02/2008 10:34

9.4 - ANEXO D - Cópia do Aval do Comitê de Ética em Experimentação Animal **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CEEA nº 55/2006

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **“Síntese de derivados solúveis da escina e algumas avaliações físico-químicas e biológicas”** (Protocolo CEEA nº114), sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Carolina de Barros Franco Araújo** e do orientador(a) Prof(a).Dr(a). **Bronislaw Polakiewicz**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 14/08/2006.

São Paulo, 14 de agosto de 2006.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA