

PRISCILA DRUMOND ALVES

**AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS PREPARADOS COM NIM
(*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae)**

**BELO HORIZONTE
FACULDADE DE FARMÁCIA/UFMG**

2007

PRISCILA DRUMOND ALVES

AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS PREPARADOS COM NIM
(*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciências Farmacêuticas, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Lins Brandão

Belo Horizonte

Faculdade de Farmácia/UFMG

2007

A474a Alves, Priscila Drumond
Avaliação cromotográfica e atividade antimicrobiana de produtos preparados com nim (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) / Priscila Drumond Alves. – 2007.
75f. : il.

Orientadora: Prof^a Dra. Cristina Duarte Vianna Soares.
Co-Orientadora: Prof^a Dra. Maria das Graças Lins Brandão.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Fitoterapia - Teses. 2. Medicamentos – Controle de qualidade – Teses. 3. Farmacognosia – Teses. I. Soares, Cristina Duarte Vianna.II. Brandão, Maria das Graças Lins III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.

CDD: 615.321

**“É urgente partir sem medo e
sem demora para onde nascem
os sonhos, buscar novas artes
de esculpir a vida”.**

Armando Arthur

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pelas bênçãos e dificuldades.

À minha orientadora Cristina, pelas inúmeras orientações, questionamentos e correções.

À minha co-orientadora Graça, pelo apoio e por acreditar no projeto e no meu trabalho.

À banca examinadora, pela avaliação e sugestões, sempre bem vindas.

Aos meus pais Renato e Maria Lúcia, por estarem sempre presentes, por me incentivarem a cada passo que dei.

À minha irmã Poliana e à prima Thamara, que dividem comigo o dia-a-dia, agüentando os momentos de extrema tensão e relaxamento.

Ao Cristhiano, meu “pára-quadras de português”, por agüentar as crises e por nunca me deixar desistir, por ser companhia nos bons e nos maus momentos.

Aos colegas e funcionários dos Laboratórios de Controle de Qualidade e de Farmacognosia, pelos milhares de galhos quebrados e pelo auxílio.

Ao Dr. Borenstein, que mesmo de longe ajudou muito fornecendo parte do padrão utilizado e realizando as análises por massas.

À Paulinha, que chegou no finzinho, mas ajudou um monte nas análises.

Ao Leo, à Gabi e à Michele, pelo auxílio na realização dos testes microbiológicos.

À Professora Elzília, pela orientação dos testes microbiológicos e por disponibilizar alunos para me ajudar.

A todos que, de uma forma ou de outra permitiram concluir esse trabalho, nunca me deixando desistir.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	10
3.1 Material	10
3.1.1. Amostras utilizadas (extratos e produtos comerciais)	10
3.1.2. Análise cromatográfica.....	11
3.1.3. Teste de susceptibilidade microbiana	12
3.2 Métodos	14
3.2.1 Extrato hidroalcoólico (não comercial)	14
3.2.1.1 Preparação dos extratos hidroalcoólicos	14
3.2.1.2 Análise cromatográfica.....	14
3.2.1.3 Teste de susceptibilidade microbiana	16
3.2.2 Produtos comerciais preparados com nim	18
3.2.2.1 Teste de susceptibilidade microbiana	19
3.2.3 Avaliação dos métodos de cromatografia líquida de alta eficiência	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Extrato hidroalcoólico (não comercial) de folhas de nim.....	22
4.1.1 Análise cromatográfica.....	23

4.1.1.1 Cromatografia em camada delgada	23
4.1.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência	25
4.1.2 Teste de susceptibilidade microbiana	34
4.2 Produtos comerciais preparados com nim	37
4.2.1 Teste de susceptibilidade microbiana	41
4.3 Avaliação dos métodos cromatográficos por CLAE-UV/DAD	44
5 CONCLUSÕES	54
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
7 ANEXOS	61
7.1 Teste de Tukey para o extrato hidroalcoólico de folhas de nim 70%	61
7.2 Teste de Tukey para o extrato hidroalcoólico de folhas de nim 80%	62

Lista de Figuras

1. A árvore (a) do nim (*Azadirachta indica*) e suas partes, folhas e frutos (b), sementes de nim (c).....2
2. Estruturas químicas de diversas substâncias presentes no nim (MORGAN, JOHNSON, 1997).....7
3. Cromatograma representativo de eluição por CLAE-UV/DAD para o pico de AZA (SILVA, 2005, com permissão).22
4. Placa cromatográfica representativa de eluição por CCD para o extrato hidroalcoólico de folhas de nim em etanol 70% (V/V) e 80% (V/V) e mancha de padrão de trabalho de AZA (Pa).24
5. Cromatogramas representativos de eluição por CLAE-UV/DAD para a solução padrão de trabalho de azadiractina (0,4 mg/ml) nos métodos cromatográficos isocrático (a), tempos de eluição 7,933 min e 8,780 min (água:acetonitrila 60:40) e gradiente (b), tempos de eluição 17,305 min e 18,872 min (ver parte experimental para detalhes). Figura inserida: espectro UV/DAD da solução padrão de trabalho de azadiractina.26
6. Espectro de IES-EM para solução padrão de trabalho de AZA (0,1 µg/ml em metanol 50% V/V).27
7. Espectro IES-EM/EM do produto iônico obtido pela dissociação induzida por colisão dos íons em m/z 738,3 (a) e em m/z 680,3 (b) (ver texto para detalhes).....28
8. Perfil de fragmentação da AZA A por IES (SHARMA *et al.*, 2003).29
9. Perfil de fragmentação da AZA B por IES (SHARMA *et al.*, 2003).30
10. Padrão de fragmentação da AZA H por IES (SHARMA *et al.*, 2003).....31
11. Cromatogramas (CLAE-EM) da solução padrão de trabalho de azadiractina (0,1 µg/ml em metanol 50% V/V) monitorados nas transições [738,3→703,3] (tempo de retenção 1,70 min) e [680,3→645,2] (tempo de retenção 1,84 min), respectivamente (ver texto para detalhes das condições).33
12. Cromatograma representativo de eluição por CLAE-UV/DAD para o extrato hidroalcoólico de folhas de nim em etanol 70% (V/V), utilizando eluição isocrática. 34
13. Placa cromatográfica por CCD representativa para eluição de produtos comerciais preparados com nim (A-F) e do padrão de trabalho de AZA (Pa).39
14. Cromatogramas representativos de eluições por CLAE-UV/DAD para o produto E pelo método isocrático (a), picos de AZA em 8,155 min e 9,023 min e gradiente (b), picos de AZA em 16,956 min e 18,546 min. Ver texto para condições.40
15. Cromatogramas representativos de eluições por CLAE-UV/DAD para o produto F pelo método isocrático (a), picos de AZA em 7,936 min e 8,752 min e gradiente (b), picos de AZA em 16,821 min e 18,336 min. Ver texto para condições.41
16. Curvas analíticas obtidas para AZA pelo método cromatográfico em gradiente (G) em relação às áreas dos picos em 17,305 min (a), em 18,872 min (b) e à soma das áreas dos picos (c) e pelo método isocrático (I) em relação às áreas dos picos em 7,993 min (a), em 8,780 min (b) e à soma das áreas dos picos (c).47

Lista de Tabelas

1. Relação de métodos cromatográficos (CLAE) descritos para azadiractina.	8
2. Resultados (n=3) da relação dose-dependência da atividade contra <i>S. aureus</i> para os extratos hidroalcoólicos de folhas de nim a 70% e 80% (V/V) de etanol em concentrações crescentes (100 a 300 mg/ml), por meio de medida dos halos de inibição, utilizando cloranfenicol como controle positivo.	36
3. Resultados estatísticos para o teste de Tukey ($q_{0,05; 3; 7}$) ^a , para verificação da relação dose-dependência dos extratos hidroalcoólicos em etanol a 70% e 80% (V/V), em concentrações crescentes (100 a 300 mg/ml) contra <i>S. aureus</i>	37
4. Resultados da atividade do produto C (100 mg/ml em etanol 50% V/V) contra bactérias Gram-positivo, Gram-negativo, leveduras e fungo, por meio de medição dos halos de inibição.	43
5. Resultados da curva analítica obtidos a partir de injeções de diferentes volumes de solução padrão de trabalho (AZA, 0,4 mg/ml, CLAE-UV/DAD, isocrático).	45
6. Resultados da curva analítica obtidos a partir de injeções de diferentes volumes de solução padrão de trabalho (AZA, 0,4 mg/ml, CLAE-UV/DAD, gradiente).	46
7. Resultados obtidos a partir das curvas analíticas de AZA pelos métodos gradiente e isocrático em CLAE-UV/DAD nos produtos comerciais preparados com nim (ver parte experimental para condições).	49
8. Resultados obtidos de precisão intra-ensaio e inter-ensaio para os métodos gradiente e isocrático em CLAE-UV/DAD, utilizando produto comercial E (ver parte experimental para condições).	50
9. Resultados de robustez obtidos por meio de alterações intencionais na composição de fase móvel e na temperatura de eluição para o método isocrático (ver texto para detalhes).	51
10. Resultados obtidos de quantidade estimada de AZA em produtos comerciais preparados com nim ^a por CLAE-UV/DAD, método isocrático (ver parte experimental para condições).	53

Lista de abreviaturas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AZA – azadiractina

CCC – cromatografia em contra-corrente

CCD – cromatografia em camada delgada

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-EM – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

CLAE-UV/DAD – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta, com arranjo de diodos

DMS – diferença mínima significativa

DP – desvio padrão

DPR – desvio padrão relativo à média

IES – ionização por electrospray

EM – espectrometria de massas

R – fator de resolução

RDC – resolução da diretoria colegiada

R_f – fator de retenção

R_t – tempo de retenção

RESUMO

Nim (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) é uma árvore indiana conhecida por sua atividade pesticida e por suas várias atividades farmacológicas, entre elas, ação de amplo espectro contra microorganismos patogênicos. Dentre mais de 300 compostos já isolados, a azadiractina (AZA) foi identificada como seu principal componente ativo. Prepararam-se extratos hidroalcoólicos de folhas de nim em diferentes concentrações de etanol (50%, 60%, 70%, 80% e 90% (V/V)) por percolação. A presença de AZA foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV/DAD) por meio dos métodos isocrático e gradiente. Tanto os extratos quanto os produtos comerciais preparados com nim foram avaliados com o objetivo de detectar e quantificar AZA e testados contra bactérias Gram-positivo, Gram-negativo, fungos e leveduras patogênicas. As curvas analíticas por CLAE-UV/DAD nos dois métodos de eluição foram realizadas através da injeção de volumes crescentes (10 a 30 µl) de solução padrão estoque (0,4 mg/ml). O método isocrático apresentou melhor linearidade ($r = 0,9985$) e menores tempos de retenção dos dois picos avaliados (R_t médio = 7,933 min e 8,780 min) que o gradiente (R_t médio = 17,305 min e 18,872 min), e, portanto, recomendado para a quantificação estimativa de AZA nos produtos. Os extratos não apresentaram mancha equivalente àquela da AZA por CCD. Todos os seis produtos comerciais avaliados apresentaram grande variação no teor de AZA e apenas dois deles apresentaram picos correspondentes à AZA por CLAE-UV/DAD. Os extratos preparados com etanol a 70% e 80% (V/V) apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*, no entanto, não houve relação dose-dependência pelo tratamento estatístico do teste de Tukey ($q_{0,05;3;7}$). Dos seis produtos comerciais testados, apenas um apresentou atividade antimicrobiana. A ausência de AZA nos extratos ou produtos indica que a atividade verificada pode estar relacionada à presença de outras substâncias.

Palavras-chave: azadiractina, *Azadirachta indica*, nim, CLAE, CCD, atividade antimicrobiana

ABSTRACT

Neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) is an Indian tree well known for its pesticide activity and several pharmacological activities, including a wide spectrum activity against pathogenic microorganisms. More than 300 compounds have already been isolated and azadirachtin (AZA) is its main active component. In the present work, Neem leaves hydroalcoholic extracts were prepared by percolation in different ethanol concentrations (50%, 60%, 70%, 80% e 90% (V/V)). The presence of AZA was verified by thin-layer chromatography (TLC) and by high performance liquid chromatography (HPLC-UV/DAD) using isocratic and gradient modes. Both for the extracts and the commercial Neem products, the AZA presence was determined by TLC and HPLC, as described above, and tested against Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi and yeasts. Analytical curves were carried out by injecting increasing volumes (10 to 30 μ l) from AZA stock standard solution (0.4 mg/ml). The isocratic method presented better linearity ($r = 0.9985$) and shorter retention times for the two evaluated peaks (average $R_t = 7.933$ min and 8.780 min) than the gradient method (average $R_t = 17.305$ min e 18.872 min), hence was recommended for AZA estimate quantitation. The extracts did not display equivalent AZA spot by TLC. Out of six commercial products analyzed, all presented a great variety in AZA amount and only two showed the AZA correspondent peaks. The extracts prepared with 70% and 80% (V/V) ethanol showed activity against *Staphylococcus aureus*, however, no dose-dependent activity was detected, according to Tukey's test ($q_{0.05;3;7}$). Only one of the six products tested showed antimicrobial activity. The absence of AZA in those extracts or products indicates that the activity may be due to the presence of other substances.

Keywords: azadirachtin, *Azadirachta indica*, Neem, HPLC-UV/DAD, TLC, antimicrobial activity

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos botânicos no controle de pragas e doenças na agricultura é uma prática muito antiga. Eles foram altamente utilizados, principalmente, nos países em desenvolvimento até o advento dos produtos sintéticos para esse fim. Estes substituíram os produtos naturais, devido a seu menor custo e maior eficácia (SUBAPIRYA, NAGINI, 2005). Durante o início do século XX, o Brasil foi um grande produtor e exportador de inseticidas naturais. Após os anos 50, seguiu a tendência mundial de substituir esses produtos por substâncias sintéticas. Desde então, observou-se o uso indiscriminado dessas substâncias na agricultura, o que levou a sérios danos ao ambiente e à vida de trabalhadores rurais devido à alta toxicidade dos agrotóxicos e seu uso inadequado (MARTINEZ, 2002).

O nim (Figura 1), cujo nome científico é *Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae, é uma planta tropical conhecida por suas propriedades pesticidas e medicinais (DAI *et al.*, 1999). É uma das plantas pesticidas mais estudadas, sendo considerada a mais importante e promissora espécie vegetal com esta propriedade (MORGAN, JOHNSON, 1997). Nos últimos anos, o nim vem sendo utilizado na agricultura do Brasil, embora de forma ainda artesanal. O extrato é feito pelo próprio agricultor, por meio da diluição de pó da planta em água ou em mistura de água e etanol. Extratos etanólicos proporcionam melhor extração da azadiractina (AZA), principal componente ativo do nim, e têm melhor estabilidade que extratos aquosos (MARTINEZ, 2002).



Figura 1. A árvore (a) do nim (*Azadirachta indica*) e suas partes, folhas e frutos (b), sementes de nim (c).

Várias características do nim o tornam uma planta tão interessante, dentre elas: o fato de a planta não ser destruída para a produção dos extratos, uma vez que as substâncias ativas encontram-se nas sementes e folhas; a dificuldade dos insetos tornarem-se resistentes, pois possui uma grande diversidade de substâncias; a alta concentração de substâncias ativas solúveis em água, de fácil extração e de baixo custo; a alta toxicidade das substâncias às pragas e a inocuidade ao homem e ao ambiente, pois são biodegradáveis e de baixa permanência (BARREK *et al.*, 2004). Além disso, o nim apresenta usos diversos, podendo ser inserido em diversos setores da economia (ISMÁN, 1997). A produção da matéria-prima, o preparo de extratos e a sua utilização podem ser desenvolvidos no país e dentro da propriedade rural, levando a uma independência econômica e tecnológica (MARTINEZ, 2002).

A árvore nim pode alcançar até quinze metros de comprimento quando atinge a idade adulta, apresentando abundância de folhas e frutos, de onde se extraem as principais substâncias ativas. Apresenta uma vasta utilidade para o homem, e possui várias indicações comprovadas na agropecuária, na veterinária e na farmácia, como planta medicinal (SUBAPIRYA, NAGINI, 2005). Por ser uma planta tipicamente de clima tropical, o Brasil possui várias regiões promissoras para seu cultivo com condições climáticas adequadas, principalmente nas regiões Centro, Norte e Nordeste, onde as árvores podem apresentar bons desenvolvimento e produção de frutos. Isto favoreceria o Brasil a produzir e exportar pesticidas naturais, sendo uma fonte de verba significativa para o país.

Tradicionalmente, na Índia, o nim é usado na prevenção da malária, na cura da lepra, em distúrbios na produção de bile, tônico, no alívio da tosse, ou da asma, problemas urinários em geral, vermífugo, contraceptivo, cicatrizante, para gases estomacais, calmante, analgésico e febrífugo. Algumas dessas ações já foram comprovadas, como suas ações antifúngica, antibacteriana (ALMAD, BEG, 2001), antiviral, antimalárica (ISAH *et al.*, 2003), antifertilidade, antipirética, antiinflamatória, analgésica, antiulcerogênica (RAJI *et al.*, 2004), anti-hiperglicêmica (principalmente quando associado a *Abroma augusta*, o linho indiano) (HALIM, 2003), neurofarmacológica, dermatófita, protetor bucal, hepatoprotetora, imunoestimulante, antioxidante, antigenotóxica, anticancerígena (SUBAPIRYA, NAGINI, 2005).

Na Índia e no Paquistão, derivados do nim também são usados em numerosos produtos farmacêuticos e de toucador como pasta de dente, sabonete e pomada dermatológica, no controle da escabiose e de outros parasitas. Na Alemanha, podem ser encontrados xampus, óleo para unhas e creme dental. No Brasil, algumas empresas fabricam produtos como xampus, óleos para unhas, sabonetes

medicinais e cremes dentais bactericidas preparados com nim, além de produtos para uso na agricultura, na pecuária e no controle de pestes domésticas (MARTINEZ, 2002).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da RDC 48, de 2004, que regulamenta o registro de fitoterápicos, preconiza que esses devem passar por testes físico-químicos e microbiológicos de forma a garantir a sua qualidade (BRASIL, 2004). A produção de um extrato vegetal padronizado e a sua caracterização por meio de métodos físicos ou físico-químicos de análises quali e quantitativa são essenciais para a fabricação uniforme de produtos e, portanto, para a sua segurança, eficácia e qualidade final do produto. Vários procedimentos gerais para produtos naturais e suas preparações encontram-se descritos em farmacopéias de diversos países, como Brasil, Estados Unidos, entre outros. Para as formas farmacêuticas líquidas, por exemplo, é necessário realizar testes físico-químicos (EUROPEAN, 2001; UNITED, 2006), como densidade relativa, teor alcoólico, ensaio limite de metanol e 2-propanol e resíduo seco, além dos testes de identificação e doseamento do princípio ativo. As farmacopéias também preconizam as informações que devem estar contidas no rótulo do produto, como material vegetal, concentração do solvente usado, concentração do solvente no produto final, teor do princípio ativo ou a razão desse sobre a quantidade de material de partida e a concentração de conservantes antimicrobianos usados. O desenvolvimento de métodos de análise quali e/ou quantitativa contribui para assegurar a identidade e a concentração de princípios ativos nos extratos a serem utilizados na agropecuária ou na medicina, garantindo, assim, a produção e distribuição de produtos de qualidade para a população.

Ainda há muitas pesquisas a serem realizadas sobre o nim, por exemplo em relação às doses efetivas necessárias para os seus diversos usos, ao aprimoramento genético das plantas cultivadas, às condições ideais de cultivo e à farmacovigilância dos produtos já existentes no mercado. Nesta pesquisa extratos hidroalcoólicos preparados com folhas de nim e produtos comerciais preparados com a planta foram analisados por métodos cromatográficos. A atividade antimicrobiana foi também avaliada por meio de testes *in vitro*. O objetivo da pesquisa foi contribuir no desenvolvimento de metodologia analítica e verificação da atividade antimicrobiana para a avaliação da qualidade de produtos preparados com a planta.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A principal substância ativa do nim é a azadiractina (AZA), que foi primeiramente isolada das sementes de nim, por J.H. Butterworth e E.D. Morgan (MERCK, 2006), mas também pode ser encontrada nas demais partes da planta, contudo, em menores concentrações. A AZA pode ser obtida como um pó microcristalino que possui massa molar 720,71 g, faixa de fusão de 154 a 158 °C, poder rotatório específico, $[\alpha]_D^{20}$, igual a -53° (0,5 mg/ml de AZA em clorofórmio) e absorção máxima na região do ultravioleta ($UV_{m\acute{a}x}$) em λ 217 nm em metanol (MERCK, 2006). A AZA é extremamente instável em meios ácidos e alcalinos, em altas temperaturas, em presença de luz e umidade. A azadiractina foi apenas

recentemente sintetizada em laboratório, sendo uma substância de alta complexidade e difícil síntese (VEITCH *et al.*, 2007).

Além de AZA, várias outras substâncias ativas isoladas do nim são descritas: salanina, 14-epoxiazadiradiona, meliantrol, melianona, gedunina, nimbolina, nimbina, nimbinem, desacetilasalanina, azadiractol, azadirona, vilosinina, meliacarpina, entre outros, totalizando mais de 300 substâncias isoladas e caracterizadas. As atividades pesticida e farmacológica se dão principalmente pela ação sinérgica dessas substâncias (SHARMA *et al.*, 2003; MARTINEZ, 2002; DAI *et al.*, 2001; SCHAAF *et al.*, 2000; MORGAN, JOHNSON, 1997).

Várias outras substâncias com estrutura semelhante à da AZA (AZA A) são descritas na literatura, a saber, azadiractina B, C, D, E, F, G, H e I. Essas e outras substâncias já foram elucidadas e há dados espectrais de ressonância magnética nuclear (RMN) e de massas para a maioria (MORGAN, JOHNSON, 1997; SCHAAF *et al.*, 2000; SHARMA *et al.*, 2003). Outras substâncias isoladas do nim ainda necessitam ser melhor estudadas, com a determinação final de estrutura, confirmação de dados espectrais de RMN e de massas, principalmente devido à grande semelhança dessas substâncias.

Na Figura 2, estão representadas as estruturas de algumas dessas substâncias relacionadas. Pode-se observar que elas são muito semelhantes, o que lhes confere propriedades similares.

Métodos físico-químicos de determinação de AZA por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são bastante explorados por detecção na região do ultravioleta (UV) ou por massas (EM). Diversos métodos são descritos, conforme demonstrado na Tabela 1.

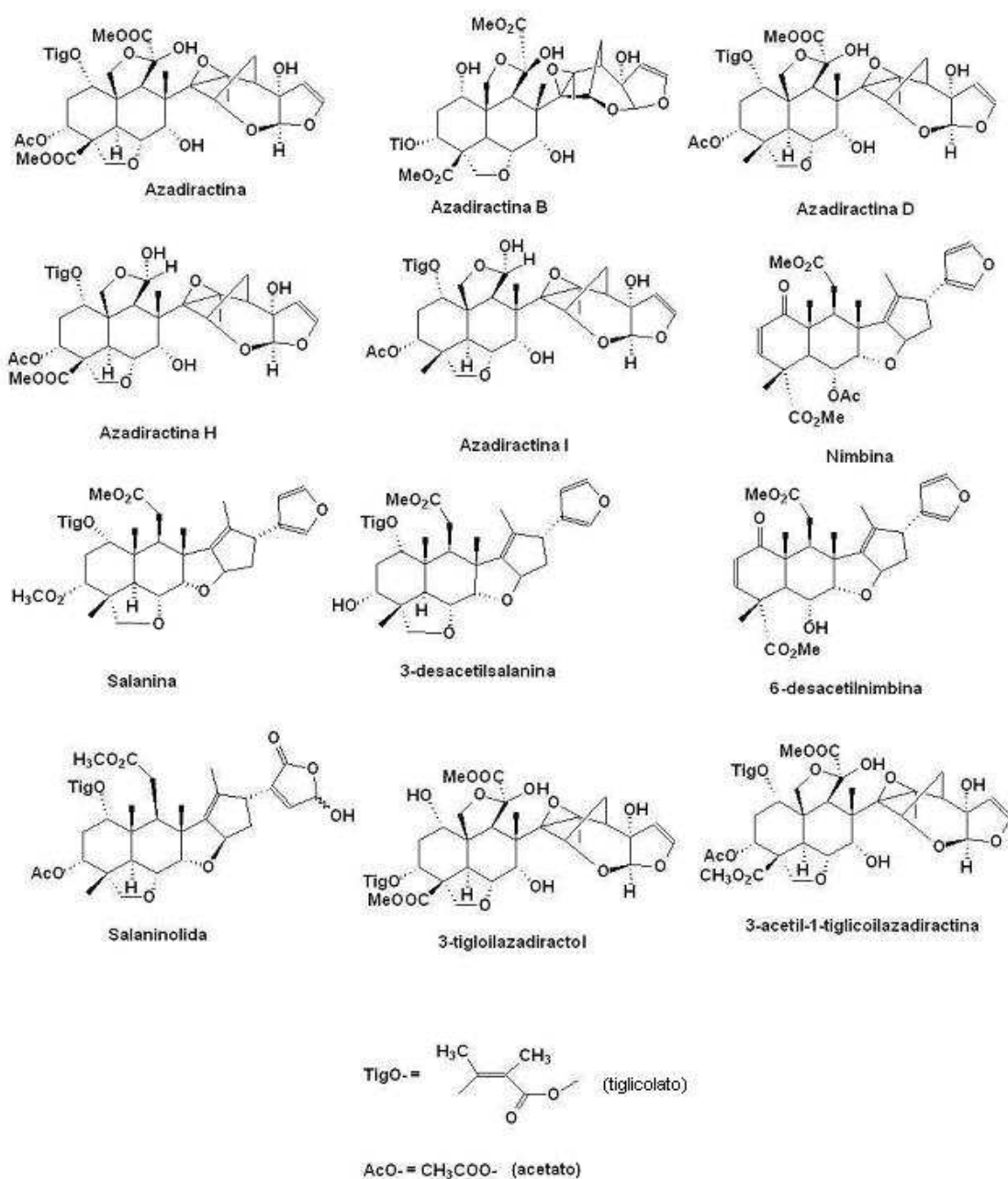


Figura 2. Estruturas químicas de diversas substâncias presentes no nim (MORGAN, JOHNSON, 1997).

Tabela 1. Relação de métodos cromatográficos (CLAE) descritos para azadiractina.

Referência	Coluna (mm)	Sistema de eluição		Tempo de retenção (min)	Detecção (nm)
		Fase móvel	Fluxo (ml/min)		
Gradiente					
Barrek <i>et al.</i> , 2004	Interchim Uptisphere C18 (250 x 3)	ACN ^a 16% em água, gradiente até 100% (40 min)	0,4	21,3	UV, 215
Schaaf <i>et al.</i> , 2000	Supelcosil C18 (100 x 4,6)	20% ACN/TFA ^b isocrático (5 min), gradiente até 65% (10 min), isocrático (10 min)	0,5	-	UV, 217 EM
Morgan, Johnson, 1997	Waters Spherisorb C18 (250 x 4,6)	ACN/água. 32% ACN (15 min) 32 a 55% ACN (5 min), 55% ACN (30 min)	1,0	22	UV, 217
Thejavanti <i>et al.</i> , 1995	Novapak C18 (150 x 3,9)	ACN/água (40:60) por 5 min, gradiente até 100% (3 min)	-	3,2	UV, 217
Isocrático					
Dai <i>et al.</i> , 1999	Waters Spherisorb (250 x 4,6)	ACN/água (40:60)	1,0	10,2	UV, 214
Kaushik, 2002	Novapak C18 (150 x 3,9)	ACN/água (40:60)	1,0	2,8	UV, 214

a: acetonitrila, b: ácido trifluoroacético

Verifica-se uma maior utilização de eluição por gradiente para avaliação e separação dos componentes dos extratos preparados com nim (THEJEAVANTI *et al.*, 1995; MORGAN, JOHNSON, 1997; SCHAAF *et al.*, 2000; BARREK *et al.*, 2004). Este método de eluição pode ser de difícil execução, pois exige equipamento sofisticado, com, no mínimo, bomba binária capaz de misturar previamente os solventes. No método descrito por Kaushik (2002), utiliza-se uma coluna cromatográfica pequena (C18, 150 x 3,9 mm) e eluição isocrática, o que leva a um baixo tempo de retenção. Um curto período de eluição é desejável, já que reduz o tempo de análise e, conseqüentemente, diminui os custos finais da análise. Dai

(1999) utiliza o mesmo sistema de eluição, mas com uma coluna maior (C18, 250 x 4,6 mm), mais comumente usada, porém com obtenção de tempo de retenção três vezes maior que o descrito por Kaushik (2002).

Métodos microbiológicos de determinação da atividade antimicrobiana do nim também são descritos por vários autores (CHOPRA *et al.*, 1952; ALLAMED *et al.*, 2001; ALMAD, BEG, 2001; ISAH *et al.*, 2003; MOSSINI *et al.*, 2004; SUBAPIRYA, NAGINI, 2005). Demonstram-se resultados positivos a partir de extratos da semente e das folhas contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e, por outro lado, resultados negativos contra *Bacillus subtilis*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella dysenteriae* e *Candida albicans* (ALHMAD, BEG, 2001). Extratos das folhas de nim foram eficazes contra fungos patógenos, como os do gênero *Trichophyton*, segundo estudos relatados (KHAN, WASSILEW, 1987; *apud* SUBAPIRYA, NAGINI, 2005). Também foram demonstradas atividades inibitórias da protease da espécie *Trichophyton* (IYER, WILLIAEMOM, 1991), da produção de aflatoxina de *A. parasiticus* (ALLAMED *et al.*, 2001), além de atividade antifúngica contra *Penicillium expansum* (MOSSINI *et al.*, 2004).

O óleo das sementes de nim também mostrou atividade antibacteriana de amplo espectro para microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo cepas resistentes a estreptomicina e também para *Mycobacterium tuberculosis* (CHOPRA *et al.*, 1952). Há relatos de que as folhas também inibem *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *M. tuberculosis* e *Micrococcus pyogenes in vitro* (SATYAVATI *et al.*, 1976; *apud* SUBAPRIYA, NAGINI, 2005).

Neste trabalho, os métodos cromatográficos (CLAE) descritos por Dai e colaboradores (1999) e Morgan e Johnson (1997) foram adaptados para a avaliação de AZA em extratos hidroalcoólicos de folhas de nim, produzidos a partir de plantas

cultivadas em solo brasileiro, e em produtos preparados com nim disponíveis no comércio. A atividade antimicrobiana foi verificada contra microorganismos patogênicos.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material

3.1.1. Amostras utilizadas (extratos e produtos comerciais)

- As folhas de nim foram coletadas de uma plantação localizada em Pompéu (Longitude 45° 6' 0", Latitude 18° 56' 24"), Minas Gerais e os extratos hidroalcoólicos, produzidos por percolação estática no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A excicata foi preparada e enviada para o Departamento de Botânica da UFMG, que confirmou a espécie (DATAPLAMT 1235);

- Produtos comerciais obtidos no comércio de Belo Horizonte ou importados e denominados alfabeticamente:

A- Bioneem universal (Bioneem, Itinga, MG), óleo de nim emulsificado, de uso recomendado na agricultura pelo preparo de uma solução a 1% do produto em água;

B- Bioneem uso doméstico Universal (Bioneem, Itinga, MG), óleo de nim diluído, recomendado para uso doméstico, no controle de pragas de jardim e parasitas de animais, pela aplicação de uma solução a 1% do produto em água;

C- Biotex Inseticida Biorgânico (Biotex, local de produção não informado no rótulo), extrato de nim recomendado para uso doméstico e contra pragas domiciliares pela pulverização de uma solução a 2% do produto em água;

D- Óleo Nim-I-Go, óleo de nim (*Azadirachta indica*) emulsionado (AgroEcologic, local de produção não informado no rótulo), óleo emulsificado de nim, óleo de karanja (*Pongamia glabra*), alho, pimenta malagueta, urucum e artemísia, recomendado para uso contra pragas da plantação, pela pulverização de uma solução a 1% do produto em água;

E- Óleo de Neem – O Pesticida Natural (Ervas do Brasil, Araguari, MG), óleo emulsificado de nim recomendado para uso em plantações, pela pulverização de uma solução diluída do produto, recomenda-se diluição de um litro do óleo em 200 litros de água para o uso;

F- Milbiol (Biocur, Holzkirchen, Alemanha), solução com aplicador em spray, que não necessita de diluição para ser aplicado, sendo recomendado para uso contra pragas domésticas.

3.1.2. Análise cromatográfica

- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência HP série 1100, equipado com bomba quaternária, autoinjeter, detector de arranjo diodo (DAD), forno para coluna e software HP CheEMtation (Agilent, Palo Alto, CA, EUA);

- Azadiractina, padrão de trabalho (CheEMervice, West Chester, PA, EUA), pureza técnica, teor não declarado;

- Solventes de grau analítico ou grau cromatográfico (hexano, etanol 96%, diclorometano, acetonitrila e metanol), água ultrapurificada (A fase móvel foi sonificada por 30 min para desgaseificação e todas as soluções injetadas foram filtradas em membrana PVDF de 0,45 µm (Sartorius, Gottingen, Alemanha));

- Tubos capilares de vidro (Drummond, Broomall, PA, EUA);

- Cromatofolhas de alumínio, sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Alemanha);

- Solução reveladora vanilina 1% (p/v) em metanol e ácido sulfúrico 5% (p/v) em etanol;

- Solução reveladora anisaldeído 0,5% (V/V), ácido sulfúrico 5% (V/V) e ácido acético glacial 10% (V/V) em metanol (WAGNER, BLADT, 1996);

- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) acoplado a espectrômetro de massas API 4000 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canadá);

- Coluna C18 Agilent 250 x 4,6 mm (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha);

- Coluna Phenomenex Gemini C18 50 x 2 mm, 3 µm (Phenomenex, Torrance, CA, EUA).

3.1.3. Teste de susceptibilidade microbiana

- Culturas padrão de microorganismos *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella thiphymurium* (ATCC14028), *Saccharomyces*

Cerevisae (ATCC 2601), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (ATCC 1641), *Aspergillus niger* (ATCC 16404);

- Gentamicina e Cloranfenicol, substâncias de referência (Sigma, Saint Louis, MO, EUA);

- Anfotericina B, pó liofilizado, padrão de trabalho (Fungizon®, Bristol, New York, NY, EUA);

- Agar caseína-soja (Biobrás, Montes Claros, MG) e Saboraud dextrose (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA);

- Tween 80 (Synth, São Paulo, SP);

- Espectrofotômetro (Coleman Junior I 6/20, Maywood, IL, EUA);

- Paquímetro digital (Mitutoyo Measuring Instruments Co. Ltda., Suzhou, Japão);

- Discos estéreis Sensibiodisc (CECON – Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda., São Paulo, SP).

3.2 Métodos

3.2.1 Extrato hidroalcoólico (não comercial)

3.2.1.1 Preparação dos extratos hidroalcoólicos

Os extratos foram preparados por percolação estática de 500 g de folhas de nim trituradas, misturadas com sílica, em 500 ml de mistura aquosa de etanol (96%) a 50%, 60%, 70%, 80% e 90% (V/V) em triplicata. A proporção de planta:solvente caracteriza a preparação como um extrato-fluido.

Para cada concentração de solvente extrator, as folhas trituradas foram previamente umedecidas com o solvente e transferidas para um percolador, acrescidas da solução até que essas fossem completamente cobertas. Deixou-se em repouso por 48 horas e coletou-se a primeira fração. Acrescentou-se mais solução alcoólica à torta, que permaneceu em repouso por mais 24 horas, quando se coletou a segunda fração. Esse processo foi repetido mais uma vez para obter um volume final de 500 ml de extratos de folhas de nim, nas diferentes concentrações de solvente extrator.

3.2.1.2 Análise cromatográfica

Os extratos hidroalcoólicos de folhas de nim foram testados por cromatografia em camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.1.2.1. Cromatografia em camada delgada

Por CCD, vários sistemas de eluentes e reveladores foram testados. Melhores resultados foram obtidos com o diclorometano:metanol (99:1). Aplicaram-se alíquotas do extrato hidroalcoólico e do padrão de trabalho de AZA (1,0 mg/ml) em etanol, utilizando capilar de vidro e eluiu-se em placa de sílica. Preliminarmente, os extratos hidroalcoólicos de folhas de nim foram revelados com solução de vanilina 1% (V/V) em metanol e de ácido sulfúrico 5% (V/V) em etanol, e aquecimento. A placa foi, em outros testes, revelada utilizando-se solução reveladora de anisaldeído/ácido sulfúrico e aquecimento por ar quente. A solução de anisaldeído/ácido sulfúrico foi preparada pela adição de 0,5 ml de anisaldeído a 10 ml de ácido acético glacial; em seguida, acrescentaram-se 85 ml de metanol e 5 ml de ácido sulfúrico concentrado sob resfriamento (WAGNER, BLADT, 1996).

3.2.1.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

Por CLAE-UV/DAD, utilizaram-se dois métodos de eluição, gradiente e isocrático, adaptados de Morgan e Johnson (1997) e Dai e colaboradores (1999), respectivamente. Por gradiente, iniciou-se com 32% de acetonitrila e após 15 min aumentou-se para 55% durante 5 min, mantendo esta fase móvel por 30 min. No método isocrático, utilizou-se como fase móvel água:acetonitrila (60:40). Em ambos os métodos, utilizou-se fluxo de 1 ml/min, coluna C18 Agilent (250 x 4,6 mm), volume de injeção de 20 µl e detecção UV/DAD em λ 217 nm. Utilizou-se solução padrão de trabalho de AZA a 0,2 mg/ml em acetonitrila (4,0 µg de AZA por injeção)

para comparação. Os extratos hidroalcoólicos foram injetados sem diluição. Todas as soluções foram filtradas por membrana de 0,45 µm.

A identificação dos picos por CLAE-EM/EM foi gentilmente realizada pelo Professor Dr. Michael R. Borenstein, Temple University, Philadelphia, PA, EUA, utilizando ionização por electrospray (IES) no modo positivo e utilizando coluna Phenomenex Gemini C18 (50 x 2 mm, 3 µm), fase móvel água:acetoneitrila (60:40), fluxo 0,3 ml/min, pela injeção de uma solução do padrão de trabalho de AZA a 0,1 µg/ml em metanol 50% (V/V), monitorado nas transições [738,3→703,3] e [680,3→645,2]. A fragmentação desses íons foi realizada utilizando dissociação induzida por colisão (gradiente de 5 a 130 V). Dados espectrais de AZAs A, B e H (íon molecular M+H com m/z 721, 663 e 663, respectivamente) descritos por Sharma e colaboradores (2003) foram utilizados para comparação com os dados obtidos neste estudo. A razão entre os tempos de retenção (AZA B/AZA A) dos picos de maior intensidade do cromatograma foram calculados para os dois métodos CLAE-UV/DAD.

3.2.1.3 Teste de susceptibilidade microbiana

A atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos foi determinada por meio do método da difusão de disco (NUNAN *et al.*, 1985; NATIONAL, 1993).

Uma alíquota de 125 ml de extrato em cada concentração alcoólica foi seca em evaporador rotatório até resíduo. Os resíduos foram dessecados em estufa a vácuo a 40 °C por 6 horas e deixados em dessecador por 50 horas. Tomaram-se 100 mg

de resíduo de extrato, reconstituindo-os em 1,0 ml de etanol a 50% (V/V). Foi utilizada uma solução de etanol a 50% (V/V) para o controle negativo.

Os microorganismos foram preparados por repique de culturas padrão em placas de Petri e por incubação da placa em estufas a $36,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou a $25,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A partir dessas placas, foram preparados os inóculos em salina até obtenção da suspensão com $40 \pm 1\%$ de transmitância (%T). Essa suspensão foi diluída dez vezes em salina (1 ml de suspensão e 9 ml de salina), da qual tomaram-se 250 μl , transferiram-se para erlenmeyer contendo 50 ml do meio, preparado com agar apropriado para cada microorganismo, obtendo-se inóculo a 0,05% (V/V). Para a cultura de *Bacillus subtilis*, acrescentou-se Tween 80 à salina, na proporção de 0,1% (V/V) (NUNAN *et al.*, 1985).

O teste foi realizado em triplicata para cada microorganismo. Adicionaram-se 20 ml de meio em cada placa e, após gelificação, acrescentaram-se 5 ml de meio com os respectivos inóculos. Após a gelificação do meio, colocaram-se os discos impregnados com 20 μl de solução de extrato, solução de antibiótico (controle positivo, cloranfenicol 1,0 mg/ml, gentamicina 1,0 mg/ml e anfotericina B 2,0 mg/ml) ou etanol a 50% (V/V) (controle negativo). As soluções foram difundidas por 60 min e as placas foram incubadas à temperatura adequada, $36,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ para bactérias e leveduras e $25,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ para fungos filamentosos. Após 24 horas, retiraram-se as placas das estufas e os halos de inibição de crescimento foram medidos por meio de paquímetro.

Para as placas de cultura de microorganismo, com discos impregnados por soluções de extratos, em que se observou alguma atividade, o teste foi repetido com

concentrações de extrato a 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml e 300 mg/ml.

3.2.2 Produtos comerciais preparados com nim

Foram avaliados seis produtos comerciais preparados com nim, cinco foram adquiridos no mercado local e um foi adquirido da Alemanha. Os seis produtos foram testados por CCD e por CLAE-UV/DAD para avaliação de AZA.

Para a análise por CCD, as amostras e padrão foram preparadas de forma semelhante como para CLAE-UV/DAD, exceto que a solução final foi preparada em diclorometano para CCD e em acetonitrila para CLAE-UV/DAD. Utilizou-se sistema eluente composto por diclorometano:metanol (99:1) e solução reveladora de anisaldeído/ácido sulfúrico e aquecimento.

O preparo das soluções foi realizado de acordo com a característica física de cada produto. Para os produtos A, B, D e E tomou-se uma alíquota de 1,0 ml e suspendeu-se com 9,0 ml de água. A suspensão foi extraída com uma porção de 20 ml e duas porções de 10 ml de diclorometano. As camadas orgânicas foram coletadas, secas em evaporador rotatório e o resíduo foi reconstituído para balão volumétrico de 10 ml preenchido com diclorometano (CCD) ou acetonitrila (CLAE-UV/DAD). O produto C foi preparado por diluição de 1,0 ml do óleo em balão volumétrico de 10 ml e o volume foi completado com diclorometano (CCD) ou acetonitrila (CLAE-UV/DAD). O produto F (em spray) foi coletado do frasco e filtrado diretamente por membrana de 0,45 µm para injeção no cromatógrafo, sem qualquer diluição.

Para a análise por CLAE-UV/DAD, utilizaram-se dois métodos, um isocrático e um gradiente, conforme descrito para os extratos hidroalcoólicos. O padrão de trabalho de AZA, na concentração 0,4 mg/ml (8,0 µg de AZA por injeção) foi preparado em acetonitrila para comparação.

Para CCD, aplicou-se uma solução de padrão de trabalho de AZA 1,0 mg/ml em diclorometano, na placa, para efeitos comparativos.

3.2.2.1 Teste de susceptibilidade microbiana

A atividade antimicrobiana dos seis produtos comerciais preparados com nim foi avaliada contra os mesmos microorganismos utilizados para a avaliação dos extratos de folhas.

Para o preparo da solução dos produtos A, B, D e E tomou-se uma alíquota de 1,0 ml e suspendeu-se com 9,0 ml de água. A suspensão foi extraída com uma porção de 20 ml e duas porções de 10 ml de diclorometano. As camadas orgânicas foram coletadas, secas em evaporador rotatório e o resíduo foi reconstituído para balão volumétrico preenchido com etanol 50% (V/V) em água, de forma a se obter uma solução a 100 mg/ml a partir do resíduo seco. Os produtos C e F foram preparados pela secagem dos mesmos em evaporador rotatório e diluição para se obter uma solução a 100 mg/ml de resíduo seco em etanol 50% (V/V) em água.

Os microorganismos e placas de cultura foram preparados conforme descrito no item 3.2.1.2.

3.2.3 Avaliação dos métodos de cromatografia líquida de alta eficiência

Os métodos por CLAE-UV/DAD, eluição isocrática e em gradiente, foram comparados através de figuras de mérito de validação. A linearidade, a precisão e a especificidade para ambos os métodos foram avaliadas. A robustez foi testada apenas para o método isocrático.

Para a construção da curva analítica, injetaram-se volumes diferentes da solução padrão de trabalho de AZA padrão (0,4 mg/ml em acetonitrila), que foram eluídos segundo esquema de fase móvel de cada um dos sistemas utilizados. Volumes de 10, 15, 20, 25 e 30 μ l, com as respectivas massas de AZA estimadas, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 e 12,0 μ g por injeção, foram utilizados.

A precisão intra-ensaio e a precisão inter-ensaio foram avaliadas pela injeção em hexaplicata da solução do produto E no mesmo dia e em triplicata em três dias diferentes, respectivamente. Os valores percentuais de desvio padrão relativo à média (DPR) foram calculados.

A seletividade foi avaliada pela determinação da pureza dos picos de AZA nos produtos utilizando análise espectral fornecida pelo detector ultravioleta com arranjo de diodos (UV/DAD). A resolução entre os picos também foi determinada.

A robustez foi determinada pela eluição da solução padrão de trabalho com variação intencional de composição de fase móvel e de temperatura ($\pm 10\%$ e $\pm 5\%$ dos valores estabelecidos para o método, respectivamente).

4 Resultados e discussão

Desde 1995, o Ministério da Saúde no Brasil vem implementando uma série de medidas visando aprimorar os produtos fitoterápicos comercializados no país (Brasil, 1995). No entanto, o mercado de produtos de origem botânica no Brasil permanece muito precário, especialmente nos centros urbanos, onde esses produtos representam a principal fonte de medicamentos de origem vegetal e a atividade de farmacovigilância no país é incipiente, sendo praticamente inexistente para fitoterápicos (BRANDÃO *et al.*, 1998; BRANDÃO *et al.*, 2002). Nesta pesquisa foram analisados, por métodos cromatográficos, extratos hidroalcoólicos preparados com folhas de nim e produtos comerciais preparados com a planta. A atividade antimicrobiana foi também avaliada por meio de testes *in vitro*. O objetivo do projeto é contribuir no desenvolvimento de metodologia analítica para a avaliação da qualidade de produtos preparados com nim.

Há uma grande dificuldade em se trabalhar com produtos naturais devido à existência de grande quantidade de substâncias nas matrizes vegetais, as quais podem ser extremamente complexas. Desse modo, muitas vezes tratamentos prévios trabalhosos ou dispendiosos da amostra são necessários. Por exemplo, uma eluição cromatográfica em gradiente pode ser indispensável, ao invés de uma separação isocrática, que é muito mais simples. Da mesma forma, extrações em fase sólida ao invés de uma extração por partição líquido-líquido podem apresentar-se vantajosas, porém, dispendiosas. Além disso, a aquisição de marcadores biológicos ou padrões nem sempre é possível, devido à indisponibilidade comercial ou preço muito elevado. Na busca do isolamento e purificação da substância de interesse, processos complexos podem ser selecionados para análise. Em 2005,

Silva isolou a AZA por cromatografia em contra-corrente (CCC), obtendo uma substância pura (aproximadamente 96% de pureza). O cromatograma apresentou um pico único com pouco mais de 10 min de tempo de eluição (fase móvel metanol:água (50:50), coluna C8, fluxo 0,8 ml/min, injeção de 100 μ l, detecção λ 214 nm) conforme mostrado na Figura 3 (SILVA, 2005).

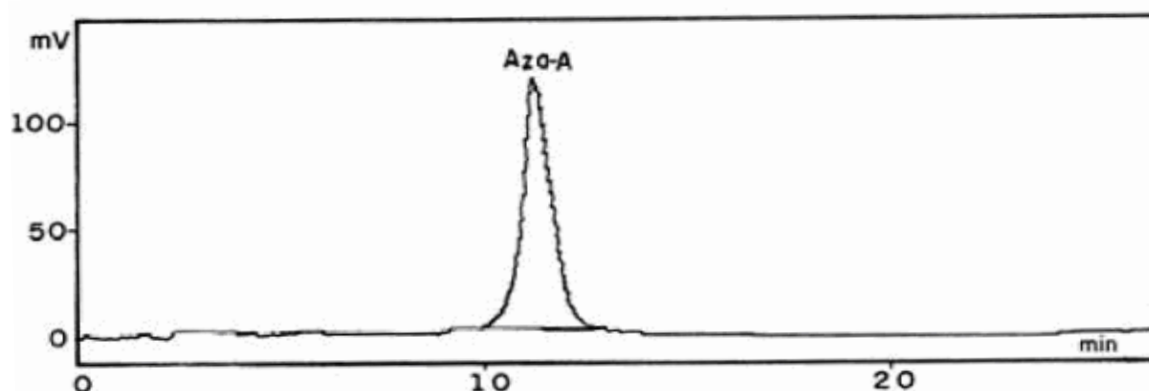


Figura 3. Cromatograma representativo de eluição por CLAE-UV/DAD para o pico de AZA (SILVA, 2005, com permissão).

No caso de padrões de AZA, a substância é disponível comercialmente, mas quantidades muito pequenas (cerca de 5 a 50 mg) são fornecidas com alto custo e nem sempre como substâncias totalmente puras. A azadiractina padrão de trabalho (frasco com 10 mg), adquirida para a realização do presente estudo não dispunha de dados de pureza em seu rótulo. O fornecedor informou que a mesma apresenta uma pureza técnica, sem, contudo, demonstrar a quantidade de AZA presente no pó. Dessa forma, foi possível identificar e apenas estimar a quantidade de AZA nos produtos, como para um método semi-quantitativo.

4.1 Extrato hidroalcoólico (não comercial) de folhas de nim

Os extratos produzidos por percolação estática de folhas trituradas de nim apresentaram diferenças visuais entre si. Observou-se, à medida em que a concentração alcoólica do solvente extrator foi aumentada, que a coloração do extrato ficou mais intensa. Os extratos em etanol a 50% e 60% (V/V) apresentaram cor parda. Os extratos em etanol a 70%, 80% e 90% (V/V) eram verdes, com a intensidade da cor aumentando nesta ordem. A alteração visual observada pode ser devido à maior extração de clorofila com o aumento da concentração alcoólica, já que essa substância é solúvel em etanol e praticamente insolúvel em água (MERCK, 2006).

4.1.1 Análise cromatográfica

4.1.1.1 Cromatografia em camada delgada

Preliminarmente, os extratos hidroalcoólicos de folhas de nim foram aplicados em placa cromatográfica, eluídos com diclorometano:metanol (99:1) e revelados com solução de vanilina 1% em metanol e de ácido sulfúrico 5% em etanol, e aquecimento (resultado não mostrado). Este sistema revelador com vanilina e ácido sulfúrico foi inicialmente avaliado devido a trabalho de Dai e colaboradores (1999), usando vanilina e ácido sulfúrico em uma reação colorimétrica para quantificação de limonóides relacionados à AZA em extratos de nim a partir de diversas partes da planta. Tal sistema revelador, contudo, não foi eficaz para revelar AZA na solução padrão de trabalho (1,0 mg/ml), sendo, então, substituído pela solução reveladora de anisaldeído/ácido sulfúrico.

A partir da aplicação dos extratos hidroalcoólicos de folhas de nim por CCD, utilizando sistema de eluição composto por diclorometano e metanol (99:1) e

solução reveladora de anisaldeído/ácido sulfúrico, e aquecimento não se observou mancha correspondente àquela do padrão de AZA (R_f 0,25). Porém, várias outras substâncias foram reveladas com o sistema. A Figura 4 representa uma placa cromatográfica do extrato hidroalcoólico de folhas de nim em etanol 70% e 80% (V/V) e padrão de trabalho de AZA 1,0 mg/ml (Pa).

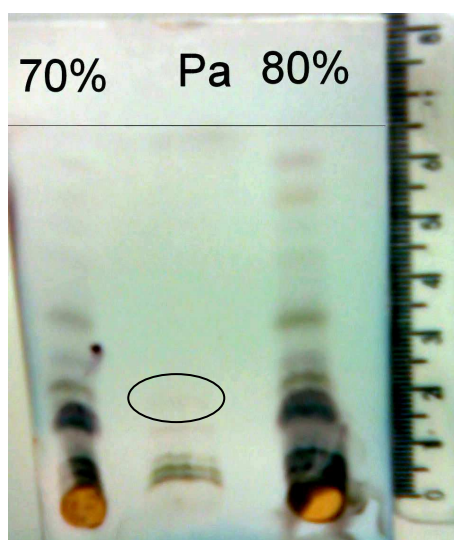


Figura 4. Placa cromatográfica representativa de eluição por CCD para o extrato hidroalcoólico de folhas de nim em etanol 70% (V/V) e 80% (V/V) e mancha de padrão de trabalho de AZA (Pa).

4.1.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Por CLAE-UV/DAD, o perfil cromatográfico da solução padrão de trabalho de AZA é mostrado na Figura 5, para os métodos isocrático (a) e gradiente (b). O perfil espectrofotométrico no ultravioleta (UV/DAD) da AZA é apresentado no quadro inserido na figura. Embora os cromatogramas tenham apresentado muitos picos, observam-se dois picos correspondentes à AZA com o mesmo perfil espectrofotométrico por UV/DAD, em 7,933 min e 8,780 min, no método isocrático e em 17,305 min e 18,872 min, no método gradiente. Para verificação de uma possível divisão dos picos por inadequação de pH da fase móvel foram realizados testes por adição de trietanolamina 1% ou ácido trifluoroacético 1% em água. Contudo, não houve diferença entre os cromatogramas obtidos pela alcalinização ou acidificação das fases móveis, indicando que os picos correspondem a duas substâncias diferentes. Esse fato pode ser devido à existência de diferentes isômeros de AZA, conforme previamente descrito na literatura (MORGAN, JOHNSON, 1997; SHARMA *et al.*, 2003). Os picos que apresentaram perfil de UV/DAD iguais àquele representado na inserção da Figura 5 foram, portanto, considerados como picos de AZA e avaliados separada e conjuntamente, por meio de curva analítica, para fins de quantificação posterior.

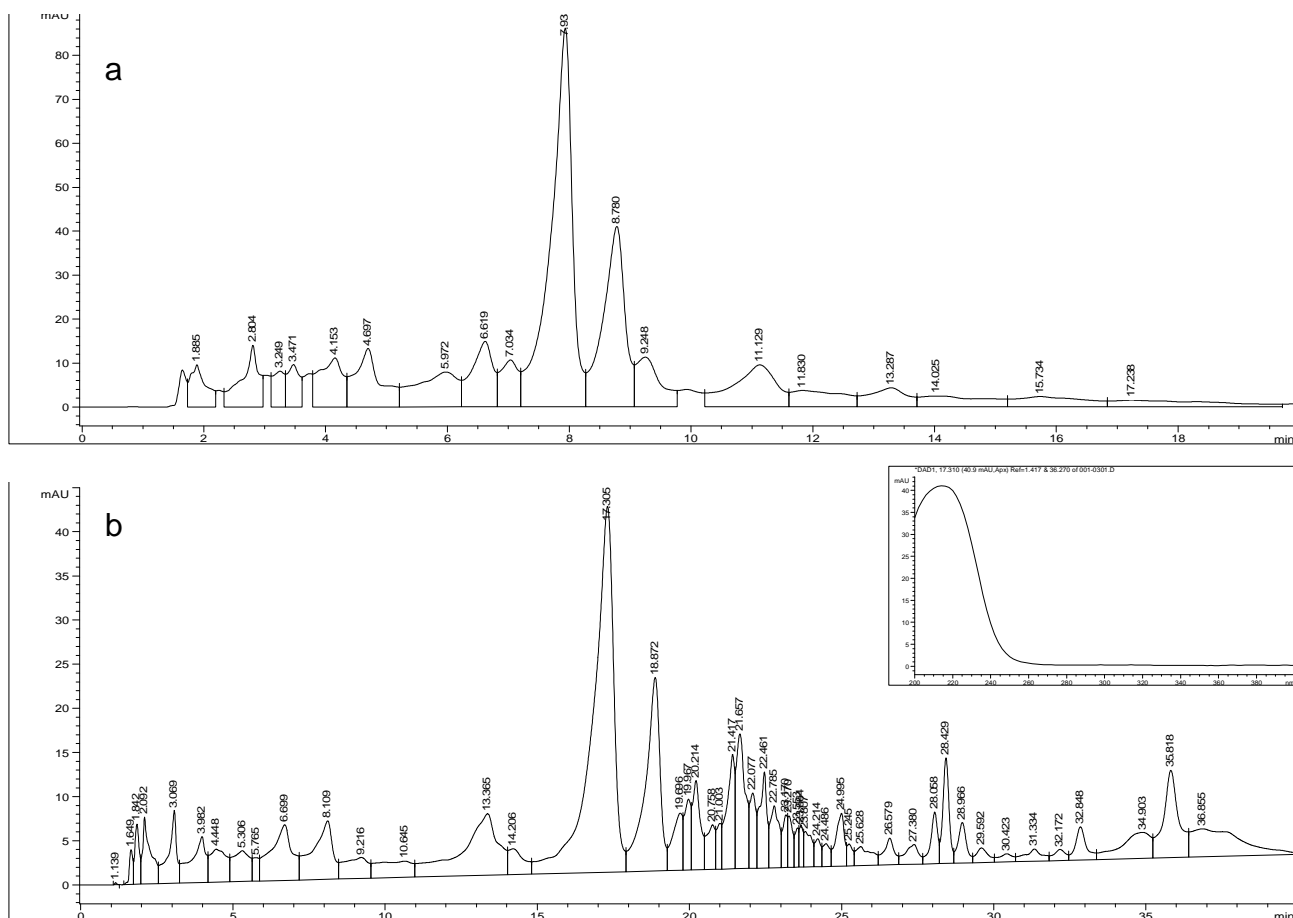


Figura 5. Cromatogramas representativos de eluição por CLAE-UV/DAD para a solução padrão de trabalho de azadiractina (0,4 mg/ml) nos métodos cromatográficos isocrático (a), tempos de eluição 7,933 min e 8,780 min (água:acetonitrila 60:40) e gradiente (b), tempos de eluição 17,305 min e 18,872 min (ver parte experimental para detalhes). Figura inserida: espectro UV/DAD da solução padrão de trabalho de azadiractina.

Com o objetivo de investigar os picos detectados, utilizou-se espectrometria de massas como recurso de identificação do padrão de trabalho. Através da varredura por electrospray positivo (IES), observam-se dois sinais intensos em m/z 738,3 e 680,3 respectivamente, indicando que os compostos podem ter se combinado a íons positivos, possivelmente $[M+NH_4]^+$, azadiractina A (M^+H+17 , 738) e azadiractina B ou H (M^+H+17 , 680), conforme mostrado na Figura 6. A fragmentação desses íons utilizando dissociação induzida por colisão (gradiente 5 a 130 V) resultou em produtos iônicos fortes, como mostrado na Figura 7a,b. A

análise dos espectros obtidos e a comparação com os perfis de fragmentação das azadiractinas A, B e H (Figuras 8-10) foi realizada segundo Sharma e colaboradores (2003). Pode-se inferir que o sinal em m/z 738,3 equivale ao aduto de AZA A e o sinal em 680,3 pode ser atribuído ao aduto de AZA B ou H.

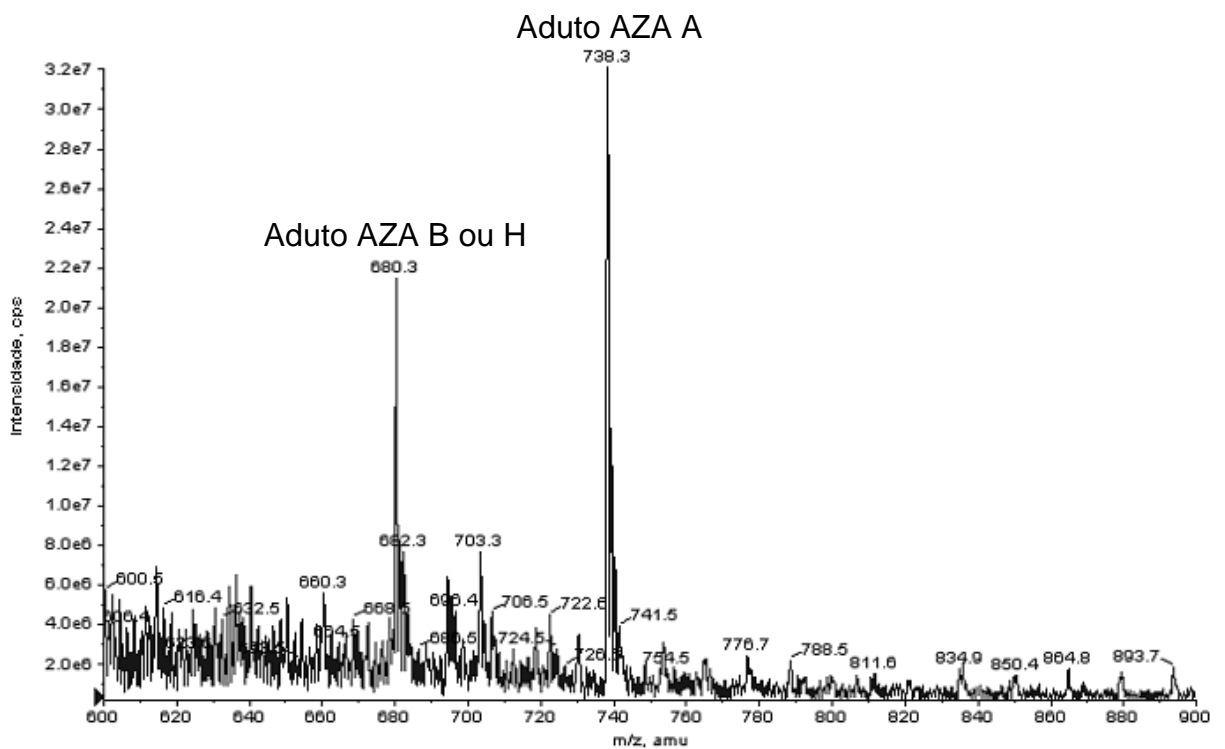


Figura 6. Espectro de IES-EM para solução padrão de trabalho de AZA (0,1 $\mu\text{g/ml}$ em metanol 50% V/V).

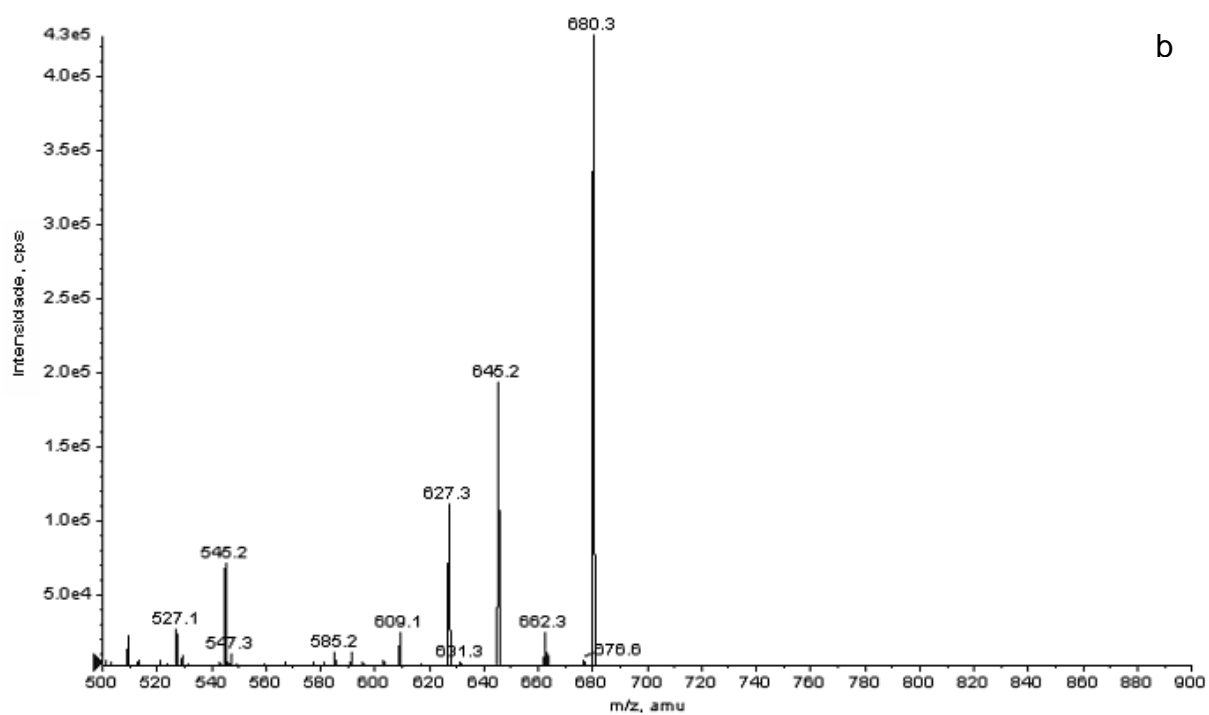
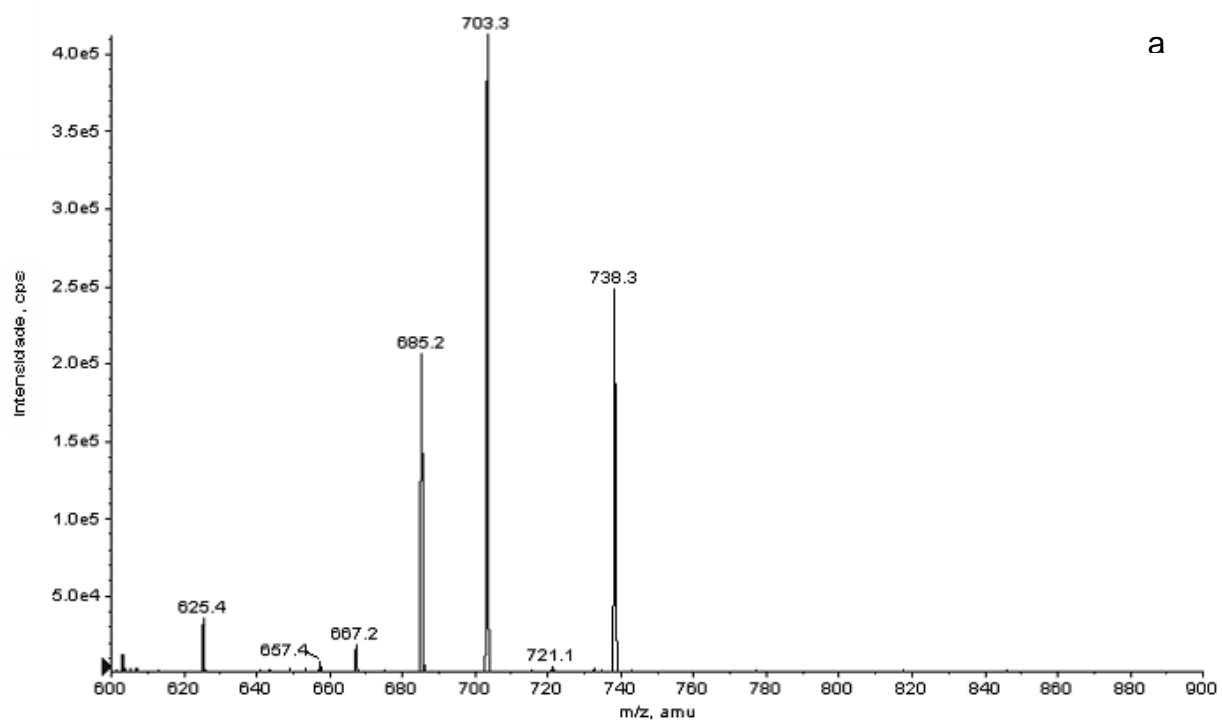


Figura 7. Espectro IES-EM/EM do produto iônico obtido pela dissociação induzida por colisão dos íons em m/z 738,3 (a) e em m/z 680,3 (b) (ver texto para detalhes).

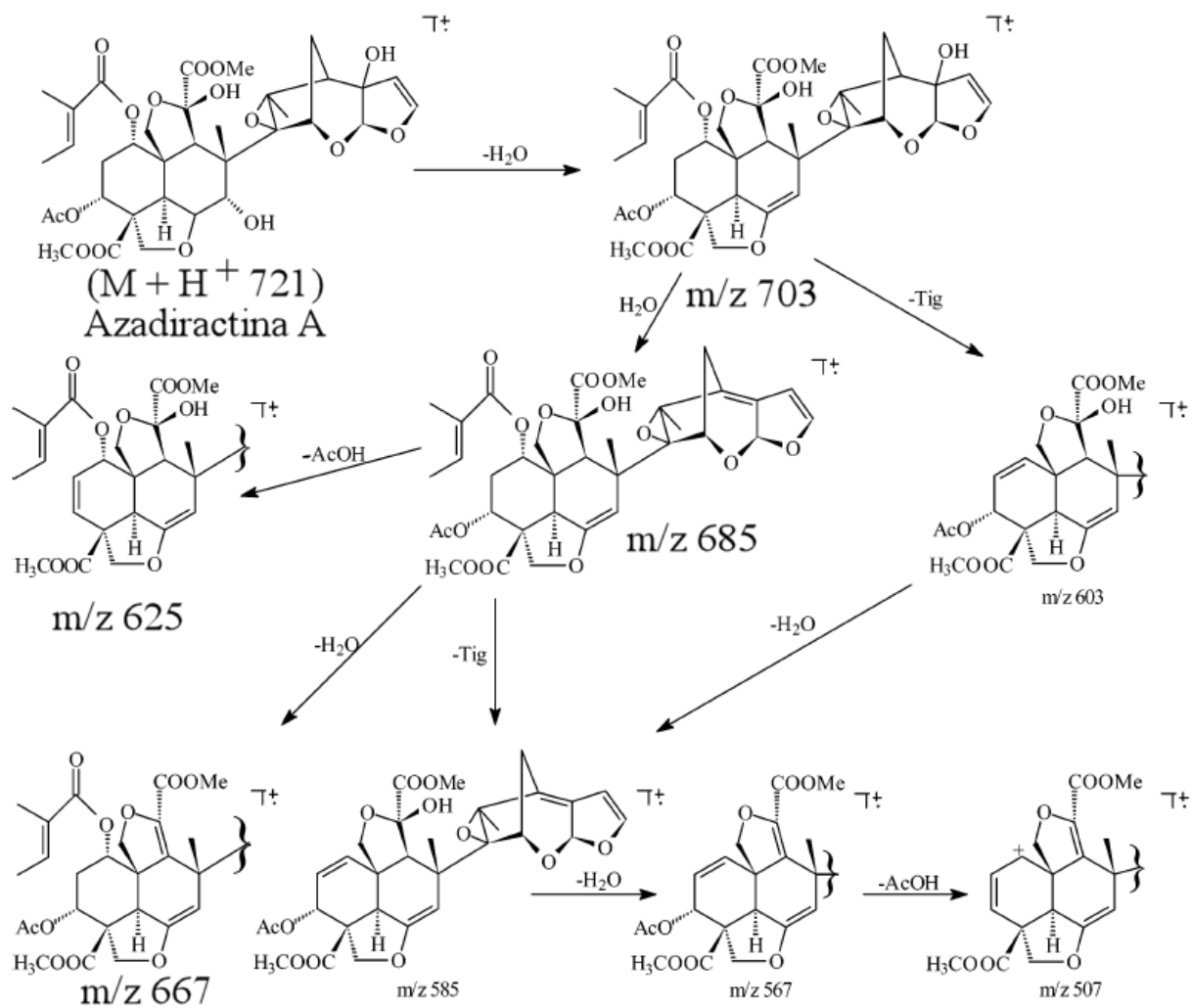


Figura 8. Perfil de fragmentação da AZA A por IES (SHARMA *et al.*, 2003).

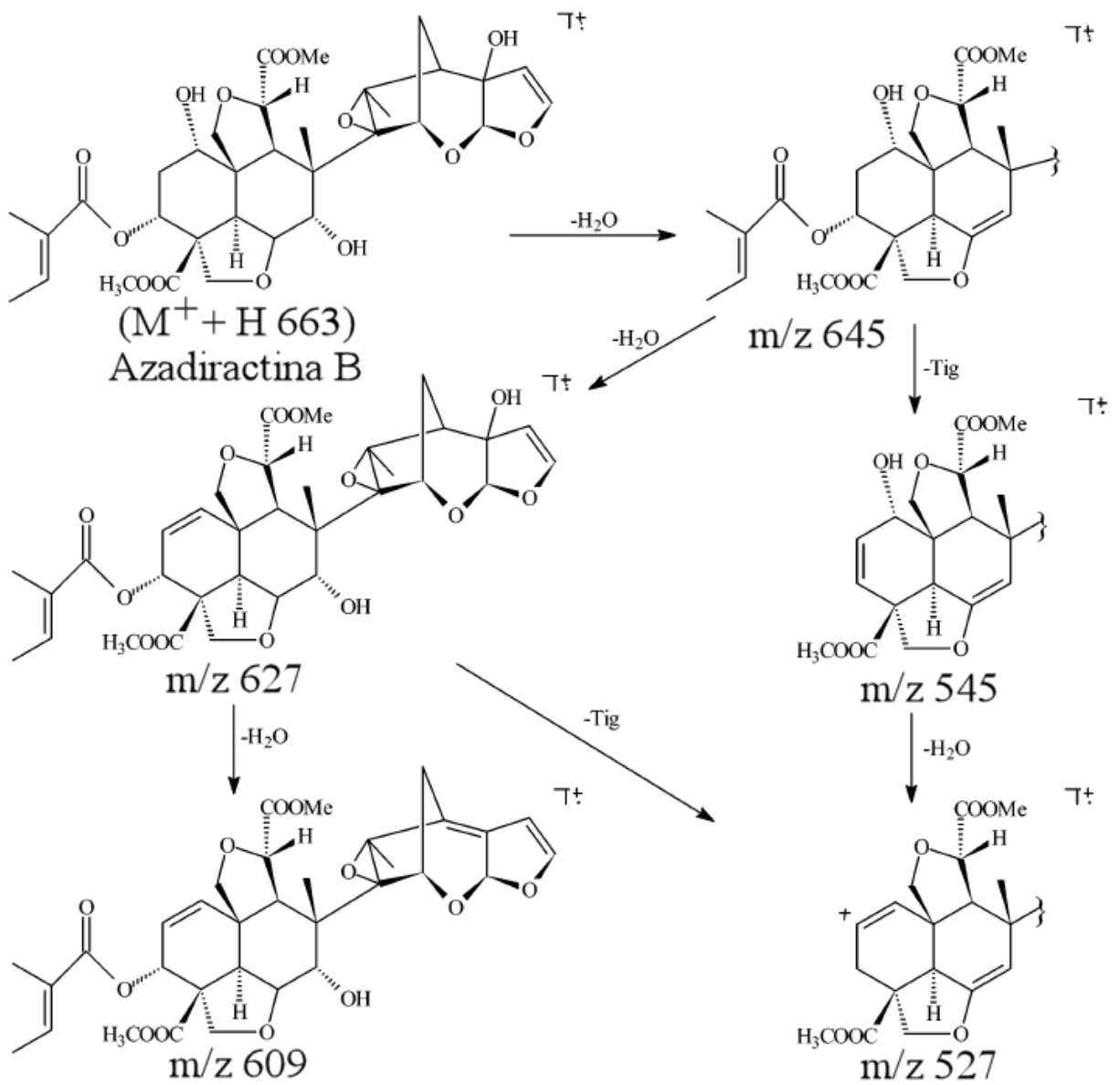


Figura 9. Perfil de fragmentação da AZA B por IES (SHARMA *et al.*, 2003).

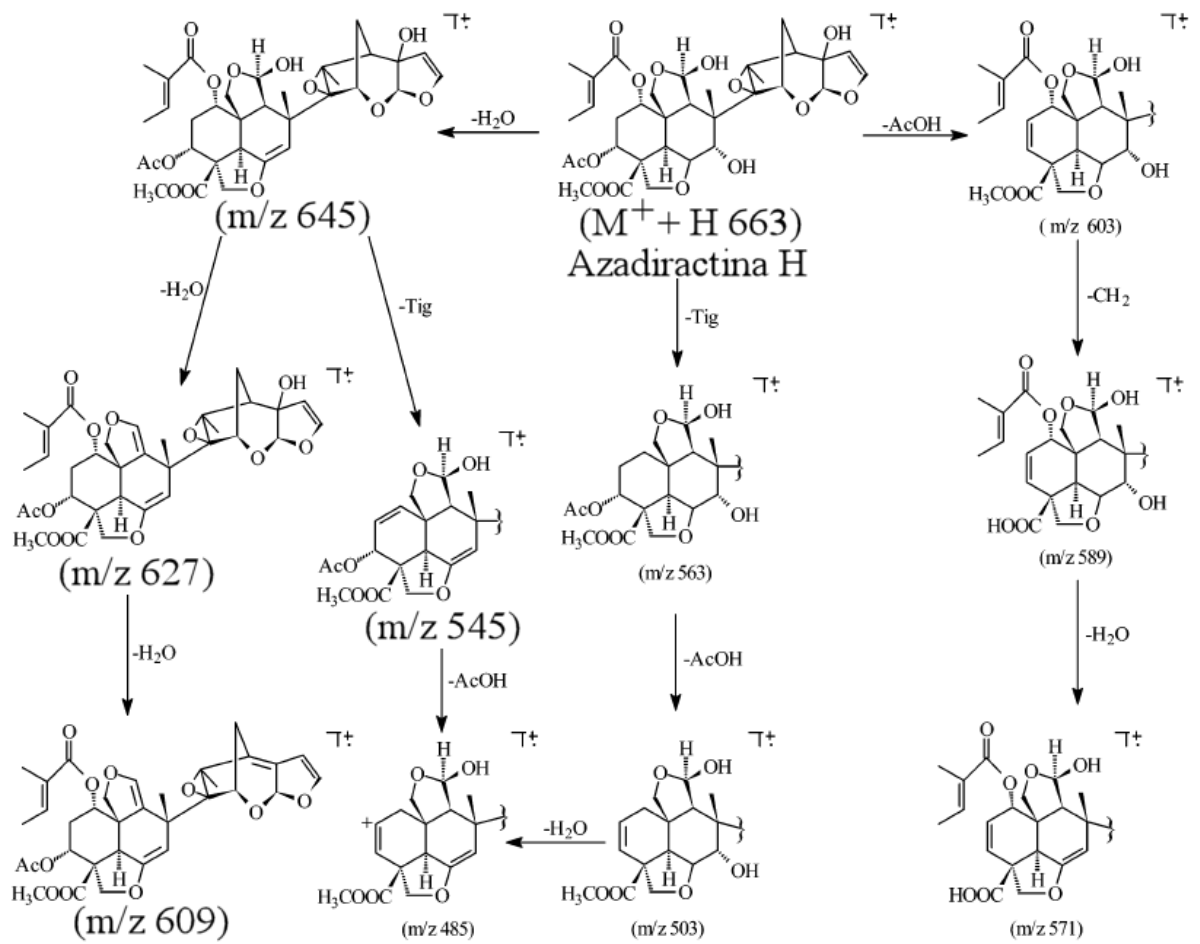


Figura 10. Padrão de fragmentação da AZA H por IES (SHARMA *et al.*, 2003).

Como se pode verificar pelos perfis de fragmentação propostos (SHARMA *et al.*, 2003), não há como atribuir o sinal em m/z 680,3 a um isômero específico de AZA. Os sinais dos produtos iônicos obtidos a partir da dissociação podem corresponder tanto à AZA B quanto à AZA H. Pelas condições do experimento, o perfil apresentado mostra um caminho de fragmentação comum aos dois isômeros, já que observam-se sinais em m/z 680,3, 645,2, 627,3, 609,1 e 545,2.

O cromatograma obtido na análise por CLAE-IES/EM apresentou dois picos em diferentes tempos de retenção 1,70 min e 1,84 min, respectivamente, indicando que o padrão de trabalho é composto por uma mistura, provavelmente AZA A (pico 1) e AZA B ou H (pico 2), conforme mostrado na Figura 11. Como mostrado em seu trabalho, Sharma e pesquisadores (2003) realizaram a separação e identificação de AZA A, B e H, utilizando CLAE-EM. AZA B foi eluída com maior tempo de retenção que AZA A, enquanto AZA H obteve menor tempo de retenção.

De modo análogo, pode-se inferir que os picos do padrão de trabalho obtidos por CLAE-EM em 1,70 e 1,84 min, neste trabalho, correspondem à AZA A e à AZA B, respectivamente. A razão dos tempos de retenção (AZAB/AZA A) obtida nesse método é de 1,08. Os valores obtidos para CLAE-UV/DAD, foram 1,10 para o método isocrático e 1,09 para o método gradiente. Isso indica que os picos obtidos em 7,933 min e 8,780 min no método isocrático e em 17,305 min e 18,872 min no método gradiente, correspondem a AZA A e AZA B, respectivamente.

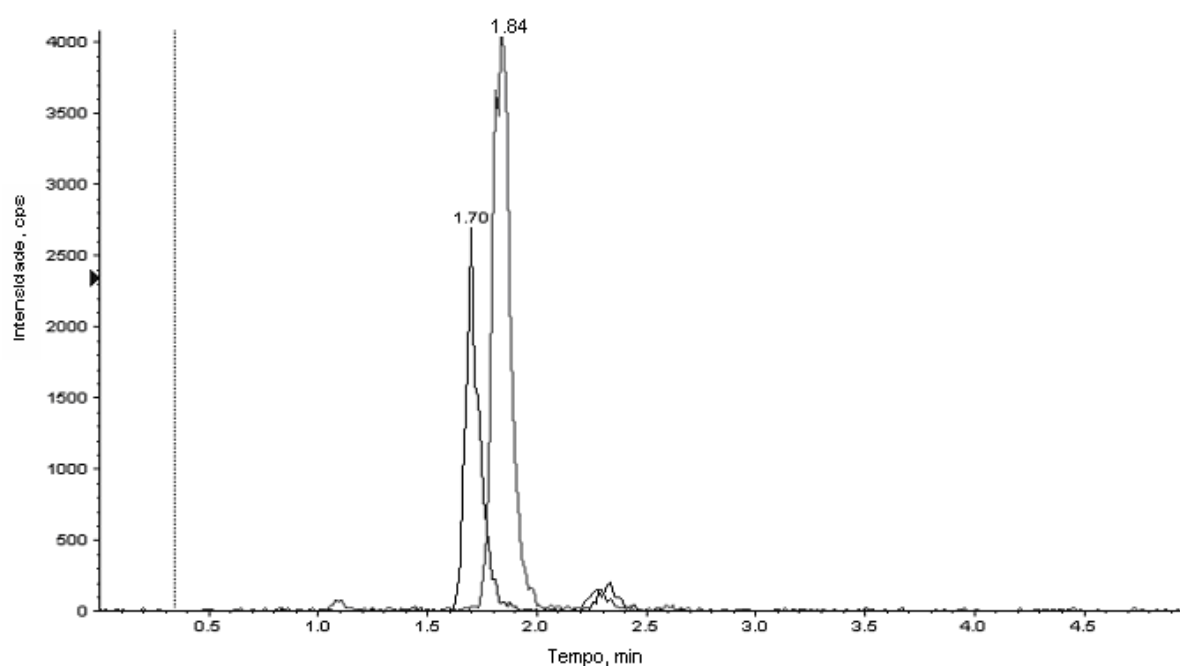


Figura 11. Cromatogramas (CLAE-EM) da solução padrão de trabalho de azadiractina ($0,1 \mu\text{g/ml}$ em metanol 50% V/V) monitorados nas transições [738,3→703,3] (tempo de retenção 1,70 min) e [680,3→645,2] (tempo de retenção 1,84 min), respectivamente (ver texto para detalhes das condições).

Os extratos hidroalcoólicos foram injetados no cromatógrafo utilizando-se os dois métodos CLAE-UV/DAD descritos. O cromatograma representativo para a eluição isocrática dos extratos está representado na Figura 12. Como pode ser observado, não há picos correspondentes às AZAs, nos tempos de retenção a cerca de 7,9 e 8,7 min. Pode-se inferir, portanto, que não há AZA em quantidade detectável por CLAE-UV/DAD nos extratos, indicando a ausência de AZA nos extratos hidroalcoólicos de folhas de nim avaliados.

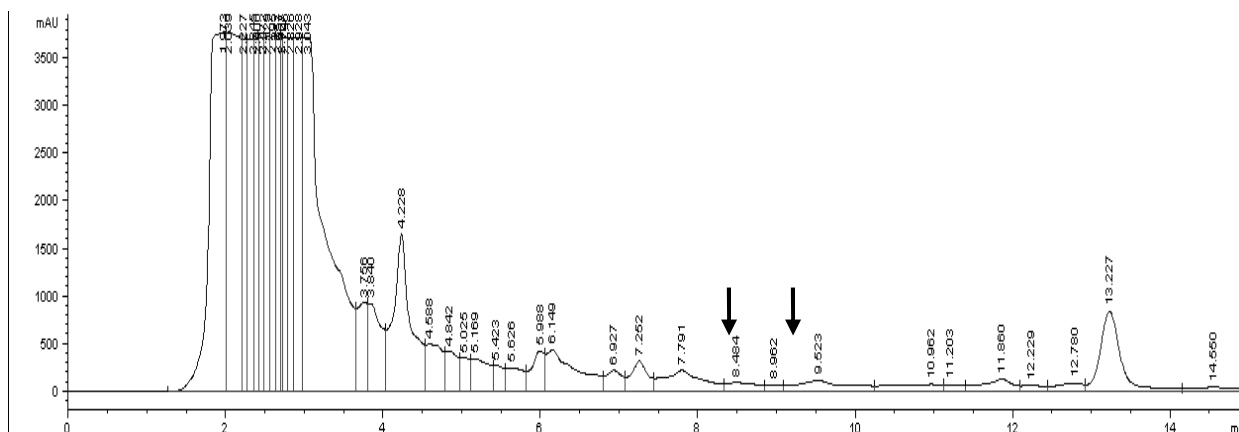


Figura 12. Cromatograma representativo de eluição por CLAE-UV/DAD para o extrato hidroalcoólico de folhas de nim em etanol 70% (V/V), utilizando eluição isocrática.

4.1.2 Teste de susceptibilidade microbiana

Os extratos hidroalcoólicos de folha de nim preparados por meio de diferentes concentrações alcoólicas foram testados contra microorganismos patogênicos para determinação de sua atividade antimicrobiana. Os discos impregnados com controle positivo apresentaram halos de inibição adequados para cada microorganismo. Para cloranfenicol (1,0 mg/ml) verificaram-se halos médios de inibição de $29,5 \pm 1,8$ contra *B. subtilis*, $31,8 \pm 0,3$ contra *M. luteus*, $26,0 \pm 0,8$ contra *S. aureus*, $19,5 \pm 0,3$ contra *E. coli* e $19,3 \pm 0,3$ contra *S. thiphymurium*. Gentamicina (1,0 mg/ml) apresentou halo médio de inibição de $10,0 \pm 0,1$ contra *P. aeruginosa*. Para anfotericina B (2,0 mg/ml) observaram-se halos médios de inibição de $12,7 \pm 0,3$ contra *S. cerevisiae*, $28,3 \pm 0,5$ contra *C. albicans* e $24,0 \pm 0,8$ contra *C. tropicalis*. Não se observou halo de inibição nos discos impregnados com o branco. Os extratos hidroalcoólicos a 50%, 60% e 90% (V/V) de etanol não apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-negativo, Gram-positivo, leveduras e fungo filamentosos, na concentração testada (100 mg/ml). Apenas os

extratos obtidos com etanol a 70% e 80% (V/V) apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*. No entanto, verificou-se apenas uma inibição local, sem possibilidade de medir o diâmetro do halo de inibição precisamente. A fim de verificar a relação dose-dependência da atividade, os extratos ativos foram avaliados em concentrações crescentes contra *S. aureus*. Verificou-se, ainda, uma pequena atividade, comprovada pela medida dos halos de inibição local, como apresentado na Tabela 2. Conforme mostrado na Tabela 3, verifica-se que a diferença entre os halos de inibição medidos (n=3) não foi estatisticamente significativa (teste de Tukey, $q_{0,05;3;7}$) e, portanto, não há relação entre as doses aplicadas e a atividade antimicrobiana dos extratos.

Apesar da atividade antimicrobiana de extrato de folhas de nim sobre diversos microorganismos ter sido descrita por vários autores (ALMAD, BEG, 2001; CHOPRA *et al.*, 1952; SUBAPIRYA, NAGINI, 2005), uma inibição pequena foi verificada com os extratos hidroalcoólicos testados nesse trabalho, produzidos a partir de plantas cultivadas em Minas Gerais.

A ausência de AZA, principal componente do nim, verificada por CCD e CLAE-UV/DAD, pode justificar a baixa atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de folhas de nim. Sabe-se que a adaptação ao terreno e ao tipo de solo e diferentes nutrientes fornecidos são grandes responsáveis por essa alteração (SIDHU *et al.*, 2003) e que há grande diferença na composição dos extratos de plantas cultivadas em locais diferentes daquele de origem. Uma possível causa para a ausência dessas substâncias pode ser o local da plantação, cujas árvores podem não ter se adaptado bem ao clima e ao terreno mineiros.

Tabela 2. Resultados (n=3) da relação dose-dependência da atividade contra *S. aureus* para os extratos hidroalcoólicos de folhas de nim a 70% e 80% (V/V) de etanol em concentrações crescentes (100 a 300 mg/ml), por meio de medida dos halos de inibição, utilizando cloranfenicol como controle positivo.

Concentração		Halo de inibição			Halo médio	
(mg/ml)		(mm) ± DP ^a			(mm) ± DP ^a	
Controle positivo (cloranfenicol)	1,0		23.35±0.3	24.20±0.3	24.00±0.1	23.80 ^b ±0.4
			22.65±0.8	24.20±0.3	24.40±0.4	
Extratos hidroalcoólicos de folhas de nim	100	70%	7.00±0.1	6.95±0.1	6.85±0.1	6.93 ^c ±0.1
		80%	6.60±0.0	6.50±0.1	6.70±0.1	6.60±0.1
	150	70%	6.70±0.2	7.35±0.2	7.05±0.1	7.03±0.2
		80%	7.10±0.2	6.60±0.2	6.75±0.1	6.82±0.1
	200	70%	7.30±0.1	7.50±0.1	7.55±0.1	7.45±0.1
		80%	6.10±0.1	6.35±0.1	6.20±0.1	6.22±0.1
	250	70%	7.20±0.3	7.45±0.1	8.10±0.4	7.58±0.2
		80%	6.65±0.2	7.15±0.3	7.10±0.1	6.97±0.2
	300	70%	7.50±0.3	7.25±0.1	7.20±0.1	7.32±0.1
		80%	6.45±0.4	8.00±0.5	6.35±0.4	6.93±0.5

a: desvio padrão, b: n = 6 para padrões, c: n = 3 para extratos.

Tabela 3. Resultados estatísticos para o teste de Tukey ($q_{0,05; 3; 7}$)^a, para verificação da relação dose-dependência dos extratos hidroalcoólicos em etanol a 70% e 80% (V/V), em concentrações crescentes (100 a 300 mg/ml) contra *S. aureus*.

Extrato hidroalcoólico 70% ^a						
Concentração (mg/ml)	Média	250	200	300	150	Discriminação
250	7,58	-	-	-	-	a
200	7,45	0,13	-	-	-	a
300	7,32	0,27	0,13	-	-	a
150	7,03	0,55	0,42	0,28	-	a
100	6,93	0,65	0,52	0,38	0,10	a
Extrato hidroalcoólico 80% ^b						
Concentração (mg/ml)	Média	250	200	300	150	Discriminação
250	6,97	-	-	-	-	a
300	6,94	0,03	-	-	-	a
150	6,82	0,15	0,12	-	-	a
100	6,60	0,37	0,33	0,22	-	a
200	6,22	0,75	0,72	0,60	0,38	a

a: q crítico ($0,05;3;7$) = 4,17, amplitude do teste a 5% de probabilidade, obtido pela tabela de Tukey, considerando 3 diferentes tratamentos (réplicas) e 7 graus de liberdade; b: diferença mínima significativa (DMS) = 1,39; c: DMS = 11,08.

4.2 Produtos comerciais preparados com nim

Uma pesquisa telefônica realizada em lojas especializadas em produtos agropecuários em Belo Horizonte mostrou que de um total de 50 lojas consultadas, apenas cinco tinham produtos preparados com nim disponíveis para compra. Isso revela que, embora o nim seja uma planta tão extensamente estudada, com atividades comprovadas pelo uso tradicional, ela ainda é uma planta muito desconhecida pelos mineiros. As lojas consultadas a respeito da venda de produtos preparados com nim, disponibilizavam os mesmos produtos dos mesmos

fabricantes, o que não permitiu uma aquisição mais diversificada de produtos a serem testados. Assim, foram avaliados seis produtos comerciais preparados com nim, cinco (A,B, C, D, E) foram adquiridos no comércio local de Belo Horizonte e um deles (F) foi adquirido da Alemanha.

É importante observar que nenhum dos produtos comerciais adquiridos trazia a concentração de princípio ativo nem a composição detalhada no rótulo. Os produtos C e D sequer traziam o endereço do fabricante, nem o nome do responsável técnico. Na loja em que foi obtido, o produto D era adquirido pelo comerciante em frascos de 1000 ml e comercializado em frascos menores (cerca de 100 ml), diferentes daquele em que foi originalmente acondicionado. Os frascos vendidos estavam sem rótulo e as instruções de uso eram passadas apenas verbalmente. Isso mostra o quanto a produção e a distribuição de produtos agroveterinários, no Brasil, ainda são fracamente regulamentadas. Além disso, pouco das normas estabelecidas por regulamentações oficiais é seguido, pois as informações dos rótulos e instruções de uso dos produtos ao consumidor estão freqüentemente incompletas.

As análises dos produtos comerciais foram realizadas por CCD e por CLAE-UV/DAD. Pela análise do perfil por CCD (Figura 13), pode-se observar que o padrão de trabalho de AZA (Pa) apresenta várias manchas. Os perfis de eluição das manchas dos produtos e do padrão foram comparados por meio do fator de retenção (R_f). A mancha com R_f 0,25 foi considerada equivalente a AZA, por ser a de maior intensidade para o padrão de trabalho. Alguns dos produtos (A – D) não apresentaram manchas correspondentes àquela com R_f 0,25. Apenas os produtos E e F apresentaram manchas com esse mesmo R_f . Além dessas, várias outras manchas estavam presentes nos perfis de eluição dos produtos. As manchas com

Rf 0,41 e 0,59 estão presentes nos perfis de eluição de quase todos os produtos, exceto para o produto D. Há, porém, várias outras substâncias que se revelam com o sistema. Vários autores relatam uma ação sinérgica de substâncias presentes no nim (SUBAPIRYA, NAGINI, 2005; IYER, WILLIAEMON, 1991; ISMAN, 1997; MARTINEZ, 2002; SIDDIQUI *et al.*, 2003; SILVA, 2005).

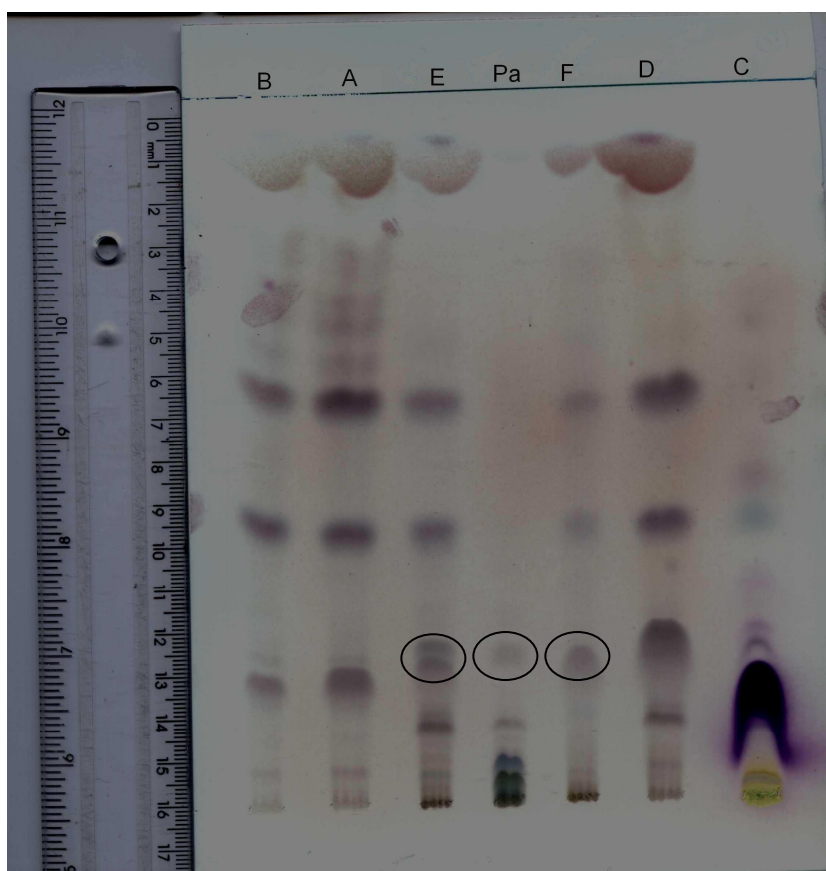


Figura 13. Placa cromatográfica por CCD representativa para eluição de produtos comerciais preparados com nim (A-F) e do padrão de trabalho de AZA (Pa).

Tanto pelo método isocrático como pelo método gradiente em CLAE-UV/DAD, os produtos A-D não apresentaram picos correspondentes àquele de AZA, apenas os produtos E e F apresentaram esses picos. Utilizaram-se os sinais espectrais de detecção UV/DAD para identificar os picos. Os cromatogramas representativos da

eluição dos produtos E e F pelos métodos isocrático e gradiente estão representados nas Figuras 14 e 15, respectivamente. A análise por CLAE-UV/DAD permitiu que se confirmasse a ausência de AZA na maioria dos produtos testados, exceto para E e F.

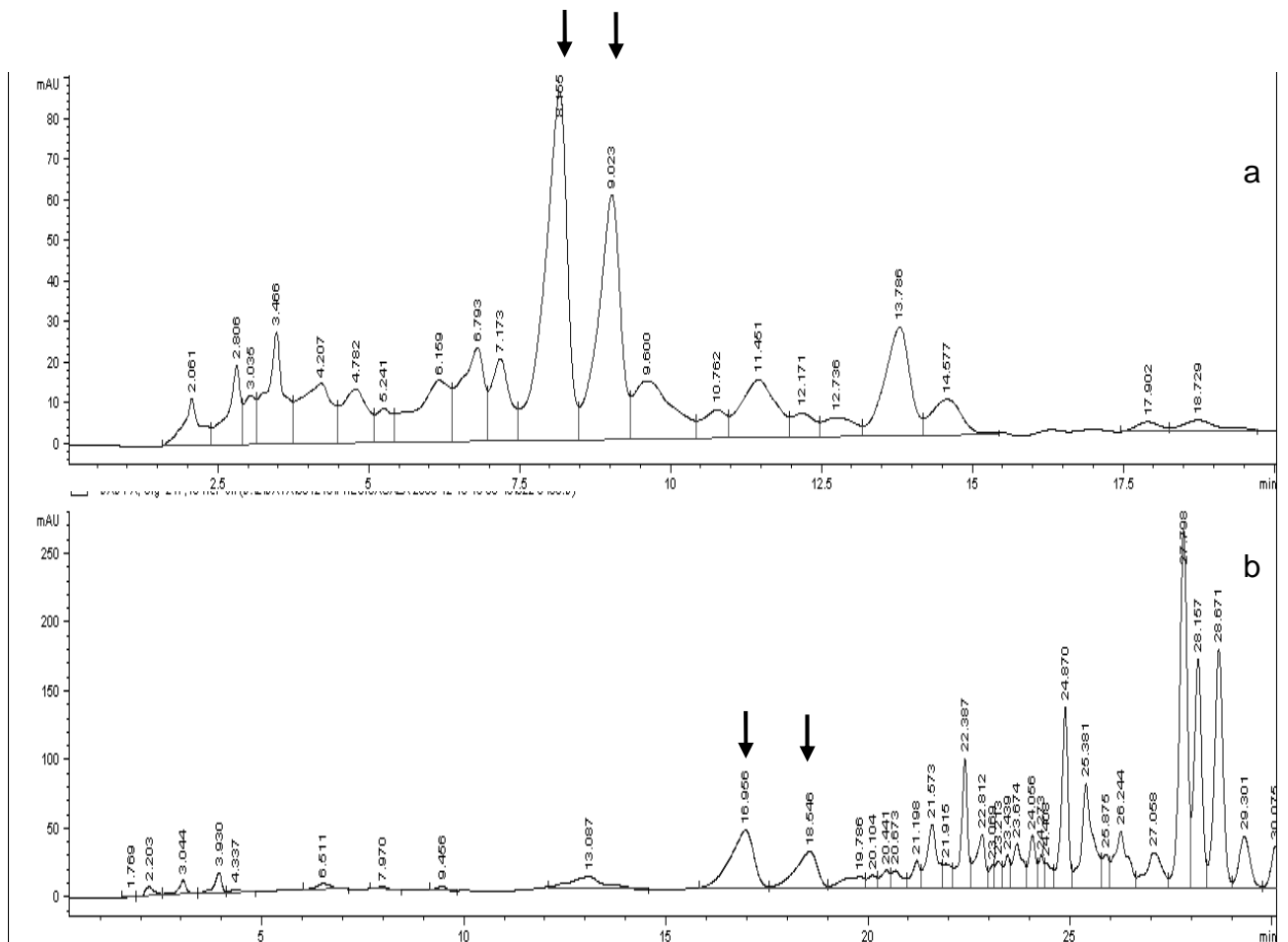


Figura 14. Cromatogramas representativos de eluições por CLAE-UV/DAD para o produto E pelo método isocrático (a), picos de AZA em 8,155 min e 9,023 min e gradiente (b), picos de AZA em 16,956 min e 18,546 min. Ver texto para condições.

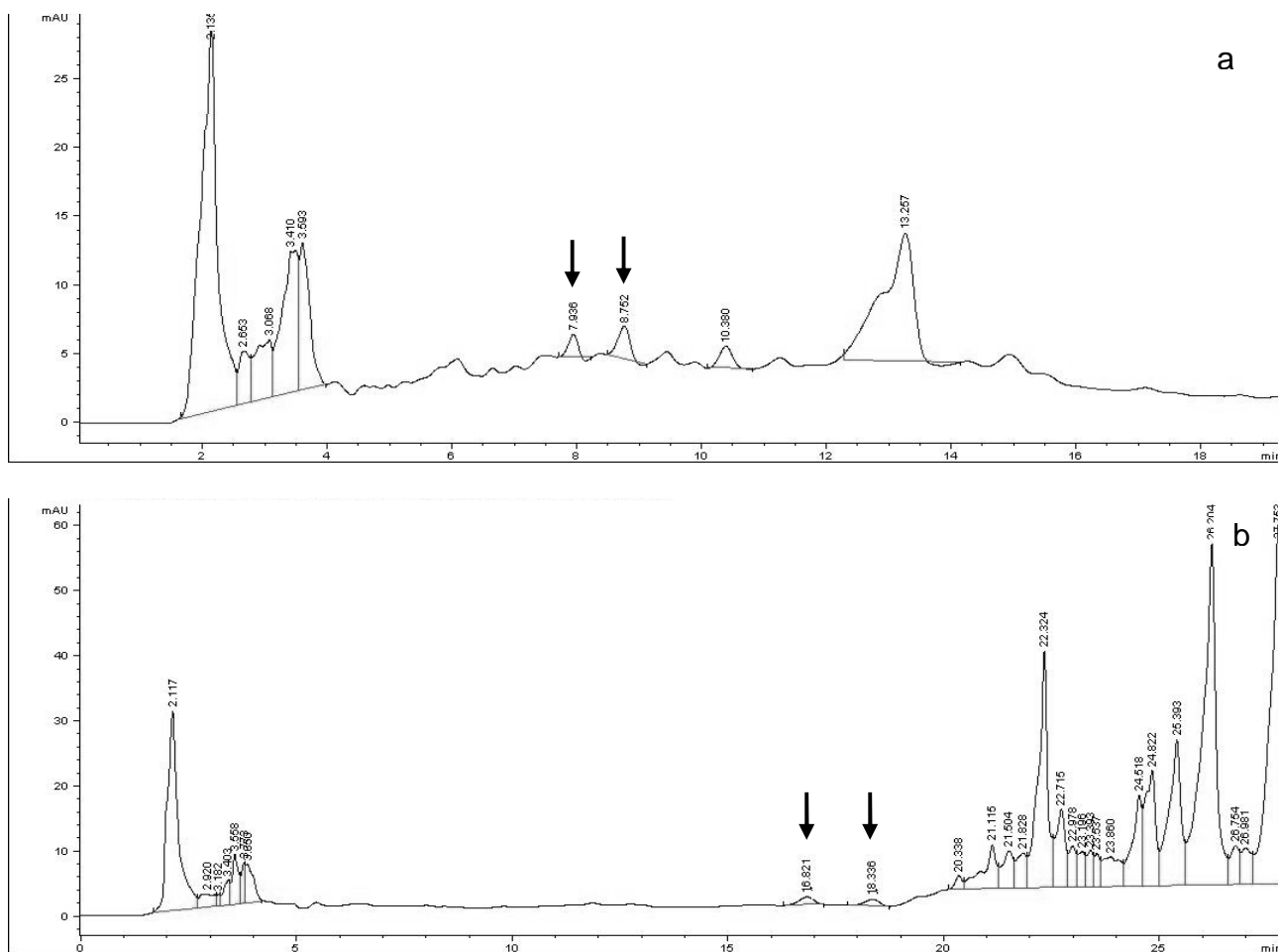


Figura 15. Cromatogramas representativos de eluições por CLAE-UV/DAD para o produto F pelo método isocrático (a), picos de AZA em 7,936 min e 8,752 min e gradiente (b), picos de AZA em 16,821 min e 18,336 min. Ver texto para condições.

Verifica-se que, pelo método isocrático, o tempo de retenção correspondente à AZA é menor que pelo método gradiente, contudo, a separação entre os picos é um pouco melhor no método por gradiente. Apesar de este último proporcionar melhor separação da AZA, o método por gradiente torna-se menos viável para análises de rotina de produtos preparados com nim, devido ao longo tempo de corrida (55 min). Desta forma, o método isocrático, que leva um tempo total de eluição de 20 min, é um método mais rápido e, portanto, vantajoso. A avaliação estatística dos métodos foi realizada utilizando algumas figuras de mérito.

4.2.1 Teste de susceptibilidade microbiana

Os produtos comerciais preparados com nim foram testados contra microorganismos patogênicos para determinação de sua atividade antimicrobiana. Não se observou halo de inibição nos discos impregnados com o branco. Os produtos A, B, D, E e F não apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-negativo, Gram-positivo, leveduras e fungo filamentosos, na concentração testada (100 mg/ml). Os discos impregnados com controle positivo apresentaram halos de inibição adequados para cada microorganismo e apenas o produto C apresentou atividade contra os microorganismos testados, como mostrado na Tabela 4.

O produto C é um preparado de nim que possui forte odor de pinho. Assim, a atividade antimicrobiana observada é provavelmente devido a excipientes usados na formulação.

Os produtos E e F, que apresentaram picos e manchas de AZA por CLAE-UV/DAD e CCD, não demonstraram contudo, atividade antimicrobiana contra os microorganismos testados, o que pode indicar que apresentam AZA em quantidade inferior àquela necessária para a inibição do crescimento desses microorganismos.

Tabela 4. Resultados da atividade do produto C (100 mg/ml em etanol 50% V/V) contra bactérias Gram-positivo, Gram-negativo, leveduras e fungo, por meio de medição dos halos de inibição.

Microorganismo	Halo de inibição±DP ^a	
	(mm)	
	Padrão	Produto C
<i>Bacillus subtilis</i>	22,57±0,61	5,90±0,36
<i>Micrococcus luteus</i>	27,30±1,26	8,63±0,79
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13,23±0,13	8,46±1,35
<i>Escherichia coli</i>	15,07±0,12	11,65±1,31
<i>Salmonella thiphymurium</i>	15,79±0,78	10,30±0,74
<i>Candida albicans</i>	12,75±0,64	10,82±1,46
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	17,26±0,15	10,28±0,57
<i>Candida tropicalis</i>	11,25±0,48	7,21±0,17
<i>Staphylococcus aureus</i>	19,65±0,15	- ^b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,46±0,64	-

a: desvio padrão, b: não se observou halo de inibição.

4.3 Avaliação dos métodos cromatográficos por CLAE-UV/DAD

Com o objetivo de se verificar a confiabilidade, a eficácia e a praticidade dos métodos para análise dos produtos preparados com nim, realizaram-se alguns testes estatísticos, comparando-se parâmetros de validação previamente definidos para cada método. Testaram-se a linearidade, a especificidade e a precisão para os dois métodos por CLAE-UV/DAD e a robustez foi testada apenas para o método isocrático.

Para a comparação da linearidade, diferentes volumes de solução padrão de trabalho de AZA (0,4 mg/ml) injetados foram avaliados. Traçaram-se as curvas analíticas de quantidade de AZA (mg) versus área dos picos. A linearidade foi avaliada para cada um dos picos de AZA e para a soma dos dois picos, conforme mostrado na Figura 16, para os dois métodos cromatográficos.

As áreas dos picos obtidas pela injeção de volumes crescentes de solução padrão de trabalho de AZA, para determinação da curva analítica estão representadas nas Tabelas 5 e 6, para os métodos isocrático e gradiente, respectivamente.

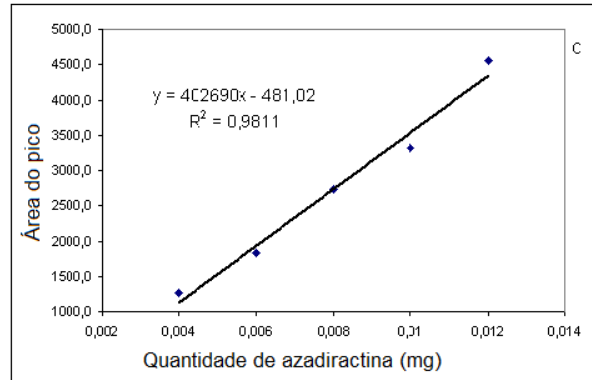
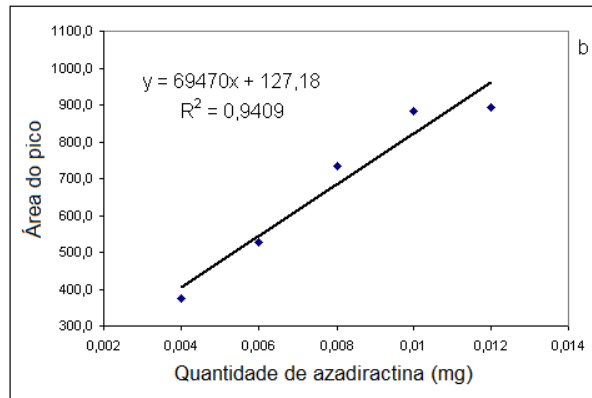
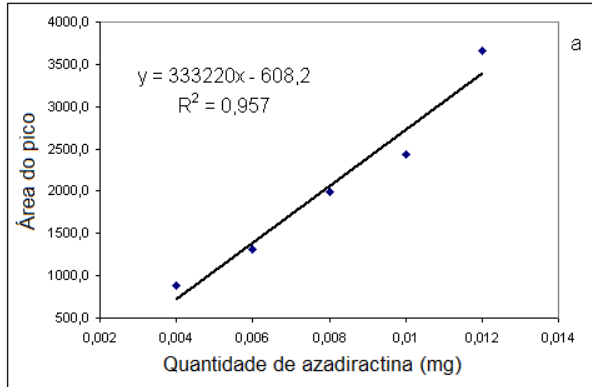
Tabela 5. Resultados da curva analítica obtidos a partir de injeções de diferentes volumes de solução padrão de trabalho (AZA, 0,4 mg/ml, CLAE-UV/DAD, isocrático).

Massa de AZA (mg)	Pico de AZA	Área do pico	Média das áreas
0,004	AZA A	1029,0	1005,1
		993,8	
		992,5	
	AZA B	464,6	447,5
		438,2	
		439,8	
AZA total	1493,6	1452,6	
	1432,0		
	1432,3		
0,006	AZA A	1532,5	1551,2
		1574,1	
		1547,1	
	AZA B	722,0	738,0
		754,6	
		737,5	
AZA total	2254,5	2289,3	
	2328,7		
	2284,6		
0,008	AZA A	2092,6	2096,3
		2117,0	
		2079,4	
	AZA B	1010,4	1011,6
		1025,0	
		999,5	
AZA total	3103,0	3108,0	
	3142,0		
	3078,9		
0,010	AZA A	2573,0	2562,9
		2559,2	
		2556,4	
	AZA B	1235,8	1228,5
		1226,3	
		1223,5	
AZA total	3808,8	3791,4	
	3785,5		
	3779,9		
0,012	AZA A	3069,5	3081,4
		3058,3	
		3116,5	
	AZA B	1441,3	1444,1
		1417,7	
		1473,2	
AZA total	4510,8	4525,5	
	4476,0		
	4589,7		

Tabela 6. Resultados da curva analítica obtidos a partir de injeções de diferentes volumes de solução padrão de trabalho (AZA, 0,4 mg/ml, CLAE-UV/DAD, gradiente).

Massa de AZA (mg)	Pico de AZA	Área do pico	Média das áreas
0,004	AZA A	890,9	896,7
		897,8	
		901,5	
	AZA B	375,7	375,5
		378,0	
		372,8	
AZA total	1266,6	1272,2	
	1275,8		
	1274,3		
0,006	AZA A	1309,1	1350,7
		1288,4	
		1454,7	
	AZA B	528,2	532,8
		499,6	
		570,7	
AZA total	1837,3	1883,6	
	1788,0		
	2025,4		
0,008	AZA A	1995,6	1946,4
		1901,7	
		1941,9	
	AZA B	734,8	743,2
		695,1	
		799,8	
AZA total	2730,4	2689,6	
	2596,8		
	2741,7		
0,010	AZA A	2429,1	2376,8
		2283,5	
		2417,7	
	AZA B	883,0	864,8
		824,2	
		887,1	
AZA total	3312,1	3241,5	
	3107,7		
	3304,8		
0,012	AZA A	3663,1	3348,5
		3372,0	
		3010,4	
	AZA B	893,0	922,2
		1011,2	
		862,5	
AZA total	4556,1	4270,7	
	4383,2		
	3872,9		

G



I

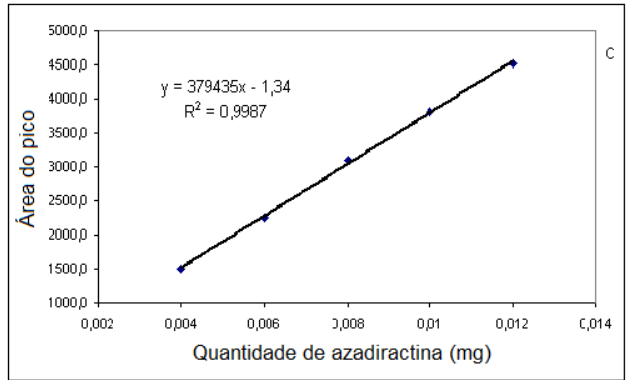
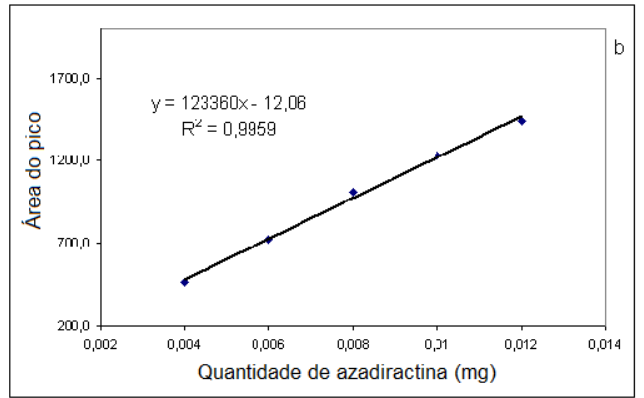
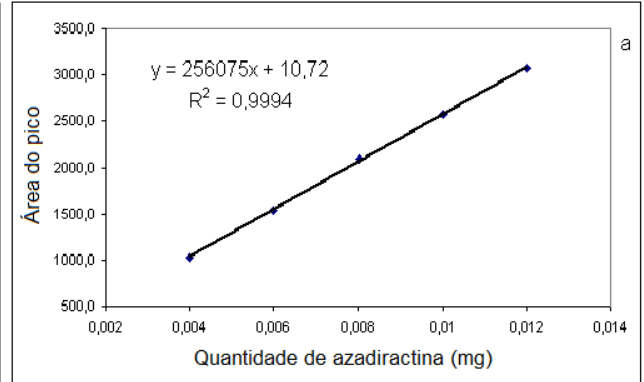


Figura 16. Curvas analíticas obtidas para AZA pelo método cromatográfico em gradiente (G) em relação às áreas dos picos em 17,305 min (a), em 18,872 min (b) e à soma das áreas dos picos (c) e pelo método isocrático (I) em relação às áreas dos picos em 7,993 min (a), em 8,780 min (b) e à soma das áreas dos picos (c).

Os dados obtidos a partir das curvas analíticas pelos métodos isocrático e gradiente estão representados na Tabela 7. Os coeficientes de correlação médios foram maiores para o método isocrático ($r > 0,990$) que para o método gradiente ($r > 0,978$). O DPR da regressão foi menor pelo método isocrático em relação à área de AZA A, B e total (4,580% pelo método gradiente e 1,136% pelo método isocrático, para AZA A; 5,421% pelo método gradiente e 1,847% pelo método isocrático em relação ao pico de AZA B e 4,386% pelo método gradiente e 1,358%, pelo método isocrático, em relação à área total dos dois picos), sugerindo uma maior precisão. Ambos os métodos foram precisos, mostrando valores de DPR intra-ensaio menor que 2,0% e inter-ensaio menor que 3,0%, como mostrado na Tabela 8. De acordo com a análise espectral por UV/DAD, os picos de AZA padrão de trabalho apresentaram pureza dentro do limite esperado para a confirmação do índice de semelhança. Os valores foram superiores a 999,66 (99,97% de pureza), para o método gradiente e superiores a 994,98 (99,50% de pureza) para o método isocrático, devido à melhor separação pelo gradiente. Estes valores apontam para a individualidade dos picos, ou seja, os picos não correspondem a uma mistura de substâncias. A resolução dos picos foi avaliada tanto para o método isocrático, quanto para o gradiente. A resolução entre os picos no método gradiente foi de 1,395 e no método isocrático, 1,718. Esses dados comprovam a eficácia dos métodos, já que ambos separaram bem os picos de AZA, com fatores de resolução adequados ($R > 1,2$) e valores de pureza de picos acima de 99%. O método isocrático foi considerado robusto, pois os parâmetros de precisão, avaliados pelo desvio padrão relativo das áreas dos picos, não se alteraram de forma considerável ao variar, intencionalmente, a composição da fase móvel em 5% da condição

estabelecida ou a temperatura da coluna em 10% daquela estabelecida (Tabela 9). As análises pelo método gradiente não foram continuadas, devido aos resultados menos favoráveis obtidos em relação ao método isocrático. Portanto, a quantidade de AZA para os produtos comerciais foi estimada apenas pelo método isocrático.

Tabela 7. Resultados obtidos a partir das curvas analíticas de AZA pelos métodos gradiente e isocrático em CLAE-UV/DAD nos produtos comerciais preparados com nim (ver parte experimental para condições).

Método	Pico de AZA	Equação da reta	Coefficiente de correlação	Precisão da regressão (%DPR)
Gradiente	AZA A	$y = 333220x - 608,20$	0,9570	4,580
	AZA B	$y = 69470x + 127,18$	0,9409	5,421
	AZA total	$y = 402690x - 481,02$	0,9811	4,3861
Isocrático	AZA A	$y = 256075x + 10,72$	0,9994	1,136
	AZA B	$y = 123360x - 12,06$	0,9959	1,847
	AZA total	$y = 379435x - 1,34$	0,9987	1,358

a: desvio padrão relativo da regressão.

Tabela 8. Resultados obtidos de precisão intra-ensaio e inter-ensaio para os métodos gradiente e isocrático em CLAE-UV/DAD, utilizando produto comercial E (ver parte experimental para condições).

Método	Tempo de retenção (min)	Precisão (DPR, %)	
		Intra-ensaio	Inter-ensaio
Gradiente	AZA A	0,4020	2,9800
	AZA B	0,6630	2,8172
	AZA total	0,4765	2,9838
Isocrático	AZA A	1,1073	1,6814
	AZA B	1,3249	2,5034
	AZA total	1,1895	2,2738

Tabela 9. Resultados de robustez obtidos por meio de alterações intencionais na composição de fase móvel e na temperatura de eluição para o método isocrático (ver texto para detalhes).

Pico	Alteração de composição				Alteração de temperatura			
	Água/acetonitrila (62:38)		Água/acetonitrila (58:42)		Temperatura 27 °C		Temperatura 33 °C	
	Área	Área média (DPR, %)	Área	Área média (DPR, %)	Área	Área média (DPR, %)	Área	Área média (DPR, %)
	1026,2		999,6		793,7		843,1	
AZA A	1007,1	1020,1 (1,1)	984,7	993,5 (0,8)	791,4	788,6 (0,9)	840,0	841,9 (0,2)
	1027,0		996,3		780,7		842,6	
	480,4		499,7		312,8		396,5	
AZA B	454,9	468,1 (2,7)	486,6	495,6 (1,6)	307,9	309,1 (1,1)	397,8	397,4 (0,2)
	468,9		500,6		306,6		397,9	
	1506,6		1499,3		1106,5		1239,6	
AZA total	1462,0	1488,2 (1,6)	1471,3	1489,2 (1,0)	1099,3	1097,7 (0,9)	1237,8	1293,3 (0,1)
	1495,9		1496,9		1087,3		1240,5	

Dos seis produtos testados pelo método isocrático por CLAE-UV/DAD, os produtos A, B, C e D não apresentaram picos correspondentes a AZA no tempo de eluição esperado. Apenas os produtos E e F mostraram picos de AZA na região esperada. De acordo com instruções do fabricante, os produtos devem ser diluídos de forma diferente para o uso, portanto, a quantidade de AZA foi também estimada de acordo com tal fator de diluição proposto pelo fabricante (1:200 para o produto E e sem diluição para o produto F). Os picos, cujos perfis espectrofotométricos (UV/DAD) correspondem àquele inserido na Figura 5, foram identificados como positivo para AZA, nos produtos testados. De acordo com a análise espectral UV/DAD, os picos de AZA apresentaram valores de semelhança acima de 990,45, isto é, 99,04% de pureza para o produto E, apontando para sua autenticidade. Os cálculos dos valores de semelhança dos picos para o produto F não puderam ser calculados pelo software, devido à baixa intensidade do sinal e pequena área dos picos. Estão mostrados na Tabela 10 os resultados obtidos para o cálculo da quantidade estimada de AZA por volume injetado e por produto, calculados segundo as instruções de diluição do fabricante.

Considerando que a maioria dos produtos avaliados sejam derivados da semente de nim, era de se esperar que apresentassem manchas e picos de AZA por CCD, bem como por CLAE-UV/DAD. A partir dos resultados da Tabela 10, verifica-se que o produto E apresentou uma quantidade de AZA da ordem de 10^{-3} e o produto F, de 10^{-2} , ou seja, o produto F apresentou concentração dez vezes maior na solução final. Além disso, o produto F apresentou maior quantidade de AZA B que AZA A. Conforme relatado por Sharma e colaboradores (2003), a AZA B possui uma maior atividade nematicida e o isômero H, maior atividade antifúngica que AZA

A, sugerindo que esse produto pode apresentar efeito maior para seu propósito como pesticida.

Tabela 10. Resultados obtidos de quantidade estimada de AZA em produtos comerciais preparados com nim^a por CLAE-UV/DAD, método isocrático (ver parte experimental para condições).

Produto	Pico	Área	Quantidade estimada de AZA		Razão entre as quantidades estimadas de AZA (F/E)
			Por injeção (mg/20µl)	Por produto ^b (mg/ml)	
E	AZA A	3869,3	$1,51 \times 10^{-2}$	$3,77 \times 10^{-3}$	AZA A = 5,97
	AZA B	2776,4	$2,26 \times 10^{-2}$	$5,65 \times 10^{-3}$	
	AZA total	6645,7	$1,75 \times 10^{-2}$	$4,38 \times 10^{-3}$	AZA B = 16,65
F	AZA A	125,9	$4,50 \times 10^{-4}$	$2,25 \times 10^{-2}$	AZA total = 10,43
	AZA B	219,6	$1,88 \times 10^{-3}$	$9,41 \times 10^{-2}$	
	AZA total	345,4	$9,10 \times 10^{-4}$	$4,57 \times 10^{-2}$	

a: dos seis produtos testados, A, B, C, D, E e F, apenas os dois últimos continham AZA; b: fator de diluição para o produto E, 1:200, segundo fabricante e ausência de diluição para o produto F.

5 Conclusões

Os testes realizados com os extratos hidroalcoólicos de folhas de nim permitiram concluir que as folhas não continham quantidade suficiente de AZA para o doseamento e que a atividade do extrato sobre microorganismos foi limitada.

Um estudo mais aprofundado a respeito da composição do extrato de folhas de nim, bem como da atividade pesticida do mesmo, é necessário, de forma a avaliar a presença de outras substâncias ativas. Este resultado revela a importância de se avaliar a matéria-prima vegetal antes da preparação dos produtos.

Dos cinco produtos nacionais testados, apenas um (20%) apresentou quantidade de AZA detectável por CLAE-UV/DAD, método isocrático. Para os dois produtos que apresentaram picos ou manchas de AZA nos seus perfis cromatográficos, o produto importado apresentou uma concentração de AZA dez vezes maior que o brasileiro na solução de uso, podendo ter uma ação terapêutica superior como pesticida. Apenas o produto C apresentou atividade contra os microorganismos testados. Essa atividade pode ser devida a presença de óleo essencial, utilizado em sua formulação. Embora os produtos E e F tenham apresentado manchas e picos de AZA, a sua quantidade não foi suficiente para inibir o crescimento dos microorganismos.

Esta pesquisa demonstrou que a planta ainda é usada de forma inadequada no Brasil, apesar de contar com vários cultivos, estudos fitoquímicos e diversas ações terapêuticas comprovadas.

Apesar da existência de uma regulamentação da Anvisa (RDC 48), nem todos os produtos preparados com nim atendem a testes como identificação ou teor de ativo, segundo a RDC 48.

6 Referências bibliográficas

ALLAMED, A., ABYAMEH, M.R., SHAEM, M., REZAEI, M.B., JAIMAND, K. Effects of neem leaf extract on production of aflatoxins and activities of fatty acid synthetase, isocitrate dehydrogenase and glutathione S-transferase in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologica*. v. 154. p. 79-84, 2001.

ALMAD, I., BEG, A.Z., Antimicrobial and phytochemical studies on 45 medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 74. p. 113-123. 2001.

BARREK, S., PAISSE, O., GRENIER-LOUSTALOT, M.F., Analysis of neem oil by LC-EM and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment. Characterization of degradation products by HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v. 378. p. 753-763, 2004

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 48 de 16 de março de 2004. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 18 de março de 2004.

BRANDÃO, M.G.L.; ALVES, R.M.S.; MOREIRA, R.A.; CAMPOS, L.M.M.; VIEIRA, M.T. Qualidade de amostras comerciais de chás de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 5, p. 56-59, 2002.

BRANDÃO, M.G.L., FREIRE, N., VIANNA-SOARES, C.D. Farmacovigilância em fitoterapia: verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 14, p. 693-700, 1998.

BUTTERWORTH, J.H., MORGAN, E.D. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communication*, v.35, p.23-24, 1968.

CHOPRA, I.C., GUPTA, K.C., NAZIR, B.N. Preliminary study of anti-bacterial substances from *Melia azadirachta*. *The Indian Journal of Medical Research*. v. 40, p. 511-515, 1952.

DAI, J., YAYLAYAN, V.A., RAGHAVAN, G.S.V., PARÈ, J.R., Extraction and colorimetric determination of azadirachtin-related limonoids in neem seed kernel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 47, p. 3738-3742, 1999.

EUROPEAN pharmacopoeia, Strasbourg, França: EDQM, 4.Ed., p. 509, 2001.

HALIM, E.M., Lowering of blood sugar by water extract of *Azadirachta indica* and *Abroma augusta* in diabetes rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. v. 41, n. 6, p.636-640, 2003.

IYER, S. R., WILLIAEMON, D. Efficacy of some plant extracts to inhibit the protease activity of *Trichophyton* species. *Geobios*. v. 18 p. 3-6, 1991

ISAH A.B., IBRAHIM Y.K., IWALEWA E.O. Evaluation of the antimalarial properties and standardization of tablets of *Azadirachta indica* (Meliaceae) in mice. *Phytotherapy Research*. v. 17, n. 7, p.807-810, 2003.

ISMAN, M.B. Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization. *Phytoparasitica* v. 4, n. 25, p.339-344, 1997.

KHAN, M., WASSILEW, S.W., Natural Pesticides from the Neem Tree and other Tropical Plants. Schmitterer, H., Asher, K.R.S., GTZ: Eschborn, Alemanha, 645 p., 1987 *apud* SUBAPIRYA R., NAGINI S., Medicinal properties of neem leaves: a review. *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*. v. 5, n. 2, p.149-156, 2005.

KAUSHIK, N., Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *Azadirachta indica* seeds by HPLC and GLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v. 374. p. 1199-1204, 2002

MARTINEZ, S.S. (Ed), *O Nim. Azadirachta indica, natureza, usos múltiplos, produção*. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 142 p., 2002.

MERCK *index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. Whitehouse Station, New Jersey: Merck Research Laboratories, 14.Ed., p. 150, 356-357, 2006.

MORGAN, E.D., JOHNSON, S. Comparison of chromatographic systems for triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) seeds. *Journal of Chromatography, A*. v. 761, p. 53-63, 1997.

MOSSINI, S.A., DE OLIVEIRA, K.P., KEMELMEIER, C. Inhibition of patulin production by *Penicillium expansum* cultured with neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts. *Journal of Basic Microbiology*. v. 44. p. 106-113, 2004.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. p. M100-514, 2004.

NUNAN, E.A., MOREIRA-CAMPOS, L.M., PAIVA, R.L.R., OLIVEIRA, S.T., DAUDOUN, H.A., OLIVEIRA, A.B. Estudo da atividade antimicrobiana de extrato de folha de *Aristolochia gigantea*, Mart. e Zucc. *Revista de Farmácia e Bioquímica*. v. 6, p. 33-40, 1985.

RAJI Y. OGUNWANDE I.A. OSADEBE C.A. JOHN G, Effects of *Azadirachta indica* extract on gastric ulceration and acid secretion in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 90, n. 1, p.167-170, 2004.

SATYAVATI, G.V., RAINA, M.K., SHARMA, M. Medicinal Plants of India. Indian Council of Medical Research, v. 1, 397 p., New Delhi, Índia. 1976 *apud* SUBAPRIYA R., NAGINI S., Medicinal properties of neem leaves: a review. *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*. v. 5, p.149-156, 2005.

SCHAAF, O., JARVIS, A.P., ESCH, S.A.V.D, GIAGNACOVO, G., OLDHAN, N.J., Rapid and sensitive analysis of azadirachtin related triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure

chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. v. 886. p. 80-97, 2000.

SHARMA, V., WALIA, S., KUMAR, J., NAIR, M.G., PARMAR, B.S., An efficient method for the purification and characterization of nematocidal azadirachtins A, B, and H, using MPLC and ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 51, p. 3966-3972, 2003.

SIDDIQUI, B.S., AFSHAN, F., GULZAR, T., SULTANA, R., NAQVI, S.N., TARIQ, R.M. Tetracyclic triterpenoids from the leaves of *Azadirachta indica* and their insecticidal activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. v. 51, p. 415-417, 2003.

SIDHU O.P., KUMAR V., BEHL HM, Variability in Neem (*Azadirachta indica*) with respect to azadirachtin content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 51, p.910-915, 2003.

SILVA, J.C.T., *Isolamento de tetranortriterpenóides de sementes de Azadirachta indica (nim) e avaliação da atividade nematocida sobre Heterodera glycines*. 2005. 81 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SUBAPRIYA R., KUMARAGURUPARAN R., CHANDRAMOHAN K.V., NAGINI S, Chemoprotective effects of ethanolic extract of neem leaf against MNNG-induced oxidative stress. *Pharmazie*. v. 58, p. 512-517, 2003.

SUBAPRIYA R., NAGINI S., Medicinal properties of neem leaves: a review. *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*. v. 5, p.149-156, 2005.

THEJEAVANTI, R., YAKKUNDI, S.R., RAVINDRANATH, B., Determination of azadirachtin by reversed-phase high-performance liquid chromatography using anisole as internal standard. *Journal of Chromatography A*. v. 705, p.374-379, 1995.

UDEINYA, I.J., MBAH, A.U., CHIJOKE, C.P., SHU, E.N. An antimalarial extract from neem leaves is antiretroviral. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 98, p.435-437, 2004.

UNITED states pharmacopeia. National Formulary. 30 rev. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p. 212-214, 2006.

VEITCH, G.E., BECKMANN, E., BURKE, B.J., BOYER, A., MASLEN, S.L., LEY, S.V. Synthesis of Azadirachtin: A Long but Successful Journey. *Angewandte Chemie*,

WAGNER, H., BLADT, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2. Ed. Berlin: Springer. 384p.

7 ANEXO

7.1 Resultados estatísticos do teste de Tukey para o extrato hidroalcoólico de folhas de nim 70% V/V.

Extrato hidroalcoólico 70%

Ho: As médias não diferem entre si

Repetição	Tratamento (concentração mg/ml)					Total bloco
	100	150	200	250	300	
1	7,00	6,70	7,30	7,20	7,50	35,70
2	6,95	7,35	7,50	7,45	7,25	36,50
3	6,85	7,05	7,55	8,10	7,20	36,75
Total	20,80	21,10	22,35	22,75	21,95	108,95
Media	6,93	7,03	7,45	7,58	7,32	36,32

Quadro ANOVA

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F	p
Tratamento	4	2,717	0,6793	2,0321	0,2559
Bloco	2	0,6017	0,3008	0,9000	0,6012
Resíduo	5	-1,671	-0,334		
Total	11	1,6473			

Conclui-se que as médias não diferem entre si ($p=0,0919$).

Teste de Tukey

Diferença mínima signif. = 1,39 $q_{5\%,3,7} = 4,17$

Concentração (mg/ml)	Media	250	200	300	150	Discriminação (5%)
250	7,58	-	-	-	-	a
		0,1				
200	7,45	3	-	-	-	a
		0,2				
300	7,32	7	0,13	-	-	a
		0,5				
150	7,03	5	0,42	0,28	-	a
		0,6				
100	6,93	5	0,52	0,38	0,10	a

Conclui-se que os tratamentos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de possibilidade

7.2 Resultados estatísticos do teste de Tukey para o extrato hidroalcoólico de folhas de nim 80% V/V.

Extrato hidroalcoólico 80%

Ho: As médias não diferem entre si

Repetição	Tratamento (concentração mg/ml)					total bloco
	100	150	200	250	300	
1	6,60	7,10	6,10	6,65	6,45	32,90
2	-	6,60	6,35	7,15	8,00	28,10
3	-	6,75	6,20	7,10	6,35	26,40
Total	6,60	20,45	18,65	20,90	20,80	87,40
Media	6,60	6,82	6,22	6,97	6,93	29,13

Quadro ANOVA

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F	p
Tratamento	4	151,28	37,8208	1,7872	0,3002
Bloco	2	22,727	11,3633	0,5370	0,7754
Resíduo	7	-148,1	21,1621		
Total	11	3,1481			

Conclui-se que as médias não diferem entre si ($p=0,0919$).

Teste de Tukey

Diferença mínima signif. = 11,075 $q_{5\%,3,7} = 4,17$

Concentração (mg/ml)	Media	250	200	300	150	Discriminação (5%)
250	6,97	-	-	-	-	a
300	6,93	0,03	-	-	-	a
150	6,82	0,15	0,12	-	-	a
100	6,60	0,37	0,33	0,22	-	a
200	6,22	0,75	0,72	0,60	0,3	a

Conclui-se que os tratamentos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de possibilidade.