

**PATRÍCYA CAIXETA DE OLIVEIRA**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DOS  
FRUTOS DA SUCUPIRA**

***Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae**

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Teresa Freitas Bara

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição

Goiânia  
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
GPT/BC/UFG**

O482o Oliveira, Patrícia Caixeta.  
Obtenção e Caracterização do Extrato Seco Padronizado dos Frutos da Sucupira *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae [manuscrito] / Patrícia Caixeta de Oliveira. - 2010. 146 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Freitas Bara; Co-orientador: Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2010.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras e tabelas.

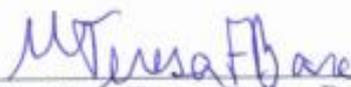
1. *Pterodon emarginatus* Vogel 2. Spray drying 3. Controle de qualidade 4. Antinociceptivo I. Título.

CDU:615.32

## Folha de Aprovação

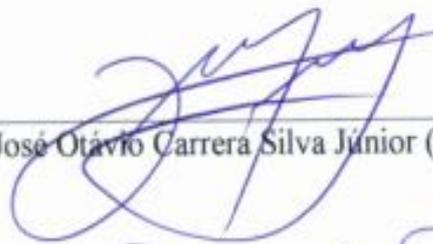
Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 31 de agosto de 2010, pela mestranda Patrícia Caixeta de Oliveira.

Banca Examinadora:



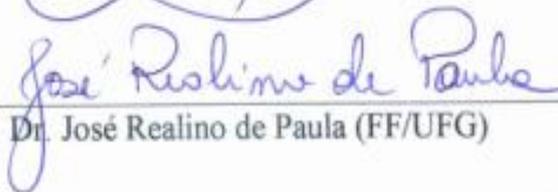
---

Prof. Dra. Maria Teresa Freitas Bara (FF/UFG)  
Presidente



---

Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Júnior (UFPA)



---

Prof. Dr. José Realino de Paula (FF/UFG)

Dedico este trabalho à Deus, e à minha orientadora  
Prof. Maria Teresa que me adotou  
com carinho nessa terra de gigantes e  
com quem aprendi principalmente, a ser uma pessoa melhor.

## **Agradecimentos**

À Deus pelo dom da vida, por sempre me guiar por seus caminhos e por mais essa vitória ...

À minha família pelo amor, ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

À pessoa amada, pelo carinho, companheirismo, apoio e paciência nessa longa jornada.

À minha orientadora Professora Maria Teresa pela oportunidade, amizade, confiança e pela orientação.

Ao meu co-orientador Professor Edemilson pela atenção e disposição em sempre ajudar.

À todos os colegas e professores do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais pela atenção, carinho e troca de experiências.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pelo apoio técnico.

Ao Laboratório de Farmacologia em Produtos Naturais pelo apoio e colaboração nos experimentos realizados.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (UFG) pelo apoio técnico.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP) pela realização dos experimentos de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pela realização das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros e à Companhia de Urbanização de Goiânia pelo apoio e compreensão fundamentais na concretização deste trabalho.

À todos meus amigos e amigas, que de longe ou de perto, torcem e vibram pelo meu sucesso.

*“Comece fazendo o necessário, depois o que é possível,  
e de repente você estará fazendo o impossível.”*

São Francisco de Assis

## RESUMO

A *Pterodon emarginatus* Vogel, conhecida popularmente como Sucupira Branca, pertence à família Fabaceae. Estudos científicos comprovaram atividades larvicida (*Aedes aegypti*), antiparasitária (*Leishmania amazonensis*), fungicida, bactericida, antioxidante, antiinflamatória, antinociceptiva e anti-tumoral nos frutos dessa espécie, que podem estar relacionadas com a presença de diterpenos, de modo particular, os derivados vouacapânicos. Esse trabalho teve como objetivo obter e caracterizar o pó, o extrato bruto e extrato seco padronizado dos frutos da sucupira. O material botânico foi moído, obtendo-se um pó grosso, apresentando 1,2% de voláteis. O perfil cromatográfico (CCD) indicou a presença dos marcadores vouacapânicos (ácido 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -óico - Rf = 0,16; 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila – Rf = 0,44; 6 $\alpha$ , hidroxivouacapan-7 $\beta$ , 17 $\beta$ -lactona – Rf = 0,71) e lupeol (Rf = 0,78). Foram observadas bandas de vibração na região do infravermelho coincidentes com as cinco bandas principais dos vouacapanos (-OH, C-H, C=O, C=C, C-O). O teor de terpenos totais foi de 9,3%. Procedeu-se a obtenção do extrato bruto por percolação em etanol a 95% P.A. Este apresentou pH 5,1, densidade relativa de 0,87, viscosidade de 25,43 mPas, teor de sólidos de 15,2%, teor de terpenos totais de 17,1%, o mesmo perfil cromatográfico e espectro na região do infravermelho obtido para o pó do fruto. Outro método utilizado para investigação de terpenos foi a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas realizada no extrato hexânico. Identificou-se a presença de vouacapanos e do lupeol. Em seguida, realizou-se o processo de secagem do extrato bruto por nebulização (*spray drying*), utilizando diferentes adjuvantes de secagem, fluxo de 0,19 L/h, vazão do ar 35 L/min, temperatura de entrada 110°C, temperatura de saída 97°C, bico aspersor tipo duplo fluido 1,2 mm. Os melhores resultados foram obtidos com o dióxido de silício coloidal (Aerosil®) a 20%, proporcionando um aspecto de pó fino. A análise térmica realizada para o marcador 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ -dihidroxivouacapan-17 $\beta$ -oato de metila demonstrou que os parâmetros de secagem foram seguros prevenindo a degradação térmica dos diterpenos. O rendimento do processo de secagem foi de 16,2%, a porcentagem de degradação de 10,9% e o teor de terpenos totais no extrato seco foi de 13,9%. O perfil cromatográfico foi mantido e o teor de voláteis foi de 3,5%. As fotomicrografias obtidas para o extrato seco mostraram partículas de formato irregular e esférico e superfície rugosa. O método analítico desenvolvido por espectrofotometria na região do visível para a quantificação dos terpenos totais no pó, extrato bruto e extrato seco foi validado apresentando-se seletivo, linear, preciso, exato e robusto. No teste de atividade antinociceptiva (capsaicina), o pré-tratamento com extrato seco de sucupira (ESS 1000 mg/kg + DMSO 20%) reduziu o tempo de reatividade em 50,9% em relação ao veículo. Os resultados obtidos permitem sugerir que o processamento tecnológico empregado para a transformação dos frutos da sucupira em extrato seco padronizado foi adequado, mantendo a qualidade química e a atividade antinociceptiva descritas. Esse trabalho representa a primeira descrição da obtenção do extrato seco padronizado e da identificação do lupeol nos frutos da sucupira.

Palavras-chaves: planta medicinal, fitoterápico, processamento tecnológico, *spray drying*, controle de qualidade, antinociceptivo.

## ABSTRACT

The *Pterodon emarginatus* Vogel, known as “sucupira branca” (Fabaceae) has been shown to possess larvicidal activity against (*Aedes aegypti*), antiparasitic effect (*Leishmania amazonensis*), fungicide, bactericide, antioxidant, antiinflammatory, antinociceptive, and antiproliferative activity among several different human cancer cell lines that may be related to presence of diterpenes, in particular, vouacapanes derivatives. This work aimed to define and characterize the powder, the crude and standardized dry extract of the fruit of “sucupira”. After crushing the fruits, showed 1.2% volatile. The chromatographic (TLC) indicated the presence of chemical markers vouacapanes (6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxyvouacapan-17 $\beta$ -oic acid - Rf = 0.16; 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxyvouacapan-17 $\beta$ -oate methyl ester - Rf = 0.44; 6 $\alpha$ -hydroxyvouacapan-7 $\beta$ -17 $\beta$ -lactone - Rf = 0.71) and lupeol (Rf = 0.78). In vibration bands in the infrared region coinciding with the five main bands of vouacapanes (-OH, C-H, C=O, C=C, C-O). The concentration of total terpenes of 9.3%. Then to obtain the crude extract was held percolation in 95% ethanol PA. The crude extract showed pH 5.1, relative density of 0.87, viscosity of 25.43 mPas, solid 15.2%, total terpenes of 17.1% and the same chromatographic profile and in the infrared spectrum obtained for the powder plant. Another method used for investigation of terpenes was the gas chromatography / mass spectrometry in the hexane extract. We identified the presence of vouacapanes and the lupeol. The drying process of the crude extract was used nebulization (spray drying) using different adjuvants drying, flow of 0.19 L / h, air flow 35 L / min, inlet temperature 110°C, outlet temperature 97°C, double fluid nozzle spray type 1.2 mm. The best results were obtained with the colloidal silicon dioxide (Aerosil<sup>®</sup>) to 20%, giving an appearance of fine powder. Thermal analysis performed for the marker 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxyvouacapan-17 $\beta$ -oate methyl ester showed that the drying parameters were safe by preventing the thermal degradation of diterpenes. The efficiency of the drying process was 16.2%, degradation of 10.9% and the concentration of terpenes total in dry extract was 13.9%. The chromatographic profile was maintained and the volatile content was 3.5%. The photomicrographs showed irregular and spherical particles, rough surface. The analytical method by spectrophotometry in the visible region for the quantification of total terpenes in the dust, crude extract and dry extract was validated presenting selective, linear, precise, accurate and robust. In the test of antinociceptive activity (capsaicin), the pre-treatment with dry extract of “sucupira” (SDE 1000 mg / kg + 20% DMSO) reduced the time reactivity in 50.9% compared to the vehicle. The results may suggest that the technological processes employed to transform the fruits of “sucupira” in standardized dry extract was adequate to maintain quality chemistry and antinociceptive activity described for the fruits. This work represents the first description of the taking of standardized dry extract and identification of lupeol in fruits of “sucupira”.

Keywords: medicinal plant, phytotherapeutic, technological processes, spray drying, quality control, antinociceptive.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore de <i>P. emarginatus</i> Vogel (Sucupira) no município de Bela Vista - GO. J. R. Paula, setembro de 2006. Fonte: MORAES, 2007.....	24
Figura 2. Representação molecular do ácido 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -óico (1); 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila (2); 6 $\alpha$ , hidroxivouacapan-7 $\beta$ , 17 $\beta$ -lactona (3). Fonte: RUBINGER et al., 2004 .....	27
Figura 3. Fotografia do MSD 1.0 (LABMAQ) e seus sistemas principais: 1) Chave geral 2) Controle do aquecimento; 3) Controle de bombeamento de líquido; 4) Câmara de secagem 5) Separador de pó seco 6) Indicador de temperatura de saída do produto e 7) Frasco coletor do pó seco. Fonte: LABMAQ, 2003 .....	43
Figura 4. Representação esquemática das atividades desenvolvidas no estudo .....	53
Figura 5. Representação esquemática do Experimento IV para extração de terpenos no pó da planta (fruto) de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	57
Figura 6: CCD – Pó (fruto sucupira). Fase móvel composta por hexano:acetato de etila:ácido acético glacial (60:40:1). Legenda: VA (vouacapano ácido - 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -óico); VE (vouacapano éster - 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila), VL (vouacapano lactona - 6 $\alpha$ , hidroxivouacapan-7 $\beta$ , 17 $\beta$ -lactona) .....	75
Figura 7. Espectro de Infravermelho do pó da planta (fruto) de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	77
Figura 8. Espectro de Infravermelho da forma ácida do vouacapano (ácido 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -óico) .....	78
Figura 9. Espectro de Infravermelho da forma éster do vouacapano (6 $\alpha$ ,7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila) .....	79
Figura 10. Espectro de Infravermelho da forma lactona do vouacapano (6 $\alpha$ , hidroxivouacapan-7 $\beta$ , 17 $\beta$ -lactona) .....	80
Figura 11. Espectro de absorção das soluções do marcador 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila (10 $\mu$ g/mL), do extrato bruto (11 $\mu$ g/mL), do extrato seco (11,5 $\mu$ g/mL), do fruto triturado (12 $\mu$ g/mL) e da água (branco) .....	83

Figura 12. Curva de calibração 1 do marcador 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila: $y = 0,051x - 0,064$ ; $r = 0,999$ . O eixo x representa as concentrações em $\mu\text{g/mL}$ e o eixo y representa absorvâncias encontradas.....	84
Figura 13. Curva de calibração 2 do marcador 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila: $y = 0,055x - 0,132$ ; $r = 0,999$ . O eixo x representa as concentrações em $\mu\text{g/mL}$ e o eixo y representa absorvâncias encontradas.....	84
Figura 14. Curva de calibração 3 do marcador 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila: $y = 0,049x - 0,073$ ; $r = 0,997$ . O eixo x representa as concentrações em $\mu\text{g/mL}$ e o eixo y representa absorvâncias encontradas .....	85
Figura 15. Curva de calibração 1 para determinação do Limite de Detecção e do Limite de Quantificação do marcador 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila: $y = 0,044x - 0,035$ ; $r = 0,998$ . O eixo x representa as concentrações em $\mu\text{g/mL}$ e o eixo y representa absorvâncias encontradas.....	93
Figura 16. Curva de calibração 2 para determinação do Limite de Detecção e do Limite de Quantificação do marcador 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila: $y = 0,048x - 0,035$ ; $r = 0,998$ . O eixo x representa as concentrações em $\mu\text{g/mL}$ e o eixo y representa absorvâncias encontradas.....	93
Figura 17. Curva de calibração 3 para determinação do Limite de Detecção e do Limite de Quantificação do marcador 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila: $y = 0,043x - 0,032$ ; $r = 0,999$ . O eixo x representa as concentrações em $\mu\text{g/mL}$ e o eixo y representa absorvâncias encontradas.....	94
Figura 18: CCD – Extrato Etanólico Bruto. Fase móvel composta por hexano:acetato de etila:ácido acético glacial (60:40:1). Legenda: VA (vouacapano ácido), VE (vouacapano éster), VL (vouacapano lactona), EEB (extrato etanólico bruto), GH (geranilgeraniol), LP (lupeol).....	100
Figura 19. Espectro de Infravermelho do extrato bruto de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	101
Figura 20. Espectro obtido por CG-MS para o marcador 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila: fração clorofórmio-metanólica da extração em fase sólida em cartucho de sílica .....	104
Figura 21. Fragmentação do pico cromatográfico ( $t_r = 53,478$ s) para o marcador 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila: fração clorofórmio-metanólica da extração em fase sólida em cartucho de sílica .....	104

Figura 22. Espectro obtido por CG-MS para o extrato hexânico de <i>P. emarginatus</i> Vogel: fração clorofórmio-metanólica da extração em fase sólida em cartucho de sílica .....	106
Figura 23. Fragmentação do pico cromatográfico (tr = 55,898 s) do extrato hexânico de <i>P. emarginatus</i> Vogel: fração clorofórmio-metanólica da extração em fase sólida em cartucho de sílica .....	106
Figura 24. Fragmentação do pico cromatográfico (tr = 55,045 s) do extrato hexânico de <i>P. emarginatus</i> Vogel: fração clorofórmio-metanólica da extração em fase sólida em cartucho de sílica .....	106
Figura 25. Espectro obtido por CG-MS para o extrato hexânico de <i>P. emarginatus</i> Vogel: fração clorofórmio da extração em fase sólida em cartucho de sílica .....	108
Figura 26. Fragmentação do pico cromatográfico (tr = 66,45 s) do extrato hexânico de <i>P. emarginatus</i> Vogel: fração clorofórmio da extração em fase sólida em cartucho de sílica .....	108
Figura 27. Espectro CG-MS do da biblioteca para lupeol .....	109
Figura 28: CCD – Extrato Seco. Fase móvel composta por hexano:acetato de etila:ácido acético glacial (60:40:1). Legenda: VA (vouacapano ácido 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -óico), VE (vouacapano éster - 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila), VL (vouacapano lactona - 6 $\alpha$ , hidroxivouacapan-7 $\beta$ , 17 $\beta$ -lactona), LP (lupeol) e GH (geranilgeraniol) .....	113
Figura 29. Espectro de Infravermelho do extrato seco de <i>P. emarginatus</i> Vogel	115
Figura 30. Microscopia eletrônica de varredura do extrato seco de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	116
Figura 31. Microscopia eletrônica de varredura do extrato seco de <i>P. emarginatus</i> Vogel, demonstrando o tamanho das partículas .....	116
Figura 32. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) do marcador 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila .....	118
Figura 33. Análise de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) do marcador 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ , di-hidroxivouacapan-17- $\beta$ -oato de metila .....	118

Figura 34. Avaliação da atividade analgésica pelo método da dor induzida pela capsaicina. Tempo de reatividade à aplicação intraplantar de capsaicina (50 µL, 1,6 % na pata posterior direita do camundongo). Os animais foram previamente tratados (60 min) pela via oral com o veículo (10 mL/kg + DMSO 20%, n = 10), com o extrato seco de sucupira (ESS 1000 mg/kg + DMSO 20%, n = 08) e previamente tratados (30 min) pela via intraperitoneal com capsazepina (10 mg/kg + DMSO 20%, n = 08) e com morfina (10 mg/kg, n = 4). As colunas e barras verticais representam as médias  $\pm$  erro padrão da média.

\*\* Estatisticamente diferente do grupo controle ( $p < 0,01$ )

\*\*\* Estatisticamente diferente do grupo controle ( $p < 0,001$ )..... 122

Figura 35. Resposta do animal (camundongo) ao estímulo nóxico através da lambida ou mordida da pata posterior direita mediante a aplicação intraplantar de capsaicina..... 123

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados do Ensaio de Granulometria dos frutos triturados de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	73
Tabela 2. Resultados do Teor de Voláteis para o pó da planta (fruto triturado) de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	74
Tabela 3. Análise do perfil cromatográfico do pó da planta (fruto triturado) de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	76
Tabela 4. Resultados dos experimentos realizados para otimização do processo extrativo <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	81
Tabela 5. Resultados do Teste de Estabilidade da reação de cor .....	82
Tabela 6. Resultados do parâmetro de repetibilidade (precisão intra-corrída) para o pó da planta (fruto triturado) de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	86
Tabela 7. Resultados da análise para avaliação do parâmetro de precisão intermediária (inter-corrída) para o pó da planta (fruto triturado) de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	87
Tabela 8. Resultados do parâmetro de precisão intermediária (inter-corrída) para o pó da planta (fruto triturado) de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	88
Tabela 9. Resultados do parâmetro de exatidão à uma concentração baixa (80%) para o pó da planta (fruto triturado) de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	89
Tabela 10. Resultados do parâmetro de exatidão à uma concentração média (100%) para o pó da planta (fruto triturado) de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	89
Tabela 11. Resultados do parâmetro de exatidão à uma concentração alta (120%) para o pó da planta (fruto triturado) de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	90

Tabela 12. Resultados da análise de robustez com leitura em $\lambda = 518$ nm, para os equipamentos 1 e 2 para o pó da planta (fruto triturado) de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	91
Tabela 13. Resultados da análise de robustez com leitura em $\lambda = 520$ nm, para os equipamentos 1 e 2 para o pó da planta (fruto triturado) de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	91
Tabela 14. Resultados da análise de robustez com leitura em $\lambda = 522$ nm, para os equipamentos 1 e 2 para o pó da planta (fruto triturado) de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	92
Tabela 15. Resultados dos parâmetros modificados para demonstrar a robustez e % TT (Terpenos Totais) após cada modificação no método de quantificação para o pó da planta (fruto triturado) de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	92
Tabela 16. Resultados dos cálculos para determinação de LD e LQ .....	94
Tabela 17. Cálculo do pH para Extrato Etanólico <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	95
Tabela 18. Cálculo da densidade relativa para Extrato Etanólico <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	96
Tabela 19. Resultados do ensaio de teor alcoólico para Extrato Etanólico de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	97
Tabela 20. Cálculo do Teor de Sólidos (%) para Extrato Etanólico de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	98
Tabela 21. Análise do perfil cromatográfico do Extrato Etanólico Bruto de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	100
Tabela 22. Resultados do Teor de Terpenos Totais para o Extrato Etanólico de Sucupira (EES*) .....	102
Tabela 23. Resultados dos teores de terpenos totais para o Extrato Etanólico de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	103

Tabela 24. Resultados da análise GC/EM para o marcador 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ , di-hidroxiouacapan-17- $\beta$ -oato de metila .....	105
Tabela 25. Resultados da análise GC/EM para o Extrato Hexânico de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	107
Tabela 26. Resultados dos teores de terpenos totais para o Extrato Seco de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	111
Tabela 27. Análise do perfil cromatográfico do Extrato Seco de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	114
Tabela 28. Resultados dos teores de terpenos totais, rendimento e degradação realizados para os extratos secos de <i>P. emarginatus</i> Vogel contendo diferentes proporções de adjuvante de secagem .....	120
Tabela 29. Resultados dos teores de terpenos totais para o Extrato Seco de <i>P. emarginatus</i> Vogel .....	121

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	24
2.1	<i>Pterodon emarginatus</i> Vogel .....	24
2.2	ASPECTOS FITOQUÍMICOS .....	26
2.3	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS .....	31
2.4	PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS .....	39
2.5	SECAGEM DE EXTRATOS VEGETAIS .....	42
2.6	CONTROLE DE QUALIDADE DE MATÉRIAS-PRIMAS VEGETAIS ..	45
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	50
3.1	OBJETIVO GERAL .....	50
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	50
<b>4</b>	<b>MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	51
4.1	REAGENTES, SOLVENTES E OUTROS MATERIAIS .....	51
4.2	EQUIPAMENTOS .....	52
4.3	MATERIAL BOTÂNICO .....	54
<b>4.3.1</b>	<b>Coleta e Moagem</b> .....	54
<b>4.3.2</b>	<b>Análise Granulométrica</b> .....	54
<b>4.3.3</b>	<b>Teor de Voláteis</b> .....	54
<b>4.3.4</b>	<b>Investigação da presença de Terpenos no pó da planta (fruto) ....</b>	55
4.3.4.1	Cromatografia em Camada Delgada .....	55
4.3.4.2	Espectroscopia na região do Infravermelho .....	55
<b>4.3.5</b>	<b>Desenvolvimento de método de quantificação de Terpenos Totais no pó da planta (fruto) .....</b>	55
<b>4.3.6</b>	<b>Validação do método de quantificação de Terpenos Totais no pó da planta (fruto) .....</b>	58
4.3.6.1	Seletividade .....	58
4.3.6.2	Linearidade e Intervalo .....	59
4.3.6.3	Precisão .....	59
4.3.6.3.1	<i>Repetibilidade</i> .....	59

4.3.6.3.2	<i>Precisão intermediária</i> .....	60
4.3.6.4	Exatidão .....	60
4.3.6.5	Robustez .....	60
4.3.6.6	Limite de Detecção e Quantificação .....	61
4.4	<b>OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO</b> .....	61
4.4.1	<b>Determinação do pH</b> .....	62
4.4.2	<b>Determinação da densidade relativa</b> .....	62
4.4.3	<b>Determinação da viscosidade</b> .....	63
4.4.4	<b>Determinação do teor alcoólico</b> .....	63
4.4.5	<b>Teor de Sólidos</b> .....	63
4.4.6	<b>Investigação da presença de Terpenos no Extrato Bruto</b> .....	63
4.4.6.1	Cromatografia em Camada Delgada .....	63
4.4.6.2	Espectroscopia na região do Infravermelho .....	64
4.4.7	<b>Teor de Terpenos Totais no Extrato Bruto</b> .....	64
4.4.8	<b>Validação do método para quantificação de terpenos totais no Extrato Bruto</b> .....	65
4.4.8.1	Seletividade .....	65
4.4.8.2	Precisão .....	65
4.4.8.2.1	<i>Repetibilidade</i> .....	65
4.4.9	<b>Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)</b> .....	66
4.5	<b>SECAGEM POR NEBULIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO</b> .....	67
4.5.1	<b>Investigação da presença de Terpenos no Extrato Seco</b> .....	68
4.5.1.1	Cromatografia em Camada Delgada .....	68
4.5.1.2	Espectroscopia na região do Infravermelho .....	68
4.5.2	<b>Teor de Voláteis</b> .....	68
4.5.3	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura</b> .....	69
4.5.4	<b>Estudo de Estabilidade Térmica dos Diterpenos</b> .....	69
4.5.5	<b>Teor de Terpenos Totais no Extrato Seco</b> .....	69
4.5.6	<b>Rendimento do Processo de Secagem e Porcentagem de Degradação</b> .....	70

<b>4.5.7</b>	<b>Validação do método para quantificação de terpenos totais no Extrato Seco</b> .....	71
4.5.7.1	Seletividade .....	71
4.5.7.2	Precisão .....	71
4.5.7.2.1	<i>Repetibilidade</i> .....	71
4.6	<b>INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA</b> .....	71
<b>4.6.1</b>	<b>Animais</b> .....	71
<b>4.6.2</b>	<b>Atividade antinocicpetiva</b> .....	72
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	73
5.1	<b>MATERIAL BOTÂNICO</b> .....	73
<b>5.1.1</b>	<b>Coleta e Moagem</b> .....	73
<b>5.1.2</b>	<b>Análise Granulométrica</b> .....	73
<b>5.1.3</b>	<b>Teor de Voláteis</b> .....	74
<b>5.1.4</b>	<b>Investigação da presença de Terpenos no pó da planta (fruto) ....</b>	74
5.1.4.1	Cromatografia em Camada Delgada .....	74
5.1.4.2	Espectroscopia na região do Infravermelho .....	76
<b>5.1.5</b>	<b>Desenvolvimento de método de quantificação de Terpenos Totais no pó da planta (fruto)</b> .....	80
<b>5.1.6</b>	<b>Validação do método de quantificação dos Terpenos Totais no pó da planta (fruto)</b> .....	82
5.1.6.1	Seletividade .....	82
5.1.6.2	Linearidade e Intervalo .....	83
5.1.6.3	Precisão .....	85
5.1.6.3.1	<i>Repetibilidade</i> .....	86
5.1.6.3.2	<i>Precisão intermediária</i> .....	87
5.1.6.4	Exatidão .....	88
5.1.6.5	Robustez .....	90
5.1.6.6	Limite de Detecção e Quantificação .....	93
5.2	<b>OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO</b> .....	95
<b>5.2.1</b>	<b>Determinação do pH</b> .....	95
<b>5.2.2</b>	<b>Determinação da densidade relativa</b> .....	96
<b>5.2.3</b>	<b>Determinação da viscosidade</b> .....	96

<b>5.2.4</b>	<b>Determinação do teor alcoólico</b> .....	97
<b>5.2.5</b>	<b>Teor de Sólidos</b> .....	98
<b>5.2.6</b>	<b>Investigação da presença de Terpenos no Extrato Bruto</b> .....	99
5.2.6.1	Cromatografia em Camada Delgada .....	99
5.2.6.2	Espectroscopia na região do Infravermelho .....	101
<b>5.2.7</b>	<b>Teor de Terpenos Totais no Extrato Bruto</b> .....	102
<b>5.2.8</b>	<b>Validação do método para quantificação de terpenos totais no Extrato Bruto</b> .....	102
5.2.8.1	Seletividade .....	102
5.2.8.2	Precisão .....	102
5.2.8.2.1	<i>Repetibilidade</i> .....	102
<b>5.2.9</b>	<b>Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)</b> .....	104
5.3	SECAGEM POR NEBULIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO .....	110
<b>5.3.1</b>	<b>Cromatografia em Camada Delgada</b> .....	112
<b>5.3.2</b>	<b>Espectroscopia na região do Infravermelho</b> .....	114
<b>5.3.3</b>	<b>Teor de voláteis</b> .....	115
<b>5.3.4</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura</b> .....	115
<b>5.3.5</b>	<b>Estudo de Estabilidade Térmica dos Diterpenos</b> .....	117
<b>5.3.6</b>	<b>Teor de Terpenos Totais no Extrato Seco</b> .....	119
<b>5.3.7</b>	<b>Rendimento do Processo de Secagem e Porcentagem de Degradação</b> .....	119
<b>5.3.8</b>	<b>Validação do método para quantificação de terpenos totais no Extrato Seco</b> .....	120
5.3.8.1	Seletividade .....	120
5.3.8.2	Precisão .....	121
5.3.8.2.1	<i>Repetibilidade</i> .....	121
5.4	INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA .....	122
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	126

## 1 INTRODUÇÃO

O mercado farmacêutico mundial de varejo movimentou US\$ 590 bilhões em 2005 e deverá movimentar em 2010 entre US\$ 820 bilhões e US\$ 830 bilhões, um crescimento de 4% a 6% em relação a 2009 segundo a Intercontinental Medical Statistics (IMS Health). Esse valor representa um crescimento nas vendas globais das indústrias em torno de 40% nos últimos cinco anos e pode ser justificado em grande parte, pela participação no mercado dos países: Brasil, Rússia, Índia e China (CAPANEMA, 2006; FEBRAFARMA, 2010).

No setor farmacêutico, um mercado promissor é o de fitoterápicos que movimenta mundialmente US\$ 21,7 bilhões por ano (RIOS, 2007 apud NIERO, 2010). Hoje os fitoterápicos representam cerca de 15% do capital da indústria farmacêutica mundial (NIERO, 2010). No Brasil, esse mercado gira cerca de US\$ 160 milhões por ano e o fator de atração é o ritmo de crescimento das vendas internas, mais de 15% anuais, contra 4% do que evoluem as vendas dos medicamentos sintéticos (FEBRAFARMA, 2009). São considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas (BRASIL, 2010).

A relevância econômica desses produtos para a indústria farmacêutica é evidente: os derivados naturais representaram 40% das vendas mundiais em 2000, 24% em 2001 e 26% em 2002 (BUTLER, 2004). Considerando-se a expansão mundial que os mercados de produtos derivados de plantas vêm conquistando, vê-se que os países detentores de grande biodiversidade têm a oportunidade de entrar em mercados bilionários (FUNARI e FERRO, 2005).

O Brasil é um país privilegiado, pois ocupa o primeiro lugar dentre os 17 países mais ricos do mundo em biodiversidade, detendo cerca de 23% do total das espécies existentes no planeta (RATES, 2001). Estima-se que 20% das plantas medicinais conhecidas são encontradas no Brasil (NIERO, 2010). A imensa variedade de espécies de plantas, animais e microrganismos existentes no ecossistema brasileiro, sem dúvida representam um importante diferencial para o desenvolvimento de medicamentos (SIMÕES et al., 2007). Neste contexto, a

diversidade molecular consiste em uma forte razão para se acreditar que os produtos naturais não podem ser desprezados nas pesquisas (YUNES e CECHINEL FILHO, 2007).

A natureza tem sido fonte de agentes medicinais por milhares de anos e continua sendo uma abundante fonte de novos quimiotipos e farmacóforos, com apenas 5-15% das cerca de 250.000 espécies de plantas superiores sistematicamente investigadas. Nos últimos anos, análises detalhadas de esqueletos de produtos naturais levaram à identificação de moléculas precursoras relativamente simples, as quais foram alicerces para uso em esquemas sintéticos combinatórios que produziram inúmeras moléculas potentes, permitindo, assim, a exploração da relação estrutura-atividade (CRAGG e NEWMAN, 2007).

As tecnologias baseadas na utilização racional da biodiversidade – como a adoção de critérios agroecológicos de cultivo e de manejo; o estabelecimento da variabilidade genética das espécies, aumentando o potencial de descoberta de novas moléculas; o estabelecimento do geoprocessamento de todas as espécies estudadas; o entendimento do conceito de sinergismo molecular na produção do efeito terapêutico dos fitoterápicos; o estudo das interações ecossistêmicas com fungos e outros microorganismos na produção de moléculas ativas – podem representar um novo paradigma no desenvolvimento de fitoterápicos em relação à descoberta de novas moléculas, ou na determinação de novas atividades farmacológicas de moléculas já conhecidas (VILLAS BÔAS, 2008).

Dentro desse contexto, é grande a busca por inovações no setor de fitoterápicos o que conseqüentemente promove o seu crescimento. Isso porque o Brasil possui uma vasta disponibilidade de recursos biogenéticos e de conhecimentos tradicionais acumulados pelas populações locais, quanto às aplicações da biodiversidade, além da tradição da ciência na área biológica (ALVES, 2005). Desse modo, o Brasil apresenta características favoráveis à consolidação da indústria farmacêutica nacional baseada em produtos naturais de origem vegetal. A competência científica instalada no país liderou na América latina a produção científica relacionada a plantas medicinais nos últimos 25 anos, respondendo por aproximadamente 42% das publicações (CALIXTO, 2005).

Com a revalorização da fitoterapia o emprego de extratos secos padronizados na fabricação de medicamentos fitoterápicos tem se apresentado como tendência atual para garantia da obtenção do efeito terapêutico desejado, principalmente

quando baseado em ensaios clínicos devidamente conduzidos (FELTRIN e CHORILLI, 2010).

O crescente avanço na produção e comercialização dos medicamentos fitoterápicos pelas indústrias farmacêuticas trouxe consigo a necessidade dos órgãos governamentais formularem diretrizes para regulamentação dos medicamentos fitoterápicos. Dentro do contexto político, no Brasil em 2007 o PAC da Saúde (Plano de Aceleração Continuada da Saúde) chamado de *Mais Saúde*, tendo um dos pilares o desenvolvimento e inovação em Saúde prevê investimentos de R\$ 89,1 bilhões de 2008 a 2011. O programa traz uma importante parceria com o BNDES (Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social) e a FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), que disponibilizará mais de R\$ 3 bilhões no setor produtivo da saúde para financiar as indústrias privadas nacionais de medicamentos (NIERO, 2010).

A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, publicada na forma das Portarias Ministeriais nº 971 em 03 de maio de 2006, e nº 1.600, de 17 de julho de 2006, propõe para a implementação das diretrizes para as plantas medicinais e fitoterápicos o provimento do acesso a medicamentos homeopáticos e fitoterápicos na perspectiva da ampliação da produção pública, elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e da Relação Nacional de Fitoterápicos, promoção do uso racional de plantas medicinais e dos fitoterápicos no SUS, o cumprimento dos critérios de qualidade, eficácia, eficiência e segurança no uso e o cumprimento das boas práticas de manipulação, de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2006a).

O decreto nº5.813 de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e institui um grupo de trabalho interministerial para elaboração do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, representa um marco histórico para o desenvolvimento tecnológico dos medicamentos fitoterápicos, dando início a uma nova perspectiva para a produção de medicamentos em que a biodiversidade brasileira é fonte de conhecimento e origem do processo. Constitui-se parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social (BRASIL, 2006b).

O decreto preenche a lacuna deixada pelo Estado na redução de incertezas e passa a proporcionar um dinamismo maior para este setor, incentivando a revisão de

conceitos e normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), além de indicar o Sistema Único de Saúde (SUS) como responsável pela definição das demandas sanitárias, definido o mercado e se comprometendo com o êxito do desenvolvimento através do seu poder de compra (VILLAS BÔAS, 2008).

Outros atos governamentais reforçam o incentivo e apoio à fitoterapia em nosso país, podendo-se citar a criação do Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2008) e a publicação pelo Departamento de Assistência Farmacêutica do Ministério da Saúde a RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), que lista 71 espécies vegetais para uso no SUS (BRASIL, 2009). Mais recentemente foi instituída, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS, o programa Farmácia Viva, no contexto da Política Nacional de Assistência Farmacêutica, que considera a necessidade de ampliação da oferta de fitoterápicos e de plantas medicinais que atenda à demanda e às necessidades locais, respeitando a legislação pertinente às necessidades do SUS na área (BRASIL, 2010).

Deve-se destacar também, a recente publicação da RDC nº14 de 31 de março 2010 (que revogou a RDC nº48 de 16 de março de 2004) e a Instrução Normativa nº05 de 31 de março de 2010 (que revogou a RE 88, de 16 de março de 2004) que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos visando atualizar e complementar os aspectos legais para aprimorar o padrão de qualidade exigido para os fitoterápicos. Para isso, é importante que sejam utilizados os extratos secos padronizados, cujo teor de um ou mais constituintes é ajustado a valores previamente definidos. Esse ajuste pode ser obtido por diluição do extrato ou pela adição de adjuvantes tecnológicos (MARQUES e VIGO, 2009), buscando a produção de medicamentos com constância na composição química e reprodutibilidade dos efeitos (segurança e eficácia) (VASCONCELOS et al., 2005).

Para a obtenção de extratos secos diversas técnicas podem ser empregadas, como a liofilização, coagulação por aspensão, secagem em estufas, sob pressão normal ou reduzida, leito fluidizado ou por nebulização (COUTO et al., 2010). A nebulização (spray drying) como operação de secagem possibilita a preparação de produtos pulverizados com características bem definidas, como tamanho e forma de partícula, além de que a rápida evaporação do solvente reduz o tempo de processamento e conseqüentemente, o risco de alterações de produtos termolábeis (JACOB, 1984 apud PAULA e PETROVICK, 1997). Além disso, em comparação

com outras técnicas de secagem, os custos de produção são baixos, especialmente tratando-se de um processo que proporciona pós secos a partir de uma dispersão líquida e por meio de uma única operação com elevado rendimento (AULTON, 2005).

Diante deste contexto favorável à implementação da prática da fitoterapia, torna-se evidente a relevância deste trabalho científico que visa o desenvolvimento tecnológico de matérias-primas / produto intermediário de origem vegetal úteis na cadeia produtiva de fitoterápicos.