



Mariana Viana Pinto

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO
PADRONIZADO DE
Mikania laevigata Sch.Bip. ex Baker., ASTERACEAE
(GUACO)**

Goiânia/GO

2011



Mariana Viana Pinto

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO
PADRONIZADO DE
Mikania laevigata Sch.Bip. ex Baker., ASTERACEAE
(GUACO)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Freitas Bara

Co-orientador: Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição

Goiânia/GO

2011

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

P659o Pinto, Mariana Viana.
Obtenção e Caracterização do Extrato Seco Padronizado de *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker., Asteraceae (Guaco) [manuscrito] / Mariana Viana Pinto. - 2011.
98 f.: il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Freitas Bara; Co-orientador: Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2011.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. Guaco. 2. Cumarina. 3. Fitoterápico. 4. Controle de Qualidade. 5. Plantas Medicinais. 6. *Spray drying*. I. Título.

CDU: 615.89

Dedico este trabalho ao meu pai e ao meu irmão, as pessoas mais importantes na minha vida. Porém, dedico especialmente à minha mãe, que certamente está radiante com a conquista de mais essa vitória.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me concedeu a graça da realização de mais um projeto na minha vida e que em todos os momentos é presença constante, me protegendo e auxiliando.

A minha madrinha Lúcia, por toda a ajuda prestada em todas as fases desse projeto, especialmente na fase final.

As queridas Didi e Iaiá, que sempre torceram por mim na concretização desse trabalho.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram e incentivaram nos estudos.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN/FF/UFG), por todo o companheirismo e ajuda prestada. Especialmente aos amigos Ezequiane, Suzana, Patrícia Abrão e Joelma.

À professora Dra. Maria Teresa Freitas Bara pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal, pela imensa paciência e amizade.

Ao professor Dr. Edemilson Cardoso da Conceição pela co-orientação, confiança e disponibilidade.

Ao professor Dr. José Realino de Paula pelas colaborações durante a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais (LFPN/ICB/UFG), nas pessoas de José Luís Rodrigues Martins e professor Dr. Élon Alves da Costa, pelos ensaios de atividade farmacológica.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (LCQM/FF/UFG), nas pessoas de Elviscley da Silva Oliveira, Cláudia Gomes Miranda e professora Dra. Ieda Maria Sapateiro Torres; ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (Farmatec/FF/UFG), na pessoa da professora Dra. Danielle Guimarães Almeida Diniz, pelo apoio técnico.

À Central Analítica (IQ/UFG), pela realização das análises de termogravimetria.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LAMMAR/IF/UFG), na pessoa da Dra. Tatiane Oliveira dos Santos, pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura dos extratos secos padronizados.

Aos professores componentes das bancas de avaliação pela disponibilidade e contribuições para a melhoria deste trabalho.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, na pessoa da professora Dra. Marize Campos Valadares Bozini, pela oportunidade de crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

*“Dois homens olharam através das
grades da prisão; um viu a lama, o
outro as estrelas.”*

Sto Agostinho

RESUMO

Mikania laevigata Sch.Bip. ex Baker., conhecida popularmente como guaco, é uma planta medicinal brasileira, pertencente à família Asteraceae, muito utilizada em medicamentos para tratar a tosse e distúrbios respiratórios. Apresenta atividades broncodilatadora, antiulcerogênica entre outras. Cumarinas, terpenos e ácidos orgânicos são os principais constituintes químicos desta espécie. Na literatura pesquisada não foram encontrados trabalhos abordando a produção de extratos secos padronizados de guaco, por isso o objetivo deste trabalho foi a obtenção e a caracterização do extrato seco padronizado desta espécie vegetal. As folhas de guaco foram coletadas, secas em estufa e trituradas, obtendo-se a droga vegetal. O extrato hidroalcoólico foi obtido através da percolação da droga vegetal utilizando como líquido extrator etanol 80%(v/v). Em seguida foram realizados diversos experimentos de secagem por *spray drying* com o intuito de investigar as influências da vazão de alimentação do extrato e da proporção de diferentes adjuvantes de secagem nas características dos extratos secos obtidos. A cumarina e o ácido o-cumárico foram utilizados como marcadores químicos e foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em todas as etapas do processo. Foi validado um método analítico seguindo os critérios propostos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o qual foi seletivo, linear, preciso, exato, sensível e robusto. Na caracterização da droga vegetal o teor de voláteis obtido foi de $9,00 \pm 1,75\%$, o teor de cumarina foi de $0,72 \pm 0,02\%$ e o teor de ácido o-cumárico foi de $0,13 \pm 0,005\%$. O tamanho médio de partículas foi de $444,823 \mu\text{m}$ e o índice de intumescência foi de 3,2 em etanol 80%, 4,27 em etanol 50% e 10,13 em água. O extrato hidroalcoólico apresentou densidade $0,9256 \pm 0,0006 \text{ g/mL}$, teor de sólidos totais de $5,18 \pm 0,21\%$, pH $6,1 \pm 0,00$, teor alcoólico de 56% e viscosidade de 5,57 mPas. Os rendimentos de secagem variaram de 11,35 a 54,11%, sendo que em todos os produtos secos, foram observados teores de voláteis e atividade de água abaixo de 5% e 0,5, respectivamente. A condição selecionada para ser empregada na obtenção de extratos secos padronizados de guaco foi aquela realizada com menor proporção de dióxido de silício coloidal (15%), maior vazão de alimentação do extrato (6mL/min), na qual obteve-se teores de cumarina e ácido o-cumárico de $1,83 \pm 0,004$ e $0,80 \pm 0,012$, respectivamente. O extrato seco obtido nestas condições apresentou partículas esféricas e a sua atividade antiulcerogênica no modelo de úlceras induzidas por indometacina foi demonstrada, sugerindo-se um efeito gastroprotetor. O perfil cromatográfico (CCD e CLAE) do pó, do extrato hidroalcoólico e do extrato seco demonstrou que a extração hidroalcoólica foi adequada para a extração de cumarina e ácido o-cumárico e o processo de secagem não ocasionou alterações no perfil químico do extrato em relação a estas substâncias. Dessa forma, a produção de extratos secos por *spray drying* a partir das folhas de *M. laevigata* pode ser uma alternativa interessante e promissora para a obtenção desse produto intermediário.

Palavras chave: Guaco. Cumarina. Fitoterápico. Controle de qualidade. Plantas medicinais. *Spray drying*.

ABSTRACT

Mikania laevigata Sch.Bip. ex Baker., popularly known as *guaco*, is a Brazilian medicinal plant belonging to Asteraceae family and widely used in medicine to treat coughs and respiratory disorders. It presents bronchodilator and antiulcer activities among others. Coumarins, terpenes and organic acids are the main chemical constituents of this specie. In the literature no studies were found concerning the production of standardized dried extracts from this plant specie, therefore the aim of this study was the obtaining and the characterization of standardized dry extract of this plant specie. *M. laevigata* leaves were collected, dried and crushed, resulting in the plant drug. The hydroalcoholic extract was obtained by percolation of the drug plant and the extraction liquid used was ethanol 80% (v/v). After drying experiments were carried out in order to investigate the influences of the extract feed rate and the drying adjuvant ratio in the characteristics of the dried extracts obtained. *o*-coumaric acid and coumarin were used as chemical markers and were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in all stages of the process. An analytical method was validated following the criteria proposed by the *Agência Nacional de Vigilância Sanitária* (ANVISA), proving to be selective, linear, precise, accurate, sensitive and robust. In the characterization of plant drug the volatile content obtained was $9.00 \pm 1.75\%$, the coumarin content was $0.72 \pm 0.02\%$ and the acid *o*-coumaric content was $0.13 \pm 0.005\%$. The average particle size was $444.823 \mu\text{m}$ and swelling index was 3.2 in ethanol 80%, 4.27 in ethanol 50% and 10.13 in water. The hydroalcoholic extract presented a density of $0.9256 \pm 0.0006 \text{ g / mL}$, total solids content of $5.18 \pm 0.21\%$, pH 6.1 ± 0.00 , alcohol content of 56% and viscosity of 5.57 mPas. The drying yields ranged from 11.35 to 54.11%, and all dried products presented volatiles content and water activity below 5% and 0.5, respectively. The selected condition to be used to obtain standardized dried extracts of *M. laevigata* was that performed with a smaller proportion of colloidal silicon dioxide (15%) and increased extract feed rate (6mL/min), in which levels were obtained coumarin and *o*-coumaric acid content of $1.83 \pm 0.004\%$ and $0.80 \pm 0.012\%$, respectively. The dry extract obtained in these conditions showed spherical particles and their antiulcer activity in the model of indomethacin induced ulcers was demonstrated, suggesting a gastroprotective effect of this extract. Comparison of powder, hydroalcoholic and dry extract chromatographic (TLC and HPLC) show that the hydroalcoholic extraction was suitable for the extraction of coumarin and *o*-coumaric acid and the drying process did not cause changes in the chemical profile of the extract in relation to these substances. Thus, the production of dried extracts by spray drying from the leaves of *M. laevigata* can be an interesting and promising alternative for obtaining such an intermediate product.

Keywords: *Mikania laevigata*. Coumarin. Phytomedicines. Quality control. Medicinal plants. Spray drying.

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Descrição dos métodos avaliados para definição do processo extrativo a partir da droga vegetal <i>M. laevigata</i>	34
Quadro 02: Variações nas condições cromatográficas do método de quantificação de cumarina e ácido o-cumárico por CLAE	37
Quadro 03: Experimentos realizados para padronização da secagem do extrato de <i>M. laevigata</i> . As: adjuvante de secagem, %As: proporção do adjuvante de secagem e Ve: vazão de alimentação do extrato	43
Quadro 04: Pontuação atribuída às lesões para a composição do índice de lesão. N° refere-se ao número de úlceras encontradas. (MACAÚBAS et al., 1988)	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** (A): Estrutura química da cumarina (1,2-benzopirona). (B): Estrutura química do ácido o-cumárico (ácido o-hidroxicinâmico)..... 26
- Figura 02:** Trepadeira de *Mikania laevigata* de onde foram coletadas as amostras em estudo (A e B); detalhes da folha de *M. laevigata* (C e D)..... 49
- Figura 03:** Perfil cromatográfico de *M. laevigata*. 1: ácido o-cumárico padrão; 2: cumarina padrão; 3: solução obtida a partir da droga vegetal..... 50
- Figura 04:** Distribuição do tamanho das partículas do pó das folhas de *M.laevigata*..... 51
- Figura 05:** Turvação da amostra após o teste..... 52
- Figura 06:** Investigação dos métodos de extração para a droga vegetal. (A):Cromatograma da droga vegetal extraída com 50 mL de etanol sob refluxo a 80°C; (B): Cromatograma de uma nova extração da mesma droga vegetal com 10 mL de etanol sob refluxo a 80°C; (C): Cromatograma da droga vegetal extraída com 50 mL de etanol em ultrassom; (D): Cromatograma de uma nova extração da mesma droga vegetal com 10 mL de etanol em ultrassom..... 54
- Figura 07:** Cromatogramas dos padrões de cumarina e ácido o-cumárico (A) e da droga vegetal de *M. laevigata* (B) utilizando o método de extração 3 e as condições cromatográficas: fase móvel composta por acetonitrila: água acidificada (solução de ácido acético 0,01% em água ultrapura) (15:85), fluxo da fase móvel 1,2 mL/min, temperatura do forno 30°C, injeção 20 L e comprimento de onda de 275 nm..... 56
- Figura 08:** Cromatogramas de varredura na faixa de 200 a 500 nm dos padrões de cumarina e ácido o-cumárico (A), da droga vegetal (B) e do solvente etanol (C) Condições cromatográficas utilizadas: fase móvel composta por acetonitrila: água acidificada (solução de ácido acético 0,01% em água ultrapura) (15:85), fluxo da fase móvel 1,2 mL/min, temperatura do forno 30°C, volume de injeção 20 µL e comprimento de onda de 275 nm..... 57
- Figura 09:** Cromatograma de varredura na faixa 200 a 500 nm da cumarina e do ácido o-cumárico (A) e do extrato hidroalcoólico de *M. laevigata* (B) Condições cromatográficas: fase móvel composta por acetonitrila: água acidificada (solução de ácido acético 0,01% em água ultrapura) (15:85), fluxo da fase móvel 1,2 mL/min, temperatura do forno 30°C, volume de injeção 20 µL e comprimento de onda de 275 nm..... 68
- Figura 10:** Cromatograma da amostra do extrato hidroalcoólico de *M. laevigata*. Condições cromatográficas: fase móvel composta por acetonitrila: água acidificada (solução de ácido acético 0,01% em água ultrapura) (15:85), fluxo da fase móvel 1,2 mL/min, modo isocrático, temperatura do forno 30°C, injeção 20 µL e comprimento de onda 275 nm..... 69

Figura 11: Curva TG correspondente a cumarina. Análise realizada em equipamento SHIMADZU® (modelo DTG-60H). Condições operacionais: cadinho de platina, razão de aquecimento de 10°C/min, intervalo de 26,69 a 601,7°C, atmosfera de ar sintético, fluxo de 50 mL/min..... 70

Figura 12: Curva TG correspondente ao ácido o-cumárico. Análise realizada em equipamento SHIMADZU® (modelo DTG-60H). Condições operacionais: cadinho de platina, razão de aquecimento de 10°C/min, intervalo de 44,72 a 601,73°C, atmosfera de ar sintético, fluxo de 50 mL/min..... 71

Figura 13: Cromatogramas de varredura na faixa 200 a 500 nm dos extratos secos de *M. laevigata*. **(A):** ES obtido no experimento 1.1 – 15% de dióxido de silício coloidal e vazão de alimentação do extrato de 6 mL/min; **(B):** ES obtido no experimento 2.4 – 30% de celulose microcristalina e vazão de alimentação do extrato de 6 mL/min; **(C):** ES obtido no experimento 3 – sem adição de adjuvante de secagem e 6 mL/min de vazão de alimentação do extrato; **(D):** padrões de cumarina e ácido o-cumárico. Condições cromatográficas utilizadas: fase móvel composta por acetonitrila: água acidificada (solução de ácido acético 0,01% em água ultrapura) (15:85), fluxo da fase móvel 1,2 mL/min, temperatura do forno 30°C, volume de injeção 20 µL e comprimento de onda de 275 nm..... 76

Figura 14: Cromatograma a 275 nm das amostra do extrato seco de *M. laevigata*. **(A):** ES obtido no experimento 1.1 – 15% de dióxido de silício coloidal e vazão de alimentação do extrato de 6 mL/min; **(B):** ES obtido no experimento 2.4 – 30% de celulose microcristalina e vazão de alimentação do extrato de 6 mL/min; **(C):** ES obtido no experimento 3 – sem adição de adjuvante de secagem e 6 mL/min de vazão de alimentação do extrato. Condições cromatográficas utilizadas: fase móvel composta por acetonitrila: água acidificada (solução de ácido acético 0,01% em água ultrapura) (15:85), fluxo da fase móvel 1,2 mL/min, temperatura do forno 30°C, volume de injeção 20 µL e comprimento de onda de 275 nm..... 78

Figura 15: Perfil cromatográfico de *M. laeviagata*. 1: ácido o-cumárico padrão; 2: cumarina padrão; 3: solução obtida a partir da droga vegetal; 4: extrato hidroalcoólico obtido com etanol 80%; 5: extrato seco adicionado de 15% de dióxido de silício coloidal (experimento 2.1). Fase móvel utilizada: tolueno: éter (1:1) saturado com 10% de ácido acético e revelador: solução etanólica de hidróxido de potássio 10%. Observou-se sob luz UV 365 nm..... 80

Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura do extrato seco de *M. laevigata* adicionado de 15% de dióxido de silício coloidal, demonstrando as características das partículas obtidas. **(A)** e **(D):** partículas isoladas. **(B)** e **(D):** partículas em aglomerados..... 81

Figura 17: Microscopia eletrônica de varredura do extrato seco de *M. laevigata* adicionado de 30% de celulose microcristalina, mostrando o

formato indefinido das partículas. **(A)** e **(B)**: partículas isoladas. **(C)** e **(D)**: partículas em aglomerados..... 82

Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura do extrato seco de *M. laevigata* obtido sem o uso de adjuvante, mostrando o formato aproximadamente esférico das partículas. **(A)**, **(B)** e **(C)**: partículas isoladas. **(D)**: partículas em aglomerados..... 83

Figura 19: Efeito do extrato seco de *M. laevigata* (ES 250, 500, 100 e 2000 mg/kg – v.o.) e da ranitidina (50 mg/kg – v.o.) sobre o número de úlceras induzidas por indometacina (50 mg/kg – s.c.). Os animais do grupo controle foram tratados com água mais tween 80 (10 mL/kg – v.o.). As barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média..... 84

Figura 20: Efeito do extrato seco de *M. laevigata* (ES 250, 500, 100 e 2000 mg/kg – v.o.) e da ranitidina (50 mg/kg – v.o.) sobre as lesões induzidas por indometacina (50 mg/kg – s.c.). Os animais do grupo controle foram tratados com água mais tween 80 (10 mL/kg – v.o.). As barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média..... 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Resultado do índice de intumescência para a droga vegetal de <i>M. laevigata</i> utilizando-se diferentes solventes.....	52
Tabela 02: Teste qualitativo para resinas.....	53
Tabela 03: Quantificação do teor de cumarina e ácido o-cumárico na droga vegetal utilizando-se diferentes métodos extrativos.....	53
Tabela 04: Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos para os cromatogramas dos padrões de cumarina e ácido o-cumárico e amostra da droga vegetal de <i>M. laevigata</i> . Rs: resolução; T: fator de cauda e N: número de pratos teóricos.....	56
Tabela 05: Áreas dos picos dos padrões de cumarina e ácido o-cumárico.....	59
Tabela 06: Repetibilidade (Precisão intracorrída) do método analítico para doseamento de cumarina e ácido o-cumárico na droga vegetal de <i>M. laevigata</i>	60
Tabela 07: Precisão intermediária (intercorrída) do método analítico para doseamento de cumarina e ácido o-cumárico na droga vegetal de <i>M. laevigata</i>	61
Tabela 08: Resultados da recuperação dos padrões de cumarina e de ácido o-cumárico adicionados às amostras da droga vegetal de <i>M. laevigata</i>	63
Tabela 09: Resultados da robustez do método analítico para doseamento de cumarina e ácido o-cumárico na droga vegetal de <i>M. laevigata</i>	64
Tabela 10: Resultados dos ensaios físico-químicos para seleção do líquido extrator a ser empregado na percolação. EH: extrato hidroalcoólico.....	65
Tabela 11: Características físico-químicas do extrato hidroalcoólico de <i>M. laevigata</i>	66
Tabela 12: Resultados de precisão do método de determinação de cumarina e ácido o-cumárico no extrato hidroalcoólico de <i>M. laevigata</i>	69
Tabela 13: Resultados dos extratos secos de <i>M. laevigata</i> obtidos nos experimentos de secagem Rp: rendimento do processo; Tv: teor de voláteis; Aa: atividade de água; TC: teor de cumarina; ToC: teor de ácido o-cumárico. Experimentos 1.1, 1.2 e 1.3: não foram utilizados adjuvantes de secagem e as vazões de alimentação do extrato foram 2, 4 e 6 mL/min, respectivamente. Experimentos 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4: utilizou-se o dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem nas proporções de 15 e 30% e as vazões de alimentação do extrato foram de 2 e 6 mL/min. Experimentos 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4: utilizou-se a celulose microcristalina como adjuvante de secagem nas proporções de 15 e 30% e as vazões de alimentação do extrato foram de 2 e 6	

mL/min. Experimento 4.1: utilizou-se a maltodextrina como adjuvante de secagem na proporção de 15% e vazão de alimentação do extrato de 2 mL/min. Experimento 5.1: utilizou-se o manitol como adjuvante de secagem na proporção de 15% e vazão de alimentação do extrato de 2 mL/min. Experimento 6.1 e 6.2: utilizou-se a lactose como adjuvante de secagem na proporção de 15% e vazões de alimentação do extrato de 2 e 6 mL/min..... 72

Tabela 14: Resultados de precisão do método de determinação da cumarina e do ácido o-cumárico no extrato seco (2.1) de *M. laevigata*..... 79

LISTA DE SIGLAS

Aa: Atividade de água

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

As: Tipo do adjuvante de secagem

%As: Proporção do adjuvante de secagem

CCD: Cromatografia em camada delgada

CLAE: Cromatografia Líquida de alta eficiência

COX: Ciclooxigenase

CV: Coeficiente de variação

Db: Diâmetro do bico atomizador

DP: Desvio padrão

DPR: Desvio padrão relativo

EH: Extrato hidroalcoólico

ES: Extrato seco

FDA: Food and Drug Administration

li: Índice de intumescência

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

Paa: Pressão do ar de aspersão

%d: Porcentagem de degradação

PDA: Detector de arranjo de diodos

pH: potencial hidrogeniônico

Rs: Resolução

r: Coeficiente de correlação

R²: Coeficiente de regressão

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

Rf: Fator de retenção

Rp: Rendimento do processo

St: Teor de sólidos totais

T: Fator de cauda

Te: Temperatura de entrada

TC: Teor de cumarina

ToC: Teor de ácido o-cumárico

Tv: Teor de voláteis

Vaa: Vazão do ar de aspersão

Vas: Vazão do ar de secagem

Ve: Vazão de alimentação do extrato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS	21
1.2	<i>Mikania laevigata</i> Sch. Bip. ex Baker	23
1.3	SECAGEM DE EXTRATOS VEGETAIS	26
2	OBJETIVOS	30
2.1	OBJETIVO GERAL	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL	31
3.1.1	Análise granulométrica	31
3.1.2	Determinação do teor de voláteis	31
3.1.3	Determinação do índice de intumescência	32
3.1.4	Teste qualitativo para resinas	32
3.1.5	Determinação do perfil cromatográfico em camada delgada (CCD)	32
3.1.6	Desenvolvimento do método analítico para quantificação do teor de cumarina e ácido o-cumárico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	33
3.1.6.1	Padrão e reagentes	33
3.1.6.2	Investigação do método de extração	33
3.1.6.3	Sistema cromatográfico	34
3.1.6.4	Determinação das condições cromatográficas	34
3.1.7	Validação do método analítico para quantificação de cumarina e ácido o-cumárico por cromatografia líquida de alta eficiência	35
3.1.7.1	Seletividade	35
3.1.7.2	Linearidade e intervalo	35
3.1.7.3	Precisão	36
3.1.7.4	Exatidão	36
3.1.7.5	Robustez	37
3.1.7.6	Limites de detecção e quantificação	37

3.1.8	Determinação do teor de cumarina e ácido o-cumárico na droga vegetal	37
3.2	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO (EH)	38
3.2.1	Determinação do teor de sólidos totais (St)	38
3.2.2	Determinação do teor alcoólico	39
3.2.3	Determinação da densidade relativa	39
3.2.4	Determinação da viscosidade	40
3.2.5	Determinação do pH	40
3.2.6	Determinação do teor de cumarina e ácido o-cumárico por CLAE	40
3.2.6.1	Método analítico	40
3.2.6.2	Co-validação do método analítico.....	41
3.2.7	Determinação do perfil cromatográfico (CCD)	41
3.3	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS SECOS (ES)	41
3.3.1	Análise termogravimétrica da cumarina e do ácido o-cumárico	41
3.3.2	Secagem por spray drying do extrato hidroalcoólico	42
3.3.3	Determinação do perfil cromatográfico (CCD)	43
3.3.4	Determinação do teor de cumarina e ácido o-cumárico por CLAE	43
3.3.4.1	Método analítico	43
3.3.4.2	Co-validação do método analítico	44
3.3.5	Porcentagem de degradação	44
3.3.6	Rendimento do processo	45
3.3.7	Teor de voláteis	45
3.3.8	Atividade de água	45
3.3.9	Seleção da condição de secagem para produção do extrato seco padronizado	45
3.3.10	Microscopia eletrônica de varredura	46
3.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DO EXTRATO SECO	46

3.4.1	Fármacos	46
3.4.2	Animais	46
3.4.3	Lesões gástricas induzidas por indometacina (DJAHANGUIRI, 1969)	47
3.4.4	Análise estatística	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL	49
4.1.1	Caracterização macroscópica das folhas e CCD	49
4.1.2	Análise granulométrica	50
4.1.3	Determinação do teor de voláteis	51
4.1.4	Determinação do índice de intumescência (Ii)	51
4.1.5	Teste qualitativo para resinas	52
4.1.6	Determinação do teor de cumarina e ácido o-cumárico por CLAE	53
4.1.6.1	Investigação do método de extração	53
4.1.6.2	Condições cromatográficas e adequabilidade do sistema	55
4.1.7	Validação do método analítico para quantificação de cumarina e ácido o-cumárico por cromatografia líquida de alta eficiência	57
4.1.7.1	Seletividade	57
4.1.7.2	Linearidade	58
4.1.7.3	Precisão	59
4.1.7.4	Exatidão	62
4.1.7.5	Robustez	63
4.1.7.6	Limites de detecção e quantificação	64
4.1.8	Determinação do teor de cumarina e ácido o-cumárico na droga vegetal	64
4.2	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO	65
4.2.1	Seleção do líquido extrator e obtenção do extrato hidroalcoólico	65
4.2.2	Caracterização físico-química do extrato hidroalcoólico	66

4.2.3	Co-validação do método de determinação de cumarina e ácido o-cumárico por CLAE	67
4.2.3.1	Seletividade	67
4.2.3.2	Precisão	69
4.2.4	Determinação do perfil cromatográfico em camada delgada.....	70
4.3	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS SECOS... ..	70
4.3.1	Análise termogravimétrica da cumarina e do ácido o-cumárico	70
4.3.2	Secagem por spray drying do extrato hidroalcoólico	71
4.3.3	Co-validação do método de determinação de cumarina e ácido o-cumárico por CLAE	75
4.3.3.1	Seletividade	75
4.3.3.2	Precisão	78
4.3.4	Perfil cromatográfico (CCD) dos extratos obtidos	79
4.3.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	80
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DO EXTRATO SECO	83
5	CONCLUSÕES	87
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

As plantas fazem parte da vida dos seres humanos desde os tempos mais remotos, sendo utilizadas de diversas formas: como alimentos, matéria-prima para vestuário, moradia, usos domésticos, em manifestações culturais e para manter sua saúde e prevenir ou curar doenças (SIMÕES et al.,2004). Os tratamentos da medicina tradicional ou popular que se baseiam na utilização de plantas medicinais vêm funcionando há séculos em países como China, Índia e também no continente africano. Especialmente nos países desenvolvidos observa-se um crescimento notável da indústria de fitoterápicos e, os fitomedicamentos utilizados pela população são oficialmente registrados, assegurando sua qualidade (MULLER; MACEDO, 2005).

O desenvolvimento do controle de qualidade de fármacos, incluindo a identificação e quantificação de compostos químicos tornou possível o surgimento de medicamentos fitoterápicos seguros, eficazes e reprodutíveis. Além disso, os fitoterápicos apresentam algumas vantagens com relação aos medicamentos sintéticos de uso tradicional: apresentam efeitos sinérgicos, como possuem uma complexa composição química as substâncias podem atuar em diversos sítios de ação, normalmente apresentam menores riscos de efeitos colaterais devido as concentrações reduzidas dos compostos ativos e apresentam menores custos de pesquisa (PEDROSA; YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

1.1 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

O Brasil detém cerca de 23% do total das espécies vegetais existentes no planeta (RATES, 2001). Dessa forma, a grande variedade de espécies de plantas, animais e microrganismos existentes no ecossistema brasileiro representa um importante diferencial para o desenvolvimento de medicamentos naturais (SIMÕES et al., 2004).

A fitoterapia é a ciência que estuda a utilização de produtos de origem vegetal com finalidade terapêutica, para prevenir, para atenuar ou para curar um estado patológico (CARVALHO, 2005).

Medicamento fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, sendo caracterizado pelo

conhecimento da espécie vegetal, de sua eficácia e dos riscos do seu uso e também pela sua reprodutibilidade e constância de sua qualidade. O fitoterápico deve ter sua eficácia e segurança validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de documentações científicas ou ensaios clínicos de fase 3 (BRASIL, 2010).

Atualmente cerca de 25% das drogas prescritas no mundo são obtidas direta ou indiretamente de plantas e cerca de 49% das drogas desenvolvidas entre 1981 e 2002 foram obtidas de produtos naturais, ou análogos semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais (KOEHN e CARTER, 2005). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que 50% da população mundial utiliza plantas medicinais para o alívio de dores e, segundo ESTRELA (1995) cerca de 30% as utiliza por indicação médica.

O setor de fitoterápicos vem se mostrando muito promissor e movimenta mundialmente US\$ 21,7 bilhões por ano, representando cerca de 15% do capital da indústria farmacêutica mundial (NIERO, 2010). No Brasil são movimentados cerca de US\$160 milhões e o ritmo de crescimento das vendas é de mais de 15% ao ano, sendo que para os medicamentos sintéticos esse número é de apenas 4% (FEBRAFARMA, 2010).

O crescimento do setor de fitoterápicos vem estimulando pesquisadores e indústrias farmacêuticas internacionais a investir em pesquisa e patenteamento de novas substâncias naturais, bem como em processos para obter drogas padronizadas (BRANDÃO et al., 2006).

O desenvolvimento de fitoterápicos é um processo bastante complexo, que envolve várias áreas de conhecimento, como a botânica, agronomia, ecologia, química, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, biotecnologia, química orgânica, tecnologia farmacêutica, dentre outras (TOLEDO et al., 2003). Para se produzir um produto fitoterápico deve-se primeiramente verificar a ação farmacológica de uma planta medicinal e, posteriormente iniciar o processo que vai desde a qualificação da matéria-prima vegetal, passando pelas operações de transformação até o produto final. A qualidade do extrato utilizado na fabricação de um medicamento fitoterápico se baseia na presença de um ou mais componentes específicos que caracterizam e justificam a atividade farmacológica de cada espécie de planta medicinal. Esses componentes são conhecidos como marcadores e devem ser quantificáveis (GUIMARÃES et al., 2007). Além disso, geralmente a atividade biológica de uma

espécie vegetal não depende apenas de uma substância, mas da interação sinérgica entre os diversos componentes nela presentes (COUTO et al., 2010).

Dentro desse contexto, o Departamento de Assistência Farmacêutica do Ministério da Saúde vem desenvolvendo diversas ações voltadas ao desenvolvimento de cadeias produtivas de plantas medicinais e fitoterápicos. Com isso, pretende-se facilitar e ampliar o acesso dos usuários do Sistema Único de Saúde a serviços e produtos fitoterápicos. A aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos através do Decreto nº 5.813 de 22 de julho de 2006, e da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, prevendo o tratamento com Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS), conforme disposto na portaria nº 971, de 3 de maio de 2006, do Ministério da Saúde, constitui um grande incentivo à Fitoterapia (BRASIL, 2006a e 2006b), o que também reforça a importância de pesquisas com plantas medicinais.

1.2 *Mikania laevigata* Sch.Bip. ex Baker.

Dentro da família Asteraceae várias espécies são consideradas plantas medicinais, sendo inclusive reconhecidas pela Farmacopéia Brasileira. Dentre estas destacamos o gênero *Mikania*, com as espécies *Mikania glomerata* Spreng, *Mikania hirsutissima* DC. e *Mikania laevigata* (BRANDÃO et al., 2008).

A espécie *Mikania laevigata* Sch.Bip. ex Baker., conhecida popularmente como guaco ou guaco-de-cheiro (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2005), é uma planta medicinal brasileira empregada em medicamentos para tosse e distúrbios respiratórios. Trata-se de uma espécie nativa do Brasil, muito utilizada pela população e a tradição do seu uso é proveniente de comunidades indígenas e caboclas (SIMÕES et al., 2004). Devido ao seu grande uso essa espécie está entre as oito que constam na lista de medicamentos fitoterápicos do Elenco de Referência Nacional do Componente Básico da Assistência Farmacêutica, contemplado na Portaria nº2.982 de 26 de novembro de 2009, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2009a). Além disso, faz parte do RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), sendo dessa forma importante que se obtenham mais estudos acerca da mesma (BRASIL, 2009b).

Trata-se de um subarbusto, de caule cilíndrico, folhas opostas de contorno oval e capítulos em forma de glomérulos (GILBERT; FERREIRA; ALVES, 2005). As

folhas são simples, glabras a olho nu, coriáceas e escuras quando secas. Apresentam lâminas ovaladas a ovalado-lanceoladas, venação actinódroma com três nervuras evidentes. Difere da *Mikania glomerata* pelo forte odor da cumarina e pela forma das folhas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2005).

Estudo recente demonstrou que o extrato etanólico de *M. laevigata*, obtido de cultivo hidropônico e tradicional, apresentou efeito alelopático mesmo em baixas concentrações, mas não conseguiu apresentar atividade antimicrobiana significativa para uma série de microrganismos (BARATTO et al., 2008). Em contrapartida, Duarte et al. (2004) destacaram a atividade antibacteriana da *M. laevigata* em *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus faecium* em concentrações similares as do cloranfenicol. Yatsuda et al. (2005) demonstraram atividade dos extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata* para cepas mutantes de *Streptococcus*, mesmo em baixas concentrações dos extratos.

Bighetti et al. (2005) observaram atividade antiulcerogênica do extrato hidroalcoólico bruto e da cumarina isolada de *M. laevigata*. A atividade anti-inflamatória desta espécie foi sugerida em estudo realizado por Suyenaga et al. (2002). Alves et al. (2009) propuseram que o mecanismo para a atividade anti-inflamatória do extrato de *M. laevigata* pode estar relacionado a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias no local da inflamação. Moura et al. (2002) demonstraram atividade broncodilatadora dos extratos de *M. glomerata* em brônquios humanos isolados e em anéis de traquéia de cobaia, sugerindo que essa planta pode ter efeitos benéficos potenciais no tratamento de doenças broncoconstritivas, justificando o uso popular dessa espécie. Graça et al. (2007) demonstraram a eficácia de *M. laevigata* como antiasmático tradicional e sugerem que seu mecanismo de ação em traquéias de ratos pode estar relacionado a mudanças na mobilização de cálcio intracelular e ativação de canais de potássio ativados por cálcio.

Com relação aos aspectos toxicológicos, os extratos fluidos de *M. glomerata* e *M. laevigata* nas doses de 5 a 10 mL/kg não foram capazes de provocar a morte em ratos Wistar machos (GILBERT et al., 2005). Ensaio pré-clínico em roedores do fitoterápico "Biotoss" (composto de mel e extratos de várias plantas, inclusive *M. glomerata*) mostrou baixa toxicidade (CARRASCHI et al, 2000). Segundo Graça et al. (2006) o xarope de *M. laevigata* não apresenta toxicidade no sistema reprodutivo de ratos machos Wistar nas doses testadas de 3,5; 7,0 e 14,0 mg/kg.

Quanto aos constituintes químicos desta espécie, uma prospecção fitoquímica do extrato bruto hidroalcoólico a 70% de *M. laevigata* revelou a presença de cumarinas, terpenos e ácidos orgânicos (BIGHETTI et al., 2005). Pedroso et al. (2008) isolaram siringaldeído desta planta, sendo considerado um dos componentes majoritários do extrato de *M. laevigata*. Os componentes ácido caurenóico, ácido grandiflórico, estigmasterol e friedelina também foram identificados em *M. glomerata* (VENEZIANI; OLIVEIRA, 1999). Rehder, Sartoratto e Rodrigues (2006) encontraram germacreno D nos óleos essenciais das folhas, inflorescências e sementes de *M. glomerata* e *M. laevigata* e nos óleos das sementes encontraram espatulenol, sendo que a cumarina foi detectada somente no óleo essencial da folha de *M. laevigata*. Dentro do gênero já foram descritas as presenças de polifenóis e taninos em *Mikania* spp. e cumarinas em *Mikania glomerata* Spreng (SIMÕES et al., 2004).

Recentemente, um estudo comparativo da composição química de *M. glomerata* e *M. laevigata* determinou que ambas possuem composição química muito semelhante (cumarina, triterpenos/esteróides e heterosídeos flavônicos) e teores de cumarina muito próximos (0,30% para *M. glomerata* e 0,43% para *M. laevigata*). Dessa forma, concluiu-se que as duas espécies podem ser usadas de forma indistinta (BOLINA; GARCIA; DUARTE, 2009).

Segundo a Farmacopéia Brasileira IV (2005), a droga vegetal do guaco é constituída pelas folhas dessecadas, contendo, no mínimo, 0,1% de cumarina (1,2-benzopirona), a qual é considerada o marcador da espécie *M. laevigata*.

A cumarina (Figura 01A) é uma lactona do ácido *o*-hidroxicinâmico (Figura 01B) ou ácido *o*-cumárico, sendo formada a partir da sua lactonização por ação enzimática e pelo calor. A palavra cumarina origina-se do caribenho cumaru, nome dado a árvore. Ocorre como cristais prismáticos, apresenta odor fragrante e sabor ardente, aromático e amargo (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997). As cumarinas livres são solúveis nos alcoóis e nos solventes orgânicos ou nos solventes clorados. As formas heterosídicas são mais solúveis em água e não sublimam ao contrário das formas livres (CUNHA, 2009).

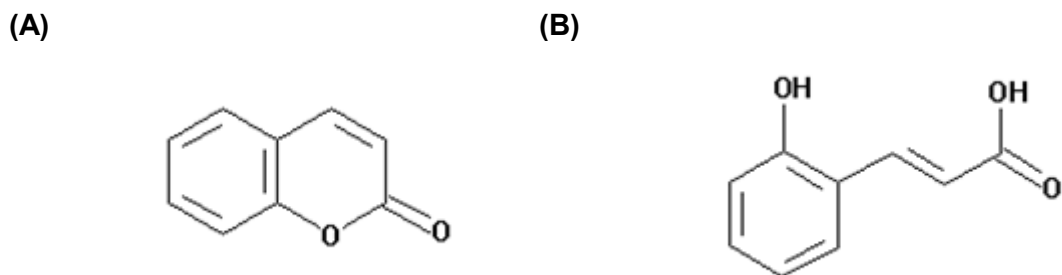


Figura 01: (A): Estrutura química da cumarina (1,2-benzopirona). (B): Estrutura química do ácido o-cumárico (ácido o-hidroxicinâmico). (SIMÕES et al., 2004).

Vários autores atribuem os efeitos farmacológicos do guaco à cumarina ou à possível interação sinérgica com outros componentes da espécie (PEDROSO et al., 2008). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera a cumarina como marcador químico do guaco e através da Instrução Normativa nº5 (BRASIL, 2008) estabelece a dose diária recomendada de cumarina para efeito expectorante e broncodilatador variando de 0,5 a 5 mg. Em um estudo de análises de tinturas a base de *Mikania* sp, Santos, Teodoro e Silva (2010) concluíram que os produtos encontrados no mercado apresentam uma grande variação no teor de cumarina, o que pode interferir significativamente na qualidade do produto final e na atividade terapêutica. Dessa forma, ressalta-se a importância da padronização do teor dessa substância visando a obtenção de medicamentos fitoterápicos seguros e eficazes.

Quanto aos aspectos toxicológicos, efeitos anticoagulantes e hemorrágicos, associados ao dicumarol, não ocorrem com a cumarina. A afirmação de que cumarinas interferem na coagulação sanguínea parece não ter base científica. Em altas doses a cumarina provoca vômitos e diarreia, inibe a inflamação imunológica, mas não inibe a resposta inflamatória aguda (GILBERT; FERREIRA; ALVES, 2005).

1.3 SECAGEM DE EXTRATOS VEGETAIS

Para obtenção de extratos vegetais um dos métodos mais utilizados é a percolação, que também tem demonstrado ser viável para a indústria farmacêutica (VASCONCELOS et al., 2005a). Na percolação ocorre a extração exaustiva das substâncias ativas, sendo assim considerada um processo de esgotamento dos princípios ativos da planta (SIMÕES et al., 2004).

Para a secagem dos extratos obtidos um dos métodos mais utilizados é a nebulização ou *spray drying*, sendo frequentemente necessário o uso de excipientes para reduzir a retenção de umidade (SOUZA et al., 2007). Nesses casos os adjuvantes de secagem mais utilizados são: amido, ciclodextrinas, dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcico, gelatina, goma arábica, lactose, maltodextrina, entre outros (SILVA JUNIOR et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2005b).

O processo de *spray drying* é muito utilizado em todo o mundo na preparação de medicamentos fitoterápicos, tanto para a obtenção de produtos finais ou intermediários, bem como na microencapsulação de óleos essenciais (LIST; SCHMIDT, 1989).

Este processo de secagem envolve três etapas principais: primeiramente o fluido a ser seco é disperso em microgotículas, aumentando sua área superficial. Posteriormente ocorre o contato destas gotículas com uma corrente de ar aquecido e, finalmente, ocorre a evaporação do líquido, restando apenas a partícula sólida, a qual normalmente apresenta o mesmo tamanho e formato da gotícula que a originou (MASTERS, 1985; RANKELL et al., 2001).

Todos os equipamentos *spray dryer* possuem uma estrutura básica composta por: distribuidor de alimentação, aspersor, fornecedor de ar quente, câmara de secagem, separador sólido-gás e sistema de coleta do produto final. No mercado existem diferentes tipos de *spray dryer*, sendo que a escolha do mesmo depende do tipo de extrato a ser seco e do que se pretende para o produto final (MASTERS, 1985).

Os aspersores estão relacionados ao tamanho da gotícula que será formada e, conseqüentemente, ao tamanho e distribuição das partículas do produto final. Existem três tipos básicos de aspersores: de pressão, pneumáticos e de disco giratório, sendo os pneumáticos os mais utilizados (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Atualmente os equipamentos *spray dryer* não apenas transformam um líquido em um pó, mas podem ser usados para produção de partículas com tamanhos e estruturas específicas (MUJUMDAR; HUANG, 2007), fato importante em se tratando de processos industriais que dependem dessa uniformidade de tamanho e de forma das partículas.

Segundo Aulton (2002) e Masters (1985), o processo de secagem por *spray drying* apresenta diversas vantagens: o processo é contínuo, sendo possível a mudança de condições de operação sem interrupção; possui rapidez e rendimento;

é possível ser empregado na secagem de produtos termossensíveis, pois o tempo de contato com altas temperaturas é curto; normalmente as partículas formadas apresentam tamanhos e formatos uniformes, sendo possível o controle destes parâmetros através da manipulação das condições operacionais; os custos do processo são relativamente baixos e, além disso, pode-se selecionar o equipamento adequado de acordo com o que se pretende para o produto final. Existem também alguns tipos de equipamentos que permitem a utilização de um sistema fechado, utilizando-se um gás inerte para reduzir possíveis reações do produto com ar atmosférico durante o processo de secagem.

Atualmente, vem sendo desenvolvidos diversos trabalhos abordando a secagem de extratos vegetais *por spray dryer*, sendo obtidos extratos secos por aspersão para *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek (espinheira-santa) (SOARES, 2002; CARVALHO, 1997); *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (marcela) (TEIXEIRA et al., 1996; DE PAULA et al., 1998); soja (GEORGETTI et al., 2008); *Rhamnus purshiana* (cáscara sagrada) (GALLO et al., 2011); *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira da praia) (VASCONCELOS et al., 2005b); *Symphytum officinale* L. (confrei) (SILVA JUNIOR et al., 2006); *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra) (SOUZA et al., 2006a); *Bauhinia forficata* Link (pata-de-vaca) (SOUZA et al., 2006b), entre outras espécies.

Os extratos secos vegetais devem ser padronizados, o que assegura a uniformidade de teor dos ativos em cada dose, além de terem um maior período de estabilidade (SHARAPIN, 2000). O fitoterápico padronizado é o que apresenta teor conhecido dos princípios ativos e segue critérios estabelecidos para a planta medicinal em questão (VILEGAS; CARDOSO, 2007). A padronização do processo de obtenção de extratos vegetais melhora o rendimento da operação, assegura a alta qualidade do produto final e a eficácia e segurança do medicamento natural (VASCONCELOS et al., 2005a).

Extratos secos vegetais padronizados são muito usados como matéria-prima para a produção de comprimidos (SOARES et al., 2005) ou como produto intermediário na obtenção de outras formas farmacêuticas sólidas e semi-sólidas, assegurando a presença da quantidade ideal de princípio ativo natural em cada dose a ser administrada.

Nesse contexto, este trabalho pretende desenvolver metodologias para a obtenção de extratos secos padronizados da espécie *Mikania laevigata*, a fim de se

obter uma matéria-prima de qualidade para ser utilizada para a produção de formas farmacêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção de extratos secos padronizados das folhas de *M. laevigata*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção do pó das folhas de guaco;
- Caracterização do pó obtido: análise granulométrica, teor de voláteis, identificação dos marcadores (CCD) e teores de cumarina e ácido o-cumárico por CLAE;
- Extração dos princípios ativos do guaco pelo método de percolação;
- Caracterização do extrato hidroalcoólico: determinação do pH, densidade relativa, teor alcoólico, teor de sólidos totais, viscosidade, determinação do perfil cromatográfico (CCD) e teores de cumarina e ácido o-cumárico;
- Secagem do extrato obtido utilizando-se o processo de nebulização (*spray drying*);
- Avaliação da influência dos parâmetros de secagem no rendimento do processo e na porcentagem de degradação dos marcadores;
- Caracterização dos extratos secos: teor de voláteis, atividade de água, determinação do perfil cromatográfico (CCD), teores de cumarina e ácido o-cumárico e análise por microscopia eletrônica de varredura;
- Validação do método de quantificação por CLAE de cumarina e ácido o-cumárico para a droga vegetal, extrato hidroalcoólico e extratos secos.
- Investigação da atividade antiulcerogênica do extrato seco padronizado obtido.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL

As folhas de *Mikania laevigata* foram coletadas no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás no mês de abril de 2010. As coordenadas geográficas do local de coleta obtidas por GPS foram altitude 768 m; latitude 16°40'33" Sul; longitude 49°14'39" Oeste. A planta foi identificada pelo Professor Dr. José Realino de Paula do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFG. A confirmação da espécie vegetal foi realizada através de comparações de suas características macroscópicas com descrições da Farmacopéia Brasileira IV (2005) e do perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada conforme será descrito no item 3.1.5.

Os folhos foram secos em estufa de ar circulante (Solab Equipamentos para Laboratório Ltda, Piracicaba, SP, Brasil) a 40°C, por cerca de 48 horas e posteriormente trituradas em moinho de facas para a obtenção da droga vegetal. O pó obtido foi acondicionado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e umidade.

3.1.1 Análise granulométrica

Para a análise granulométrica, 20 g da droga vegetal foram submetidos à passagem através de tamises com abertura de malhas de 106, 150, 250, 300, 355 e 710 μm , usando vibrador de tamizes (Bertel Ltda, Caieiras, SP, Brasil), durante 20 minutos. Após tamisação, os materiais foram recolhidos e pesados individualmente. Foi avaliada a distribuição granulométrica de três determinações. O tamanho das partículas foi avaliado pela quantificação percentual de retenção do pó das folhas de guaco e o diâmetro médio de partícula foi determinado segundo a Farmacopéia Brasileira V (2010).

3.1.2 Determinação do teor de voláteis

A determinação do teor de voláteis na droga vegetal foi realizada utilizando uma balança para análise de umidade com lâmpada de halogênio (Ohaus – MB35,

Florham Park, USA), sendo os ensaios realizados em triplicata com amostras de aproximadamente 1g.

3.1.3 Determinação do índice de intumescência

Foi determinado o índice de intumescência através da diferença de volume de aproximadamente 1 g da droga vegetal antes e após o contato com 25 mL de etanol 80%(v/v), etanol 50%(v/v) e água. Colocou-se a droga vegetal em proveta com tampa esmerilhada em contato com o solvente e agitou-se a cada 10 minutos por uma hora, deixando-se posteriormente em repouso por três horas. Cada teste foi realizado em triplicata (FARMACOPÉIA BRASILEIRA V, 2010).

3.1.4 Teste qualitativo para resinas

Extraiu-se 1 g da droga vegetal com 15 mL de etanol absoluto, etanol 50%(v/v), 60%(v/v), 70%(v/v) e 80%(v/v). Agitou-se e ferveu-se por 3 minutos. Filtrou-se e adicionou-se 5 mL de água. Observou-se a turvação (MATOS, 1988).

3.1.5 Determinação do perfil cromatográfico em camada delgada (CCD)

Foi realizada CCD com a solução extrativa das folhas de *M. laevigata* obtida extraíndo-se 0,1 g da droga vegetal com 25 ml de etanol 80%(v/v), sob refluxo a uma temperatura de 80°C durante 15 minutos. Utilizou-se cumarina (0,1 mg/mL) e ácido o-cumárico (1 mg/mL) (Sigma, St. Louis, USA) como substâncias de referência. Cerca de 20 µL da solução da amostra e 10 µL das soluções dos padrões foram aplicados em cromatoplasmas de alumínio impregnadas com sílica F254nm (Merck, Darmstadt, Alemanha). A fase móvel consistiu de uma mistura de tolueno:éter (1:1) saturado com 10% de ácido acético e o revelador foi uma solução etanólica de hidróxido de potássio 10% (WAGNER; BLADT, 2001). Observou-se sob luz UV (365 nm).

3.1.6 Desenvolvimento do método analítico para quantificação do teor de cumarina e ácido o-cumárico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

3.1.6.1 Padrão e reagentes

Para as análises quantitativas foram utilizados padrão de cumarina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e ácido o-cumárico (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), álcool etílico P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), ácido acético glacial P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), água ultrapura Milli-Q (Millipore, Massachusetts, USA), acetonitrila grau HPLC (Burdick & Jackson, Michigan, USA e J.T.Baker, New Jersey, USA) e metanol grau HPLC (J.T.Baker)

3.1.6.2 Investigação do método de extração

Primeiramente utilizou-se o método de extração proposto pela Farmacopéia Brasileira IV (2005). Foram realizadas sucessivas extrações de 0,1 g da droga vegetal com 10 mL e 7 mL (2 vezes) de etanol 50%, em banho-maria, sob refluxo a 80°C. Todos os extratos obtidos foram reunidos em balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com etanol 50%. Em uma nova extração com 10 ml de etanol 50% dessa mesma droga vegetal verificou-se por CLAE que este método não extraiu completamente os marcadores da droga vegetal. Por isso, iniciou-se a investigação do método de extração utilizando-se a mesma quantidade de pó, porém testando diferentes tipos e volumes de solventes, bem como outros métodos.

As condições testadas estão demonstradas no Quadro 01 e as amostras foram quantificadas por CLAE utilizando o sistema cromatográfico descrito no item a seguir.

Teste	Solvente	Massa da droga vegetal	Método
1	Clorofórmio	0,1 g	Três extrações em ultrassom por 15 minutos, utilizando 20 mL de solvente nas duas primeiras e 10 mL na terceira. Completou-se o volume para 50 mL com o mesmo solvente. Pipetou-se volumetricamente 5 mL e concentrou-se até a secura, ressuspendeu-se com 1 mL de etanol P.A.
2	Etanol P.A.	0,1 g	Três extrações em ultrassom por 15 minutos, utilizando 20 mL de solvente nas duas primeiras e 10 mL na terceira. Completou-se o volume para 50 mL com o mesmo solvente.
3	Etanol P.A.	0,1 g	Igual ao método 2, mas utilizou-se refluxo a 80°C.

Quadro 01: Descrição dos métodos avaliados para definição do processo extrativo a partir da droga vegetal de *M. laevigata*.

3.1.6.3 Sistema cromatográfico

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters (Massachusetts, USA) equipado com bomba quaternária, módulo de separação e2695, detector de arranjo de diodos (PDA) 2998 e sistema de processamento de dados Empower 2.0. Utilizou-se coluna cromatográfica X Terra[®] RP18, 5 μ , 4.6 x 150 mm (Waters, Massachusetts, USA). Todas as amostras foram filtradas em membrana de 0,45 μ m Millex[®] (Millipore, Massachusetts, USA) e a fase móvel em membrana em PVDF de 0,45 μ m (Millipore).

Os parâmetros de adequabilidade do sistema: fator de cauda (T), resolução (Rs) e número de pratos teóricos (N) foram avaliados conforme especificações da Food and Drug Administration (1994).

3.1.6.4 Determinação das condições cromatográficas

Primeiramente utilizou-se o método da Farmacopéia Brasileira IV (2005) para doseamento da cumarina por CLAE. A fase móvel proposta era uma mistura de metanol e água (47:53), fluxo da fase móvel 0,5 mL/min, modo isocrático, volume de injeção 10 μ L e comprimento de onda 275 nm.

O método desenvolvido por Santos (2005) foi também investigado para quantificação de cumarina e ácido o-cumárico. O método consistia de fase móvel composta por acetonitrila: água acidificada (solução de ácido acético 0,01% em água ultrapura) (20:80), fluxo da fase móvel 1,2 mL/min, modo isocrático,

temperatura do forno 35°C, volume de injeção 20 µL e comprimento de onda 275 nm. Para uma melhor separação dos picos da amostra foram realizadas várias tentativas de ajuste dessas condições.

3.1.7 Validação do método analítico para quantificação de cumarina e ácido o-cumárico por cromatografia líquida de alta eficiência

O método utilizado foi validado de acordo com as especificações da RE 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). Os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação.

3.1.7.1 Seletividade

Foi avaliada através da análise dos cromatogramas de varredura (200 a 500 nm) da solução amostra a 100% da concentração definida no método, das soluções padrão na concentração de 10 µg/mL e do solvente utilizado (etanol P.A.), obtidos por meio de detector de arranjo de diodos (PDA).

3.1.7.2 Linearidade e intervalo

Foi preparada uma solução mãe de cumarina na concentração aproximada de 1 mg/mL e, a partir desta foram preparadas três curvas padrão nas concentrações aproximadas de 5, 20, 40, 80 e 160 µg/mL. Para o ácido o-cumárico foi preparada uma solução mãe na concentração aproximada de 0,2 mg/mL e, a partir dela três curvas padrão nas concentrações aproximadas de 1,5, 5, 10, 20, 40 µg/mL. Todas essas soluções foram preparadas em etanol P.A. Foram plotados gráficos relacionando a concentração dos padrões e a área média dos picos correspondentes. A linearidade foi avaliada pelos coeficientes de correlação obtidos na regressão linear de cada curva padrão média e determinou-se o intervalo linear.

3.1.7.3 Precisão

A precisão foi avaliada nos níveis de repetibilidade e precisão intermediária. Para cada nível avaliado, preparou-se amostras em três concentrações diferentes, 80, 100 e 120%, pesando-se aproximadamente 0,08, 0,1 e 1,2 g da droga vegetal e submetendo-a ao método analítico desenvolvido. Cada concentração foi avaliada em triplicata. A repetibilidade foi calculada por meio do coeficiente de variação (Equação 01) entre os 9 resultados das análises realizadas em um mesmo dia e por um mesmo analista. A precisão intermediária foi avaliada pelo coeficiente de variação entre os 18 resultados das análises realizadas em dois dias diferentes e por analistas diferentes.

$$CV(\%) = \frac{DP}{\bar{x}} \times 100 \quad (01)$$

Onde: DP = Desvio padrão dos teores obtidos;

\bar{x} = Média dos teores

3.1.7.4 Exatidão

Foi avaliada por meio do teste de recuperação do padrão. Foram preparadas amostras da droga vegetal a 80, 100 e 120% da concentração definida no método e padrões na concentração de aproximadamente 40 µg/mL. Para quantificação foram preparados *vials* contendo 500 µL de amostra e 500 µL de etanol P.A. ou 500 µL de amostra e 250 µL de cada padrão nas concentrações exatas de 11,8726 µg/mL para a cumarina e 11,1359 µg/mL para o ácido o-cumárico. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada concentração. A exatidão foi calculada de acordo com a equação (02), onde a concentração teórica corresponde à concentração do padrão adicionado e a concentração média experimental corresponde à concentração recuperada do padrão calculada através da diferença entre as áreas dos picos das amostras adicionadas de padrão e sem adição de padrão.

$$Exatid\ o\ (\%) = \frac{Concentra\ o\ m\ dia\ experimental}{Concentra\ o\ te\ rica} \times 100 \quad (02)$$

3.1.7.5 Robustez

A robustez foi avaliada submetendo-se o método à pequenas e deliberadas alterações nos parâmetros analíticos e comparando-se os resultados obtidos com o de amostras processadas nas condições do método original, por meio do coeficiente de variação (CV). Os parâmetros avaliados foram comprimento de onda de leitura (λ) e temperatura do forno ($^{\circ}\text{C}$) (Quadro 02).

Parâmetro	Original	Condição	
		1	2
λ	275	273	277
$^{\circ}\text{C}$	30	32	-

Quadro 02: Variações nas condições cromatográficas do método de quantificação de cumarina e ácido o-cumárico por CLAE.

3.1.7.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidos a partir de três curvas padrão (obtidas na linearidade – item 3.1.7.2), utilizando-se as equações (03) e (04), respectivamente.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (03)$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (04)$$

Onde: DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas padrão;

IC = inclinação da curva padrão média.

3.1.8 Determinação do teor de cumarina e ácido o-cumárico na droga vegetal

A determinação do teor de cumarina e ácido o-cumárico foi realizada em triplicata, utilizando o método de extração, sistema e método cromatográfico descritos nos itens 3.1.6.2, 3.1.6.3 e 3.1.6.4, respectivamente.

Os cálculos foram realizados utilizando a equação (05).

$$\text{Teor (\%)} = \frac{\text{Ca} \times \text{FD} \times 100}{\text{ma}} \quad (05)$$

Onde: Ca = concentração da amostra obtida pela equação da reta da curva padrão (mg/mL);

FD = fator de diluição da amostra;

ma = massa da amostra (mg).

3.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO (EH)

Foram realizados testes piloto utilizando etanol 50 e 80% (Chemis, São Paulo, SP, Brasil) como líquido extrator na percolação de 50 gramas da droga vegetal. A percolação foi realizada a temperatura ambiente com um gotejamento de 5 gotas por minuto, até o esgotamento da droga, monitorado por CCD (item 3.1.5). O percolado obtido foi concentrado por rotaevaporação a 40°C até atingir a proporção droga:solvente de 1:4.

Após a escolha do líquido extrator mais apropriado (através do teor de cumarina e ácido o-cumárico), 1 Kg da droga foi submetido previamente à uma maceração em ultrassom por 30 minutos e depois por mais 48 horas à temperatura ambiente. Iniciou-se a percolação nas mesmas condições do teste piloto, até o esgotamento do marcador, monitorado por CCD. O percolado foi concentrado até a proporção droga:solvente de 1:4 e armazenado em frascos de vidro âmbar, sob refrigeração (4°C), para posterior caracterização e produção do extrato seco.

3.2.1 Determinação do teor de sólidos totais (St)

Para a determinação do teor de sólidos totais (St) no extrato hidroalcoólico foi utilizada uma balança para análise de umidade com lâmpada de halogênio (Ohaus - MB35, Florham Park, USA), sendo realizada em triplicata com amostras de aproximadamente 1 mL. O valor obtido para teor de voláteis foi subtraído de 100%, resultando em teor de sólidos totais.

3.2.2 Determinação do teor alcoólico

O teor alcoólico dos extratos obtidos foi determinado utilizando-se o método de destilação segundo a Farmacopéia Brasileira IV (1988) com modificações. Para o extrato etanólico obtido utilizando-se etanol 50% foi determinado o teor alcoólico através do método 1 para líquidos com menos de 30% de álcool e para os extratos obtidos utilizando-se o etanol 80% foi determinado através do método 2 para líquidos com mais de 30% de álcool:

Método 1 - transferiu-se, volumetricamente, para aparelho destilador adequado, 25 mL do líquido no qual o álcool estava sendo determinado e anotou-se a temperatura na qual o volume foi medido. Juntou-se igual quantidade de água e destilou-se coletando-se volume do destilado até obter-se 23 mL de destilado. Ajustou-se a temperatura do destilado àquela em que foi medida a amostra e juntou-se água destilada até obter-se 25 mL. Misturou-se. Determinou-se a densidade do líquido a 25°C utilizando-se picnômetro. Com o resultado avaliou-se a porcentagem, em volume, de C_2H_5OH contido no líquido examinado, pela Tabela Alcoométrica.

Método 2 - transferiu-se, volumetricamente, para aparelho destilador adequado, 25 mL do líquido no qual o álcool estava sendo determinado e anotou-se a temperatura na qual o volume foi medido. Juntou-se 50 mL de água e destilou-se coletando-se volume do destilado até obter-se 48 mL de destilado. Ajustou-se a temperatura do destilado aquela em que foi medida a amostra e juntou-se água destilada até obter-se 50 mL. Misturou-se. Determinou-se a densidade do líquido a 25°C utilizando-se picnômetro. Com o resultado avaliou-se a porcentagem, em volume, de C_2H_5OH contido no líquido examinado, pela Tabela Alcoométrica.

3.2.3 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa foi determinada pelo método do picnômetro (FARMACOPÉIA BRASILEIRA V, 2010), pesando-se o picnômetro vazio, o mesmo contendo a amostra a 20°C e contendo água destilada a 20 °C. A densidade relativa corresponde à relação entre a massa da amostra e a massa da água contida no picnômetro, conforme representado pela equação (06):

$$Densidade \left(g / cm^3 \right) = \frac{(ma_2 - mv)}{(ma_1 - mv)} \quad (06)$$

Onde: ma_1 = massa do picnômetro + água

ma_2 = massa do picnômetro + amostra

mv = massa do picnômetro vazio

3.2.4 Determinação da viscosidade

A determinação da viscosidade foi realizada em triplicata utilizando um viscosímetro modelo DV-III+ (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Massachusetts, USA), utilizando spindle LV1, velocidade de 120 rpm, torque de 11,2%, à uma temperatura de 25,2°C.

3.2.5 Determinação do pH

Foi realizada em potenciômetro (modelo PHS 3B – LABMETER, Copenhagen, Denmark) previamente calibrado com soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA V, 2010).

3.2.6 Determinação do teor de cumarina e ácido o-cumárico por CLAE

3.2.6.1 Método analítico

Transferiu-se 0,5 mL do extrato hidroalcoólico para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com etanol P.A. Esta amostra foi então submetida à análise por CLAE utilizando o sistema cromatográfico descrito no item 3.1.6.3 e o método cromatográfico descrito no item 3.1.6.4. A determinação do teor de cumarina (TC) e ácido o-cumárico (ToC) nos extratos hidroalcoólicos foram realizadas em triplicata.

Os cálculos foram realizados utilizando a equação (05) (item 3.1.8), onde a massa da amostra correspondeu à massa de sólidos totais presente em 0,5 mL do extrato.

3.2.6.2 Co-validação do método analítico

Foi realizada uma co-validação do método desenvolvido para doseamento de cumarina e ácido o-cumárico na droga vegetal para verificar sua adequação à análise do extrato hidroalcoólico. Foram avaliados os parâmetros seletividade (item 3.1.7.1) e precisão.

A precisão foi avaliada apenas no nível repetibilidade, onde se procedeu a análise em sextuplicata da amostra a 100%, conforme método descrito no item 3.2.6.1 e em seguida calculou-se o coeficiente de variação entre os teores obtidos.

3.2.7 Determinação do perfil cromatográfico (CCD)

A determinação do perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico foi realizada segundo item 3.1.5, com o intuito de comparar o perfil cromatográfico da droga vegetal e do extrato hidroalcoólico obtido. Cerca de 5 µL do extrato hidroalcoólico foi aplicado em bandas na placa cromatográfica.

3.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS SECOS (ES)

Para a obtenção dos extratos secos foi empregado um *spray dryer* de escala laboratorial modelo MSD 1.0 (Labmaq do Brasil Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil) com regime de fluxo co-corrente, equipado com: sistema de alimentação de extrato, composto por uma bomba peristáltica e um atomizador pneumático; soprador circular para fornecimento do ar de secagem, aquecido eletricamente e com temperatura regulada por um termostato digital do tipo PID; câmara de secagem cilíndrica de vidro borossilicato com 160 mm de diâmetro e 645 mm de comprimento; ciclone de aço inoxidável; e frasco coletor de vidro.

3.3.1 Análise termogravimétrica da cumarina e do ácido o-cumárico

Amostras sólidas de padrões de cumarina de 11,92 mg e de ácido o-cumárico de 6,58 mg foram utilizadas para a determinação das curvas termogravimétricas (curva TG).

As análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (IQ – UFG), utilizando-se equipamento SHIMADZU® (modelo DTG-60H). As condições operacionais foram: cadinho de platina, razão de aquecimento de 10°C/min, no intervalo de 26,69 a 601,7°C para a cumarina e 44,72 a 601,73°C para o ácido o-cumárico, em atmosfera de ar sintético, com fluxo de 50 mL/min.

As curvas de perda de massa foram feitas empregando-se o software Origin Pro 8.

3.3.2 Secagem por *spray drying* do extrato hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico foi submetido a vários processos de secagem por *spray drying* para a observação do comportamento do mesmo frente a parâmetros como pressão do ar de aspersão (Paa), vazão do ar de aspersão (Vaa), vazão do ar de secagem (Vas), vazão de alimentação do extrato (Ve), temperatura de entrada (Te) do sistema e diâmetro do bico atomizador (Db). Inicialmente realizou-se a secagem sem o emprego de adjuvantes de secagem. Sequencialmente foram empregados diferentes adjuvantes de secagem em diferentes proporções (Quadro 03).

Utilizou-se em todas as secagens Paa de 60 psi, Vaa de 35 L/min, Vas de 1,0 m³/min, Te de 90°C e Db de 1,2 mm. Variou-se o parâmetro Ve, sendo utilizadas vazões de 2 mL/min, 4 mL/min e 6 mL/min.

Os critérios utilizados para a posterior padronização das condições de secagem foram as características físicas dos extratos obtidos, o teor de cumarina e ácido o-cumárico, o teor de voláteis, a atividade de água e o rendimento do processo de secagem.

Experimento	As	% As	Ve (mL/min)
1.1	Sem adjuvante	-	2
1.2	Sem adjuvante	-	4
1.3	Sem adjuvante	-	6
2.1	Dióxido de silício coloidal	15%	6
2.2	Dióxido de silício coloidal	15%	2
2.3	Dióxido de silício coloidal	30%	2
2.4	Dióxido de silício coloidal	30%	6
3.1	Celulose microcristalina	15%	2
3.2	Celulose microcristalina	15%	6
3.3	Celulose microcristalina	30%	2
3.4	Celulose microcristalina	30%	6
4.1	Maltodextrina	15%	2
5.1	Manitol	15%	2
6.1	Lactose	15%	2
6.2	Lactose	15%	6

Quadro 03: Experimentos realizados para padronização da secagem do extrato de *M. laevigata*. **As:** adjuvante de secagem, **%As:** proporção do adjuvante de secagem e **Ve:** vazão de alimentação do extrato.

Os extratos secos obtidos foram acondicionados à temperatura ambiente, em frascos de vidro âmbar com tampa e mantidos em dessecador afim de minimizar possíveis alterações nesse material, como aglomeração provocada pela absorção de água e oxidação.

3.3.3 Determinação do perfil cromatográfico (CCD)

A determinação do perfil cromatográfico do extrato seco foi realizada segundo método descrito no item 3.1.5, com o intuito de comparar o perfil cromatográfico da droga vegetal e do extrato seco obtido. Pesou-se em torno de 50 mg do extrato seco e solubilizou-se em 50 mL de etanol P.A. Aplicou-se cerca de 20 µL desta solução em bandas na placa cromatográfica.

3.3.4 Determinação do teor de cumarina e ácido o-cumárico por CLAE

3.3.4.1 Método analítico

Pesou-se cerca de 50 mg de cada extrato, transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, solubilizou-se em etanol P.A. com auxílio do ultrassom e completou-se o volume com o mesmo solvente. Esta amostra foi submetida à análise por CLAE utilizando o sistema cromatográfico descrito no item 3.1.6.3 e o método cromatográfico descrito no item 3.1.6.4. A determinação do teor de cumarina (TC) e de ácido o-cumárico (ToC) nos extratos secos foi realizada em triplicata.

Os cálculos foram realizados utilizando a equação (05) (item 3.1.8).

3.3.4.2 Co-validação do método analítico

Foi realizada uma co-validação do método desenvolvido para doseamento de cumarina e ácido o-cumárico na droga vegetal para verificar sua adequação à análise dos extratos secos. Foram avaliados os parâmetros seletividade (item 3.1.7.1) e precisão.

A precisão foi avaliada no nível repetibilidade, onde se procedeu a análise em sextuplicata da amostra, conforme método descrito no item 3.3.4.1 e em seguida calculou-se o coeficiente de variação entre os teores obtidos.

3.3.5 Porcentagem de degradação

A porcentagem de degradação (%d) foi calculada pela equação (07) para degradação em relação à cumarina e (08) para degradação em relação ao ácido o-cumárico.

$$\%d = 100 - (TC\ ES / TC\ EH) \times 100 \quad (07)$$

$$\%d = 100 - (ToC\ ES / ToC\ EH) \times 100 \quad (08)$$

Onde: TC ES = teor de cumarina no extrato seco;

TC EH = teor de cumarina no extrato hidroalcoólico;

ToC ES = teor de ácido o-cumárico no extrato seco;

ToC EH = teor de ácido o-cumárico no extrato hidroalcoólico.

3.3.6 Rendimento do processo

O rendimento do processo (R_p) foi obtido como a porcentagem de recuperação dos sólidos adicionados ao sistema, pesando-se o frasco coletor vazio e após o processo de secagem (equação 09).

$$R_p = \frac{(mf - mi) \times 100}{(ma \times Tst/100) + mas} \quad (09)$$

Onde: mf = Massa do frasco coletor contendo o extrato seco;

mi = Massa do frasco coletor vazio;

ma = Massa do extrato hidroalcoólico adicionado ao sistema;

Tst = Teor de sólidos totais;

mas = Massa do adjuvante de secagem adicionado.

3.3.7 Teor de voláteis

A determinação do teor de voláteis foi realizada em balança para análise de umidade com lâmpada de halogênio (Ohaus modelo MB35, Florham Park, USA), sendo os ensaios realizados em triplicata com amostras de aproximadamente 0,5 g.

3.3.8 Atividade de água

A atividade de água foi determinada em triplicata utilizando aparelho Testo 650 (Testo, AG, Alemanha).

3.3.9 Seleção da condição de secagem para produção do extrato seco padronizado

Os indicadores de qualidade avaliados para a escolha do método de secagem foram: teor de cumarina (TC), teor de ácido *o*-cumárico (ToC), porcentagem de degradação (%d), rendimento do processo (R_p), teor de voláteis (T_v) e atividade de água (A_a).

3.3.10 Microscopia eletrônica de varredura

Foram analisados três extratos secos (um obtido sem excipiente, outro obtido com dióxido de silício coloidal e outro obtido com celulose microcristalina) por microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo essas análises realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LAMMAR) do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF – UFG). Primeiramente as amostras foram delicadamente depositadas sobre a superfície de *stubs* recobertos com fita de carbono e depois esse material foi levado a um sistema para deposição de filmes de ouro (Denton Vacuum, Desk V). As amostras foram então analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging), as imagens foram obtidas e o tamanho de algumas partículas foi determinado para efeito de comparação entre os extratos secos.

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DO EXTRATO SECO

3.4.1 Fármacos

Indometacina (Indocid – Merck Sharp & Dohme) e ranitidina (Antak – Glaxosmithkline).

3.4.2 Animais

Os animais utilizados foram camundongos albinos tipo Swiss, machos, pesando entre 20 e 50 g, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Goiás. Eles foram mantidos em condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com água e ração *ad libitum* e passaram por um período de adaptação no laboratório de pelo menos 72 horas antes dos experimentos.

Esse experimento foi desenvolvido seguindo normas que discorrem sobre cuidados com animais de laboratório (CIOMS, 1985) sendo seguidas todas as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) depois de devida aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, protocolo nº 104/08.

O experimento foi realizado no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais (LFPN), no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

3.4.3 Lesões gástricas induzidas por indometacina

A metodologia utilizada para avaliação da atividade antiulcerogênica foi descrita por Djahanguiri (1969). Foram utilizados grupos experimentais de 6 a 9 camundongos, os quais foram mantidos em jejum de 18 horas com solução de glicose a 5% *ad libitum*. O veículo (água filtrada mais tween 80, 10 mL/kg) foi administrado por gavagem, assim como o ES nas doses de 250, 500, 1000 e 2000 mg/Kg e a ranitidina 50 mg/Kg foi utilizada como controle positivo. Foi avaliada também a atividade antiulcerogênica do adjuvante empregado no processo de secagem do extrato. Para isto, seguiu-se o mesmo protocolo descrito anteriormente, porém administrou-se dióxido de silício coloidal nas doses de 180, 260 e 360mg/Kg de peso corporal. Uma hora após estes tratamentos foi administrado indometacina 50 mg/Kg (s.c.). Após 3 horas foi realizado novo tratamento com veículo, ES e ranitidina por gavagem (nas mesmas doses anteriores). Após mais 3 horas os animais foram sacrificados sob anestesia etérea. Os abdomens foram abertos, os estômagos localizados, removidos, abertos ao longo da pequena curvatura, seus conteúdos foram desprezados e a mucosa lavada, delicadamente, com salina. Os estômagos foram mantidos em béquer com salina gelada até a inspeção em microscópio estereoscópio.

O índice de lesão e o número de úlceras foram determinados segundo protocolo pré-estabelecido conforme tabela proposta por Macaúbas et al. (1988). Foi utilizado um índice de ulceração que considera o edema de mucosa, hemorragias, intensidade de ulceração e número total de úlceras e petéquias por cm² da mucosa gástrica. Foram atribuídos pontos relativos às lesões e a sua soma reflete a intensidade da lesão da mucosa, compondo o índice de lesão (Quadro 04).

Tipo de lesão	Pontuação atribuída
descoloração da mucosa	1 ponto
edema	1 ponto
hemorragias	1 ponto
perda de pregas da mucosa	1 ponto
cada 10 petéquias	2 pontos
úlceras ou erosões de até 1 mm	n° X 2 pontos
úlceras ou erosões maiores de 1 mm	n° X 3 pontos
úlceras perfuradas	n° X 4 pontos

Quadro 04: Pontuação atribuída às lesões para a composição do índice de lesão. N° refere-se ao número de úlceras encontradas (MACAÚBAS et al., 1988).

3.4.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias em valores percentuais relativos ao grupo veículo ou controle negativo. As diferenças entre os grupos foram detectadas pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste Student-Newman-Keuls.

As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (SOKAL; ROHLF, 1981).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F.; ALVES, V.B.F.; ASSIS, I.P.; NAPIMOGA, J.T.C.; BUCEK, E.U.; SECCO, D.D.; CUNHA, F.Q.; REHDER, V.L.G.; NAPIMOGA, M.H. Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.61, p.1097-1104, 2009.

AULTON, M. E. **Pharmaceutics**: The Science of Dosage Form Design. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2001.

AULTON, M. E. **Pharmaceutics**: The Science of Dosage Form Design. 2 ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 2002, p. 388-390.

AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2 ed. São Paulo: Artmed, 2005, p.678.

BARATTO, L.; LANG, K.L.; VANZ, D.C.; REGINATTO, F.H.; OLIVEIRA, J.B.; FALKENBERG, M. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.577-582, 2008.

BIGHETTI, A.E.; ANT NIO, M.A.; KOHN, L.K.; REHDER, V.L.G.; FOGLIO, M.A.; POSSENTI, A.; VILELA, L.; CARVALHO, J.E. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, v.12, p.72-77, 2005.

BOLINA, R.C.; GARCIA, E.F.; DUARTE, M.G.R. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1B, p. 294-298, 2009.

BRANDÃO, M. G. L.; GOMES, C. G.; NASCIMENTO, A. M. Plantas nativas da medicina tradicional brasileira: uso atual e necessidade de proteção. **Revista Fitos: Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Fitoterápicos**, v.2, n.3, p.24-29, 2006.

BRANDÃO, M.G.L.; ZANETTI, N.N.S.; OLIVEIRA, G.R.R.; GOULART, L.O.; MONTE-MOR, R.L.M. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p.127-134, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006- Dispõe sobre política nacional de práticas integrativas e complementares no Sistema Único de Saúde**. Brasília, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 5.813, de 22 de julho de 2006- **Dispõe sobre política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº05, de 11 de dezembro de 2008 – **Determina a publicação da lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado**. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº2.982, de 26 de novembro de 2009 – **Aprova as normas de execução e de financiamento da Assistência Farmacêutica na Atenção Básica**. Brasília, 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), 2009**. Disponível em: <www.saude.gov.br/renisus>. Acesso em: 27 maio 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº14, de 31 de março de 2010 - **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. Brasília, 2010.

CAMELO, S. R. P. **Estudos de pré-formulação e formulação de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy**. 2010. 166 p. Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 2010.

CARRASCHI, L.; ZAUPA, C.; CAMPOS, E.J.V.; BORGES, J.O.; USHIROBIRA, T.M.A.; MARQUES, L.C. Estudo toxicológico pré-clínico agudo e sub-agudo do produto Biotoss em roedores. In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. Recife, Pernambuco. **Resumo TO004**, 2000. 98 p.

CARVALHO, E. L. S. **Desenvolvimento de produtos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek** – Celastraceae (espinheira-santa), 1997. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

CARVALHO, J.C.T. **Formulário Médico-Farmacêutico de Fitoterapia**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2005. 402 p.

CIOMS. International guiding principles for biomedical research involving animals. In: SMITH, J. A.; BOYD, K. M. (Ed). **Lives in balance**. New York: Oxford University Press, 1985.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994, Vol. II.

COSTA, A.F. **Farmacognosia experimental**. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000, Vol. III.

COSTA, I. M. **Estudo de pré-formulação com o composto polifenólico quercetina**. 2005. 198 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

COUTO, A. G.; VITORINO, J. C.; SILVA, R. M. L. Tecnologia e garantia da qualidade de fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2010, cap. 10, p. 241-308.

CRAIG, C; STITZEL, R.E. **Farmacologia Moderna com Aplicações Clínicas**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, 294p.

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica: Cumarinas**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, p.226-231, 2009.

DA SILVA, F.A. **Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de Ilex paraguariensis A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate)**. 2007. 243 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DE CAMPOS, A. M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de Ilex paraguariensis St. Hill. Aquifoliaceae (erva-mate)**. 1996. 149 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

DE PAULA, I. C.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V. L., PETROVICK, P. R. Development of ointment formulations prepared with *Achyrocline satureioides* spray-dried extracts. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 235-241, 1998.

DE SOUZA, K. C. B. **Desenvolvimento de metodologia analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* forma flavicarpa**. 1997. 156 p. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Porto Alegre, 1997.

DE SOUZA K. C. B.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. The adjuvants Aerosil 200 and Gelita-Sol-P influence on the technological characteristics of spraydried powders from *Passiflora edulis* var. flavicarpa. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.26, p. 331-336, 2000.

DJAHANGUIRI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 4, p. 265, 1969.

DO AMARAL, M. P. H. et al. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2B, p.607-611, 2009.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P.M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, supl.01, p.06-08, 2004.

ESTRELA, E. **Tratado de Cooperacion Amazonica** – Secretaria Protempore, Plantas medicinales Amazônicas: Realidad y Perspectivas, Lima: TCA, 1995.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 3rd ed. - Supplement 2001. Council of Europe, Strasbourg, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed., Parte II. São Paulo: Atheneu, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

FEBRAFARMA – www.febrafarma.org.br. Acessada em: maio de 2010.

GALLO, L.; LLABOT, J.M.; ALLEMANDI, D.; BUCALÁ, V.; PIÑA, J. Influence of spray drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. **Powder Technology**, v.208, p.205-214, 2011.

GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P.; FONSECA, M.J.V. Spray Drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v.41, p.1521-1527, 2008.

GILBERT, B.; FERREIRA, J.L.P.; ALVES, L.F. **Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas**. FIOCRUZ. Curitiba, Brasil: Abifito, 2005.

GRAÇA, C.; FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; DALSENTER, P.R.; MARQUES, M.C.A. *Mikania Laevigata* syrup does not induce side effects on reproductive system of male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.29-32, 2006.

GRAÇA, C.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; RATTMANN, Y.D.; SOUZA, L.M.; CIPRIANI, T.R.; SASSAKI, G.L.; RIECK, L.; PONTAROLO, R.; SANTOS, J.E.S.; MARQUES, M.C.A. *In vivo* assessment of safety and mechanisms underlying *in vitro* relaxation induced by *Mikania Laevigata* Schultz Bip. Ex Baker in the rat trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p.430-439, 2007.

GUIMARÃES, E. C. B. T.; RODRIGUES, C. R.; DIAS, L. R. S.; DORNELAS, C. B.; CASTRO, H. C.; CABRAL, L. M.; SANTOS, T. C. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para o controle químico da qualidade de fitoterápicos à base de extratos secos de alcachofra. **Revista Fitos: Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Fitoterápicos**, v.3, n.2, p.64-77, 2007.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206-20, 2005.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**. Boston: CRC Press, 1989, 374 p.

MACAÚBAS, C. I. P.; OLIVEIRA, M. G. M.; FORMIGONI, M. L. O. S.; SILVEIRA FILHO, N. G.; CARLINI, E. A. Estudo da eventual ação anti-úlceras gástrica do bálsamo (*Sedum sp.*), folha-da-fortuna (*Bryophyllum calycinum*), couve (*Brassica oleraceae*) e da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) em ratos. In: **Estudo da ação anti-úlceras gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “Espinheira-santa” e outras)**, Central de medicamentos CEME, Ministério da Saúde, 1988, p. 05-20.

MACEDO, E. V. Extração de Matérias-Primas vegetais. In: Nikolai Sharapin. (Org.). **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Bogotá: Convenio Andrés Bello - CAB, 2000, p. 27-62, v.1.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**. 4. ed. Londres: George Godwin, 1985.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1988.

MOURA, R.S.; COSTA, S.S.; JANSEN, J.M.; SILVA, C.A.; LOPES, C.S.; BERNARDO FILHO, M.; SILVA, V.N.; CRIDDLE, D.N.; PORTELA, B.N.; RUBENICH, L.M.S.; ARAÚJO, R.G.; CARVALHO, L.C.R.M. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea pig trachea. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p.249-256, 2002.

MUJUMDAR, A. S.; HUANG, L. X. Global R&D Needs in Drying. **Drying Technology**, v. 25, p. 647–658, 2007.

MULLER, A. C.; MACEDO, M. F. Patentes de fitomedicamentos: como garantir o compartilhamento dos benefícios de P&D e do uso sustentável de recursos genéticos. **Revista Fitos**, v.1, n.2, p.19-24, 2005.

NIERO, R. Fármacos, fitofármacos e fitoterápicos: abordagem econômica e de mercado. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2010, cap.1, p.1-15.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p. 641-650, 2010.

PEDROSO, A.P.D.; SANTOS, S.C.; STEIL, A.A.; DESCHAMPS, F.; BARISON, A.; CAMPOS, F.; BIAVATTI, M.W. Isolation of syringaldehyde from *Mikania laevigata* medicinal extract and its influence on the fatty acid profile of mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p.63-69, 2008.

PEDROSA, R.C.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, n.1, p.147-152, 2001.

RANKELL, A. S.; LIEBERMAN, H. A., SCHIFFMAN, R. F. **Secagem**. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica, vol. 1. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001, p. 83-112.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p.603-13, 2001.

REHDER, V.L.G.; SARTORATTO, A.; RODRIGUES, M.V.N. Essential oils composition from leaves, inflorescences and seeds of *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker and *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n.esp., p.116-118, 2006.

Reviewer Guidance, **Validation of Chromatographic Methods**, Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, 1994.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997.

SANTOS, S. C. **Caracterização Cromatográfica de Extratos Mediciniais de Guaco: *Mikania laevigata* Schultz Bip ex Baker e *M. glomerata* Sprengel e Ação de *M. laevigata* na Inflamação Alérgica Pulmonar**. 2005. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

SANTOS, F.R.; TEODORO, L.L.I.; SILVA, M.M. **Determinação do teor de cumarina em tinturas de guaco (*Mikania* sp.)** 2010. 42 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Fitoterapia) – Curso de Pós-Graduação em Fitoterapia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

SENNA, E. L.; PETROVICK, P. R.; ORTEGA, G. G.; BASSANI, V. L. Preparation and characterization of spray-dried powders from *Achyrocline satureioides* (Lam.) Dc extracts. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 123-127, 1997.

SHARAPIN, N. (org.) **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Santafé de Bogotá – Colômbia: CYTED, 2000.

SHAW F. V. Spray drying as an alternative granulation technique. In: Parikj DM. **Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology**. Nova York: Marcel Dekker, 1997, p. 75-96.

SILVA JÚNIOR, J.O.C; VIEIRA. J.L.F; BARBOSA, W.L.R.; PEREIRA, N.L. Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.671-677, 2006.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

SOARES, L. A. L. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek – Celastraceae**. 2002. 285 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SOARES, L. A. L.; ORTEGA, G. G., PETROVICK, P. R.; SCHMITH, P. C. Dry granulation and compression of spray-dried plant extracts. **AAPS PharmSciTech**, v.6, n. 3, p. E359-E366, 2005.

SOKAL, R. R.; ROHLF, J. F. **Biometry**; the principles and practice of statistics in biological research. San Francisco: Freeman & Company. 1981.

SOUZA,T.P.; GÓMEZ-AMOZA, J.L.; MARTÍNEZ PACHECO, R.; PETROVICK, P.R. Compression behavior of formulations from *Phyllanthus niruri* spray dried extract. **Pharmazie**, v. 61, p. 213-217, 2006a.

SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Powder properties and system behavior during spray drying of *Bauhinia forficata* Link extract. **Drying Technology**, v. 24, p. 735-749, 2006b.

SOUZA, T. P; PACHECO, R.M; AMOZA, J. L. G; PETROVICK, P. R. Eudragit E as excipient for production of granules and tablets from *Phyllanthus niruri* L spray-dried extract. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 2, p. E1-E7, 2007.

SUYENAGA, E.S.; RECHE, E.; FARIAS, F.M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; CHAVES, C.G.M.; HENRIQUES, A.T. Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. **Phytotherapy Research**, v.16, p.519-523, 2002.

TEIXEIRA, H. F. **Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (LAM) DC. Compositae – Marcela**. 1996. 146p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

TOLEDO, A.C.O.; HIRATA, L.L.; BUFFON, M.C.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v.21, n.1/2, p.7-13, 2003.

VASCONCELOS, E.A.F.; BARBOSA, R.M.; MEDEIROS, M.G.F.; MOURA, T.F.A.L. Influência do processo extrativo, solvente e tamanho da partícula do material vegetal no teor de sólidos totais da solução extrativa da *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Fitos**, v.1, n.1, p. 74-79. 2005a.

VASCONCELOS, E.A.F.; MEDEIROS, M.G.F.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p. 243-249. 2005b.

VENEZIANI, R.C.S.; OLIVEIRA, D.C.R. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.27, p.99-102, 1999.

VILEGAS,W.; CARDOSO,C.A.L. Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Univali, 2007, cap.7, p.157-182.

YATSUDA, R.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; MURATA, R.M.; REHDER, V.L.G.; MELO, L.V.; KOO, H. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p. 183-189, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas**. 2nd ed. Berlin: Springer, 2001.

ZÉTOLA, M.; DE LIMA, T. C. M.; SONAGLIO, D.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G.; LIMBERGUER, R. P.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* - Verbenaceae (Brazilian *false melissa*). **Journal of Ethnopharmacology**, v.82, p. 207-215, 2002.