



Ezequiane Machado da Silva Oliveira

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO
PADRONIZADO DE *Vernonanthura ferruginea* (LESS.) H. ROB.,
ASTERACEAE (ASSA-PEIXE)**

Goiânia/GO

2011



Ezequiane Machado da Silva Oliveira

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO
PADRONIZADO DE *Vernonanthura ferruginea* (LESS.) H. ROB.,
ASTERACEAE (ASSA-PEIXE)**

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. Dra. 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**

O482o Oliveira, Ezequiane Machado Silva.
Obtenção e caracterização do extrato seco padronizado de
Vernonanthura ferruginea (Less.) H. Rob., Asteraceae.
[manuscrito] / Ezequiane Machado da Silva Oliveira. - 2011.
102 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. Plantas medicinais. 2. Lupeol. 3. Fitoterápico. 4. Controle de qualidade. 5. Spray drying. 6. Gastroproteção. I. Título.

CDU:633.88

Dedico este trabalho, com gratidão, às três pessoas que mais amo: Meus pais Ezequias e Leila, que me ensinaram não só a determinação em buscar meus sonhos, mas sobretudo que esta busca deve ser feita sob os preceitos de justiça, humanidade e solidariedade; E meu esposo Erlis, que dia após dia, me proporcionou o carinho, a compreensão e o apoio necessário para que eu nunca desanimasse.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN/FF/UFG), que fizeram do nosso ambiente de trabalho o melhor possível, favorecendo a troca de experiências e o desenvolvimento de nossas pesquisas. Especialmente aos amigos Mariana Viana Pinto, Renê Oliveira do Couto, Frederico Severino Martins e Annylore Lima Rosa, por toda a ajuda e companheirismo.

À Prof^a. Dra. Maria Teresa Freitas Bara pela orientação, paciência, amizade e conhecimentos repassados.

Ao Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição pela co-orientação, apoio, confiança e preocupação com o nosso crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. José Realino de Paula pelo compartilhamento de conhecimentos e sugestões tão úteis na execução deste trabalho.

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

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

Ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (RMN/IQ/UFG), na pessoa do Prof. Dr. Luciano Morais Lião, pelo ensaio de RMN do produto isolado.

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 do extrato seco padronizado.

Aos professores componentes das bancas de avaliação pela atenção dispensada e contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

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

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

“Viva como se fosse morrer amanhã e aprenda como se fosse viver para sempre”.

Mahatma Gandhi

RESUMO

Vernonanthura ferruginea (Less.) H. Rob. (Asteraceae), planta típica do cerrado brasileiro, conhecida popularmente como assa-peixe, demonstrou atividade analgésica, antiedematogênica, antioxidante e antiulcerogênica em estudos científicos. Porém, na literatura consultada não existem trabalhos relacionados à produção de extratos secos desta espécie vegetal. A obtenção de extratos secos padronizados de *V. ferruginea*, por meio da técnica de *spray drying* iniciou-se pela obtenção e caracterização do material de partida (pó das folhas da planta) e a partir deste, obteve-se o extrato hidroalcoólico pelo método de percolação usando como líquido extrator etanol a 95% (v/v). Os experimentos de secagem foram conduzidos seguindo um planejamento fatorial do tipo $2^3 + 2$ a fim de investigar as influências de alguns parâmetros envolvidos no processo, e. g. fluxo de alimentação de extrato, temperatura de entrada do ar de secagem e proporção de adjuvante de secagem nas propriedades dos extratos secos obtidos, tais como rendimento do processo, umidade residual, atividade de água, teor de triterpenos totais e teor de lupeol. O lupeol, triterpeno relacionado à diversas atividades farmacológicas (antiinflamatória, antitumoral, antiulcerogênica, etc), foi isolado pela primeira vez nesta espécie e selecionado como marcador químico de todas as etapas do processo. Para tanto, foi validado um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) seguindo os parâmetros e critérios de aceitação propostos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o qual provou ser seletivo, linear, sensível, preciso, exato e robusto. Na caracterização do pó das folhas, foi realizada prospecção fitoquímica preliminar onde foi constatada a presença de taninos, flavonóides, triterpenos, saponinas, resinas e mucilagens. Foram verificados teores de voláteis, triterpenos totais e lupeol que apresentaram valores de $8,25 \pm 0,57\%$, $2,49 \pm 0,16\%$ e $0,17 \pm 0,01\%$, respectivamente, além de tamanho médio de partículas de $398,97 \pm 6,91 \mu\text{m}$. O extrato hidroalcoólico apresentou densidade $0,8364 \pm 0,0015 \text{ g/mL}$, resíduo seco de $6,70 \pm 0,19\%$, pH $5,81 \pm 0,05$, teor alcoólico de $87,08 \pm 0,80\%$ e viscosidade de $4,93 \pm 0,0416 \text{ mPas}$. Ainda foram obtidos teores de triterpenos totais e lupeol de $22,57 \pm 0,94\%$ e $4,31 \pm 0,01\%$, respectivamente. Os rendimentos de secagem variaram de 10,47 a 30,82%, sendo que em todos os produtos secos, foram observados teores de voláteis e atividade de água abaixo de 5% e 0,5, respectivamente. Análises de Variância (ANOVA) demonstraram que todos os fatores e algumas de suas interações afetaram significativamente o teor de triterpenos totais e o teor de lupeol no pó, sendo que a condição selecionada para ser empregada na obtenção de extratos secos padronizados de assa-peixe com propriedades físico-químicas adequadas foi aquela realizada com maior proporção de dióxido de silício coloidal (20%), menor vazão de extrato de alimentação (4mL/min) e menor temperatura do ar de secagem (80°C), na qual obteve-se teores de triterpenos totais e lupeol de $7,65 \pm 0,27\%$ e $2,47 \pm 0,04\%$, respectivamente. O extrato seco obtido nestas condições apresentou alta proporção de partículas esféricas e a sua atividade antiulcerogênica no modelo de úlceras induzidas por indometacina foi comprovada. A comparação do perfil cromatográfico (CCD) do pó, do extrato hidroalcoólico e do extrato seco demonstrou que a extração hidroalcoólica foi seletiva para a extração de lupeol em relação a outros terpenos majoritários e o processo de secagem não ocasionou alterações no perfil químico do extrato em relação a estas substâncias. Assim, a técnica de *spray drying* pode ser uma

alternativa atrativa e promissora para o desenvolvimento de fitoterápicos de *V. ferruginea*.

Palavras chave: Fitoterápico. Lupeol. Controle de qualidade. *Spray drying*. Gastroproteção.

ABSTRACT

Vernonanthura ferruginea (Less.) H. Rob. (Asteraceae), a typical plant of the Brazilian savannah, popularly known as *assa-peixe*, presented analgesic, antiedematogenic, antioxidant and antiulcer activities in scientific studies. But in literature there are no works related to the production of dried extracts of this plant species. In this work, standardized spray-dried extracts of *V. ferruginea* were obtained. The work started with the obtainment and characterization powder of the leaves of the *V. ferruginea*. A hydroalcoholic extract was obtained by percolation using as solvent ethanol 95 % (v/v). The drying experiments followed a $2^3 + 2$ factorial design. The influence of several in-process parameters e. g. extract feed rate, drying air inlet temperature and drying adjuvant ratio, on the dried extracts properties were investigated. The properties investigated were process yield, residual moisture, water activity, total triterpenes content and lupeol content. The lupeol, triterpene related to several pharmacological activities (anti-inflammatory, anticancer, antiulcer, etc), was first time isolated in this species and was used as chemical marker in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) quantification assays in all steps of this work. In this way an analytical methodology was validated following Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA – Brazilian National Health Surveillance Agency) guidelines. This methodology proved to be selective, linear, sensible, precise, accurate and robust. On the herbal raw material characterization, preliminary phytochemical screening was performed, which confirmed the presence of tannins, flavonoids, triterpenes, saponins, resins and mucilage. Was also observed a mean powder size of $398.97 \pm 6.91 \mu\text{m}$, as well as moisture, total triterpenes and lupeol contents of $8.25 \pm 0.57\%$, $2.49 \pm 0.16\%$ and $0.17 \pm 0.01\%$, respectively. The concentrated hydroalcoholic extract presented density of $0.8364 \pm 0.0015 \text{ g/mL}$, solids content of $6.70 \pm 0.19\%$, pH 5.81 ± 0.05 , alcoholic content of $87.08 \pm 0.80\%$ and a viscosity of $4.93 \pm 0.0416 \text{ mPas}$. The levels of total triterpenes and lupeol contents were 22.57 ± 0.94 and $4.31 \pm 0.01\%$, respectively. Results showed drying yields ranging from 10.47 to 30.82%. Also, all dried products showed moisture contents and water activities below 5% and 0.5, respectively. Analysis of variance (ANOVAs) proved that all factors and some of their interactions significantly affected the levels of total triterpenes and lupeol contents. Moreover, the selected condition for obtaining dry extracts of *V. ferruginea* with adequate physicochemical properties is the one performed with the higher colloidal silicon dioxide ratio (20%), the lower extract feed rate (4mL/min) and the lower drying air inlet temperature (80°C), in which it was obtained levels of total triterpenes and lupeol contents of $7.65 \pm 0.27\%$ and $2.47 \pm 0.04\%$, respectively. The dry extract obtained in this condition show high content of spherical particles and its antiulcer activitie in model of ulcer induced by indomethacin was proved. Comparison of powder, hydroalcoholic and dry extract chromatographic (TLC) show that the hydroalcoholic extraction was selective for the extraction of lupeol against other major terpenes and the drying process did not cause changes in the chemical profile of the extract with respect to these substances. Thus, the spray drying can be an attractive e and promising alternative for the development of *V. ferruginea* phytomedicines.

Keywords: Phytomedicines. Lupeol. Quality control. Spray drying. Gastroprotection.

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Sumário de algumas espécies do gênero <i>Vernonia</i> descritas na literatura com atividade biológica.....	22
Quadro 02: Prospecção fitoquímica do pó das folhas de <i>V. ferruginea</i>	29
Quadro 03: Ensaio de adequação da extração e do tempo de reação do método de quantificação de triterpenos totais no pó de <i>V. ferruginea</i>	33
Quadro 04: Descrição dos parâmetros avaliados para definição do processo extrativo à partir do pó das folhas de <i>V. ferruginea</i>	35
Quadro 05: Condições avaliadas para a definição do método cromatográfico de quantificação de lupeol em <i>V. ferruginea</i>	37
Quadro 06: Variações nas condições cromatográficas do método de quantificação do lupeol por CLAE.....	39
Quadro 07: Condições iniciais de obtenção do extrato seco de <i>V. ferruginea</i>	44
Quadro 08: Fatores codificados e seus níveis no planejamento fatorial $2^3 + 2$ para obtenção do extrato seco de <i>V. ferruginea</i>	46
Quadro 09: Experimentos realizados para obtenção dos extratos secos de <i>V. ferruginea</i>	46
Quadro 10: Pontuação atribuída às lesões para a composição do índice de lesão.....	51
Quadro 11: Componentes químicos identificados nas folhas de <i>V. ferruginea</i>	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: <i>V. ferruginea</i> (Less.) H. Rob.....	23
Figura 02: Estrutura química do Lup-20(29)-en-3 β -ol (Lupeol).....	24
Figura 03: Fluxograma de isolamento do lupeol de folhas de <i>V. ferruginea</i>	32
Figura 04: <i>V. ferruginea</i> (HMA – Goiânia – GO).....	52
Figura 05: Folhas de <i>V. ferruginea</i>	52
Figura 06: Perfil cromatográfico das folhas de <i>V. ferruginea</i> . P: lupeol; EBM: extrato bruto metanólico; e FH: fração hexânica do EBM.....	54
Figura 07: Fluxograma dos resultados do isolamento do lupeol de folhas de <i>V. ferruginea</i>	56
Figura 08: Espectro de IV do lupeol isolado das folhas de <i>V. ferruginea</i>	57
Figura 09: Espectro de RMN ¹ H do lupeol isolado das folhas de <i>V. ferruginea</i>	57
Figura 10: Distribuição do tamanho das partículas do pó das folhas de <i>V. ferruginea</i>	58
Figura 11: Curva de calibração do lupeol padrão para doseamento de triterpenos totais.....	59
Figura 12: (a):Cromatograma do pó das folhas extraído com metanol; (b): Cromatograma do pó das folhas extraído com metanol e fracionado com hexano, (c): Cromatograma do pó das folhas extraído com hexano.....	61
Figura 13: Cromatogramas do lupeol padrão (a) e do pó das folhas de <i>V. ferruginea</i> (b) utilizando o método de extração ME-VII e as condições cromatográficas definidas no método MC-X).....	62
Figura 14: Cromatogramas de varredura na faixa de 190 a 400nm do padrão de lupeol (a), do pó das folhas (b) e do solvente acetonitrila (c).....	63
Figura 15: Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico coletado no início (EH1) e próximo ao final da percolação (EH2) e lupeol padrão (P).....	69
Figura 16: Cromatograma de varredura na faixa 190 a 400nm do extrato hidroalcoólico de <i>V. ferruginea</i>	72
Figura 17: Cromatograma a 210nm do extrato hidroalcoólico de <i>V. ferruginea</i>	72

Figura 18: Perfil cromatográfico de <i>V. ferruginea</i> . P: lupeol padrão; EHex: extrato hexânico do pó das folhas; EH: extrato hidroalcoólico após partição com hexano; e ES: extrato seco solubilizado em hexano.....	73
Figura 19: Superfície de resposta do teor de triterpenos totais em função da proporção de adjuvante de secagem e temperatura de entrada do ar de secagem.....	78
Figura 20: Superfície de resposta do teor de triterpenos totais em função da proporção de adjuvante de secagem e vazão do extrato de alimentação.....	78
Figura 21: Superfície de resposta do teor de triterpenos totais em função da temperatura de entrada do ar de secagem e vazão do extrato de alimentação.....	78
Figura 22: Superfície de resposta do teor de lupeol em função da temperatura de entrada do ar de secagem e vazão do extrato de alimentação.....	79
Figura 23: Superfície de resposta do teor de lupeol em função da proporção de adjuvante de secagem e temperatura de entrada do ar de secagem.....	79
Figura 24: Superfície de resposta do teor de lupeol em função da proporção de adjuvante de secagem e vazão do extrato de alimentação.....	80
Figura 25: Comparação da degradação de lupeol em extratos secos sem a adição de adjuvante de secagem e com a adição de dióxido de silício coloidal nas proporções de 10, 15 e 20%.....	81
Figura 26: Comparação da degradação de triterpenos totais em extratos secos sem a adição de adjuvante de secagem e com a adição de dióxido de silício coloidal nas proporções de 10, 15 e 20%.....	81
Figura 27: Cromatograma de varredura na faixa 190 a 400nm do extrato seco (E2) de <i>V. ferruginea</i>	85
Figura 28: Cromatograma a 210nm do extrato seco de <i>V. ferruginea</i>	85
Figura 29: Fotomicrografias em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) do extrato seco padronizado de <i>V. ferruginea</i>	86
Figura 30: Redução no número de úlceras induzidas por indometacina em camundongos tratados com extrato seco de <i>V. ferruginea</i>	88
Figura 31: Redução no índice de lesões induzidas por indometacina em camundongos tratados com extrato seco de <i>V. ferruginea</i>	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Adequação do volume de solvente e tempo de reação do método de determinação do teor de triterpenos totais no pó de <i>V. ferruginea</i>	59
Tabela 02: Quantificação por CLAE do teor de lupeol no pó das folhas de <i>V. ferruginea</i> submetido a diferentes métodos extrativos.....	60
Tabela 03: Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos para os cromatogramas do pó das folhas de <i>V. ferruginea</i> e padrão de lupeol.....	63
Tabela 04: Áreas dos picos do padrão de lupeol obtidas na construção da curva de calibração.....	64
Tabela 05: Repetibilidade (Precisão intracorrída) do método analítico para doseamento de lupeol nas folhas de <i>V. ferruginea</i>	65
Tabela 06: Precisão intermediária (Precisão intercorrída) do método analítico para doseamento de lupeol nas folhas de <i>V. ferruginea</i>	66
Tabela 07: Resultados da recuperação do padrão de lupeol adicionado à amostra das folhas de <i>V. ferruginea</i>	66
Tabela 08: Resultados da robustez do método analítico para doseamento de lupeol nas folhas de <i>V. ferruginea</i>	67
Tabela 09: Resultados dos ensaios físico-químicos dos ensaios piloto de percolação utilizando diferentes líquidos extratores	68
Tabela 10: Características físico-química do extrato hidroalcoólico concentrado de <i>V. ferruginea</i>	70
Tabela 11: Resultados de precisão do método de determinação do lupeol no extrato hidroalcoólico de <i>V. ferruginea</i>	72
Tabela 12: Resultados da caracterização dos extratos secos de <i>V. ferruginea</i> obtidos nos experimentos preliminares de secagem por <i>spray drying</i>	74
Tabela 13: Características físico-químicas dos extratos secos de <i>V. ferruginea</i> obtidos por <i>spray drying</i> no planejamento fatorial 2 ³	76
Tabela 14: Significâncias (<i>p</i>) dos efeitos dos fatores estudados sobre as propriedades dos extratos secos de <i>V. ferruginea</i> (ANOVA/MSR) obtidos por <i>spray drying</i> no planejamento fatorial 2 ³	77
Tabela 15: Caracterização do extrato seco sem adição de adjuvantes de secagem.....	81
Tabela 16: Teores de triterpenos totais e lupeol encontrados nos diferentes estágios de produção do extrato seco padronizado (E2).....	82

Tabela 17: Resultados de precisão do método de determinação do lupeol no extrato seco de *V. ferruginea*.....85

Tabela 18: Número de úlceras induzidas por indometacina em camundongos tratados com extrato seco de *V. ferruginea* (E2).....88

Tabela 19: Índices de lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos tratados com extrato seco de *V. ferruginea* (E2).....88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- Aa:** Atividade de água
- As:** Tipo do adjuvante de secagem
- As%:** Proporção do adjuvante de secagem
- D₅₀:** Diâmetro médio das partículas
- EBE:** Extrato etanólico
- EBM:** Extrato metanólico
- EFS:** Extração em fase sólida
- EH:** Extrato hidroalcoólico
- ES:** extrato seco
- FH:** Fração hexânica
- FM:** Fase móvel
- IE:** Índice de espuma
- II:** Índice de intumescência
- PID:** Controle proporcional, integral e derivativo
- PVDF:** Fluoreto de polivinilideno
- Rp:** Rendimento do processo
- Rs:** Resolução
- Sf:** Sub-fração
- Ssf:** Sub-sub-fração
- Vaa:** Vazão do ar de aspersão
- Vas:** Vazão do ar de secagem
- Ve:** Vazão do extrato
- VGLM:** *Visual General Linear Model*

SUMÁRIO

	RESUMO	06
	ABSTRACT	08
	LISTA DE QUADROS	09
	LISTA DE FIGURAS	10
	LISTA DE TABELAS	12
	LISTA DE SIGLAS	14
1	INTRODUÇÃO	19
1.1	PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS	19
1.2	<i>Vernonanthura ferruginea</i> (LESS.) H. ROB.	22
1.3	TRITERPENOS E LUPEOL	24
1.4	EXTRATOS SECOS PADRONIZADOS E A QUALIDADE DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS	25
2	OBJETIVOS	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PÓ DAS FOLHAS DE <i>V.</i> <i>ferruginea</i>	28
3.1.1	Caracterização fitoquímica do pó das folhas	28
3.1.1.1	<i>Prospecção fitoquímica</i>	28
3.1.1.2	<i>Caracterização preliminar dos triterpenos</i>	29
3.1.1.3	<i>Isolamento e Identificação do lupeol</i>	31
3.1.1.3.1	Preparo das amostras	31
3.1.1.3.2	Cromatografia em coluna	30
3.1.2	Determinação da distribuição granulométrica	31
3.1.3	Determinação do teor de voláteis	32
3.1.4	Desenvolvimento do método analítico para quantificação do teor de triterpenos totais por espectrofotometria no UV-Vis	33
3.1.5	Determinação do teor de triterpenos totais	34
3.1.6	Desenvolvimento de método analítico para quantificação de lupeol por cromatografia líquida de alta eficiência	34
3.1.6.1	<i>Padrão e reagentes</i>	34
3.1.6.2	<i>Investigação do método de extração.....</i>	34
3.1.6.3	<i>Sistema cromatográfico</i>	36

3.1.6.4	<i>Determinação das condições cromatográficas</i>	36
3.1.7	Validação do método analítico para quantificação de lupeol por cromatografia líquida de alta eficiência	37
3.1.7.1	<i>Seletividade</i>	37
3.1.7.2	<i>Linearidade</i>	38
3.1.7.3	<i>Precisão</i>	38
3.1.7.4	<i>Exatidão</i>	39
3.1.7.5	<i>Robustez</i>	39
3.1.7.6	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	40
3.1.8	Determinação do teor de lupeol no pó das folhas de <i>V. ferruginea</i>	40
3.2	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO	40
3.2.1	Determinação do teor de resíduo seco	41
3.2.2	Determinação do teor alcoólico	41
3.2.3	Determinação da densidade relativa	41
3.2.4	Determinação da viscosidade	42
3.2.5	Determinação do pH	42
3.2.6	Determinação do perfil cromatográfico (CCD)	42
3.2.7	Determinação do teor de triterpenos totais por espectrofotometria UV-Vis	42
3.2.8	Determinação do teor de lupeol por CLAE	42
3.2.8.1	<i>Método analítico</i>	42
3.2.8.2	<i>Co-validação do método analítico</i>	43
3.3	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS SECOS	43
3.3.1	Avaliação preliminar das condições de secagem e seleção do adjuvante de secagem	44
3.3.2	Avaliação da influência dos parâmetros de secagem na obtenção dos extratos secos	45
3.3.3	Determinação do perfil cromatográfico (CCD)	47
3.3.4	Seleção das condições de secagem para obtenção do extrato seco padronizado	47
3.3.5	Determinação do teor de triterpenos totais por espectrofotometria UV-Vis	47

3.3.6	Determinação do teor de lupeol por CLAE	47
3.3.6.1	<i>Método analítico</i>	47
3.3.6.2	<i>Co-validação do método analítico</i>	48
3.3.7	Porcentagem de degradação	48
3.3.8	Rendimento do processo	48
3.3.9	Umidade residual	49
3.3.10	Atividade de água	49
3.3.11	Microscopia eletrônica de varredura do extrato seco padronizado	49
3.3.12	Atividade antiulcerogênica do extrato seco padronizado	49
3.3.12.1	<i>Fármacos</i>	49
3.3.12.2	<i>Animais</i>	49
3.3.12.3	<i>Lesões gástricas induzidas por indometacina</i>	50
3.3.12.4	<i>Análise estatística</i>	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PÓ DAS FOLHAS DE <i>V. ferruginea</i>	52
4.1.1	Caracterização macroscópica das folhas	52
4.1.2	Caracterização fitoquímica do pó	53
4.1.2.1	<i>Prospecção fitoquímica</i>	53
4.1.2.2	<i>Caracterização preliminar dos triterpenos por reação qualitativa, CCD e CLAE</i>	54
4.1.2.3	<i>Isolamento e Identificação do lupeol</i>	55
4.1.3	Determinação da distribuição granulométrica	57
4.1.4	Determinação do teor de voláteis	58
4.1.5	Determinação do teor de triterpenos totais por espectrofotometria UV-Vis	58
4.1.6	Determinação do teor de lupeol por CLAE	60
4.1.6.1	<i>Desenvolvimento de método analítico para quantificação de lupeol por cromatografia líquida de alta eficiência</i>	60
4.1.6.1.1	<i>Seleção do método de extração</i>	60
4.1.6.1.2	<i>Condições cromatográficas e adequabilidade do sistema</i>	62
4.1.6.2	<i>Validação do método analítico para quantificação de lupeol por cromatografia líquida de alta eficiência</i>	63

4.1.6.2.1	Seletividade	63
4.1.6.2.2	Linearidade	64
4.1.6.2.3	Precisão	65
4.1.6.2.4	Exatidão	65
4.1.6.2.5	Robustez	67
4.1.6.2.6	Limites de detecção e quantificação	67
4.1.6.3	<i>Determinação do teor de lupeol</i>	67
4.2	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO	68
4.2.1	Seleção líquido extrator e obtenção do extrato hidroalcoólico	68
4.2.2	Perfil cromatográfico	69
4.2.3	Caracterização físico-química do extrato hidroalcoólico	69
4.2.4	Co-validação do método de determinação de lupeol por CLAE ...	71
4.2.4.1	<i>Seletividade</i>	71
4.2.4.2	<i>Precisão</i>	72
4.3	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO	73
4.3.1	Perfil cromatográfico (CCD) do extrato seco	73
4.3.2	Ensaio preliminares de obtenção dos extratos secos	73
4.3.3	Avaliação da influência dos parâmetros de secagem na obtenção dos extratos secos	75
4.3.4	Seleção das condições de secagem para obtenção do extrato seco padronizado	83
4.3.5	Co-validação do método de determinação de lupeol por CLAE ...	84
4.3.5.1	<i>Seletividade</i>	84
4.3.5.2	<i>Precisão</i>	85
4.3.6	Microscopia eletrônica de varredura do extrato seco padronizado	86
4.3.7	Atividade antiulcerogênica do extrato seco padronizado	86
5	CONCLUSÕES	90
	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos, observa-se na cultura popular a utilização de plantas medicinais, mesmo sem o conhecimento prévio de seus constituintes químicos, mas sim pelos efeitos terapêuticos que estas produzem (FILHO; YUNES, 1998; MACIEL; PINTO; VEIGA JÚNIOR, 2002). A seleção de plantas, a partir de informações da medicina tradicional ou popular, pode conduzir a descoberta de moléculas promissoras com ação terapêutica (AGRA; FRANÇA; BARBOSA FILHO, 2007). Contudo a transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico (TOLEDO et al., 2003).

As potencialidades de uso das plantas medicinais encontram-se longe de estar esgotadas, afirmação endossada pelos novos paradigmas de desenvolvimento social e econômico baseados nos recursos renováveis. Novos conhecimentos e novas necessidades certamente encontrarão, no reino vegetal, soluções, por meio da descoberta e do desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica ou com aplicações tanto na tecnologia farmacêutica quanto no desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficiência de ação (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003).

1.1 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial, com destaque para as plantas superiores, as quais correspondem a 24% da biodiversidade, além disso, possui uma rica diversidade étnica e cultural que representa um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, tendo o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (BRASIL, 2006). Contudo para garantir a longevidade deste potencial florístico, a exploração deve ser racional e sustentada, ainda que o objetivo maior seja a preservação da saúde e da vida humana através da prevenção, controle ou cura das diferentes moléstias que afetam e afligem as populações (PACHÚ, 2007).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas, sendo ainda caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2010). São medicamentos, cujo componente ativo é o extrato vegetal, que representa um complexo de substâncias com propriedades terapêuticas (COUTO; VITORINO; DA SILVA, 2009).

A produção de metabólitos secundários pela planta está sujeita à influência de diversos fatores que podem estar relacionados à sua fisiologia, genética ou às condições ecológicas às quais o vegetal é submetido (CASTRO et al., 2004). Portanto, a padronização do cultivo de plantas medicinais é importante para garantir a produção das substâncias de interesse com ação terapêutica. Além disso, uma qualidade consistente do fitoterápico pode ser alcançada se todas as etapas de processamento da matéria-prima vegetal e manufatura do produto final conservarem o constituinte ativo e as substâncias sinérgicas (SCHMIDT; GONZÁLEZ ORTEGA, 1993). Visando este objetivo, o trabalho com plantas medicinais inicia-se na identificação correta da espécie, coleta adequada, pré-tratamento e armazenamento corretos e termina com a preparação e utilização terapêutica, que também devem ser adequados para que os resultados sejam satisfatórios (PACHÚ, 2007). Para tanto, um conhecimento cada vez mais aprofundado sobre as plantas medicinais, desenvolvido através de estudos integrados das áreas de botânica, química, farmacologia, biologia molecular e outras ciências afins se faz necessário (SANTOS, 2002).

Visando a garantia do acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira e ao desenvolvimento do complexo produtivo da saúde, o Governo Federal lançou em 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006). As ações decorrentes desta política tiveram início em 2008, quando foi divulgada a Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008, que aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e

cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2008). Dando seqüência a estas ações, em 2009 foi lançada a RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS) (BRASIL, 2009), onde são listadas 71 espécies de plantas, com o intuito de subsidiar toda a cadeia produtiva e orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da Renafito (Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos), o desenvolvimento e a inovação na área de plantas medicinais e fitoterápicos.

1.2 *Vernonanthura ferruginea* (LESS.) H. ROB.

O gênero *Vernonanthura* compreende 65 espécies, distribuídas através do México, Antilhas, América Central e do Sul. No Brasil, há cerca de 34 espécies, predominantemente distribuídas nas regiões Sul e Sudeste (ROBINSON, 1992). Este gênero foi descrito por Robinson (1992) baseado em espécies do gênero *Vernonia* Schreb, com o qual compartilha alguns atributos. Este autor enfatiza que as espécies típicas da tribo Vernonieae (*Vernonia* s.s., *Vernonanthura* H. Rob., *Colobus* H. Rob. e *Trepadonia* H. Rob.) são caracterizadas por lobos da corola glabros e também pelo grão de pólen tipo A (MENDONÇA et al., 2009). Devido a estas semelhanças, muitos trabalhos na literatura usam indiscriminadamente o termo *Vernonia* e *Vernonanthura* para descrever plantas da mesma espécie. Um exemplo disto é a planta estudada neste trabalho, que em diversas publicações científicas leva o nome de *Vernonia ferruginea* Less. (SILVA; LEPERA; LONGO, 2003; NÉSPOLI et al., 2007; BARBASTEFANO, 2007).

Em levantamento feito por Barbastefano (2007), dentro do gênero *Vernonia*, pode-se citar diversas espécies com estudos de atividade biológica já comprovada cientificamente (Quadro 01), o que torna este gênero interessante sob o ponto de vista econômico e farmacológico.

Espécie	Parte usada	Atividade biológica
<i>Vernonia cinerea</i> (Chea et al., 2006)	Planta inteira	Antimalárico
<i>Vernonia amygdalina</i> (Erasto et al., 2006)	Folhas	Bactericida e fungicida
<i>Vernonia chinensis</i> (Chen et al., 2005)	Folhas	Anticancerígeno
<i>Vernonia scorpioides</i> (Pagno et al., 2006)	Folhas	Anticancerígeno
<i>Vernonia colorata</i> (Cioffi et al., 2004)	Folhas	Antiinflamatório
<i>Vernonia colorata</i> (Sy et al., 2006)	Folhas	Hipo/hiperglicêmico
<i>Vernonia condensata</i> (Frutuoso et al., 1994)	Folhas	Antiulcerogênico
<i>Vernonia polyanthes</i> (da Silveira et al., 2003)	Folhas	Vasodilatador

Quadro 01: Sumário de algumas espécies do gênero *Vernonia* descritas na literatura com atividade biológica. Fonte: BARBASTEFANO, 2007.

Vernonanthura ferruginea, Asteracea (Figura 01), é uma planta típica do cerrado (SANO; ALMEIDA; RIBEIRO, 2008), conhecida popularmente por assa-peixe, assa-peixe-do-pará ou calção-de-velho. É perene, arbustiva ou arbórea, ereta, muito ramificada, de caule lenhoso e rugoso na base, com densa pilosidade ferrugínea no ápice. Mede de 2 a 3,5 m de altura e é nativa do Brasil. É uma das plantas daninhas mais freqüentes em nossas pastagens, ocorrendo em todo o território brasileiro, exceto na Região Sul. É mais comum em solos de cerrado e de baixa fertilidade, sendo considerada como um padrão de terras fracas (LORENZI; MATOS, 2002). Coelho e Silva (2003) citam o uso popular do chá das flores e raízes para gripe e pneumonia nos municípios de Pontes e Lacerda e Comodoro (Mato Grosso). Coelho e colaboradores (2005) relata o uso pela comunidade Mumbuca (Tocantins) do chá das folhas como cicatrizante. Souza e Felfili (2006) descrevem o uso popular de *V. ferruginea* para bronquites, asma, machucados e como depurativo na região de Alto paraíso (Goiás). Suas raízes, em infusão, são também empregadas na medicina popular como depurativas e diuréticas na região de Alto Rio Grande (Minas Gerais) (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Em estudos científicos realizados com esta planta, o extrato hidroalcoólico das folhas demonstrou atividade analgésica e antiedematogênica (SILVA; LEPERA; LONGO, 2003) nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e edema de pata de rato induzido por carragenina. Néspoli e colaboradores (2007) demonstraram a atividade antioxidante do extrato etanólico bruto das folhas de *V. ferruginea* frente ao radical DPPH. Barbastefano (2007) comprovou a atividade antiulcerogênica dos extratos metanólico e clorofórmico das partes aéreas de *V. ferruginea* nos modelos de úlcera induzida por etanol e piroxicam.

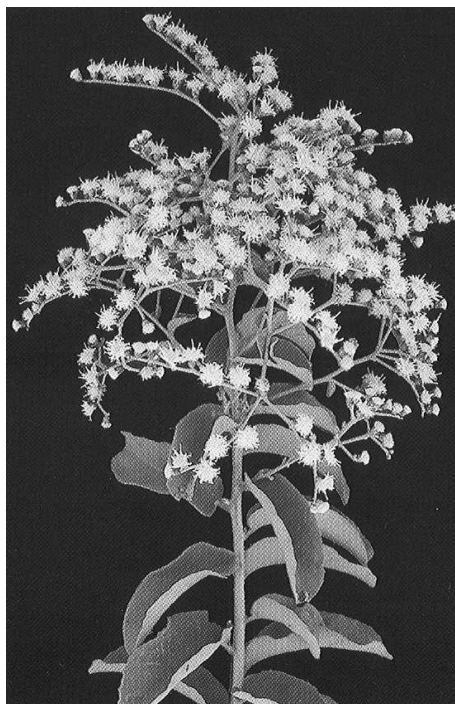


Figura 01: *V. ferruginea* (LORENZI; MATOS, 2002)

1.3 TRITERPENOS E LUPEOL

Triterpenóides são constituintes que têm despertado um grande interesse nos últimos anos em razão da descoberta do seu potencial farmacológico, com inúmeras atividades terapêuticas, tais como: antiinflamatória, antifúngica, antiviral, hepatoprotetora, expectorante, imunomoduladora, entre outras (MAHATO; NANDY; ROY, 1992; MAHATO; SEN, 1997; YASUKAWA; AKIHISA, 2000; AMARAL et al., 2006; BARBOSA FILHO et al., 2006, 2007; CUNHA; ROQUE, 2009).

O lupeol, triterpeno pentacíclico da família dos lupanos (Figura 02), foi identificado como princípio ativo da espécie *Vernonia polyanthes* (BARBASTEFANO, 2007), estando presente também em diversas outras espécies do gênero *Vernonia* (ZANON et al., 2006; BENFATTI et al., 2007; SINGH et al., 2006; COSTA et al., 2007). Em estudo da atividade antiinflamatória, o lupeol e o seu éster lupeol linoleato apresentaram resultados superiores a indometacina no tratamento da artrite induzida em ratas (GEETHA; VARALAKSHMI, 2001). Porém, esta atividade antiinflamatória não está relacionada à diminuição da produção de prostaglandinas (KWEIFIOOKAI et al., 1995), mas possivelmente vinculada a uma ação imunossupressora, com uma inibição da migração celular ao local do edema e da liberação de fatores quimiotáticos pró-inflamatórios (FERNANDEZ et al., 2001). Além da evidente

atividade antiinflamatória, o lupeol isolado das folhas de *Ixora coccinea*, apresentou potencial antimitótico (ZACHARIAH; NAIR; VELAYUDHA, 1994), com atividade inibitória sobre a proliferação do câncer de próstata humano (SALEEM et al., 2009). Barbastefano (2007) e Lira e colaboradores (2009) propuseram os mecanismos gastroprotetores desta substância. Em 2009, Gallo e Sarachine (2009) publicaram uma revisão relacionando as diversas atividades biológicas do lupeol. Em acréscimo a estas atividades, o lupeol ainda apresenta as vantagens de possuir toxicidade muito baixa e um grande potencial hepatoprotetor (SUNITHA; NAGARAJ; VARALAKSHMI, 2001; SUDHAHAR et al., 2006).

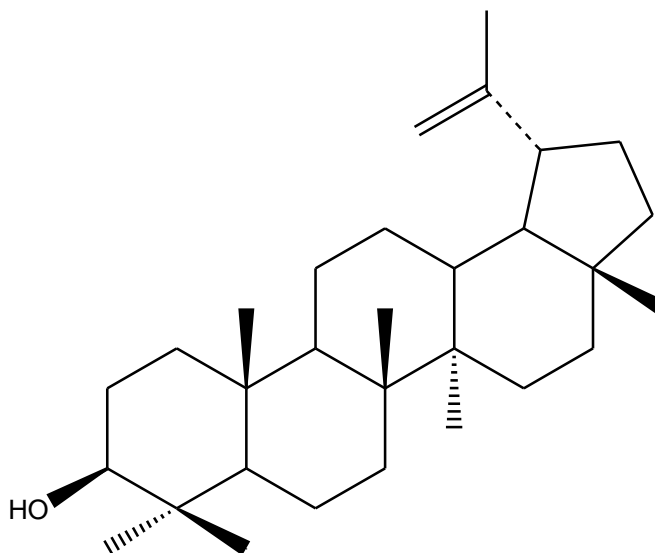


Figura 02: Estrutura química do Lup-20(29)-en-3β-ol (Lupeol)

1.4 EXTRATOS SECOS PADRONIZADOS

O uso de extratos secos nas formulações farmacêuticas apresenta vantagens em relação ao uso da planta em pó, tais como, melhor farmacocinética, maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, mais fácil padronização, maior concentração de compostos ativos e mais elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas (CRIPPA, 1978; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). As indústrias farmacêuticas têm um especial interesse pelos extratos secos, pois as formas farmacêuticas sólidas apresentam precisão de dosagem e facilidade de manuseio, transporte e armazenagem, além de maior estabilidade química, física e microbiológica (PACHÚ, 2007).

Entre os procedimentos de secagem que podem ser aplicados aos extratos de plantas, destaca-se a técnica de secagem por aspersão (*spray drying*) (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010), com a vantagem de que não apenas converte um líquido a um pó, mas pode ser usada na engenharia de pós, produzindo partículas com tamanhos e estruturas específicas (MUJUMDAR; HUANG, 2010), o que torna a técnica bastante atrativa do ponto de vista farmacotécnico, especialmente em processos industriais que dependem da uniformidade de tamanho e forma de partículas, como a compressão (LIST; SCHMIDT, 1989). Além disto, a secagem por aspersão (*spray drying*) consome menos tempo comparativamente à liofilização e à outras técnicas de secagem, e, apesar de utilizar altas temperaturas, ainda mostra-se viável para a secagem de produtos termolábeis, pela rápida exposição ao calor (MASTERS, 1985; LIST; SCHMIDT, 1989). Neste contexto, já existem muitos estudos publicados sobre a produção de extratos secos de plantas medicinais utilizando a técnica do *spray drying* (ZÉTOLA et al., 2002; SOARES, 2002; ABADIO et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2005; PETROVICK, 2006; DA SILVA, 2007; DE SOUZA; BASSANI; SCHAPOVAL, 2007; QUEK; CHOK; SWEDLUND, 2007; SPANIOL, 2007; GEORGETTI et al., 2008; SU et al., 2008; TONON; BRABET; HUBINGER, 2008; COSTA et al., 2009), nos quais é explorada a otimização dos parâmetros de secagem como temperaturas de entrada e de saída e vazão do extrato de alimentação, concentração e tipo de adjuvante tecnológico, assim como os teores de resíduo seco do extrato fluido a nebulizar, uma vez que estes são fatores indispensáveis para obtenção de extratos secos com melhores características físico-químicas e aumento do rendimento da operação (GAUDY; PUECH; JACOB, 1991; PAULA et al., 1998).

Para que se obtenha um extrato seco padronizado, é necessário que esta padronização tenha início na obtenção das matérias-primas vegetais, uma vez que estas podem sofrer influências advindas do cultivo, colheita, processamento e armazenamento. A seleção do método e líquido de extração também é uma etapa importante para o alcance da finalidade terapêutica desejada, pois uma vez conhecidas as substâncias ou classes relacionadas à atividade farmacológica, busca-se obter o seu maior rendimento extrativo (COUTO; VITORINO; DA SILVA, 2009), considerando fatores como a facilidade operacional, inocuidade fisiológica e ambiental, gastos de tempo e energia (LIST; SCHMIDT, 1989). Por fim, o método de secagem deve ser estabelecido, considerando que a secagem é uma das operações industriais mais importantes e que mais consomem energia (MUJUMDAR; HUANG, 2007). No caso da

secagem por aspersão, o manejo das condições de secagem, como do mecanismo de aquecimento do ar, pode ser utilizado como recurso para redução de custos operacionais (MASTERS, 1985; LIST; SCHMIDT, 1989).

Cabe ressaltar ainda que para assegurar a qualidade do produto fitoterápico em seu desenvolvimento, é de fundamental importância o estabelecimento de métodos analíticos validados, tanto para o controle da matéria-prima vegetal quanto para produtos tecnológicos intermediários (SOUZA, 2004). No entanto, ainda há várias dificuldades para o controle de qualidade e a comprovação de segurança e eficácia dos medicamentos fitoterápicos, devido à complexidade química dos derivados de drogas vegetais. Faltam investimentos em pesquisa com plantas nativas por parte das indústrias, que preferem o registro de produtos baseados em plantas exóticas, por disporem de vasta literatura científica publicada. A dificuldade inerente ao processo de caracterização química e farmacológica dos derivados de drogas vegetais exige tempo e recursos apreciáveis, e investimento em equipes multidisciplinares (CARVALHO et al., 2007).

O desenvolvimento de um produto padronizado, com características químicas, físicas, físico-químicas e tecnológicas definidas, que possa servir de base para a obtenção de produtos derivados, é vital para o desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e ao desenvolvimento de formas farmacêuticas que contemplem a composição química da droga vegetal e que satisfaçam requerimentos farmacêuticos básicos de qualidade e reprodutibilidade na preparação do produto de uso medicinal (AGUADO et al., 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção do extrato seco padronizado das folhas de *Vernonanthura ferruginea* (Less.) H. Rob., Asteraceae (Assa-peixe).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obtenção e caracterização do pó das folhas de assa-peixe;
- ✓ Extração dos princípios ativos do assa-peixe por percolação;
- ✓ Caracterização do extrato hidroalcoólico;
- ✓ Secagem do extrato hidroalcoólico, utilizando-se o processo de nebulização (*spray drying*) e avaliação do processo;
- ✓ Caracterização dos extratos secos;
- ✓ Seleção do extrato seco com as melhores características físico-químicas e verificação da sua atividade antiulcerogênica;
- ✓ Desenvolvimento de método de quantificação de triterpenos totais para o pó das folhas, extrato hidroalcoólico e extratos secos por espectrofotometria UV-vis;
- ✓ Desenvolvimento e validação de método de quantificação de lupeol para o pó das folhas, extrato hidroalcoólico e extratos secos por cromatografia líquida de alta eficiência.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PÓ DAS FOLHAS DE *V. ferruginea*

A coleta do material botânico foi realizada no Hospital de Medicina Alternativa de Goiânia, no mês de fevereiro de 2010. As coordenadas geográficas obtidas por GPS foram 49° altitude 768 m; latitude 16° 40' 33,3" Sul; longitude 14' 39,5" Oeste. A identificação da espécie foi realizada pelo Prof. Dr. José Ângelo Rizzo, da Unidade de Conservação/ICB/UFG. Uma exsicata foi depositada sob o nº UFG-43196 no Herbário da Universidade Federal de Goiás. A amostra coletada foi caracterizada seguindo a chave de identificação proposta por Batalha, Aragaki e Mantovani (1998) e de acordo com as características macroscópicas da planta descritas por Lorenzi (2000).

As folhas de assa-peixe foram secas utilizando estufa com circulação de ar mantida a 40°C por cinco dias. Em seguida, foram trituradas em moinho de facas e o pó obtido foi acondicionado à temperatura ambiente ao abrigo da luz e umidade, para posterior caracterização.

3.1.1 Caracterização fitoquímica do pó das folhas

3.1.1.1 Prospecção fitoquímica

Foi realizada a triagem fitoquímica preliminar do pó das folhas de acordo com a metodologia proposta por Costa (2001), com a finalidade de identificar as classes dos componentes presentes na planta e comparar com os dados presentes na literatura (BARBASTEFANO, 2007; MALAFRONT et al., 2009). Os testes qualitativos e semi-quantitativos realizados (Quadro 02) abrangeram ensaios para alcalóides, taninos, flavonóides, esteróides, triterpenos, saponinas, antraquinonas, cumarinas, resinas e mucilagens. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Classe química	Método de detecção
Alcalóides	Precipitação com reagentes de Dragendorff, Bertrand, Hager e ácido tânico.
Taninos	Precipitação com gelatina.
✓ Hidroxilas fenólicas	Reação com FeCl_3 e AlCl_3 .
Flavonóides	Reações de cianidina, oxalo-bórica, com H_2SO_4 concentrado e hidróxidos alcalinos.
Esteróides/Triterpenos	Reativo de Liebermann-Burchard.
Saponinas	Formação de espuma resistente a adição de ácido. Índice de espuma (IE)
Antraquinonas	Reação com hidróxido de amônio 6N (Reativo de Borntraeger)
Cumarinas	Reação com NaOH (extrato etéreo).
Resinas	Turvação do extrato etanólico com adição de água.
Mucilagens	Índice de intumescência (II)

Quadro 02: Prospecção fitoquímica do pó das folhas de *V. ferruginea*.

3.1.1.2 Caracterização preliminar dos triterpenos

3.1.1.2.1 Preparo das amostras

Foram preparados extratos metanólico (EBM) e etanólico (EBE) por maceração de 1 g do pó das folhas com 25 mL de metanol P.A. e etanol P.A, respectivamente. A maceração foi realizada sob refluxo a 60°C por uma hora e o extrato obtido foi filtrado em papel de filtro. Foi obtida também, a fração hexânica (FH) do extrato metanólico pela partição líquido-líquido de 10 mL do EBM com três porções de 20 mL de hexano, seguida de evaporação e ressuspensão em 10 mL de metanol.

3.1.1.2.2 Ensaio colorimétrico

Para o EBM e FH realizou-se reação qualitativa para identificação de triterpenos, utilizando reativo de Liebermann Burchard, composto por 1mL de clorofórmio P.A., 1 mL de anidrido acético P.A. e 0,2 mL de ácido sulfúrico P.A.

3.1.1.2.3 Cromatografia em camada delgada

Foi realizada cromatografia em camada delgada (CCD) em cromatoplaças de alumínio impregnadas com sílica F254 nm (Merck, Darmstadt, **Alemanha**), utilizando uma mistura de hexano : acetato de etila (85:15) como fase móvel e vanilina sulfúrica (WAGNER; BLADT, 2001) como revelador. Utilizou-se lupeol (Sigma, St. Louis, USA) como substância de referência.

3.1.1.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

Para o EBM, EBE e FH foi realizada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), 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 Enpower 2.0. Utilizou-se coluna cromatográfica Luna 5 μ C8(2), 250 x 4.6 mm (Phenomenex, California, USA), fase móvel constituída de acetonitrila : metanol acidificado com ácido acético 0,1% (v/v) (95 : 5), fluxo de 1,2 mL/minuto e volume de injeção de 30 μ L. Padrão de lupeol foi também injetado para comparação do tempo de retenção. Todos os reagentes utilizados foram de grau HPLC.

3.1.1.3 Isolamento e Identificação do lupeol

3.1.1.3.1 Preparo das amostras

Procedeu-se a maceração de 100 g do pó das folhas com três porções de 500 mL de clorofórmio P.A. Cada porção foi mantida em contato com o pó por 24 horas, totalizando 72 horas de extração. Após cada troca de solvente, o macerado foi filtrado em papel de filtro. As três porções foram reunidas e concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo até a secura.

3.1.1.3.2 Cromatografia em coluna

O isolamento do lupeol das folhas de *V. ferruginea* foi realizado em quatro etapas à partir de 2,5 g do extrato bruto clorofórmico, sendo três etapas de

cromatografia em coluna utilizando sílica gel 60 como fase estacionária, seguidas de uma etapa de extração em fase sólida utilizando cartuchos de sílica de 1 g (Waters, Massachusetts, USA), conforme o esquema representado na Figura 03.

O monitoramento do isolamento foi feito através de CCD, conforme técnica descrita no 3.1.1.2.3.

Na primeira etapa utilizou-se uma coluna de volume de 250 mL, a qual foi eluída com hexano, clorofórmio e metanol. Utilizou-se 250 mL de cada solvente, coletando-se frações de cerca de 85 mL para hexano e clorofórmio e de cerca de 30 mL para o metanol. As frações que continham a substância de interesse foram reunidas e novamente fracionadas em uma coluna de volume de 100 mL, utilizando como fase móvel uma mistura de diclorometano : éter de petróleo (7 : 3), com objetivo de obter frações isentas de clorofila e seus derivados e coletou-se separadamente sub-frações de 10 mL. As sub-frações contendo a substância de interesse foram reunidas em dois grupos de acordo com seu perfil cromatográfico e em seguidas cromatografadas em coluna de volume de 25 mL, utilizando fase móvel gradiente composta de hexano e acetato de etila nas proporções que variaram de (95:5) a (50:50), na taxa de 5% a cada 25 mL de solvente adicionado. Coletou-se separadamente sub-sub-frações de 5 mL. As sub-sub-frações obtidas foram reunidas em 8 grupos de acordo com o perfil cromatográfico e submetidas a extração em fase sólida (EFS), onde foram eluídas com 10 mL de hexano, 10 mL de clorofórmio e 10 mL de clorofórmio : metanol (1 : 1). Cada solvente foi coletado em tubos de 5 mL, totalizando 6 tubos para cada cartucho, numerados de 1 a 6.

Para identificação do composto, as frações finais contendo lupeol isolado foram submetidas à espectroscopia de infravermelho em espectrômetro IV modelo SPECTRUM BX II (Perkin Elmer, Connecticut, USA) e à espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H , CDCl_3 , 500 MHz) em espectrômetro Brüker modelo Avance III – 500 (Brüker, Wisconsin, USA).

3.1.2 Determinação da distribuição granulométrica

Este ensaio foi realizado em triplicata, onde cerca de 20 g do pó das folhas foram submetidos à passagem através de tamises previamente pesados, com abertura de malhas de 710, 355, 300, 250, 180 e 125 μm , usando um tamizador vibratório (Bertel Ltda, Caieiras, SP, Brasil), durante 20 minutos. Após tamisação, os tamises

foram pesados individualmente. Assim, o diâmetro médio das partículas (D_{50}) foi determinado pela técnica da distribuição cumulativa de frequência das massas retidas em cada tamis (F. BRAS. V, 2010).

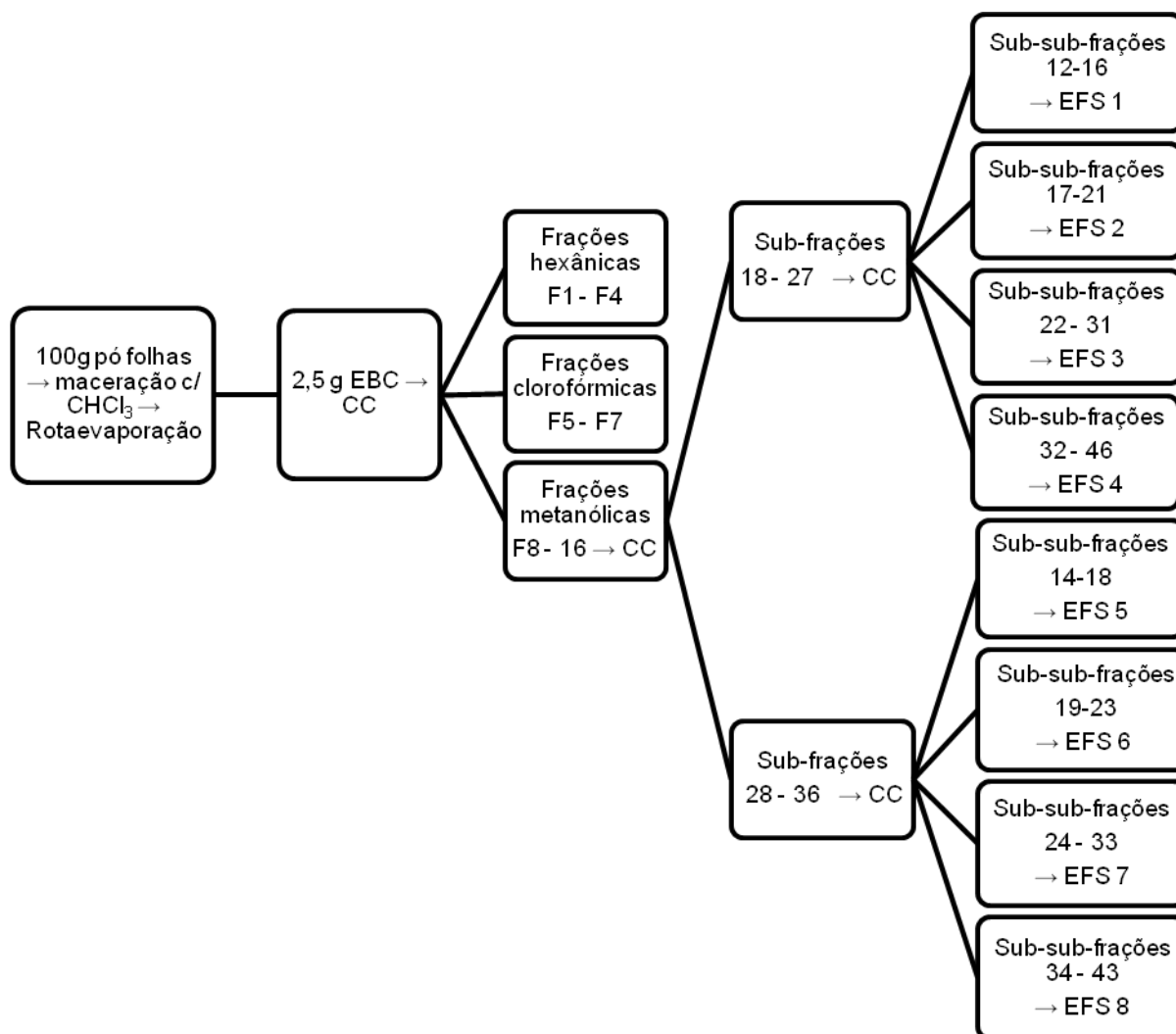


Figura 03: Fluxograma de isolamento do lupeol de folhas de *V. ferruginea*. EBC: Extrato clorofórmico; CC: Cromatografia em coluna; EFS: Extração em fase sólida.

3.1.3 Determinação do teor de voláteis

A determinação dos voláteis no pó das folhas foi realizada utilizando uma balança de infravermelho com lâmpada de halogênio (Ohaus, Florham Park, USA) modelo MB 35. Os resultados foram expressos como a média de três determinações realizadas com cerca de 1,0 g do pó cada.

3.1.4 Desenvolvimento do método analítico para quantificação do teor de triterpenos totais por espectrofotometria no UV-Vis

Com o intuito de quantificar os triterpenos totais da *V. ferruginea* foi desenvolvido um método analítico espectrofotométrico, seletivo para triterpenos e esteróides. O método proposto foi adaptado do doseamento de colesterol em plasma sanguíneo (KENNY, 1952), que se baseia na reação de Liebermann-Burchard.

Foi realizada uma varredura da solução do padrão de lupeol (Sigma- Aldrich, St. Louis, USA) e da solução extrativa das folhas em espectrofotômetro UV-Vis modelo Cary 50 (Varian, California, USA), visando o estabelecimento da seletividade do método e a determinação do comprimento de onda de leitura. O solvente utilizado no preparo das soluções a serem analisadas foi clorofórmio P.A.

Foi construída uma curva de calibração com o padrão de lupeol nas concentrações de 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 e 0,3 mg/mL, para estabelecimento da linearidade.

Foram avaliados também os parâmetros: volume de solvente utilizado na extração de 500 mg do pó e tempo de incubação necessário para o término da reação de Liebermann-Burchard (Quadro 03). A cada porção de solvente (clorofórmio) adicionado, o pó foi sonicado por 5 minutos e o sobrenadante foi filtrado. As porções filtradas foram reunidas constituindo as soluções teste, que foram quantificadas em seguida. Para avaliação da significância estatística das diferenças entre os teores obtidos foi realizada ANOVA seguida do teste de Tukey, a uma significância de $p < 0,05$.

Ensaio	Nº de porções x	
	volume de CHCl ₃	Tempo de incubação
1	2 x 20 mL	30 minutos
2	3 x 20 mL	30 minutos
3	4 x 20 mL	30 minutos
4	4 x 15 mL	15 minutos
5	4 x 15 mL	30 minutos
6	4 x 15 mL	45 minutos

Quadro 03: Ensaios de adequação da extração e do tempo de reação do método de quantificação de triterpenos totais no pó de *V. ferruginea*.

3.1.5 Determinação do teor de triterpenos totais

Para quantificação dos triterpenos, tomou-se 2 mL de cada solução teste, em triplicata, transferiu-se para tubos de ensaio, adicionou-se 2mL de anidrido acético P.A. e incubou-se em banho-maria à 37°C por 3 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,2 mL de ácido sulfúrico P.A. e incubou-se pelo tempo necessário para o término da reação. Ao final, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro. Os resultados foram obtidos por meio da equação (1) e calculados como teor de triterpenos totais expressos em lupeol.

$$\text{Teor (\%)} = \frac{Ca \times FD \times 100}{ma} \quad (1)$$

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

FD = fator de diluição da amostra;

ma = massa do pó (mg).

3.1.6 Desenvolvimento de método analítico para quantificação de lupeol por cromatografia líquida de alta eficiência

3.1.6.1 Padrão e reagentes

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

3.1.6.2 Investigação do método de extração

Foram avaliados diferentes solventes extratores (metanol e hexano), proporções pó das folhas/solvente e métodos de extração, conforme demonstrado no quadro 04. Para as amostras extraídas (ME-VII a X) ou fracionada (ME-XI) com hexano, pipetou-se 5 mL da solução extrativa, concentrou-se até *secura* com auxílio de um secador e em seguida, ressuspendeu-se com 5 ml de acetonitrila grau HPLC em banho de ultrassom por 2 minutos. Na seqüência, estas soluções foram injetadas em CLAE.

As quantificações por CLAE foram realizadas utilizando o sistema cromatográfico descrito no item 3.1.6.3 e a condição cromatográfica MC-X descrita no quadro 05 (item 3.1.6.4), sendo realizada ANOVA, seguida do teste de Tukey, a uma significância de $p < 0,05$, para a seleção do melhor método extrativo.

Teste	Solvente	Pó das folhas / Solvente (mg/mL)		Método de extração
ME-I	metanol	200/50		Três extrações em ultrassom por 15 minutos, utilizando 15 mL de solvente em cada. Completou-se o volume para 50 mL com o mesmo solvente.
ME-II	metanol	100/50		Idêntico ao ME-I.
ME-III	metanol	200/50		Duas extrações em ultrassom por 15 minutos, utilizando 20 mL de solvente em cada. Completou-se o volume para 50 mL com o mesmo solvente.
ME-IV	metanol	1000/50		Idêntico ao ME-I.
ME-V	metanol	1200/50		Idêntico ao ME-I.
ME-VI	metanol	1000/50		Semelhante ao ME-I, porém com 5 minutos de aquecimento em refluxo a 60°C antes de cada sonicação.
ME-VII	hexano	1000/50		Três extrações em ultrassom por 15 minutos, utilizando 2 porções de 20 mL e 1 porção de 10 mL de solvente. Completou-se o volume para 50 mL com o mesmo solvente.
ME-VIII	hexano	1000/100		Quatro extrações em ultrassom por 15 minutos, utilizando 3 porções de 20 mL e 1 porção de 10 mL de solvente. Completou-se o volume para 50 mL com o mesmo solvente.
ME-IX	hexano	1000/100		Cinco extrações em ultrassom por 15 minutos, utilizando 4 porções de 20 mL e 1 porção de 10 mL de solvente. Completou-se o volume para 50 mL com o mesmo solvente.
ME-X	hexano	1000/50		Semelhante ao ME-VII, porém com 10 minutos aquecimento em refluxo a 60°C antes de cada sonicação.
ME-XI	metanol	1000/50		Semelhante ao ME-VII, porém em seguida procedeu-se um fracionamento com hexano.

Quadro 04: Descrição dos parâmetros avaliados para definição do processo extrativo à partir do pó das folhas de *V. ferruginea*. ME: método de extração.

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 (DAD) 2998 e sistema de processamento de dados Enpower 2.0. Utilizou-se coluna cromatográfica Luna 5 μ C8(2), 250 x 4.6 mm (Phenomenex, California, USA) e coluna (Waters) com as mesmas especificações para o teste de robustez. Todas as soluções analisadas 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 (*system suitability*): fator de cauda (T), resolução (Rs), número de pratos teóricos (N) e repetibilidade do padrão (DPR) foram avaliados conforme especificações da Food and Drug Administration (1994).

3.1.6.4 Determinação das condições cromatográficas

Com a finalidade de adequar a resolução do pico referente ao lupeol, os parâmetros analíticos tais como temperatura da coluna (TC), composição e fluxo da fase móvel, foram avaliados conforme disposto no quadro 05. O volume de injeção foi mantido a 30 μ L em todas as análises. O comprimento de onda de leitura foi de 210 nm, derivado do estudo do cromatograma de varredura do padrão de lupeol na faixa de 190 a 400 nm. A condição inicial testada (MC-I) foi baseada no método proposto por Silva e Diniz (2010).

Teste	TC (°C)	Composição da fase móvel	Fluxo da fase móvel (mL/min)
MC-I	40	Acetonitrila : Metanol acidificado com 0,1% de ácido acético (95:5)	1.2
MC-II	35	Idêntico ao MC-I	1.2
MC-III	30	Idêntico ao MC-I	1.2
MC-IV	23 a 25	Idêntico ao MC-I	1.2
MC-V	23 a 25	Idêntico ao MC-I	1.0
MC-VI	23 a 25	Acetonitrila : Metanol acidificado com 0,1% de ácido acético (90:10)	1.0
MC-VII	23 a 25	Acetonitrila : Metanol acidificado com 0,1% de ácido acético (97:3)	1.0
MC-VIII	23 a 25	Acetonitrila : Metanol acidificado com 0,1% de ácido acético (98:2)	0.8
MC-IX	23 a 25	Acetonitrila	0.8
MC-X	23 a 25	Acetonitrila acidificada com 0,01% de ácido acético	0.8
MC-XI	23 a 25	Acetonitrila acidificada com 0,02% de ácido acético	0.8

Quadro 05: Condições avaliadas para a definição do método cromatográfico de quantificação de lupeol em *V. ferruginea*. MC: Método cromatográfico.

3.1.7 Validação do método analítico para quantificação de lupeol por cromatografia líquida de alta eficiência

O método selecionado foi validado de acordo com as especificações da RE 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), contemplando os parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, robustez e limites de quantificação e detecção.

3.1.7.1 Seletividade

Foi avaliada por meio da análise dos cromatogramas de varredura de 190 a 400 nm da solução preparada conforme ME-VII (quadro 04, item 3.1.6.2), da solução padrão à 40 µg/mL e do solvente utilizado (acetonitrila), obtidos por meio de detector de arranjo de diodos (DAD).

3.1.7.2 Linearidade

À partir de uma solução de 380,51 µg/mL de lupeol em acetonitrila, preparou-se três curvas padrão nas concentrações de 9,51, 19,02, 38,05, 76,10 e 152,20 µg/mL, utilizando o mesmo solvente. Foi plotado um gráfico relacionando a concentração do padrão e a área média do pico correspondente. A linearidade foi avaliada tendo por base o coeficiente de correlação obtido na regressão linear da curva padrão média. O intervalo linear foi então determinado e a equação da reta foi obtida e utilizada nos cálculos de doseamento.

A linearidade foi determinada também para o pó da planta. Para isto, preparou-se preparou-se soluções em três concentrações diferentes, pesando-se 800, 1000 e 1200 mg do pó das folhas e procedendo o método analítico desenvolvido. Desta forma, as concentrações finais das soluções analisadas corresponderam a 80, 100 e 120% da concentração definida no método, sendo preparadas 3 soluções para cada concentração. Calculou-se o coeficiente de correlação da curva média e obteve-se a equação da reta.

3.1.7.3 Precisão

A precisão foi avaliada nos níveis de repetibilidade e precisão intermediária. Para cada nível avaliado, preparou-se soluções em três concentrações diferentes, pesando-se 800, 1000 e 1200 mg do pó das folhas e procedendo o método analítico desenvolvido. Desta forma, as concentrações finais das soluções analisadas corresponderam a 80, 100 e 120% da concentração definida no método, sendo preparadas 3 soluções para cada concentração. A repetibilidade foi calculada por meio do coeficiente de variação (Equação 2) entre os 9 resultados das análises realizadas em um único dia e por um único 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.

$$CV(\%) = \frac{DP}{\bar{x}} \times 100 \quad (2)$$

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, adicionando-se uma alíquota de 200 µL do padrão de lupeol com concentração exata de 377,81 µg/mL a 500 µL de soluções do pó das folhas em concentrações equivalentes a 80, 100 e 120% da concentração definida no método, preparadas da mesma forma que no ensaio de precisão. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada concentração. A exatidão foi calculada de acordo com a equação (3), onde a concentração teórica corresponde à concentração do padrão adicionado e a concentração média experimental corresponde à concentração recuperada do padrão, calculada através do acréscimo na área do pico em relação à solução do pó antes da adição do padrão.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (3)$$

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 soluções preparadas e quantificadas nas condições usuais descritas no método (condições normais), por meio do coeficiente de variação (CV). Os parâmetros avaliados foram fabricante do solvente utilizado para preparo da fase móvel (acetonitrila) e fabricante da coluna cromatográfica (Quadro 06).

	Acetonitrila	Coluna (C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm)
Condições normais	J.T.Baker	Phenomenex
Variação 1	Honeywell	Phenomenex
Variação 2	J.T.Baker	Waters

Quadro 06: Variações nas condições cromatográficas do método de quantificação do lupeol 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, utilizando-se as equações (4) e (5), respectivamente.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (4)$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (5)$$

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

IC = inclinação da curva padrão media.

3.1.8 Determinação do teor de lupeol no pó das folhas de *V. ferruginea*

A determinação do teor de lupeol (TL) foi realizada em triplicata, utilizando o método de extração, sistema e método cromatográfico selecionados (itens 3.1.6.2, 3.1.6.3 e 3.1.6.4).

Os cálculos foram realizados utilizando a equação (1) (item 3.1.5).

3.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *V. ferruginea*

Foram realizados testes piloto utilizando etanol 80 e 95% (Chemis, São Paulo, SP, Brasil) como líquido extrator na percolação de 50 gramas do pó das folhas. A percolação foi realizada a temperatura ambiente com um gotejamento de 4 gotas por minuto, até o esgotamento do pó, monitorado por CCD (item 3.1.1.2). O percolado obtido foi concentrado em evaporador rotativo até atingir a proporção pó das folhas:solvente de 1:2 (p/v).

Após a escolha do líquido extrator mais apropriado, 1 Kg do pó das folhas foi submetido previamente à maceração por 48 horas no líquido extrator e em seguida à percolação nas mesmas condições do teste piloto, até o esgotamento do marcador, monitorado por CCD. O percolado foi concentrado até a proporção pó das folhas:solvente de 1:2 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 resíduo seco

Para a determinação do teor de resíduo seco (Trs) 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 1 mL. O valor obtido para teor de voláteis foi subtraído de 100%, resultando em teor de resíduo seco.

3.2.2 Determinação do teor alcoólico

O teor alcoólico dos extratos obtidos foi determinado pelo método de destilação descrito na Farmacopéia Brasileira V edição (2010). Para tanto, destilou-se uma mistura de 35 mL do extrato e 70 mL de água destilada, coletando-se o destilado até que este atingisse o volume de cerca de 68 mL e completou-se para 70 mL com água destilada. A densidade do destilado foi determinada a 20 °C e comparada a valores tabelados que relacionam a mesma ao respectivo teor alcoólico. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.2.3 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa foi determinada pelo método do picnômetro (F. BRAS. V, 2010), pesando-se o picnômetro vazio, o mesmo contendo o extrato hidroalcoólico a 20°C e contendo água destilada a 20 °C. A densidade relativa corresponde à relação entre a massa do extrato e a massa da água contida no picnômetro, conforme representado pela equação (6):

$$\text{Densidade (g / cm}^3\text{)} = \frac{(ma_2 - mv)}{(ma_1 - mv)} \quad (6)$$

Onde: ma_1 = massa do picnômetro + água

ma_2 = massa do picnômetro + extrato

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, à velocidade de 135 rpm e torque de 11,1%.

3.2.5 Determinação do pH

Foi realizada em aparelho potenciométrico (modelo PHS 3B – LABMETER, Copenhagen, Denmark) previamente calibrado com soluções tampão 7,0 e 4,0 (F. BRAS. V, 2010).

3.2.6 Determinação do perfil cromatográfico (CCD)

A determinação do perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico foi realizada (item 3.1.1.2), com o intuito de comparar o perfil cromatográfico do pó das folhas e dos extratos obtidos.

3.2.7 Determinação do teor de triterpenos totais por espectrofotometria UV-Vis

Para a determinação do teor de triterpenos totais no extrato hidroalcoólico, pipetou-se 0,1 mL do mesmo, evaporou-se até a secura e ressuspendeu-se com 10 mL de clorofórmio P.A. Em seguida, procedeu-se o método proposto no item 3.1.5 e para os cálculos utilizou-se a equação (1), onde a massa (ma) correspondeu à massa do resíduo seco da tomada de ensaio.

3.2.8 Determinação do teor de lupeol por CLAE

3.2.8.1 Método analítico

Transferiu-se 1,5 mL do extrato para funil de separação de 60 mL, adicionou-se 3,5 mL de etanol P.A. e 5 mL de água destilada. Esta mistura foi extraída com 4 porções de 10 mL de hexano P.A. Após cada extração, as porções hexânicas foram filtradas em algodão e reunidas em balão volumétrico de 50 mL. Completou-se o

volume com hexano P.A. Pipetou-se 5 mL da solução extrativa, concentrou-se até seca com auxílio de um secador e em seguida, ressuspendeu-se com 5 ml de acetonitrila grau HPLC em banho de ultrassom por 2 minutos. Esta solução foi então submetida à análise por CLAE utilizando o sistema cromatográfico descrito no item 3.1.6.3 e o método cromatográfico selecionado (item 3.1.6.4). A determinação do teor de lupeol (TL) no extrato hidroalcoólico foi realizada em triplicata.

Os cálculos foram realizados utilizando a equação (1) (item 3.1.5), onde a massa correspondeu à massa do resíduo seco da tomada de ensaio.

3.2.8.2 Co-validação do método analítico

Com o intuito de verificar a adequação do método desenvolvido para doseamento de lupeol no pó das folhas à análise do extrato hidroalcoólico, foi realizada uma co-validação, onde 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 de seis réplicas da solução preparadas conforme item 3.2.8.1 e em seguida calculou-se o coeficiente de variação entre os teores obtidos.

3.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS SECOS DE *V. ferruginea*

Para a obtenção dos extratos secos foi empregado *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 Avaliação preliminar das condições de secagem e seleção do adjuvante de secagem

Inicialmente o extrato hidroalcoólico foi submetido à duas diferentes condições de secagem por nebulização sem a utilização de adjuvantes (T1 e T2), para a observação do comportamento do mesmo frente a parâmetros como vazão do ar de aspersão (Vaa), vazão de alimentação do extrato (Ve) e diâmetro do bico atomizador (Db). Em seguida foram realizados 4 testes pilotos (T3 a T6) para a seleção do tipo (As) e proporção do adjuvante de secagem (As%), de acordo com o quadro 07. Como adjuvantes de secagem foram utilizados dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200) e celulose microcristalina (Avicel®). As proporções de adjuvante utilizadas foram calculadas em relação ao resíduo seco do extrato hidroalcoólico.

Os critérios utilizados para padronização das condições de secagem e tipo de adjuvante foram: a característica física do extrato, a umidade residual e o rendimento do processo.

Parâmetros de secagem	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Paa (psi)	60	60	60	60	60	60
Vaa (L/min)	35	40	40	40	40	40
Vas (m ³ /min)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Ve (mL/min)	2	4	4	4	4	4
Te (°C)	100	100	100	100	100	100
Db (mm)	1,0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
As / As%	-	-	DSC / 10%	DSC / 20%	DSC / 25%	CM / 10%

Quadro 07: Condições iniciais de obtenção do extrato seco de *V. ferruginea*. T: Teste; Paa: Pressão do ar de aspersão; Vaa: Vazão do ar de aspersão; Vas: Vazão do ar de secagem; Ve: Vazão do extrato de alimentação; Te: Temperatura do ar de secagem; Db: Diâmetro interno do bico atomizador; As: Tipo do adjuvante de secagem; As%: proporção do adjuvante de secagem em relação ao resíduo seco do extrato hidroalcoólico; DSC: dióxido de silício coloidal; CM: celulose microcristalina.

3.3.2 Avaliação da influência dos parâmetros de secagem na obtenção dos extratos secos

Para o estudo da influência de parâmetros de secagem nas propriedades do extrato, a fim de se obter produtos com melhores características físico-químicas e maior rendimento de operação, foram investigadas três variáveis de processo: Proporção de dióxido de silício coloidal (As%), temperatura do ar de secagem (Te) e vazão do extrato de alimentação (Ve). Os valores codificados e não codificados de cada variável de processo estão representados no quadro 08. Foi realizado um planejamento fatorial 2^3 , com duplicata do ponto central, totalizando 10 experimentos, designados de E1 a E10 (Quadro 09). Utilizou-se cerca de 150 mL do extrato hidroalcoólico para cada experimento.

A análise estatística dos dados experimentais foi realizada por análise de variância (ANOVA) usando a metodologia de superfície de resposta, empregando o módulo *Visual General Linear Model* (VGLM) do *software* Statistica '99 (Statsoft Inc.). Para permitir a análise de variância, os fatores (variáveis do processo) foram codificados seguindo a regra de codificação dada pela equação (7). A função de resposta aplicada foi uma equação linear múltipla (Equação 8).

$$X_i = \frac{\text{Valor não codificado} - 0,5 \times (\text{maior valor} + \text{menor valor})}{0,5 \times (\text{maior valor} - \text{menor valor})} \quad (7)$$

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 \quad (8)$$

Onde: Y = variável dependente;

β_0 = constante;

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ = coeficientes polinomiais;

$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}, \beta_{123}$ = coeficientes de interação entre as variáveis de processo estudadas;

x_1, x_2 e x_3 = valores codificados das variáveis proporção de adjuvante de secagem (%As), temperatura do ar de secagem (Te) e vazão do extrato de alimentação (Ve), respectivamente.

Variável	Níveis		
	-1	0	+1
X1 = As% (%)	10	15	20
X2 = Te (°C)	80	100	120
X3 = Ve (mL/min)	4	5	6

Quadro 08: Fatores codificados e seus níveis no planejamento fatorial $2^3 + 2$ para obtenção do extrato seco de *V. ferruginea*. As%: Proporção do adjuvante de secagem; Te: Temperatura do ar de secagem; Ve: Vazão do extrato de alimentação.

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃
E1	-1	-1	-1
E2	+1	-1	-1
E3	-1	+1	-1
E4	+1	+1	-1
E5	-1	-1	+1
E6	+1	-1	+1
E7	-1	+1	+1
E8	+1	+1	+1
E9	0	0	0
E10*	0	0	0

Quadro 09: Experimentos realizados para obtenção dos extratos secos de *V. ferruginea*. x₁, x₂ e x₃: valores codificados das variáveis proporção de adjuvante de secagem (%As), temperatura do ar de secagem (Te) e vazão do extrato de alimentação (Ve), respectivamente. * duplicata do experimento E9.

Os extratos secos obtidos foram acondicionados à temperatura ambiente, em frascos de vidro âmbar com tampa, mantidos em dessecador para sua posterior caracterização.

Foi realizado também um experimento de secagem sem a adição de dióxido de silício coloidal, utilizando a temperatura do ar de secagem de 100 °C e a vazão do extrato de alimentação de 5 mL/min, o qual foi designado de E0. Imediatamente após a secagem, o extrato seco obtido foi submetido aos ensaios de umidade residual, atividade de água e teores de triterpenos totais e lupeol. Os teores de triterpenos e lupeol foram comparados aos resultados dos experimentos de secagem que utilizaram dióxido de silício coloidal, por meio de ANOVA, seguida de teste de Tukey, sendo considerado significativo um $p < 0,05$.

3.3.3 Determinação do perfil cromatográfico (CCD)

A determinação do perfil cromatográfico do extrato seco foi realizada segundo método descrito no item 3.1.1.2, com o intuito de comparar o perfil cromatográfico do pó das folhas e do extrato obtido.

3.3.4 Seleção das condições de secagem para obtenção do extrato seco padronizado

Os indicadores de qualidade avaliados para a escolha da melhor condição de secagem foram: teor de triterpenos totais (Tt), teor de lupeol (TL), porcentagem de degradação (Td), rendimento do processo (Rp), umidade residual (Ur) e atividade de água (Aa).

3.3.5 Determinação do teor de triterpenos totais por espectrofotometria UV-Vis

Para a determinação do teor de triterpenos totais (Tt) nos extratos secos, pesou-se cerca de 10 mg do mesmo, transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, solubilizou-se em clorofórmio P.A. com auxílio do ultrassom e completou-se o volume com o mesmo solvente. Filtrou-se em papel de filtro e em seguida, procedeu-se o método proposto no item 3.1.5. Os cálculos foram realizados de acordo com a equação (1) (item 3.1.5).

3.3.6 Determinação do teor de lupeol por CLAE

3.3.6.1 Método analítico

Pesou-se cerca de 40 mg de cada extrato seco, transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, solubilizou-se em hexano P.A. com auxílio do ultrassom e completou-se o volume com o mesmo solvente. Pipetou-se 5 mL desta solução, evaporou-se até a secura com auxílio de um secador e ressuspendeu-se com 5 mL de acetonitrila grau HPLC em banho de ultrassom por 2 minutos. Esta solução foi submetida à análise por CLAE utilizando o sistema cromatográfico descrito no item 3.1.6.3 e o método cromatográfico selecionado (item 3.1.6.4). A determinação do teor de lupeol (TL) nos extratos secos foi realizada em triplicata.

Os cálculos foram realizados utilizando a equação (1) (item 3.1.5).

3.3.6.2 Co-validação do método analítico

Com o intuito de verificar a adequação do método desenvolvido para doseamento de lupeol no pó das folhas à análise do extrato seco, foi realizada uma co-validação, onde 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 de seis réplicas da solução preparada conforme método descrito no item 3.3.6.1 e em seguida calculou-se o coeficiente de variação entre os teores obtidos.

3.3.7 Porcentagem de degradação

A porcentagem de degradação de lupeol (TdL) e de triterpenos totais (TdT) foi calculada por meio das equações 9a e 9b.

$$TdL = 100 - (TL\ ES / TL\ EH) \times 100 \quad \text{(9a)}$$

$$TdT = 100 - (Tt\ ES / Tt\ EH) \times 100 \quad \text{(9b)}$$

Onde: TL ES = teor de lupeol no extrato seco; TL EH = teor de lupeol no extrato hidroalcoólico;

Tt ES = teor de triterpenos totais no extrato seco; Tt EH = teor de triterpenos totais no extrato hidroalcoólico.

3.3.8 Rendimento do processo

O rendimento do processo (Rp) foi obtido como a porcentagem de recuperação dos sólidos, pesando-se o frasco coletor vazio e após o processo de secagem (equação 10).

$$Rp = \frac{(mf - mi) \times 100}{(ma \times Trs / 100) + mas} \quad \text{(10)}$$

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

ma = Massa do extrato hidroalcoólico adicionado ao sistema; Trs = Teor de resíduo seco;

mas = Massa do adjuvante de secagem adicionado.

3.3.9 Umidade residual

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

3.3.10 Atividade de água

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

3.3.11 Microscopia eletrônica de varredura do extrato seco padronizado

O extrato seco E2 foi analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Primeiramente a amostra foi depositada 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 imagens foram obtidas utilizando equipamento da marca Jeol, modelo JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging.

3.3.12 Atividade antiulcerogênica do extrato seco padronizado

3.3.12.1 Fármacos

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

3.3.12.2 Animais

Foram utilizados 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.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas que discorrem sobre os cuidados com animais de laboratório (CIOMS, 1985) e recomendações da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) depois da devida aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, protocolo nº 104/08.

3.3.12.3 Lesões gástricas induzidas por indometacina (DJAHANGUIRI, 1969)

Foram utilizados grupos experimentais de 10 camundongos os quais foram mantidos em jejum de 18 horas com solução de glicose a 5% *ad libitum*. Foi administrado por gavagem o extrato seco E2 nas doses de 200, 400, 800 e 1600 mg/Kg de peso corporal, a ranitidina 50 mg/Kg utilizada como controle positivo e 10 mL/kg do veículo (água filtrada) como controle negativo. Uma hora após estes tratamentos foi administrada via subcutânea indometacina 50 mg/Kg. Após 3 horas foi realizado novo tratamento por gavagem com ES, ranitidina e veículo (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 e 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 e colaboradores (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 o seu somatório reflete a intensidade da lesão da mucosa, compondo o índice de lesão (Quadro 10).

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 dióxido de silício coloidal nas doses de 180, 260 e 360 mg/Kg de peso corporal foi utilizado em substituição do extrato seco.

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

3.3.12.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias. As diferenças entre os grupos foram detectadas pela análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Student-Newman-Keuls.

A atividade antiulcerogênica foi considerada significativa quando $p < 0,05$ (SOKAL; ROHLF, 1981).

REFERÊNCIAS

- ABADIO, F. D. B.; DOMINGUES, A. M.; BORGES, S. V.; OLIVEIRA, V. M. **Physical properties of powdered pineapple (*Ananas comosus*) juice** - effect of maltedextrin concentration and atomization speed. *J. Food Eng.*, v. 64, p. 285-287, 2004.
- AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. **Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil**. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 17, p.114-140, 2007.
- AGUADO, M.; NUÑEZ, M. B.; DUDIK, H. N.; BELA, A.; RAISMAN, J. S.; SANSBERRO, P. **Diseño de comprimidos de extrato de *Aloysia polystachya* por compresión directa**. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 25, n. 2, p. 225-230, 2006.
- AMARAL, F. M. M.; RIBEIRO, M. N. S.; BARBOSA FILHO, J. M.; REIS, A. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; MACEDO, R. O. **Plants and chemical constituents with giardicidal activity**. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 16, p. 696-720, 2006.
- AULTON, M. E. **Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design**. Philadelphia: Elsevier's Health Sciences, 2001.
- AULTON, M. E. **Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design**. Edinburg: Churchill Livingstone, p. 388-390, 2002.
- BARBASTEFANO, V. 2007. **Atividade antiulcerogênica de extratos brutos, frações semi-purificadas e substância ativa de duas espécies do gênero *Vernonia*: *Vernonia polyanthes* e *Vernonia ferruginea***. Tese (Doutorado em Biologia funcional e molecular) – Universidade de Campinas, Campinas - SP.
- BARBOSA FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE FILHO, P. F.; SILVA, M. S., CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS JÚNIOR, L. J. **Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase**. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 16, p. 258-285, 2006.
- BARBOSA FILHO, J. M.; NASCIMENTO JÚNIOR, F. A.; TOMAZ, A. C. A.; ATHAYDE FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; SOUZA, M. F. V.; BATISTA, L. M.; DINIZ, M. F. F. M. **Natural products with antileprotic activity**. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 17, p. 141-148, 2007.
- BATALHA, M. A.; ARAGAKI, S; MANTOVANI, W. **Chave de identificação das espécies vasculares do cerrado em Emas (Pirassununga, SP) baseada em**

caracteres vegetativos. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, v. 17, p. 85-108, 1998.

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. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - PNPMF.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008, que aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS),** 2009. Disponível em: <www.saude.gov.br/renisus>. Acesso em: 27/05/2009.

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.

BENFATTI, A. C.; BARBASTEFANO, V.; RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. **Análise fitoquímica do extrato clorofórmico das folhas de *Vernonia polyanthes Less (Asteraceae)*.** In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T0696-2.pdf>>, Acesso em: 25/05/2009.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. **Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments.** J. Food Sci., v. 65, n. 6, p. 1248-1252, 2000.

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

CARVALHO, E. L. S. 1997. **Desenvolvimento de produtos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia Martius ex Rissek* – Celastraceae (espinheira-santa).** Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRGS, Porto Alegre, RS.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; NETTO, E. M. **Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos**. T&C Amazônia, v. 5, n. 11, 2007.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. Contribuição ao estudo de plantas medicinais: **Metabólitos secundários**. Visconde do Rio Branco, Viçosa, MG, 2004.

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, p. 259, 1985.

COELHO, M. F. B; SILVA, A. C. **Plantas de uso medicinal nos municípios de Pontes e Lacerda e de Comodoro, Mato Grosso, Brasil**. Rev. Agricultura Tropical. UFMT. v. 07, n. 01, p. 55-66, 2003. Disponível em: < <http://www.ufmt.br/agtrop/revista7/doc/05.htm>>. Acesso em: 08/03/2010

COELHO, F. B. R.; DAL BELO, C. A.; LOLIS, S. F.; SANTOS, M. G. **Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO**. Rev. Eletrônica Farmácia, v. 2, n. 2, p. 52-55, 2005.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 3, p.1032, 2001.

COSTA, F. J.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R. **Metabólitos secundários isolados de *Vernonia chalybaea* Mart. (Asteraceae)**. XLVII Congresso Brasileiro de Química, Natal – RN, 2007. Disponível em: < <http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/7/7-162-81.htm>>. Acesso em: 12/03/2010.

COSTA, R. S.; OZELA, E. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L. P.; SILVA JÚNIOR, J. O. C. **Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae)**. Rev. Bras. Farm., v. 90, n. 3, p. 169-174, 2009.

COUTO, A. G.; VITORINO, J. C.; DA SILVA, R. M. L. Tecnologia e garantia da qualidade de fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B; FILHO CECHINEL, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. Ed. Santos: Santos - São Paulo, cap. X, 2009.

CRIPPA, F. **Problems of Pharmaceutical Technics with Plant Extracts.** Fitoterapia, v. 49, p. 257-263, 1978.

CRYER, B. **NSAID gastrointestinal toxicity.** Curr. Opin. Gastroenterol., v. 16, n. 6, p. 495-502, 2000.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. **Esteróis e triterpenos:** ácidos biliares, precursores das vitaminas D e fitosteróis, cardioprotetores, hormonas esteróides, matérias-primas de núcleo esteróide usadas em sínteses parciais de saponósidos. In: CUNHA, A. P. Farmacognosia e fitoquímica. 2ª Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, cap. 20, 2009.

DA SILVA, F. A. 2007. **Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. – Aquifoliaceae (erva-mate).** Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas) – UFRGS, Porto Alegre, RS.

DE CAMPOS, A. M.; 1996. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hill. Aquifoliaceae (erva-mate).** Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRGS, Porto Alegre, RS.

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 Dev. Ind. Pharm., v. 24, p. 235-241, 1998.

DE SOUZA, K. C. B. 1997. **Desenvolvimento de metodologia analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* forma flavicarpa.** Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRGS, Porto Alegre, RS.

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 Dev. Ind. Pharm., v. 26, p. 331-336, 2000.

DE SOUZA K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. **Influence of excipients and technological process on antiinflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route.** Phytomedicine, n. 14, p. 102-108, 2007.

DJAHANGUIRI, B. **The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat.** Scand. J. Gastroenterol., v. 4, p. 265, 1969.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV EDIÇÃO, São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA V EDIÇÃO, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>.

FERNANDEZ, M. A.; DE LAS HERAS, B.; GARCIA, M. D.; SAENZ, M. T.; VILLAR, A. **New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol.** J. Pharm. Pharmacol., v. 53, n. 11, p. 1533-1539, 2001.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. **Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais.** Conceitos sobre modificação estrutural para modificação da atividade. Quim. Nova, v. 21, p. 99-105, 1998.

GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J. **Biological activities of lupeol.** Int. J. Biomed. Pharm. Sci., v. 3, n. 1, p. 46-66, 2009.

GAUDY, D.; PUECH, A.; JACOB, M. **Rôle de l'adjuvant dans l'optimization de la production d'un extrait sec vegetal nébulisé: "cas de l'extrait de Noix Vomique".** Acta Pharm. Helv., v.66, p. 5-10, 1991.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. **Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleato in rats.** J. Ethnopharmacol., v. 76, p. 77-80, 2001.

GEORGETTI, S. R.; CASSAGRANDE, R.; DE SOUZA, C. R. F.; DE OLIVEIRA, W. P.; FONSECA, M. J. V. **Spray drying of the soybean extract: effects on chemical properties and antioxidant activity.** Food Sci. Technol., v. 41, p. 1521-1527, 2008.

JÁCOME, R. L. R. P.; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; WAGNER, H. **Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("pau-pereira").** Quim. Nova, v. 27, n. 6, 2004.

KENNY, A. P. **The Determination of Cholesterol by the Liebermann-Burchard Reaction.** Biochem. J., v. 52, p. 611-619, 1952.

KWEIFIOOKAI, G.; DEMUNK, F.; MACRIDES, T. A.; SMITH, P.; RUMBLE, B. A. **Antiarthritic Mechanisms of Lupeol Triterpenes.** Drug Develop. Research, v. 36, n. 1, p. 20-24, 1995.

LIRA, S. R. S.; RAO, V. S.; CARVALHO, A. C. S.; GUEDES, M. M.; MORAIS, T. C.; SOUZA, A. L.; TREVISAN, M. T. S.; LIMA, A. F.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A. **Gastroprotective effect of lupeol on ethanol-induced gastric damage and the underlying mechanism.** *Inflammopharmacol.* 17, 2009, p. 221–228

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

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil – Terrestres, Aquáticas, Parasitas e Tóxicas.** São Paulo, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil.** Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LUBI, N. C.; SATO, M. E. O.; GAENSLY, F. **Desenvolvimento de forma farmacêutica líquida de uso oral, isenta de substâncias glicogênicas, com extrato fluido de *Mikania glomerata* Sprengel - Asteraceae (guaco).** *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 13, p. 43-46, 2003.

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, p. 05-20, 1988.

MACEDO, R. O.; BARBOSA FILHO, J. M.; COSTA, E. M.; SOUZA, A. G. Thermal behaviour of some terpenoids. *J. Therm. Anal. Calorim.*, v. 56, p. 1353-1357, 1999.

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

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F. **Plantas medicinais - A necessidade de estudos multidisciplinares.** *Quim. Nova*, v. 25, p. 429-438, 2002.
MAHATO S. B.; NANDY, A. K.; ROY, G. **Triterpenoids.** *Phytochemistry*, v. 31, p. 2199-2249, 1992.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. **C-13 NMR-Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A Compilation and Some Salient Features**. *Phytochemistry*, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MAHATO, S. B.; SEN, S. **Advances in triterpenoid research**. *Phytochemistry*, v. 44, p. 1185-1236, 1997.

MALAFRONT, N.; PESCA, M. S.; BISIO, A.; ESCOBAR, L. M.; TOMMASI, N. **New flavonoid glycosides from *Vernonia ferruginea***. *Nat. Prod. Commun.*, v. 4, n. 12, p. 1639-1642, 2009.

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

MENDONÇA, C. B. F.; ESTEVES, V. G.; ESTEVES, R. L.; NUNES, A. D. **Palynotaxonomy of *Vernonanthura* H. Rob. (Vernonieae, Asteraceae) species from Southeast Brazil**. *Rev. Bras. Bot.*, v. 32, n. 4, p. 647-662, 2009.

MORAIS, W. F. 2007. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades analgésicas e antiinflamatória do extrato etanólico, frações e substância isolada da casca do caule de *Pterodon emarginatus* Vog. (sucupira)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO.

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

NÉSPOLI, J. H. B.; SIMIONATTO, E.; FLAUZINO, N.; HESS, S. C.; PERES, M. T. L. P.; POPPI, N. R. 2007. **Composição volátil e avaliação da atividade antioxidante de *Vernonia ferruginea* (Asteracea)**. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia – SP. Resumo disponível em: <<http://sec.sbq.org.br/eventos/30rasbq/resumos/T0086-2.pdf>>. Acesso em: 12/03/2010.

OLIVEIRA, W. P.; BOTT, R. F.; SOUZA, C. R. F. **Manufacture of standardized dried extracts from medicinal brazilian plants**. *Drying Technol.*, v. 24, p. 523–533, 2006.

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

PACHÚ, C. O. 2007. **Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB.

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

PETROVICK, G. F. 2006. **Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado revestido contendo produto seco por spray drying de *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. Asteraceae (marcela)**. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRGS, Porto Alegre, RS.

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. **The physicochemical properties of spray dried watermelon powders**. Chem. Eng. Process, v. 46, p. 386-392, 2007.

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, p. 83-112, 2001.

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

ROBINSON, H. **A new genus *Vernonanthura* H. Rob. (Vernonieae: Asteraceae)**. Phytologia, v. 73, p. 65-76, 1992.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais**. Ciênc. Agrotéc., v. 25, p. 102-123, 2001.

SALEEM, M.; MURTAZA, I.; WITKOWSKY, O.; KOHL, A. M.; MADDODI, N. **Lupeol triterpene, a novel diet-based microtubule targeting agent: Disrupts survivin/cFLIP activation in prostate cancer cells**. Biochem. Biophys. Res. Communic., v. 388, p. 576-582, 2009.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: Ecologia e flora**. v. 2, Embrapa cerrados, Brasília, Distrito Federal, p. 573, 2008.

SANTOS, M. R. V. 2002. **Atividade cardiovascular da fração aquosa do extrato hidroalcoólico das folhas de *Sida cordifolia* Linn (Malvaceae) em ratos**.

Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, cap. 15, 2003.

SCHMIDT, P. C.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. **Passionsblumenkraut: Bestimmung dês Gesamtflavoidgehaltes von *Passiflorae herba***. Deutscher Apotheker Zeitung, v. 47, p.17-26, 1993.

SHARAPIN, N. (org.) **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Santafé de Bogotá – Colômbia: CYTED, p. 74, 2000.

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

SILVA, R. F. P.; LEPERA, E. Z. P.; LONGO, M. C. ***Vernonia ferruginea* Less: Atividade analgésica e antiedematogênica**. In: VI Jornada Farmacêutica de Plantas Mediciniais. UNESP, 2003. Resumo disponível em: <<http://www.fcfar.unesp.br/jppm/resumos.htm>>. Acesso em: 12/03/2010.

SILVA, M. A. A.; DINIZ, D. G. A. **Estudo da encapsulação e estabilidade de nanocápsulas contendo lupeol**. Anais do Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão- CONPEEX, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, p. 2910-2922, 2010. Disponível em: <http://www.ufg.br/conpeex2010/>. Acesso em: 20/02/2011.

SINGH, G. R.; VAIDYA, V. V.; SHAILAJAN, S.; BAING, M. M.; CHAMPANERKAR, P. A. **Quantitation of Lupeol in Vernonia cinerea L. whole plant powder by High Performance Thin-Layer Chromatography**. Indian Drugs, v. 43, n. 12, p. 989-992, 2006.

SOARES, L. A. L. 2002. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek – Celastraceae**. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas), UFRGS, Porto Alegre, RS.

SOKAL, R. R.; ROHLF, J. F. **The principles and practice of statistics in biological researchs**. Biometry. Freeman, New York, 1981.

SOUZA, T. P. 2004. **Desenvolvimento tecnológico e otimização de formas farmacêuticas sólidas contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae)**. Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SOUZA, C. D; FELFILI, J. M. **Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, Goiás, Brasil**. Acta Bot. Bras., v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

SPANIOL, B. 2007. **Comparação do comportamento compressional de granulado contendo produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. entre máquinas de comprimir alternativa e rotativa**. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRGS, Porto Alegre, RS.

SU, Y. L.; FU, Z. Y.; ZHANG, J. Y.; WANG, W. M.; WANG, H.; WANG, Y. C.; ZHANG, Q. J. **Microencapsulation of radix *Salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying**. Powder Technol., v. 184, p. 114-121, 2008.

SUDHAHAR, V.; KUMAR, S. A.; VARALAKSHMI, P.; SUNDARAPANDIYAN, R. **Mitigating role of lupeol and lupeol linoleate on hepatic lipemic-oxidative injury and lipoprotein peroxidation in experimental hypercholesterolemia**. Mol. Cell Biochem., v. 295, p. 189-98, 2006.

SUNITHA, S.; NAGARAJ, M.; VARALAKSHMI, P. **Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats**. Fitoterapia, v. 72, n. 5, p. 516-523, 2001.

TEIXEIRA, H. F. 1996. **Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (LAM) DC. Compositae – Marcela**. Porto Alegre, 146p. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

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

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. **Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying**. J. Food Eng., v. 88, p. 411-418, 2008.

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).** Rev. Bras. Farmacogn., v. 15, p. 243-249, 2005.

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T. **Antitumor-promoting activities of sterol and triterpenoides.** J. Jpn. Oil Chem. Soc., v. 49, p. 571-583, 2000.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis - a Thin Layer Chromatography Atlas**, 2a Ed, Berlin: Springer, p. 364, 2001.

ZACHARIAH, R.; NAIR, C.R.S.; VELAYUDHA, P.P. **Anti-inflammatory and anti-mitotic activities of lupeol isolated from the leaves of *Ixora coccinea* Linn.** Indian J. Pharm. Sci., v. 56, n. 4, p. 129-132, 1994.

ZANON, R. B.; HOELZEL, S. C. S. M; MOSTARDEIRO, M. A.; ATHAYDE, M. L. **Secondary metabolic of *Vernonia tweedieana* Baker.** Latin American Knowledge Harvester, 2006. Resumo disponível em: <<http://lakh.unm.edu/handle/10229/36633>>. Acesso em: 12/03/2010.

ZANON, R. B.; PEREIRA, D. F.; BOSCHETTI, T. K.; SANTOS, M.; ATHAYDE, M. L. **Phytoconstituents isolated from dichloromethane fraction of *Vernonia tweediana* Baker leaves.** Rev. Bras. Farmacogn., v. 18, n. 2, p. 226-229, 2008.

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).** J. Ethnopharmacol., v. 82, p. 207-215, 2002.