

Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE PELLETS CONTENDO EXTRATO DE
Pothomorphe umbellata (Pariparoba) VIA EXTRUSÃO ESFERONIZAÇÃO**

César Aparício de Araújo Júnior

Goiânia
2011.

Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE PELLETS CONTENDO EXTRATO DE
Pothomorphe umbellata (Pariparoba) VIA EXTRUSÃO ESFERONIZAÇÃO**

Dissertação apresentada a
Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal de Goiás
como exigência parcial, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas

César Aparício de Araújo Júnior
Orientadora Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto

Goiânia
2011.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)

Araújo Júnior, César Aparício de.

Desenvolvimento e avaliação de pellets contendo extrato de *Pothomorphe umbellata* (Pariparoba) Via Extrusão e Esferonização [manuscrito] / César Aparício de Araújo Júnior. - 2011.

ix, 107 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima; Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto

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

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Anexos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora de Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, apresentada a Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, em 31/08/2011.

Comissão Julgadora:**Titulares:**

Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima – FF/UFG

Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho – UFMT

Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto – FF/UFG

Dr^a. Stephânia Fleury Taveira.

Suplente:

Prof^a. Dr^a. Danielle Guimarães Almeida Diniz – FF/UFG

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nas dificuldades e me agraciar com os momentos felizes, por me dar força interior para superar os desafios e habilidade para caminhar em trechos tortuosos e sabedoria para concluir esta etapa.

A minha família pela paciência de quando estive ausente, pelo carinho e o incentivo quando estive a reclamar.

A Professora Dra. Eliana Martins Lima que confiou toda a estrutura necessária para a realização desse trabalho, além de valiosa orientação.

Ao Professor Dr. Ricardo Neves Marreto pela orientação e paciência diante das minhas dúvidas.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desse trabalho.

Em especial a minha esposa Erika, pois sem sua presença, dedicação e incentivo, esse trabalho não seria possível.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	FAMÍLIA <i>Piperaceae</i> Link.....	3
2.2	GÊNERO <i>Pothomorphe</i>	4
2.3	ESPÉCIE <i>Pothomorphe umbellata</i> (L.) Miq.....	5
2.3.1	Atividades de <i>P. umbellata</i> de acordo com os dados da medicina popular e tradicional	5
2.3.2	Constituintes químicos	8
2.4	OBTENÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS.....	8
2.5	4-NEROLIDILCATECOL.....	12
2.6	FORMAS FARMACEUTICAS ORAIS MULTIPARTICULADAS.....	13
2.6.1	Pellets	14
2.6.1.1	Extrusão/esferonização.....	15
2.6.1.2	Caracterização de pellets.....	23
2.6.2	Excipientes utilizados na produção de sistemas multiparticulados	25
2.6.2.1	Polissorbatos.....	25
2.6.2.2	Dióxido de titânio.....	26
2.6.2.3	Talco farmacêutico.....	26
2.6.2.4	Celulose Microcristalina (CMC).....	27
2.6.2.5	Dióxido de Silício Coloidal.....	28
2.6.2.6	Poliétilenoglicol (PEG 6000).....	28
2.6.2.7	Lactose Mono-Hidratada.....	29
2.6.2.8	Copolímero Polivinilálcool e polietilenoglicol (75:25) (Kollicoat® IR).....	29
2.6.2.9	Povidona (PVP –K30).....	30
2.6.2.10	Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).....	31
3	OBJETIVOS	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	MATERIAIS	33
4.1.1	Equipamentos	33
4.1.2	Substâncias e Reagentes	34
4.2	MÉTODOS	35
4.2.1	Caracterização da matéria-prima vegetal	35
4.2.1.1	Tratamento da matéria-prima vegetal.....	35
4.2.1.2	Determinação do Teor de Umidade Residual.....	35
4.2.1.3	Determinação do Teor de Cinzas Totais.....	35
4.2.1.4	Determinação do índice de intumescência (I.I.).....	36
4.2.1.5	Determinação da granulometria da droga vegetal.....	36
4.2.1.6	Determinação do perfil cromatográfico do 4-NC na matéria-prima vegetal.....	37
4.2.2	Obtenção e caracterização do extrato hidroalcoólico de <i>Pothomorphe umbellata</i> (L.) Miq	37
4.2.2.1	Extração por maceração.....	37
4.2.2.2	Extração por percolação.....	38
4.2.3	Caracterização dos extratos	41
4.2.3.1	Cromatografia de camada delgada para monitoramento do marcador.....	41
4.2.3.2	Determinação do pH.....	42
4.2.3.3	Determinação de sólidos totais solúveis.....	42
4.2.3.4	Determinação do teor alcoólico.....	42
4.2.4	Otimização e Validação do Método Analítico para a quantificação de 4-NC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	43
4.2.4.1	Avaliação do parâmetro de seletividade do método analítico.....	44

4.2.4.2	Avaliação do parâmetro da Linearidade - curva de calibração.....	44
4.2.4.3	Avaliação do parâmetro da Precisão Intra-corrída (Repetibilidade).....	45
4.2.4.4	Avaliação do parâmetro da Precisão Inter-corrídas (Precisão Intermediária).....	45
4.2.4.5	Avaliação do parâmetro de Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	46
4.2.4.6	Avaliação do parâmetro de Robustez.....	46
4.2.5	Avaliação da atividade antioxidante.....	47
4.2.6	Obtenção dos pellets.....	48
4.2.7	Caracterização dos pellets.....	53
4.2.8	Estudo acelerado de fotoestabilidade.....	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	55
5.1.1	Determinação do teor de umidade residual.....	55
5.1.2	Determinação do teor de cinzas totais.....	55
5.1.3	Determinação do índice de intumescência (I.I.).....	55
5.1.4	Determinação da granulometria da droga vegetal.....	56
5.1.5	Determinação do perfil cromatográfico do 4-NC da matéria-prima vegetal.....	56
5.2	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>P. umbellata</i> (L.) Miq.....	60
5.2.1	Extração por maceração.....	60
5.2.2	Extração por percolação.....	60
5.3	CARACTERIZAÇÃO DO PERCOLADO.....	62
5.3.1	Determinação do pH.....	62
5.3.2	Determinação de sólidos totais solúveis.....	62
5.3.3	Determinação do teor alcoólico.....	62
5.4	OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO 4-NC POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	63
5.4.1	Avaliação do parâmetro de seletividade do método analítico.....	65
5.4.2	Avaliação do parâmetro da Linearidade - curva de calibração.....	67
5.4.3	Avaliação do parâmetro de Precisão.....	70
5.4.3.1	Repetibilidade.....	70
5.4.3.2	Precisão Intermediária.....	72
5.4.4	Avaliação do parâmetro de Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	73
5.4.5	Avaliação do parâmetro de Robustez.....	74
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	76
5.6	OBTENÇÃO DOS PELLETS.....	78
5.7	CARACTERIZAÇÃO DOS PELLETS.....	83
5.8	ESTUDO ACCELERADO DE FOTOESTABILIDADE.....	85
5.8.1	Fotoestabilidade do percolado.....	85
5.8.2	Fotoestabilidade dos pellets sem revestimento e revestidos com HPMC, Povidona e Copolímero.....	85
5.8.3	Fotoestabilidade dos pellets revestidos com copolímero (3%, 6% e 9% de ganho de peso).....	88
6	CONCLUSÕES.....	91
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
8	ANEXO.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Pothomorphe umbellata</i> (L.) Miq.....	4
Figura 2	<i>Pothomorphe peltata</i> (L.) Miq.....	5
Figura 3	Estrutura química do 4-nerolidilcatecol nome IUPAC: (2E)-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-olate.....	8
Figura 4	Etapas para obtenção de extratos vegetais e classificação das extrações sólido-líquido.....	11
Figura 5	(A) Pellets de omeprazol em cápsulas e (B) pellets presentes em comprimido.....	14
Figura 6	Produtos obtidos após as etapas do processo de extrusão/esferonização: (a) mistura de pós secos; (b) grânulos após granulação; (c) extrusado obtidos na extrusão e (d) pellets obtidos após esferonização.....	16
Figura 7	Tipos de extrusores: Extrusores alimentados por parafuso (A; B e C); Extrusores alimentados por gravidade (D; E e F); Extrusor alimentado por pistão (G).....	18
Figura 8	Configuração de placas de esferonização: (a) de ranhuras perpendiculares e (b) de ranhuras radiais.....	19
Figura 9	Representação gráfica da formação dos pellets dentro do esferonizador durante a operação (A) movimento em corda do produto; (B) atrito com a parede lisa.....	20
Figura 10	Representação dos mecanismos de esferonização. O diagrama mostra a transição de partículas: de cilíndricas (a) em partículas cilíndricas com extremidades arredondadas (b), seguida da forma de halteres (c), para elipsóide (d) e, finalmente, esféricas (e).....	20
Figura 11	Representação do processo de revestimento em leito fluidizado.....	23
Figura 12	Estrutura química do polissorbato 80 (Tween [®] 80).....	26
Figura 13	Estrutura química da celulose microcristalina.....	27
Figura 14	Estrutura química do polietilenoglicol (PEG 6000).....	28
Figura 15	Estrutura química da Lactose mono-hidratada.....	29
Figura 16	Estrutura química do Copolímero (Kollicoat [®] IR).....	30
Figura 17	Estrutura química da Povidona (PVP-K30).....	30
Figura 18	Estrutura química da Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).....	31
Figura 19	Estrutura esquemática de um percolador comum. 1) Algodão; 2) Papel de filtro; 3) Droga vegetal; 4) Papel de filtro; 5) Algodão; 6) Papel de filtro; 7) Vidro de relógio.....	39
Figura 20	Percoladores utilizados: (A) Percoladores de vidro; (B) Percolador de metal.....	41
Figura 21	Representação esquemática do sistema de destilação simples para a determinação do teor alcoólico do percolado de <i>P. umbellata</i>	43
Figura 22	Fluxograma das etapas para a produção de pellets.....	49
Figura 23	(A) Extrusor (Caleva [®] Extuder 20) e (B) Esferonizador (Caleva [®] . Multi Bowl Spheronizer).....	51
Figura 24	(A) Estufa Lawes [®] e (B) Leito fluidizado (Mycrolab- H00264-Hüttlin [®] - FS).....	52
Figura 25	Revestimento dos pellets: Bomba peristáltica (Watson Marlow [®] , 323); Leito fluidizado (Mycrolab-H00264-Hüttlin [®] - FS).....	52
Figura 26	Distribuição granulométrica do pó da raiz da <i>P. umbellata</i>	56

Figura 27	Perfil cromatográfico em camada delgada das soluções extrativas e solução de referência de 4-nerolidilcatecol visualizado sob luz natural (A) e sob luz ultravioleta (B).....	57
Figura 28	Cromatograma da solução padrão de 4-NC (200ug/mL).....	65
Figura 29	Cromatograma da solução do extrato de 4-NC.....	66
Figura 30	Cromatograma para a verificação da especificidade do método utilizando a injeção de etanol (diluente do 4-NC).....	66
Figura 31	Curvas de calibração do 4-nerolidilcatecol.....	69
Figura 32	Cromatogramas das soluções padrão de 4-NC (10µg/mL a 200µg/mL).....	69
Figura 33	Curvas para determinação dos limites de detecção e quantificação do 4-nerolidilcatecol.....	74
Figura 34	Curva para avaliação da concentração efetiva da atividade antioxidante do 4-NC, da vitamina E, do percolado e do percolado contendo EDTA.....	77
Figura 35	Granulado obtido após mistura dos pós em batedeira.....	80
Figura 36	Produto Intermediário: (A) e (B) Extrudes na malha de extrusão; (C) Extrudes após a extrusão.....	80
Figura 37	(A) Formação de pellets no esferonizador, (B) Pellets dentro do esferonizador, ao final do processo.....	80
Figura 38	Pellets após processo de secagem.....	81
Figura 39	Distribuição do tamanho dos pellets.....	83
Figura 40	Fotomicrografias dos pellets obtidas por MEV: (A) Pellet revestido com Kollicoat [®] IR com ganho de peso de 3%; (B) Pellet revestido com Kollicoat [®] IR com ganho de peso de 6%; (C) Pellet revestido com Kollicoat [®] IR com ganho de peso de 9%.....	84
Figura 41	Resultados do estudo de fotoestabilidade do percolado diluído (1:1,v/v) e do 4-NC. O percolado final foi diluído com etanol (1:1, v/v). As amostras controle ficaram protegidas da luz, mas mantidas dentro da câmara de fotoestabilidade durante o tempo de exposição.....	85
Figura 42	Tendência de degradação do 4-NC presente no pellet sem revestimento (Pellet CMC); no percolado diluído (Perc. Dil.) e do 4-NC padrão em solução etanólica.....	86
Figura 43	Resultados do estudo de fotoestabilidade dos pellets. Pellets sem revestimento (SR), pellets revestidos com HPMC (Opadray [®]), pellets revestidos com povidona (PVP-K30) e pellets revestidos com copolímero (Kollicoat [®]).....	87
Figura 44	Resultados do estudo de fotoestabilidade dos pellets sem revestimento (SR); pellets revestidos com copolímero (Kollicoat [®]) 3%, 6% e 9% em ganho de peso.....	88
Figura 45	Resultados do estudo de fotoestabilidade do percolado diluído (Perc. Dil.) dos pellets sem revestimento (Pellet SR); do 4-NC e pellets revestidos com copolímero (Kollicoat [®]) 9% em ganho de peso.....	89
Figura 46	Tendência de degradação do 4-NC presente no pellet revestido (Pellet Kol. 9% em ganho de peso) e do 4-NC no percolado.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Componentes das formulações para o revestimento dos pellets contendo 4-NC utilizando-se leito fluidizado.....	52
Tabela 2	Componentes das formulações para o revestimento dos pellets contendo 4-NC utilizando-se Kollicoat IR® e relação de ganho de peso para cada lote.....	53
Tabela 3	Fatores de retenção (Rf's) das manchas de referência e manchas encontradas.....	58
Tabela 4	Propriedades físicas do pó das raízes de <i>Pothomorphe umbellata</i>	59
Tabela 5	Concentração de 4-nerolidilcatecol após a extração por maceração utilizando duas proporções de etanol:água.....	60
Tabela 6	Concentração do 4-nerolidilcatecol após processo de extração..	62
Tabela 7	Características do Percolado Final.....	63
Tabela 8	Resultados das áreas dos picos e coeficientes de correlação (r).	67
Tabela 9	Construção das curvas padrão de 4-NC, relação das concentrações usadas, áreas médias dos picos.....	68
Tabela 10	Resultados do parâmetro de repetibilidade (Precisão intra-corridas).....	71
Tabela 11	Resultados do parâmetro de precisão intermediária, Analista A, primeiro dia e analista B, segundo dia.....	72
Tabela 12	Construção das curvas padrão de 4-NC para verificação dos limites de detecção e quantificação.....	73
Tabela 13	Parâmetros modificados para demonstrar robustez do método e valores de área; tempo de retenção; assimetria do pico e NPT após cada modificação.....	75
Tabela 14	Resultados dos parâmetros avaliados na validação da metodologia analítica.....	76
Tabela 15	Resultados das leituras de absorbância e EC ₅₀ obtidas do teste de atividade antioxidante.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CMC	Celulose Microcristalina
DP	Desvio Padrão
DPPH•	2,2 difenil-1-picril-hidrazila
DPR	Desvio Padrão Relativo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FF	Forma Farmacêutica
FFSO	Formas Farmacêuticas Sólidas de uso Oral
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
ICH	International Conference on Harmonisation
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NPT	Número de Pratos Teóricos
PVP	Povidona
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
USP	United States Pharmacopeia – Farmacopéia Americana
R _f	Fator de Retenção
RS	Resíduo seco
SKF	Smith Kline & French
t _R	Tempo de Retenção
4-NC	4-Nerolidilcatecol

RESUMO

A *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. é uma espécie da família Piperaceae, conhecida no Brasil como “Caapeba”, “Caapeba do Norte” ou “Pariparoba” sendo muito utilizada como analgésico, antiinflamatório e anti-espasmódico. De acordo com estudos científicos, o 4-nerolidilcatecol (4-NC) que é o principal metabólito secundário da *P. umbellata*, apresenta atividade antioxidante superior à da vitamina E. A incorporação dos extratos de *P. umbellata* (L.) Miq. em formas farmacêuticas sólidas (FFS) é uma estratégia interessante para viabilizar seu uso como agente antioxidante de uso oral e para estabilização de seu princípio ativo lábil, o 4-NC. Os pellets são FFS de uso oral que apresentam boas propriedades de escoamento, devido a sua forma esférica; estreita distribuição de tamanho, além disso, os pellets permitem obter dispersão uniforme das doses dos fármacos e incorporação de grande quantidade de substâncias ativas incompatíveis em uma mesma forma farmacêutica. O objetivo deste trabalho foi obter um extrato de *P. umbellata*, desenvolver e caracterizar uma forma farmacêutica sólida multiparticulada e avaliar a estabilidade do 4-NC nas formulações desenvolvidas. As raízes de *P. umbellata* foram submetidas às análises de umidade residual, de determinação do índice de intumescência, de teor de cinzas totais e determinação granulométrica. A identificação de constituintes da amostra vegetal foi realizada por cromatografia de camada delgada (CCD). A obtenção do extrato hidroalcoólico foi realizada por percolação. A quantificação de 4-NC foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) UV-Vis. O método analítico foi validado segundo a Resolução RE nº 899 da ANVISA. A determinação da atividade antioxidante do 4-NC isolado e do percolado foi avaliada utilizando-se espectrofotômetro UV-Vis através da técnica que avalia a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, (DPPH•). Os pellets foram produzidos pela técnica de extrusão/esferonização utilizando-se líquido de granulação constituído pelo percolado, dióxido de silício coloidal e polissorbato 80. Os excipientes utilizados foram celulose microcristalina, lactose e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). A secagem dos pellets foi feita em estufa e o revestimento em leito fluidizado. HPMC, povidona e copolímero - composto de polivinilálcool:polietilenoglicol (75:25) - foram os polímeros testados no revestimento. O estudo da fotoestabilidade acelerada foi realizado segundo as normas descritas pelo International Conference on Harmonisation (ICH), avaliando-se a degradação do ativo em solução, na solução extrativa (percolado) e na forma farmacêutica sólida (pellets não revestidos e revestidos). Os pellets foram caracterizados através da distribuição de tamanho, morfologia e friabilidade. A morfologia externa dos pellets foi avaliada através de estereomicroscópio e a espessura do revestimento foi verificada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O teor de umidade da droga vegetal foi de 6,33% ± 0,305, o teor de cinzas totais foi de 8,25% ± 0,61 o índice de intumescência de 3,30mL ± 0,87 e o tamanho médio do pó foi de 170,26 µm. O método analítico para o 4-NC foi linear na faixa de 10 a 200 µg/mL. Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) calculados foram de 1,42 e 0,42µg/mL. A precisão apresentou desvio padrão relativo (DPR) menor que 5,0%. A percolação foi um processo eficiente na extração do 4-NC. A produção dos pellets a partir da técnica de extrusão/esferonização foi satisfatória apresentando um produto de tamanho uniforme em média de 1000 µm. No estudo da atividade antioxidante, o valor da concentração efetiva (CE₅₀) encontrada para o 4-NC isolado e o presente no percolado foi cerca de duas vezes mais potente que a vitamina E. No estudo de fotoestabilidade do 4-NC presente nos pellets revestidos, o copolímero utilizado no revestimento foi o que ofereceu maior proteção do 4-NC contra a fotodegradação. Considerando a inviabilidade de obtenção de formas farmacêuticas sólidas com o ativo puro, conclui-se que o uso do extrato contendo o 4-NC é considerado mais vantajoso uma vez que a tecnologia farmacêutica pode melhorar a estabilidade do ativo contra a degradação.

Palavras chave: *Pothomorphe umbellata*. 4-nerolidilcatecol. Fotoestabilidade. Pellets

ABSTRACT

Pothomorphe umbellata (L.) Miq. Piperaceae is known in Brazil as "caapeba", "caapeba North" or "Pariparoba" being widely used as an analgesic, anti-inflammatory and anti-spasmodic. According to scientific studies, 4-nerolidylcatechol (4-CN) is the main secondary metabolite of *P. umbellata*, has antioxidant activity greater than that of vitamin E. The incorporation of the extracts of *P. umbellata* (L.) Miq. in solid dosage forms is an interesting strategy to enable its use as an oral antioxidant and stabilizing its active labile 4-NC. Pellets are oral dosage forms which have good flow properties due to their spherical shape, narrow size distribution, in addition, the pellets allow to obtain uniform dispersion of doses of drug and incorporation of large amounts of active substances incompatible in the same pharmaceutical form. The objective of this study was to obtain an extract of *P. umbellata*, develop and characterize a multi-particulate solid dosage form and evaluate the stability of the developed formulations containing 4-NC. The roots of the plant material of *P. umbellata* was subjected to analysis of content, residual moisture, determination of swelling index, total ash content and granulometric determination. The identification of plant constituents of the sample was made by thin layer chromatography (TLC). Obtaining the hydroalcoholic extract was made by percolation. Quantitation of 4-NC was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC-UV-Vis). The analytical method was validated for the parameters required in Resolution N°. 899, ANVISA. The determination of antioxidant activity of the isolated 4-NC and the percolated was evaluated using UV-Vis spectrophotometer using a technique that measures the activity of scavenging free radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH •). The pellets were produced by extrusion technique / spheronisation using granulation liquid consisting of the percolated, colloidal silicon dioxide and polysorbate 80. The excipients were microcrystalline cellulose, lactose and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). The drying of the pellets was done in an oven and fluidized bed coating. HPMC, povidone and copolymer (polyvinyl alcohol polyethylene glycol graft copolymer) were tested in the polymer coating. Accelerated photostability study was performed according to standards described by the ICH International Conference on Harmonisation evaluating 4-NC degradation in the extraction solution (percolated) and the solid dosage form (uncoated and coated pellets). The pellets were characterized by size distribution, morphology and friability. The external morphology of the pellets was evaluated through a stereomicroscope and the thickness of the coating was observed by Scanning Electron Microscopy (SEM). The result obtained for the moisture content was $6.33 \pm 0.305\%$ for total ash content: $8.25\% \pm 0.61$ and swelling index of $3.30 \pm 0.87\text{mL}$ and an average particle size of the powder was $170.26\mu\text{m}$. The analytical method for 4-NC was linear in the range 10 to $200\mu\text{g/mL}$. LQ and LD were calculated 1.42 and $0.42\mu\text{g/mL}$. The accuracy showed less than 5.0% relative standard deviation (RSD). The percolation process was efficient in the extraction of 4-NC. The production of pellets from the extrusion technique/spheronisation was presenting a satisfactory product was uniform with an average size of $1000\mu\text{m}$. In the study of antioxidant activity, the effective concentration (EC_{50}) value found for the isolated 4-NC and present in the percolated was about two times more potent than vitamin E. In the study of photostability of 4-NC present in the coated pellets, the copolymer coating was used in which offered more protection to the active 4-NC against photodegradation. Given the impossibility of obtaining solid dosage forms with pure active, the use of the extract containing the 4-NC is considered more advantageous since the pharmaceutical technology can improve the stability of the asset against degradation.

Keywords: *Pothomorphe umbellata*. 4-nerolidylcatechol. Photostability. Pellets.

1 INTRODUÇÃO

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (WALL e WANI, 1996). Apesar do aumento de estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SOEJARTO, 1996).

Um significativo número de terapias são derivadas ou inspiradas em produtos naturais. Este fato tem contribuído para o desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN *et al.*, 2003; BALUNAS e KINGHORN, 2005; TAN *et al.*, 2006; GORDALIZA, 2007). A diversidade de espécies encontradas na flora nativa brasileira faz com que as plantas sejam uma fonte potencialmente rica em agentes ativos terapêuticos (BROHEM *et al.*, 2009).

Dentre as plantas que apresentam interesse terapêutico destaca-se o gênero *Pothomorphe*, da família *Piperaceae*. *Pothomorphe umbellate* (L.) Miq. é uma planta nativa da Mata Atlântica tendo o 4-NC ($C_{21}H_{30}O_2$) como o metabólito secundário mais abundante das raízes desta espécie apresentando aspecto oleoso e coloração amarelo ouro (KIJJOA *et al.*, 1980).

Farmacologicamente, o extrato bruto desta espécie tem sido utilizado na medicina popular para o tratamento de várias enfermidades, como colagogo e colerético (PECKOLT, 1929); atividades antimaláricas (AMORIM *et al.* 1988); analgésica (BIOKA e ABENA, 1990; PERAZZO *et al.*, 2005), antiinflamatória (BARROS, 2005; PERAZZO *et al.*, 2005), entre outras.

Considerando o grande uso popular da *Pothomorphe umbellate* (L.) Miq e os estudos indicando o seu potencial antioxidante, justifica-se o desenvolvimento de uma forma farmacêutica sólida oral (FFSO) que ofereça padronização na concentração e proteção contra a degradação do ativo. Trabalhos científicos demonstram que o 4-NC apresenta instabilidade química (CARDOSO, 2008; SILVA *et al.*, 2005) assim, a realização de estudos de fotoestabilidade é também relevante para o desenvolvimento de formas farmacêuticas contendo esta substância.

Diante deste contexto, a farmacotécnica pode ser usada como uma ferramenta importante na obtenção de formas farmacêuticas (FF) que possam proteger o ativo de determinadas condições que provocam degradação. Além de proteção, tecnologias podem ser empregadas para promover a liberação gradual ou

imediate de um fármaco veiculado em uma FFSO seja em sistemas monolíticos ou multiparticulados. A granulação, o revestimento em leito fluidizado, a extrusão/esferonização e a compressão são processos utilizados na obtenção de subunidades dos sistemas multiparticulados (PEZZIN *et al.*, 2007).

Boas propriedades de escoamento, devido à forma esférica (KANBE *et al.*, 2007); estreita distribuição de tamanho e dispersão uniforme das doses dos fármacos (MURRAY *et al.*, 2007) e a permissão de incorporação de grande quantidade de substância ativa e de substâncias bioativas incompatíveis em uma mesma forma farmacêutica (IOSIO *et al.*, 2008) são algumas vantagens alcançadas com o uso de pellets.

No presente trabalho, foram preparados sistemas multiparticulados contendo extrato de *Pothomorphe umbellate* no intuito de proteger o 4-NC contra a fotodegradação. As preparações dos pellets foram realizadas pelas técnicas de extrusão/esferonização com revestimento em leito fluidizado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

As espécies medicinais são uma fonte de novas substâncias ativas de interesse farmacêutico e cosmético, desde que sejam feitos estudos quanto aos seus aspectos botânicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e de controle de qualidade podendo garantir desta forma eficácia e segurança no uso do produto final (Di STASI, 2002).

Apesar de muitos produtos naturais terem se tornado ferramentas no desenvolvimento de fármacos, eles ainda necessitam ser caracterizados através de estudos químicos e farmacológicos (BROHEM *et al.*, 2009).

2.1 FAMÍLIA *PIPERACEAE* Link

A família *Piperaceae* Link é formada por cerca de 10 gêneros e um número incerto de espécies, com uma estimativa entre 1400 a mais de 2000, sendo a maioria pertencente aos dois principais gêneros: *Piper* L. e *Peperomia* Ruiz et Pavon, distribuídos principalmente nas regiões tropicais do mundo (CRONQUIST, 1981; FREITAS, 1999; GREIG, 2004).

Souza e Lorenzi (2005) e Greig (2004) relatam que esta família é muito comum nas formações florestais brasileiras principalmente na Mata Atlântica, onde 3 gêneros nativos são encontrados: *Piper*, *Peperomia* e *Sarcochachis*. Segundo estes autores, o gênero *Piper* engloba atualmente os antigos gêneros *Ottonia* e *Pothomorphe*. Apesar desta observação, o termo *Pothomorphe* ainda é muito utilizado em trabalhos científicos.

No continente sul-americano, e mais especificamente o Brasil, várias espécies da família têm sido usadas na medicina, estando incluídas na primeira edição da Farmacopéia Brasileira (SILVA, 1926): *Piper angustifolium* Ruiz et Pavon, de nome vulgar matico ou erva de soldado tendo como partes usadas as folhas. São indicadas como hemostático, adstringente nas hemoptises e tratamento das diarreias e externamente utilizado nas feridas hemorrágicas, úlceras e leucorréias (COIMBRA, 1958). De igual forma estão descritos os frutos de *Piper cubeba* L. de uso como estimulante estomacal, como balsâmico e expectorante nas afecções

catarrais das vias respiratórias e anti-séptico das vias respiratórias e *Heckeria umbellata* (L.) Kunth. (SILVA, 1929).

Sob o ponto de vista químico, a família *Piperaceae* Link é citada pela presença de ésteres e éteres fenólicos, alcalóides pirrolidínicos, óleos voláteis e lignanas (GIBBS, 1974; RICE-EVANS, 1996). O mais pesquisado é o gênero *Piper* L. tendo sido isoladas várias substâncias pertencentes a algum dos grandes grupos como alcalóides, principalmente os amídicos (pirrolidínicos e piperidínicos), lignanas, flavonóides, lactonas (kava-lactonas), butenólidos e ciclohexano-epóxidos (CALLE-ALVAREZ, 1983; BURKE e NAIR, 1986; SENGUPTA e RAY, 1987; FREITAS, 1999).

2.2 GÊNERO *Pothomorphe*

Segundo Sponchiado-Júnior (2006), a primeira citação ao Gênero *Pothomorphe* no Brasil foi feita em um manuscrito de 600 páginas escrito por um padre português cujo nome permanece desconhecido.

Silva (1926) incluiu *Pothomorphe umbellata* na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, sob a sinonímia de *Heckeria umbellata*, oficializando para esta espécie o nome pariparoba.

O gênero *Pothomorphe* é constituído de um número pequeno de espécies. Alguns autores acreditam que o número de espécies não ultrapasse duas dezenas (YUNKER, 1972; YUNKER, 1973, BHATTACHARYYA e JOHRI, 1998). No Brasil ocorrem duas espécies: *Pothomorphe umbellata* (Figura 1) e *Pothomorphe peltata* (Figura 2).



Figura 1: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Fonte: medicinadasplantas.blogspot.com)



Figura 2: *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. (Fonte: medicinadasplantas.blogspot.com)

2.3 ESPÉCIE *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.

A espécie *Pothomorphe umbellata* é conhecida popularmente como catajé, capeua, caena, atajé, caapeva, aguaxima, caapeba verdadeira, caapeba, caá-peba, caá-peuá, capeba ou pariparoba. Em determinadas regiões do País, a planta também é conhecida como malvarisco e caapeba-do-norte (LE CONTE, 1934; DI STASI, 2002; PANIZZA, 1997, MORAES, 1986).

2.3.1 Atividade de *Pothomorphe umbellata* de acordo com dados da medicina popular e tradicional

A Farmacopéia Brasileira em sua primeira edição oficializou o uso da pariparoba no Brasil registrando como droga as raízes secas do vegetal (MORAES, 1986).

Lima, citado por Riedel (1941), afirma que a pariparoba é um estimulante da secreção biliar e diurética. Peckolt (1929) diz que as diversas partes do vegetal têm a propriedade de fluidificar a bile facilitando o seu escoamento, atribuindo também propriedades colagogas e coleréticas.

A infusão das folhas da *Pothomorphe umbellata* tem sido utilizada popularmente no alívio de dores musculares, enquanto que o uso interno (via oral) de um macerado das folhas em água tem sido usado para tratar distúrbios

hepáticos, uso também atribuídos à infusão das raízes da planta (Di STASI *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 1996).

A decocção das folhas ou raízes é usada para aliviar a icterícia, malária, problemas urinários e renais, sífilis e gonorréia, leucorréia, problemas menstruais e dores de estômago, também tem sido aplicado em feridas e tumores. A decocção da raiz é usada como um poderoso digestivo e para tratamento de constipação, dispepsia e dores de estômago (DOMIS e OYEN, 2010; disponível em: <http://database.prota.org/search.htm>; acesso em dez., 2010).

Otero e colaboradores (2000) em estudos de etnobotânica com comunidades rurais da Colômbia, citaram *Pothomorphe umbellate* como uma das 101 espécies de ervas medicinais utilizadas por curandeiros locais no tratamento de picadas de cobras, especialmente envenenamentos por *Bothrops*, *Pothidium* e *Bothriechis*.

Sacoman e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antitumoral e a citotoxicidade de extratos obtidos de *Pothomorphe umbellate*. Eles verificaram que a inibição da topoisomerase I pode ser atribuída ao 4-NC colaborando com a atividade antitumoral observada em ensaios *in vivo*.

Vários estudos têm apresentado diferentes atividades biológicas dos extratos brutos obtidos de *Pothomorphe umbellate*. O Quadro a seguir apresenta um resumo de atividades biológicas encontradas na literatura.

Atividade biológica	Referências
Atividade analgésica e antiinflamatória	BARROS, 2005; BIOKA e ABENA, 1990; DESMARCHELIER <i>et al.</i> ,2000; FASCINELI <i>et al.</i> , 1999; PERAZZO <i>et al.</i> 2005;
Atividade antimicrobiana	FONSECA, 1939; FREISE, 1933; ISOBE <i>et al.</i> , 2002; MONGELLI <i>et al.</i> , 1995; NORIEGA <i>et al.</i> , 2008; PECKOLT, 1929; RIEDEL, 1941; SPONCHIADO-JUNIOR, 2006.
Ação contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>	MONGELLI <i>et al.</i> , 2002; MONGELLI <i>et al.</i> ,1995.
Atividade antimalárica	ANDRADE-NETO <i>et al.</i> , 2007; AMORIM <i>et al.</i> 1988; PINTO <i>et al.</i> , 2009.
Atividade fotoprotetora e antioxidante	BARROS <i>et al.</i> , 1996; DESMARCHELIER <i>et al.</i> ,1997a; DESMARCHELIER <i>et al.</i> 1997b; ROPKE <i>et al.</i> , 2003.
Potencial contra o envelhecimento	ROPKE <i>et al.</i> , 2003(a).
Atividade antitumoral	MONGELLI <i>et al.</i> 1999.
Atividade anti-HIV	GUSTAFSON <i>et al.</i> 1992 .
Atividade antifúngica	PILLA, 2005; ROPKE <i>et al.</i> , 2006; TABOPDA <i>et al.</i> , 2008.

Quadro 1: Principais atividades biológicas do extrato de *Pothomorphe umbellate* tendo o 4-NC como o metabólito secundário mais abundante.

2.3.2 Constituintes químicos

De maneira geral, sabe-se que os membros da família *Piperaceae* são ricos em substâncias tais como fenóis, ésteres fenólicos, terpenóides e éteres (GIBBS, 1974; CALLE-ALVAREZ, 1983). Pelo o que tem sido apresentado, as plantas do gênero *Pothomorphe* produzem lignanas, neolignanas, flavonóides e alcalóides (KIJJOA *et al.*, 1980; RORIG e VAN POSER, 1997). Investigações fitoquímicas evidenciaram a presença de 4-nerolidilcatecol nas raízes e folhas de *Pothomorphe umbellata* e ainda o acúmulo de sesamina em folhas da planta adulta (BARROS *et al.*, 1996).

Bergamo (2003) realizou o estudo fitoquímico das folhas de *Pothomorphe umbellata* através de três frações do extrato bruto: hexânica, metanólica e acetato de etila que resultou no isolamento de onze substâncias, entre as quais duas amidas, cinco flavonas, duas lignanas, um fenilpropanóide, além do 4-nerolidilcatecol. Em particular, na fração acetato de etila foram isoladas três substâncias de caráter ácido.

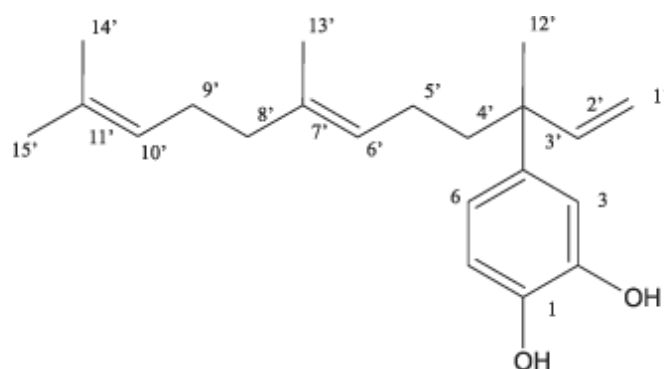


Figura 3: Estrutura química do 4-nerolidilcatecol nome IUPAC: (2E)-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-olate

2.4 OBTENÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS

Os extratos vegetais podem ser fluidos, moles, secos (Farm. Brasil. 5º Ed. 2010). Os extratos líquidos são obtidos a partir de matérias-primas vegetais com o objetivo de retirar, com maior ou menor especificidade, determinados componentes. As soluções extrativas podem ser preparadas em meio aquoso, hidroalcoólico, hidropoliglicólico ou oleosos (SCHILCHER, 1997).

As operações de extração podem ser classificadas como: operações de extração parcial (extração sem esgotamento) e operações de extração exaustiva, que permitem o esgotamento da matéria-prima. A maceração e suas variáveis, assim como a turbo-extração, pertencem ao primeiro grupo, enquanto que a percolação, a extração contra-corrente, extração em carrossel e a extração com gases supercríticos pertencem ao segundo grupo (SONAGLIO *et al.*, 2004).

Os fatores que interferem na extração são: as características do material vegetal, o seu grau de divisão, o meio extrator (solvente) e a metodologia. O grau de divisão do material influencia diretamente a eficiência da extração. As raízes e os caules são tecidos extraordinariamente compactados (xilema), ao passo que as folhas e flores apresentam com textura mais delicada. Assim, para haver penetração dos solventes é necessário considerar que quanto mais rígido for o material menor deve ser sua granulometria (FALKENBERG *et al.*, 2004).

O conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja referencialmente extrair determina o solvente ou mistura solvente que mais se aproxima do ótimo de seletividade para aquela extração. Praticamente todos os constituintes de interesse para a análise fitoquímicas apresentam alguma solubilidade em misturas etanólicas ou metanólicas a 80%. Além disto, os solventes devem ser escolhidos considerando-se a toxicidade e/ou os riscos que o seu manuseio representa, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade e o custo (FALKENBERG *et al.*, 2004).

O tempo de extração depende de fenômenos de difusão do solvente; da agitação (que pode abreviar a duração de um processo extrativo); da rigidez do material vegetal quanto do seu estado de divisão; da natureza das substâncias a extrair e da temperatura. Esta última, quando aumentada pode facilitar a solubilidade de qualquer substância, entretanto, o calor nem sempre pode ser empregado, já que muitas substâncias são instáveis em altas temperaturas (FALKENBERG *et al.*, 2004).

O Quadro 2 apresenta os principais métodos de extração sólido/líquido: extrações a frio e a quente além das diferenças e vantagens. Já a Figura 4 apresenta as principais etapas para obtenção de extratos vegetais e classificação das extrações sólido-líquido.

EXTRAÇÕES A FRIO		
Turbolização	Maceração	Percolação
A extração ocorre concomitantemente com a redução do tamanho de partícula, resultado da aplicação de elevadas forças de cisalhamento favorecendo rápida dissolução das substâncias. Os tempos de extração ocorrem na ordem de minutos com quase esgotamento da droga. Em laboratório, para pequenas quantidades, pode-se realizar o processo com um liquidificador, atentando-se para a estabilidade da solução extrativa.	É realizada em recipiente fechado, em diversas temperaturas, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. Não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula.	É uma extração exaustiva das substâncias ativas. A droga vegetal moída é colocada em um recipiente cônico ou cilíndrico (<i>percolador</i>), de vidro ou de metal, através do qual é feito passar o líquido extrator. O produto obtido denomina-se percolado.
EXTRAÇÕES A QUENTE EM SISTEMAS ABERTOS		
Infusão	Decocção	
A extração se dá pela permanência, durante certo tempo, do material vegetal em água fervente, num recipiente tapado. A infusão é aplicável a partes vegetais de estrutura mole, as quais devem ser contundidas, cortadas, ou pulverizadas grosseiramente, conforme a sua natureza, a fim de que possam ser mais facilmente penetradas e extraídas pela água.	Consiste em manter o material vegetal em contato, durante certo tempo, com um solvente (normalmente água) em ebulição. É uma técnica de emprego restrito, pois muitas substâncias ativas são alternadas por um aquecimento prolongado e costuma-se empregá-la com materiais vegetais duros e de natureza lenhosa.	
EXTRAÇÕES A QUENTE EM SISTEMAS FECHADOS		
Extração sob refluxo	Extração em aparelho de soxhlet	
Consiste em submeter o material vegetal à extração com um solvente em ebulição, em um aparelho dotado de um recipiente, onde será colocado o material e o solvente, acoplado a um condensador, de forma que o solvente evaporado durante o processo seja recuperado e retorne ao conjunto. A desvantagem está relacionada quando existem substâncias termolábeis.	É utilizada para extrair sólidos com solventes voláteis, exigindo o emprego do aparelho de soxhlet. Em cada ciclo da operação, o material vegetal entra em contato com o solvente renovado; assim, o processamento possibilita uma extração altamente eficiente, empregando uma quantidade reduzida de solvente.	

Quadro 2: Principais características dos tipos de extrações a frio e a quente. (Adaptado de: FALKENBERG *et al.*, 2004).

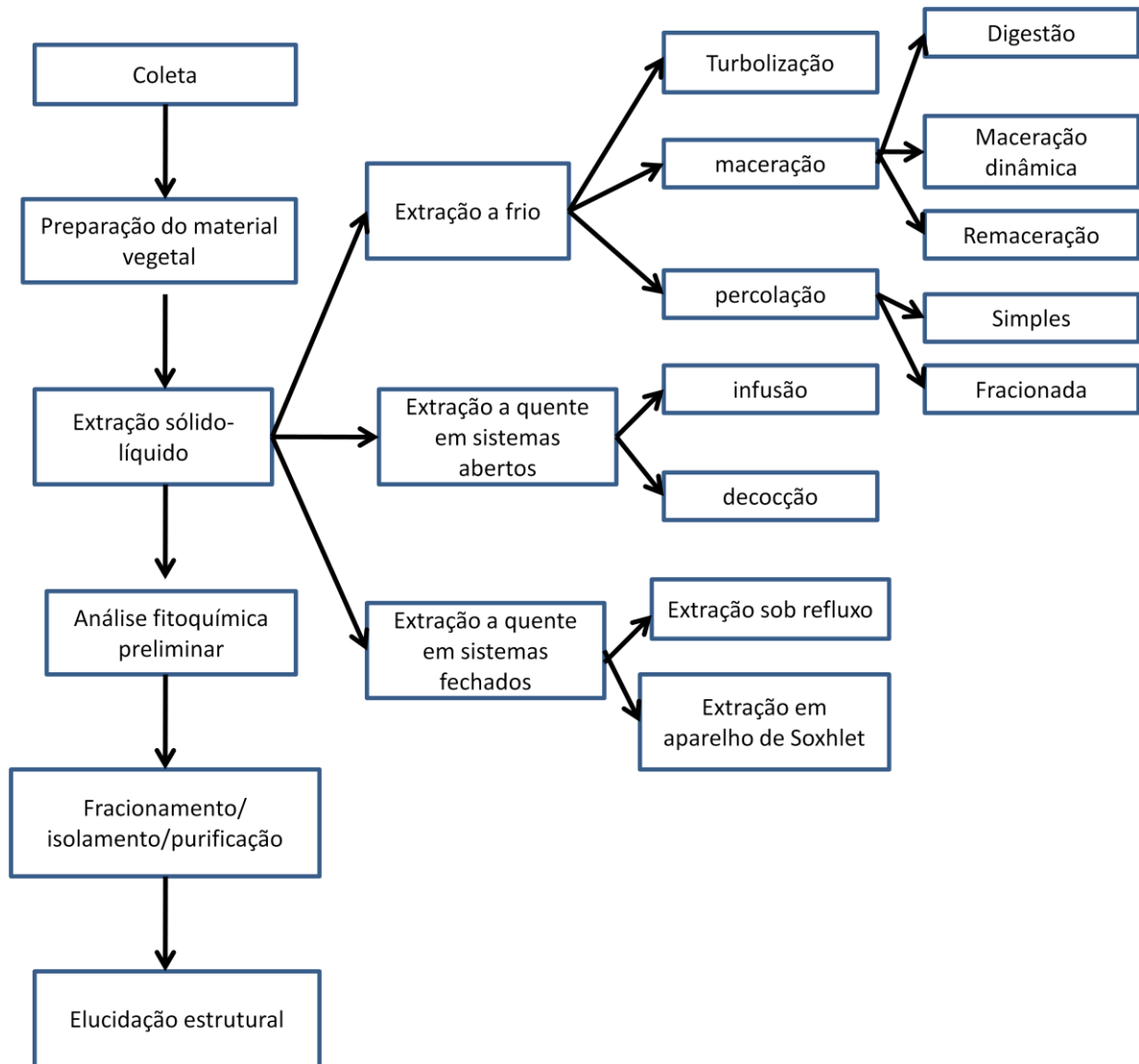


Figura 4: Etapas para obtenção de extratos vegetais e classificação das extrações sólido-líquido.

As drogas vegetais mais indicadas para serem extraídas por maceração são aquelas ricas em substâncias ativas que não apresentam uma estrutura celular, como gomas, resinas e alginatos. Na preparação de tinturas-mães em homeopatia ou de tinturas oficiais, os líquidos extratores preferidos são o etanol e as soluções hidroetanólicas (SONAGLIO *et al.*, 2004).

A maceração na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator não levando ao esgotamento da matéria-prima vegetal. Os principais fatores que influenciam a eficiência de

maceração estão vinculados ao material vegetal, ao líquido ou misturas de líquidos extratores e às condições do sistema, em conjunto (LIST e SCHMIDT, 1989).

Diferentemente da maceração, a percolação é uma operação dinâmica, indicada na extração de substâncias, farmacologicamente muitas ativas, presentes em pequenas quantidades ou pouco solúveis e quando o preço da droga é relevante (LIST e SCHMIDT, 1989).

Na percolação simples, o procedimento usual inicia-se com o intumescimento prévio da droga com o líquido extrator, durante 1 a 2 horas, fora do percolador, de forma que as forças de expansão resultantes não venham afetar a estrutura deste.

Após o intumescimento segue-se a fase mais crítica, que é o empacotamento homogêneo e não muito compacto do percolador. Juntamente com a qualidade de empacotamento, também a forma e as dimensões do percolador, assim como a velocidade de fluxo, desempenham papel determinante na eficiência da percolação. A velocidade de fluxo pode ser lenta (0,5 a 1 mL/min/kg), moderada (1 a 2 mL/min/kg) ou rápida (2 a 5 mL/min/kg), considerando um tamanho de partícula de 1 a 3 mm. Partículas com o diâmetro inferior a 1 mm podem produzir uma compactação excessiva, reduzindo a velocidade de fluxo, sem que ocorra, necessariamente, um incremento na eficiência do processo (SONAGLIO *et al.*, 2004).

A percolação fracionada implica a separação das duas ou três principais frações de percolado, que contêm, normalmente, em torno de 75 a 80% das substâncias passíveis de extração, das frações seguintes, mais diluídas. Essas últimas são destinadas à fase posterior de concentração ou de simples ajustes do volume final, como é o caso dos extratos fluídos (SONAGLIO *et al.*, 2004).

2.5 4-NEROLIDILCATECOL (4-NC)

Um estudo realizado por da Silva e colaboradores (2005) investigou a fotoestabilidade e o fator de proteção solar de extratos da raiz de *Pothomorphe umbellate* presente em uma formulação em gel. O método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi usado para avaliar a estabilidade química usando o 4-NC como marcador a 5, 25, 45°C por um período de 103 dias. A fotoestabilidade e o fator de proteção solar (FPS) foram analisados através do método

espectrofotométrico usando amostras irradiadas com lâmpadas de UVB. Nenhuma diferença significativa da concentração do 4-nerolidilcatecol foi encontrada nas formulações estocadas a 5 e a 25°C.

O interesse no estudo de antioxidantes oriundos de alimentos e plantas medicinais se deve ao uso como reguladores do equilíbrio de formação/remoção dos radicais livres que podem prevenir doenças crônico-degenerativas (BOSCOLO *et al.*, 2007).

A partir das observações de Barros *et al.* (1996), o emprego do extrato hidroalcoólico de *Pothomorphe umbellate* que contém o antioxidante 4-NC, o qual apresenta atividade superior à da vitamina E, ganha crescente interesse.

2.6 FORMAS FARMACEUTICAS ORAIS MULTIPARTICULADAS

Historicamente, a via de administração mais comum e, convenientemente, empregada para administração de fármacos é a oral. Durante os anos 80, mais de dois terços do mercado farmacêutico mundial, consistiam de medicamentos administrados oralmente e, mais de 85% era representado pelas preparações farmacêuticas orais sólidas (PRISTA *et al.*, 1995; LE HIR, 1997; ALLEN *et al.*, 2005; AULTON, 2005; SWARBRICK, 2007).

Os fármacos são administrados na forma de formulações de medicamentos. Os adjuvantes empregados nos medicamentos podem exercer funções farmacotécnicas variadas e especializadas como: permitir, entre outras funções, solubilização, suspensão, modificação da taxa de dissolução, favorecimento da compressibilidade, além de correção das características organolépticas do fármaco (AULTON, 2005).

A tecnologia farmacêutica tem como finalidade realizar estudos de novas formulações através de otimização de efeitos farmacológicos incluindo a biodisponibilidade, segurança e eficácia em um tratamento terapêutico (GÓMEZ-CARRACEDO *et al.*, 2008 e 2009). Dentre todas as formas farmacêuticas (sólidas, semi-sólidas e líquidas) a que possui maior praticidade, aceitação e variabilidade tecnológica são as formas farmacêuticas sólidas de uso oral (FFSO). As FFSO podem ser divididas em sistemas monolíticos ou multiparticulados. Este último sistema é constituído por grânulos, *pellets* ou até mesmo minicomprimidos (PEZZINI, *et al.*, 2007).

2.6.1 Pellets

O interesse pela utilização de pellets como forma farmacêutica remonta à segunda metade da década de 1940. Em 1952, o laboratório Smith Kline & French (*SKF*) lançou no mercado uma nova forma farmacêutica, o *Spansule*, que consistia em cápsulas preenchidas com pellets revestidos que possuíam diferentes tempos de dissolução (SANTOS *et al.*, 2004). Apenas em 1964, a *SKF* introduziu uma nova técnica para a produção de pellets de liberação sustentada, que se baseava no congelamento por pulverização de uma solução líquida de lipídios e princípio ativo (LANTZ *et al.*, 1964).

Foi nesta mesma época que surgiu no Japão uma nova técnica para a produção de pellets baseada na esferonização inventada por Nakahara. Os pellets eram obtidos por extrusão/esferonização de uma massa úmida constituída pela mistura de substância ativa e excipientes (NAKAHARA, 1966). Assim, deu-se início ao desenvolvimento da técnica de extrusão e esferonização que atualmente é uma das técnicas mais popularmente utilizada para produção de pellets (VERVAET *et al.*, 1995).

Os pellets são definidos como esferas que possuem diâmetros variáveis dependendo da aplicação e do se deseja da produção (VERVAET *et al.*, 1995). Pellets produzidos pela indústria farmacêutica apresentam tamanhos variando de 500 a 1500 μm (GHEBRE-SELLASSIE, 1989; DUKIC-OTT *et al.*, 2009), podem ser destinados tanto para o enchimento de cápsulas duras de gelatina quanto para obtenção de comprimidos, como formas farmacêuticas unitárias (Figura 5) (CONINE e HADLEY, 1970; JALAL *et al.*, 1972; MALINOWSKI e SMITH, 1974; SANDBERG *et al.*, 1988; MILLILI e SCHWARTZ, 1990; BÉCHARD e LEROUX, 1992).



Figura 5: (A) Pellets de omeprazol em cápsulas (<http://www.indiamart.com/murlikrishnapharma/products.html>) e (B) pellets presentes em comprimido (MURRAY *et al.*, 2007).

O processo de produção de pellets é denominado peletização que consiste na aglomeração de pós finos de substância ativa e excipientes em pequenas unidades esféricas. Os pellets diferenciam-se do produto obtido no processo de granulação clássica não apenas no que se diz respeito ao processo de produção, mas também pelas características físicas apresentadas (SANTOS *et al.*, 2004).

Dentre as vantagens do uso de pellets pode-se citar: 1) apresentam ótimas propriedades de escoamento, devido à sua forma esférica (KANBE *et al.*, 2007); 2) possuem estreita distribuição de tamanho; 3) dispersão uniforme das doses dos fármacos (MURRAY *et al.*, 2007); 4) superfície susceptível ao revestimento por película com interesse à proteção entérica, ou à liberação controlada ou sustentada; 5) permite a incorporação de grande quantidade de substância ativa e de substâncias bioativas incompatíveis em uma mesma forma farmacêutica (IOSIO *et al.*, 2008); 6) apresentam grande dispersão no trato gastrointestinal com conseqüente redução da irritação da mucosa por fármacos potencialmente gastro-irritantes (HOWARD *et al.*, 2006); 7) baixo risco de efeitos adversos por superdosagem (DUKIC-OTT *et al.*, 2009); 8) máxima absorção das drogas reduzindo a variabilidade inter e intrapacientes (GHEBRE-SELLASSIE e KNOCH, 2002); 9) diferentes características de liberação podem ser combinados para atingir o padrão de liberação desejado de ingredientes ativos (SUMMERS e AULTON, 2005; MEHTA *et al.*, 2005).

As formulações de pellets comercialmente disponíveis são geralmente revestidas com filmes poliméricos com a finalidade de se obter liberação controlada. A espessura (BIANCHINI e VECCHIO, 1989; ZHANG *et al.*, 1991; YUEN *et al.*, 1993) e a composição (EERIKAINEN e LINDQVIST, 1991; YUEN *et al.*, 1993) do filme influencia na liberação do ativo. Desta forma, a mistura de diferentes tipos de revestimentos pode resultar em diferentes perfis de liberação (VERVAET *et al.*, 1995).

2.6.1.1 Extrusão/esferonização

Os principais passos envolvidos no processo para obtenção de pellets por extrusão/esferonização são: **1) Mistura seca dos componentes**, a fim de se obter uma dispersão pulveréa homogênea; **2) Umidificação da massa**: uma vez obtida a mistura homogênea dos pós, segue-se a adição do líquido de granulação para

produção uma massa úmida suficientemente plástica; **3) Extrusão** é a compactação da massa úmida até que escoe através de orifícios presentes no equipamento formando estruturas cilíndricas; **4) Esferonização** é a etapa em que o extrusado é quebrado em cilindros com comprimentos uniformes que são moldados em esferas devido à rotação e à fricção ocorridas no processo; **5) Secagem**, para obter um conteúdo de umidade final requerido. A secagem pode ocorrer em leito estático (estufa) ou em leito fluidizado; **6) Tamisação** é considerada uma etapa opcional quando se quer obter uma distribuição estreita de tamanho dos pellets (HICKS e FREESE, 1989; VERVAET *et al.*, 1995; GHEBRE-SELLASSIE e KNOCH, 2002; SANTOS *et al.*, 2004).

Uma representação esquemática dos produtos obtidos após as principais etapas do processo de obtenção de pellets pelo método de extrusão/esferonização está apresentada na Figura 6.

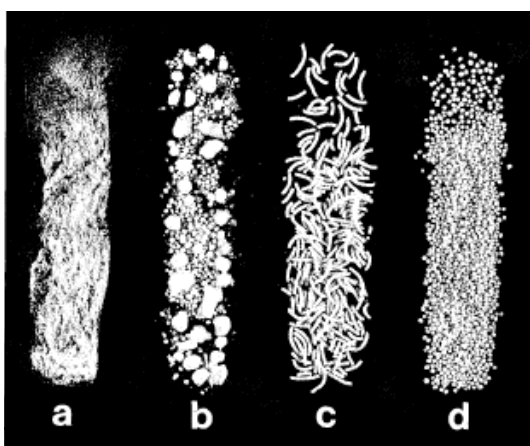


Figura 6: Produtos obtidos após as etapas do processo de extrusão/esferonização: (a) mistura de pós secos; (b) grânulos após umidificação; (c) extrusados obtidos na extrusão e (d) pellets obtidos após esferonização (Fonte: MEHTA *et al.*, 2005).

Na etapa de mistura seca dos componentes são utilizados os equipamentos de mistura convencionais. Na umidificação da massa são empregados os mesmos equipamentos e processos utilizados na granulação por via úmida. A quantidade de líquido necessária para obter esfericidade e esferas de tamanho uniforme geralmente é maior que a utilizada no processo similar de obtenção de granulados para compressão (AULTON, 2005).

A extrusão produz, a partir da massa úmida, partículas de tamanho uniforme em forma de bastão. A massa úmida é forçada a passar por uma matriz, adquirindo a forma de pequenas partículas cilíndricas. Ao saírem, os extrusados quebram-se a uma mesma distância, devido ao seu próprio peso. O extrusado deve ter plasticidade

suficiente para sofrer deformação, mas não deve ser plástico a ponto de promover a aderência entre as partículas, quando coletadas ou roladas no esferonizador (SUMMERS e AULTON, 2005).

Existem vários tipos de extrusores, mas, de maneira geral, eles podem ser divididos em três classes, de acordo com o seu mecanismo de alimentação: 1) Extrusores alimentados por parafuso (placa terminal ou axial, forma de abóbada e radial); 2) Extrusores alimentados por gravidade (rolo cilíndrico, rolo dentado, radial); e 3) Extrusores alimentados por pistão (êmbolo) (HARRISON *et al.*, 1987; SUMMERS e AULTON, 2005; MEHTA *et al.*, 2005).

Dentre os extrusores alimentados por parafuso pode-se citar o extrusor de Arquimedes que é composto por um parafuso-sem-fim, cuja finalidade é conduzir a massa umidificada até a rede de extrusão permitindo trabalhar com quantidades contínuas de alimentação sob os mecanismos axial ou radial em relação ao posicionamento da placa de extrusão (Figura 7) (SANTOS *et al.*, 2004; MEHTA *et al.*, 2005).

Existem três versões para os extrusores de rolos (Figura 7). Uma primeira é constituída por uma rede circular perfurada, que gira em torno dos rolos e esses, em torno dos próprios eixos. Numa versão deste tipo de extrusor, o rolo encontra-se em posição externa à rede de extrusão ou dois rolos são perfurados e denteados (semelhantes a engrenagens). Outra versão é constituída por rolos posicionados sobre uma placa perfurada de extrusão que permanece imóvel (SANTOS *et al.*, 2004; MEHTA *et al.*, 2005).

O extrusor de pistão consiste em um sistema cilíndrico e um pistão, que se encontra dentro do corpo cilíndrico que comprime a massa umidificada, forçando a sua passagem através dos orifícios da placa de extrusão (Figura 7) (SANTOS *et al.*, 2004; MEHTA *et al.*, 2005).

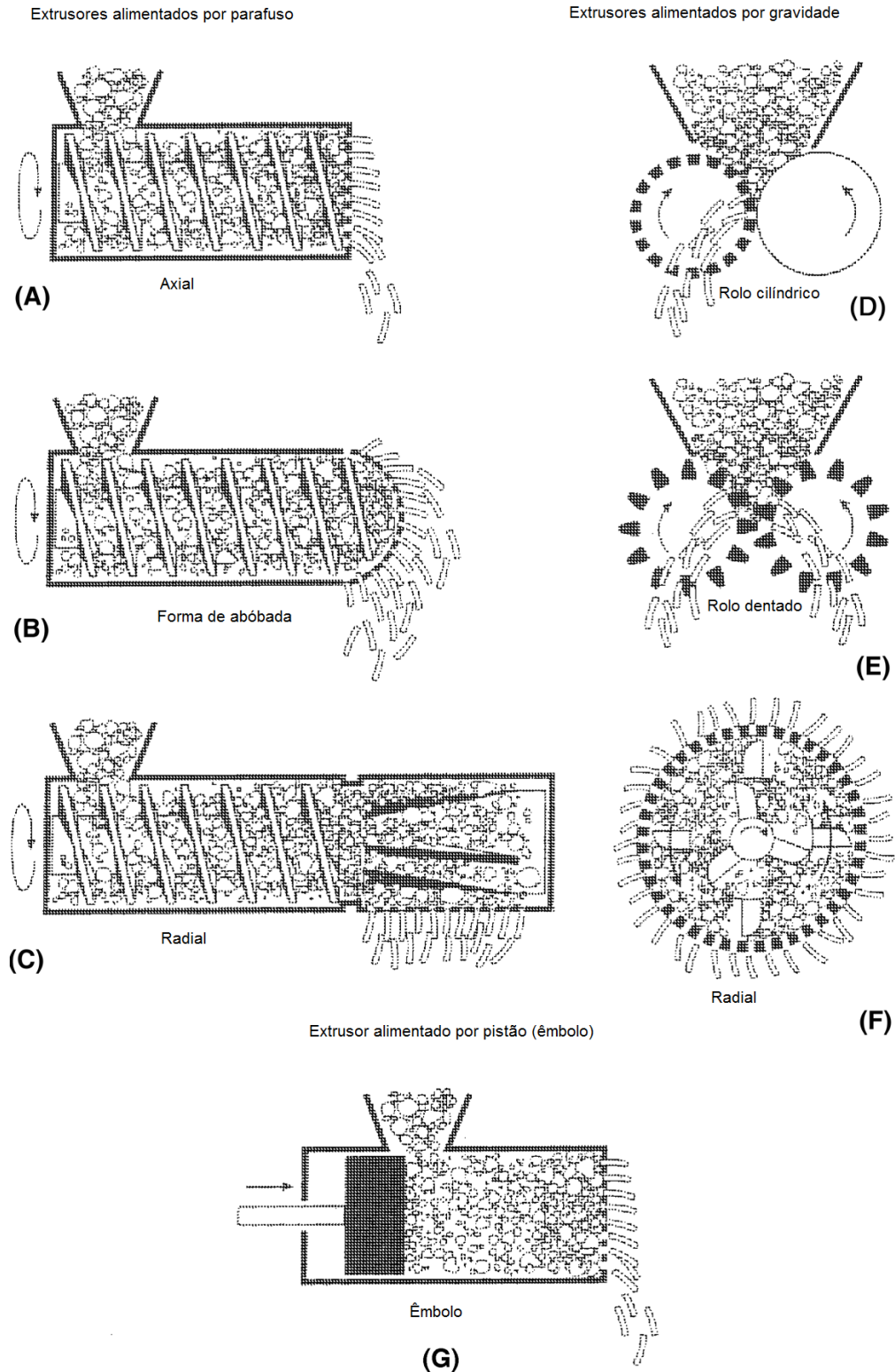


Figura 7: Tipos de extrusores: Extrusores alimentados por parafuso (A; B e C); Extrusores alimentados por gravidade (D; E e F); Extrusor alimentado por pistão (G). (Fonte: Adaptado de MEHTA *et al.*, 2005).

Esferonização é um processo que foi inventado por Nakahara em 1964. A patente descreve um "Método e aparelho para produção de granulado esférico" a partir de mistura de pós umidecidos (NAKAHARA, 1966). O equipamento descrito na patente foi comercializado pela Fuji Denki Kogyo Co. sob o nome comercial Marumerizer[®]. O processo só foi aplicado na indústria farmacêutica a partir de 1970, quando dois artigos foram publicados por funcionários da Eli Lilly and Co. e Conine Hadley. Tais artigos descreviam os passos envolvidos no processo, incluindo a (a) mistura seca, (b) granulação úmida, (c) extrusão, (d) esferonização, (e) secagem, e (f) triagem (opcional) (CONINE e HADLEY, 1970). Reynolds descreveu o equipamento e os processos mecânicos, incluindo o movimento das partículas dentro do esferonizador (REYNOLDS, 1970).

A esferonização tem a função de dar forma arredondada aos bastões obtidos da extrusão, transformando-os em partículas esféricas. Isso é feito em uma peça bastante simples do equipamento. A parte funcional consiste em um recipiente de paredes fixas, com um prato ou disco rotatório de alta velocidade. A transformação do extrusado em esferas é dependente das forças de atrito geradas pela colisão partícula-partícula e partícula-equipamento (SUMMERS e AULTON, 2005).

Com relação aos tipos de esferonizadores, todos mantêm a similaridade da configuração, ou seja, uma placa rotatória dentro de uma câmara cilíndrica (SANTOS *et al.*, 2004). Geralmente, são utilizados dois modelos (SUMMERS e AULTON, 2005): a) modelo reticulado, com os sulcos posicionados em ângulo reto; b) modelo radial, com sulcos desenhados radialmente a partir do centro do disco (Figura 8).

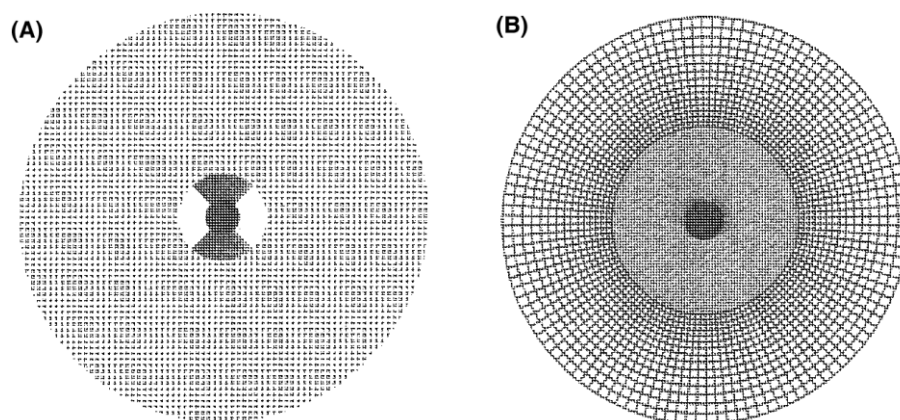


Figura 8: Configuração de placas de esferonização: (A) de ranhuras perpendiculares e (B) de ranhuras radiais (Fonte: Adaptado de MEHTA *et al.*, 2005).

A transição do extrusado para a forma esférica durante a esferonização (Figura 9) ocorre em vários estágios, os quais podem ser melhores descritos observando-se os diagramas da Figura 10.

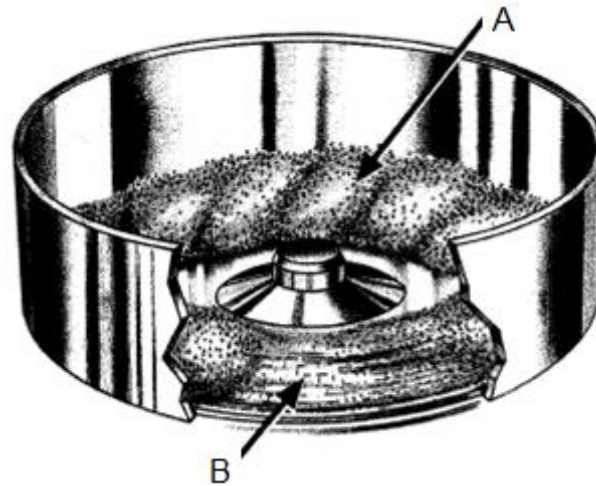


Figura 9: Representação gráfica da formação dos pellets dentro do esferonizador durante a operação (A) movimento em corda do produto; (B) atrito com a parede lisa (Fonte: Adaptado de MEHTA *et al.*,2005).

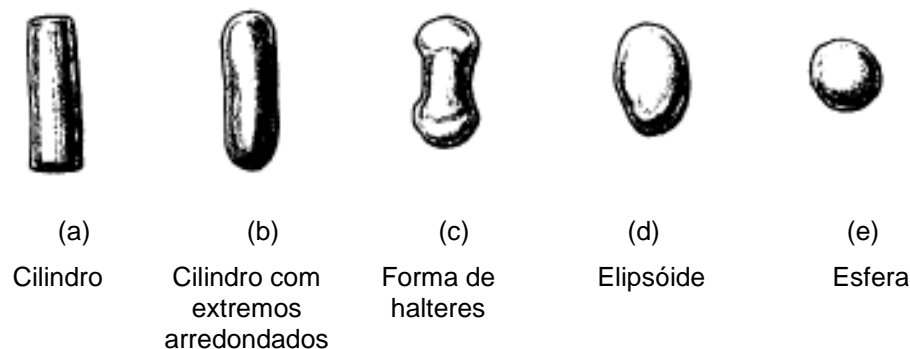


Figura 10: Representação dos mecanismos de esferonização. O diagrama mostra a transição de partículas: de cilíndricas (a) em partículas cilíndricas com extremidades arredondadas (b), seguida da forma de halteres (c), para elipsóide (d) e, finalmente, esféricas (e). (Fonte: SUMMERS e AULTON, 2005).

Na primeira fase, o produto de extrusão cilíndrico é quebrado em dimensões menores e de comprimento igual ao seu diâmetro para ter, então, as suas extremidades arredondadas; segue-se a formação de uma estrutura em forma de haltere, que é moldada em forma elíptica e finalmente modelada em forma esférica (ROWE, 1985). Outro mecanismo sugerido para a formação de pellets (BAERT e REMON, 1993) implica a formação de cilindros de produto de extrusão de extremidades arredondadas, que sofrem torção central e a quebra em duas porções semi-esféricas, que, finalmente, são modeladas e polidas em esferas por ação das

forças de rotação e fricção proporcionadas durante o processo (SANTOS *et al.*, 2004).

A secagem é uma operação importante na fabricação primária de materiais farmacêuticos, pois garante que a umidade residual seja reduzida o suficiente para prevenir a deteriorização dos produtos durante a armazenagem (AULTON, 2005). A secagem dos pellets pode ser feita à temperatura ambiente ou elevada e em leito estático ou dinâmico. Para a secagem à temperatura ambiente utiliza-se uma câmara ou estufa, que permita o controle do ambiente (temperatura e umidade) (SANTOS *et al.*, 2004).

Os pellets podem ser secos em quaisquer secadores utilizados na granulação por via úmida convencional, incluindo secadores de leito fluidizado e secadores de bandeja (SUMMERS e AULTON, 2005).

O revestimento é um processo que envolve a deposição de uma película fina e uniforme que visa recobrir totalmente a superfície das partículas com uma camada sólida de outro material (RAVAGNANI, 2003; OLIVEIRA, 1992; REZENDE, 2007; STUART, 2004; VIANA, *et al.*, 2006).

No século XVII, na Europa, o revestimento com soluções a base de açúcar foi desenvolvido na indústria farmacêutica tendo rápida aceitação, o que tornou as formas farmacêuticas sólidas preferidas na época (FREIRE e OLIVEIRA, 1992; REZENDE, 2007).

A evolução em recobrimento de partículas foi significativa a partir de 1950 quando foram introduzidos novos conceitos em equipamentos e nos anos 70 quando iniciou-se a utilização de materiais poliméricos como agentes formadores de filmes (REZENDE, 2007).

Os principais componentes para formulação de revestimento constituem em polímeros, plastificantes, corantes e solventes. Tais polímeros devem ter solubilidade em ampla gama de sistemas solventes e habilidade em produzir revestimentos que possuam propriedades mecânicas adequadas, não devendo também interferir na biodisponibilidade dos fármacos (STUART, 2004; VIANA, *et al.*, 2006). Os polímeros utilizados para o revestimento de formas farmacêuticas para liberação imediata podem ser divididos em classes conforme descritos no quadro abaixo.

Classe do polímero	Exemplos
Celulósicos	Hidroxipropilmetilcelulose
	Hidroxipropilcelulose
	Hidroxietilcelulose
Vinílicos	Polivinilpirrolidona
	Polivinilálcool
	Copolímeros de Polivinilpirrolidona e polivinilacetato
	Copolímeros de Polivinilálcool e polietilenoglicol
Glicólicos	Polietilenoglicol
Acrílicos	Copolímero de amino alquil metacrilato
Carboidratos	Maltodextrina e Polidextrose

Quadro 3: Exemplos de polímeros mais utilizados no revestimento de formas farmacêuticas de liberação imediata (Adaptado de: PORTER *et al.*, 2009).

Dentre as vantagens do revestimento polimérico cita-se: o tempo de processo e a mão-de-obra que são reduzidos, o pequeno acréscimo de peso das partículas e a possibilidade de modificar e controlar a dissolução do fármaco (REZENDE, 2007).

Os benefícios adquiridos por meio da técnica de revestimento são: evitar irritação das mucosas do trato gastrointestinal (DASHEVSKY *et al.*, 2004a); mascarar sabor e odor; alterar o perfil de liberação do ativo, quando necessário (BANDO e MCGINITY, 2006; DUKIC-OTT *et al.*, 2007); evitar inativação do ativo no estômago (VIANA, 2006); proteger contra umidade, ar ou luz; evitar liberação de pó; facilitar a ingestão; melhorar a integridade mecânica (DASHEVSKY *et al.*, 2004b); melhorar a estabilidade do produto (VIANA, 2006); melhorar a aparência e facilitar a identificação do produto (VIANA, 2006).

Atualmente, dentro dos processos de revestimento, o leito fluidizado tem recebido considerável atenção não somente na área farmacêutica (DHANASEKHARAN *et al.*, 2006; JONES, 1994; OLSEN, 1989), mas também na área de alimentos, tintas, materiais agroquímicos, entre outros.

O leito fluidizado pode ser usado para secagem, aglomeração/granulação, peletização e produção de formas farmacêuticas de liberação modificada (PARIKH *et al.*, 2005).

Granulação e secagem em leito fluidizado oferecem diversas vantagens sobre granulação multi-passo e outros processos de secagem: a mistura de pós secos, granulação e secagem podem ser sucessivamente realizadas dentro de próprio equipamento; pode reduzir o tempo e os passos do processo de fabricação; e

diminuir a exposição do operador aos compostos irritantes e/ou tóxicos (GUO *et al.*, 2002).

O processo de revestimento em leito fluidizado (Figura 11) envolve a movimentação de partículas através de uma corrente de ar ascendente sobre as quais é aspergida (de um bico localizado no fundo da câmara ou sobre parte superior do leito) uma suspensão ou solução de revestimento. A solução envolve a partícula através de um processo simultâneo de umedecimento e secagem até formação de uma camada. O revestimento por aspersão pode ser explicado por três etapas: fluidização, atomização e secagem (REZENDE, 2007; PARIKH *et al.*, 2005; PEZZINI *et al.*, 2007).

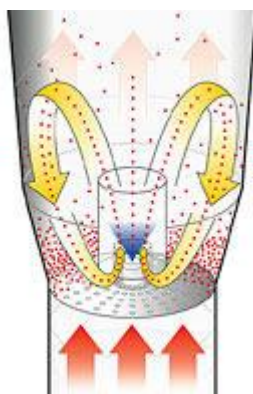


Figura 11: Representação do processo de revestimento em leito fluidizado.

(Fonte: <http://www.cjtech.co.kr/Technical%20Process%20Fluid%20Bed%20Granulation.htm>).

2.6.1.2 Caracterização de pellets

Segundo Santos e colaboradores (2006), apenas através da avaliação das características físicas dos pellets é que se torna possível aprovar a viabilidade de uma formulação e/ou do processo empregado para a produção. Dentre as diversas características que devem ser avaliadas pode-se citar: tamanho e distribuição de tamanho, morfologia e friabilidade.

Uma distribuição uniforme de tamanho facilita a mistura de pellets sobretudo quando há a necessidade de se misturar pellets de diferentes lotes ou de diferentes composições para o enchimento de cápsulas ou para a produção de comprimidos. A distribuição uniforme de tamanho evita a variação do conteúdo de substância ativa, e conseqüentemente problemas na biodisponibilidade (SANTOS *et al.*, 2006).

A determinação da distribuição de tamanho pode ser realizada por tamisação, microscopia (óptica ou eletrônica) e por análise de imagens.

A tamisação de pellets é o método mais utilizado devido ao seu baixo custo, simplicidade, rapidez e baixa variação na determinação por diferentes operadores (MEHTA, 1989). Três tipos de padrões de tamises podem ser empregados: o padrão americano, o padrão *Tyler* e o padrão britânico.

A microscopia e a análise por imagem são métodos diretos de determinação. Na microscopia óptica, o diâmetro dos pellets pode ser determinado por meio de um filete calibrado ou por meio de lâminas de grelhas circulares ou quadradas. Para a microscopia eletrônica, as amostras devem ser revestidas com uma película apropriada para a observação (p.ex., ouro ou ouro/paládio). Segundo Metha (1989), a desvantagem destas duas técnicas está relacionada ao fato de serem cansativas devido à observação individualizada de um grande número de pellets e ao tempo necessário para a criação dos gráficos de frequência da distribuição de tamanho e de percentagem acumulada.

Atualmente as análises por imagem é realizada de forma automatizada utilizando softwares específicos.

A área superficial específica é influenciada pelo tamanho das unidades, pela forma ou esfericidade, pela porosidade e pela rugosidade ou aspereza superficial (MEHTA, 1989). Este parâmetro é importante quando se pretende realizar o revestimento dos pellets. Diferentes técnicas para a determinação da área superficial de materiais sólidos são sugeridas pela literatura (MEHTA, 1989; MARTIN, 1993). Dentre eles, o método matemático permite o cálculo da área superficial de uma amostra a partir da distribuição do tamanho (SANTOS *et al.*, 2006).

A morfologia superficial de pellets além de afetar propriedades de empacotamento e de escoamento, tem importância no revestimento de pellets com filme. Um revestimento homogêneo é imprescindível para a proteção (no caso de uma proteção entérica) ou para liberação uniforme do ativo. A microscopia óptica e eletrônica são técnicas normalmente utilizadas na caracterização da morfologia superficial de pellets (SANTOS *et al.*, 2006).

A friabilidade é normalmente determinada sob a forma de índice de friabilidade. Pellets que são submetidos a revestimento numa câmara de leito fluidificado, podem ter a friabilidade determinada neste mesmo equipamento

levando-se em consideração as variáveis de tempo e massa do sólido (VERVAET *et al.*, 1995).

Wan e Jeyabalan (1986) determinaram a friabilidade de pellets num friabilômetro na presença de esferas de aço, alternativamente esferas de vidro têm sido utilizadas (VERVAET *et al.*, 1996; ALVAREZ *et al.*, 2003; DREU *et al.*, 2005; DUKIC-OTT *et al.*, 2007; PAKER-LEGGs e NEAU, 2008).

2.6.2 Excipientes utilizados na produção de sistemas multiparticulados

Até o início dos anos 60, era comum associar a eficácia clínica de um medicamento somente à atividade intrínseca do fármaco. Desde então, evidências relatadas passaram a demonstrar que, tanto os componentes das formulações, quanto as técnicas de preparo, influenciam na eficácia dos medicamentos (SHARGEL, YU, 1999; STORPIRTS, 1999) e também na proteção dos ativos presentes nas formas farmacêuticas.

2.6.2.1 Polissorbitos

Os tensoativos não iônicos são usados como emulsificante O/A (1 a 15% p/V), solubilizante (1 a 10% p/V), molhante e suspensor (0,1 a 0,3% p/V). São empregados em uma grande variedade de preparações, incluindo aquelas contendo óleos essenciais e vitaminas lipossolúveis. Também são usados em cosméticos e produtos alimentícios. Conhecidos, comercialmente como Tween[®] (VILLANOVA e SÁ, 2009).

Os polissorbitos são preparados a partir do sorbitol, em três etapas: desidratação, esterificação parcial com ácidos graxos e adição química de óxido de etileno, na presença de catalisador. polissorbito 80 (Figura 12) é um éster oleato do sorbitol com anidrido copolimerizado com, aproximadamente, 20 moles de óxido de etileno para cada mol de sorbitol e anidrido sorbitol. É um líquido oleoso esverdeado a âmbar, com fraco odor característico e cálido sabor amargo. É muito solúvel em água, produzindo solução inodora e praticamente incolor. É usado em cosméticos, produtos alimentícios e medicamentos de uso oral, parenteral e tópico sendo considerado não tóxico e não irritante. (VILLANOVA e SÁ, 2009).

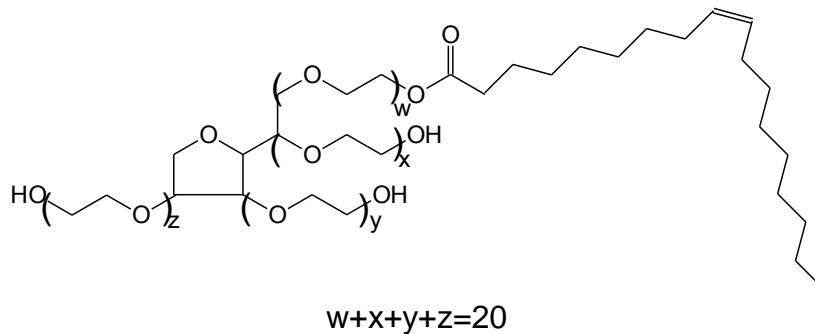


Figura 12: Estrutura química do polissorbato 80 (Tween[®] 80).
(Adaptado de: Wikipedia).

2.6.2.2 Dióxido de titânio

A capacidade de opacificar e branquear o meio em que está disperso é a mais importante propriedade do dióxido de titânio (TiO₂). O potencial opacificante é essencialmente controlado por duas propriedades: índice de refração e tamanho de partícula. O índice de refração é uma propriedade associada à estrutura cristalina, ficando assim fora do controle do fabricante. O dióxido de titânio rutilo é o que apresenta o maior índice de refração de todos os pigmentos brancos disponíveis.

2.6.2.3 Talco farmacêutico

O talco (3MgO·4SiO₂·H₂O) é usado como lubrificante (1 a 10%, p/p) ou como diluente (5 a 30%, p/p) para cápsulas e comprimidos. É um silicato de magnésio purificado e hidratado. Pode conter quantidades pequenas e variáveis de silicato de alumínio e ferro. Encontrado na forma de pó cristalino brilhante, branco ou quase branco (VILLANOVA e SÁ, 2009)

O talco é considerado um agente deslizante e antiaderente (SOARES, PETROVICK, 1999).

2.6.2.4 Celulose Microcristalina (CMC)

Resultante da hidrólise da celulose purificada após tratamento com ácido clorídrico. É insolúvel em água, solventes orgânicos e diluentes ácidos, mas parcialmente solúvel em diluentes alcalinos. É considerada adsorvente, agente de suspensão, diluente de comprimidos e cápsulas e desintegrante de comprimidos (SILVA, 2006).

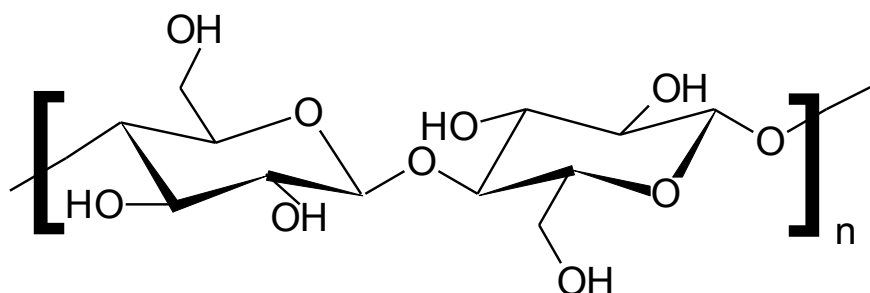


Figura 13: Estrutura química da celulose microcristalina.
(Adaptado de: <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>).

A celulose microcristalina (Figura 13) apresenta capacidade diluente e aglutinante. Na quantidade de 5 a 15% p/p tem boa propriedade antiaderente e lubrificante. Em cápsulas, pode ser usada como diluente único (até 90% p/p). Usualmente utilizada em até 30% p/p para não comprometer a dissolução. É considerada pelo FDA como própria para o uso em preparações vaginais, tópicas, para inalação, comprimidos, cápsulas, pós, xampus e suspensões orais (VILLANOVA e SÁ, 2009).

A CMC possui característica fibrosa associada à boa propriedade de escoamento e elevada área superficial, o que proporciona excelente fluxo para a mesma. A presença do Aerosil[®] (1% p/p) melhora a estabilidade da celulose microcristalina frente a umidade. Existem inúmeros tipos de celulose sendo que os mais utilizados são o Avicel[®] PH 101 e o Avicel[®] PH 102. A diferença entre ambos é o tamanho das partículas, que é de 50µm e 100µm, respectivamente (HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 2006).

2.6.2.5 Dióxido de Silício Coloidal

O pequeno tamanho de partícula e a grande superfície de contato fazem com que o dióxido de silício coloidal (SiO_2), também, conhecido como Aerosil[®], Car-O-Sil[®] ou sílica coloidal, forneça boas propriedades de fluxo aos pós. Empregado como estabilizante de emulsões (1 a 5% p/V), suspensor em géis e outras formas semissólidas (2 a 10%p/V). É um pó amorfo, branco, inodoro, insípido e não gorduroso. Possui tamanho de partícula em torno de 15 nm. É insolúvel em água, álcool e outros solventes orgânicos. Solúvel em soluções de hidróxidos alcalinos, a quente. Forma dispersão coloidal com água (VILLANOVA e SÁ, 2009).

Outra aplicação do Aerosil[®] é como agente absorvente, ou seja, estabilizante de conteúdos higroscópicos, uma vez que é um excipiente capaz de absorver água sem liquefazer-se (GUO *et al.*, 2002; JONAT, 2005).

2.6.2.6 Polietilenoglicol (PEG 6000)

O polietilenoglicol (Figura 14) é um polímero de óxido de eteno de alto peso molecular. É solúvel em água indicado para uso farmacêutico e alimentício como plastificante, aglutinante, lubrificante e coadjuvante para dispersão. Age como ligante e lubrificante por permitir a redução do coeficiente de fricção entre as partículas e as superfícies dos equipamentos do processo (SILVA, 2006).

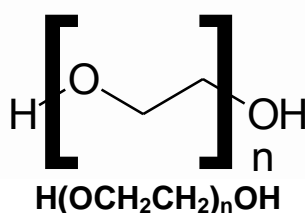


Figura 14: Estrutura química do polietilenoglicol (PEG 6000).
(Adaptado de: <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>).

2.6.2.7 Lactose Mono-Hidratada

A lactose (Figura 15) é um dissacarídeo natural formado por galactose e glicose ((VILLANOVA e SÁ, 2009).

Existe sob as formas anoméricas α e β , normalmente denominadas por lactose mono-hidratada e lactose anidra, respectivamente.

A lactose é utilizada como excipiente de preenchimento e diluente para cápsulas e comprimidos (ÇELIK e OKUTGEN, 1993).

Apresenta-se como um pó cristalino branco, inodoro e levemente adocicado. É solúvel em água, insolúvel em solventes orgânicos como etanol, éter e clorofórmio. A lactose mono-hidratada contém aproximadamente 5% de água de cristalização (VILLANOVA e SÁ, 2009; WADE e WELLER, 1994).

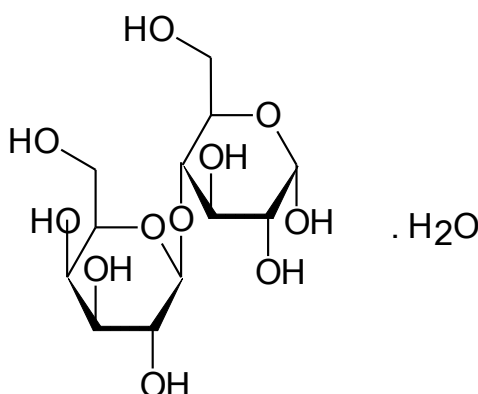


Figura 15: Estrutura química da lactose mono-hidratada
(Adaptado de: <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>). Sinônimo: α -Lactose.

2.6.2.8 Copolímero Polivinilálcool e Polietilenoglicol (75:25) - (Kollicoat[®] IR)

É um copolímero constituído por polivinil álcool e polietilenoglicol na proporção de 75:25 (Figura 16). Apresenta-se como pó branco a levemente amarelado. É utilizado em revestimento de formas farmacêuticas. Produz boas propriedades de filmes e grande aderência à superfície dos comprimidos. Apresenta soluções com baixa viscosidade e propriedade de barreira contra o meio externo protegendo a forma farmacêutica contra a umidade e oxidação (PORTER *et al.*, 2009).

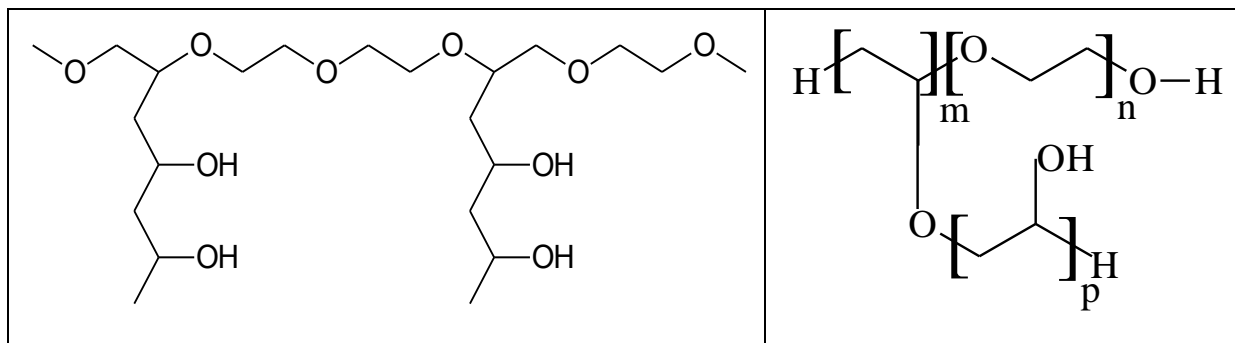


Figura 16: Estrutura química do copolímero (Kollicoat[®] IR): Macrogol-poly(vinyl alcohol) *graft*-copolymer, Polyvinyl alcohol-polyethylene glycol *graft*-copolymer (Kollicoat IR). p= álcoolpolivinil e n= polietilenoglicol. (Adaptado de: <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>).

2.6.2.9 Povidona (PVP –K30)

A povidona (Figura 17) é um polímero não-iônico com capacidade formadora de filme. Apresenta compatibilidade fisiológica e propriedade espessante. Fisiologicamente inerte e não tóxico, é solúvel em água e em solventes orgânicos (SILVA, 2006).

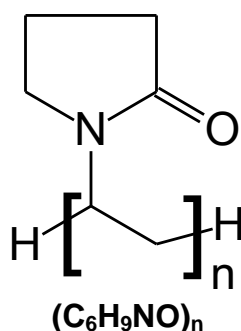
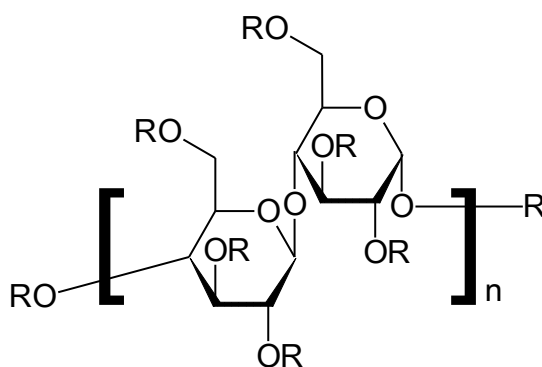


Figura 17: Estrutura química da Povidona (PVP-K30).
(Adaptado de: <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>),
Sinônimos: PVP, Polividona, Polivinilpirrolidona, Povidona.

É caracterizada pela sua viscosidade em soluções aquosas expressa pelo valor *K*. O valor *K* varia entre 10 e 120 e relaciona-se com o peso molecular aproximado do polímero. É um excipiente farmacêutico utilizado como ligante ou diluente. Ocorre como um pó fino, de coloração branca, inodoro ou quase inodoro e higroscópico. É solúvel em ácidos, clorofórmio, etanol, cetonas, metanol e água, sendo praticamente insolúvel em éter, hidrocarbonetos e óleo mineral (WADE e WELLER, 1994).

2.6.2.10 Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)

A hidroxipropilmetilcelulose (Figura 18) é um polímero classificado como éter de celulose. É um dos derivados da celulose mais empregados como retardante da liberação de fármacos em formulações orais (LOPES *et al.*, 2005; NERURKAR *et al.*, 2005; AGUIAR, 2007). É empregado também como agente suspensor e formador de filme (SALAMAT-MILLER *et al.*, 2005; SMART *et al.*, 2005; SUDHAKAR *et al.*, 2006; AGUIAR, 2007). Outra característica é a sua capacidade de intumescimento (LOPES *et al.*, 2005; NERURKAR *et al.*, 2005; BURDOCK, 2007, AGUIAR, 2007). É atóxico, não-iônico, compatível com outros excipientes além de ser capaz de incorporar grandes quantidades de fármacos (LOPES *et al.*, 2005; BURDOCK, 2007, AGUIAR, 2007).



R= H ou R= CH₃ ou R= CH₂CH(OH)CH₃

Figura 18: Estrutura química da hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).
(Adaptado de: <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>).

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Obter o extrato de *Pothomorphe umbellate*, preparar e caracterizar uma forma farmacêutica sólida multiparticulada e avaliar a estabilidade das formulações desenvolvidas contendo 4-NC.

Objetivos Específicos

- Desenvolver processo extrativo para o 4-NC das raízes da *Pothomorphe umbellate* (L.) Miq.;
- Produzir a partir do extrato hidroalcoólico, pellets via extrusão-esferonização;
- Realizar a caracterização dos pellets obtidos;
- Avaliar a fotoestabilidade do 4-NC contido no extrato e nos pellets.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Equipamentos

- Balança de infravermelho, (Gehaka[®] - IV 2000);
- Câmara de luz ultravioleta, (366 nm);
- Câmara de Fotoestabilidade, (Nova Ética[®] - Farma – IV2000);
- Câmara fria, (Danica Doors[®] - C-EC);
- Cromatógrafo Líquido, (Varian[®], - Pro Star), composto pelos módulos: PS 410 – sistema de injeção automático; PS 240 - bomba quaternária; PS 325 – detector de UV-Visível; Programa processador de dados: Galaxie Workstation – versão 9.0;
- Coluna C₁₈ – ChromSep SS ChromSpher 5 C18, Varian[®], (150mm x 4,6mm x de 5 µm);
- Extrusor, (Caleva[®] – Extruder 20);
- Esferonizador, (Caleva[®] –Multi Bowl Spheronizer);
- Estufa de secagem, (Lawes[®] – 5 Band);
- Jogo de Tamis, (Haver & Boeker- Alemanha; W.S. Tyler – USA Standard Sieve; W.S. Tyler – Canadian Standard Series);
- Leito dinâmico, (Microlab Hüttlin[®]);
- Microscópio óptico, (Leica[®] DME) com câmera acoplada (Leica[®] EC3)
- Moinho industrial de facas e martelo (DPM3);
- Mufla EDG/EDGCON 1P
- Placas de sílica gel 60 (10cm x 4cm x 0,20mm) com indicador de fluorescência;
- Percolador em aço inox de 5L (Equipalabor[®]);
- Percolador de vidro de 1L;

4.1.2 Substâncias e Reagentes

- Dióxido de silício coloidal (Aerosil[®]);
- Dióxido de titânio
- Copolímero (Kollicoat IR[®] - Basf[®]);
- CMC - Celulose microcristalina
- HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose (Opadray YS-1-7006[®])
- Polietilenoglicol (PEG 600[®])
- Povidona (PVP K-30[®])
- Talco farmacêutico;
- 4-nerolidilcatecol (4-NC)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização da matéria-prima vegetal

4.2.1.1 Tratamento da matéria-prima vegetal

As raízes semi-processadas de *Pothomorphe umbellata* (Pariparoba sustentável – Lote nº 204090080) foram adquiridas junto a Centroflora (Botucatu - SP) pesadas e submetidas à moagem em moinho industrial. O armazenamento foi feito em recipiente fechado (aço inox), mantido em câmara fria a temperatura de 7°C e umidade controlada para minimizar a proliferação microbiana no material cominuído.

4.2.1.2 Determinação do teor de umidade residual (BORGES, 2005)

A determinação do teor de umidade residual da droga vegetal foi feita em triplicata utilizando balança de infravermelho (Gehaka[®], modelo IV 2000). Um grama da droga vegetal foi acondicionado em prato metalizado de 10 cm de diâmetro, de forma a preencher todo o fundo do recipiente. Foi utilizado o modo automático de secagem até que se atingisse peso constante a temperatura de 105°C.

4.2.1.3 Determinação do teor de cinzas totais

Uma amostra de 2g do pó das raízes de *Pothomorphe umbellata* foi pesada em balança analítica e transferida para um cadinho o qual foi previamente calcinado em mufla a 450°C, resfriado e pesado. A amostra foi uniformemente distribuída no cadinho e incinerada em mufla. A temperatura da mufla foi aumentada de forma gradativa até que atingisse 450°C permanecendo desta forma por 4 horas. Após este período, a amostra foi deixada em dessecador até atingir a temperatura ambiente sendo novamente pesada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2000). O teor de cinzas totais foi calculado como percentual pela média de três determinações segundo a equação (1):

$$\text{Teor de Cinzas} = \frac{mra_2}{mra_1} \times 100 \quad (1)$$

onde:

mra_2 = massa do recipiente mais amostra, após aquecimento;

mra_1 = massa do recipiente mais amostra, antes do aquecimento.

4.2.1.4 Determinação do índice de intumescência da droga vegetal.

Uma amostra de 1g de *Pothomorphe umbellata* foi colocada em uma proveta graduada de capacidade de 25 mL com escala de 0,2 mL e tampa esmerilhada. Em seguida, foram adicionados água:etanol (1:3) completando o volume final de 25 mL. A agitação do sistema ocorreu em intervalos de 10 minutos, durante um período de 1 hora. O volume final ocupado pelo material vegetal foi verificado após repouso de três horas, à temperatura ambiente (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988). O índice de intumescência foi calculado segundo a equação (2):

$$I.I. = Vf - Vi \quad (2)$$

Onde:

Vf = volume final ocupado pela amostra (mL)

Vi = volume inicial ocupado pela amostra (mL)

4.2.1.5 Determinação da granulometria da droga vegetal

Amostra de 100 gramas da droga vegetal foi pesada em balança semi-analítica e colocada sobre um jogo de 6 tamises previamente pesados constituídos pelas seguintes malhas: 710, 500, 250, 125, 90 e 63 μm , provido de tampa e recipiente para coleta do pó. Os tamises foram agitados em um agitador mecânico (Haver[®] EML 200), através de movimentos horizontais rotativos e verticais durante vinte minutos. Posteriormente, pesou-se novamente cada tamis para verificar a quantidade de material vegetal que ficou retida em cada malha (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988).

4.2.1.6 Determinação do perfil cromatográfico do 4-NC na matéria-prima vegetal

O 4-NC foi verificado em cromatografia de camada delgada utilizando-se placas de sílica gel 60 (100 x 40 x 0,2 mm) com indicador de fluorescência. Hexano e acetato de etila (7:3) foram utilizados como fase móvel. Em 1,0g da raiz processada adicionou-se 10mL de álcool etílico. Aproximadamente 10µL da solução resultante foi aplicada na placa. Os cromatogramas foram desenvolvidos no sentido ascendente, em câmara saturada, até a altura de 8 cm.

Após a eluição e secagem a temperatura ambiente, as manchas resultantes foram visualizadas em câmara de luz ultravioleta no comprimento de onda de 366nm. Para visualização das manchas a luz natural, a placa foi revelada através de nebulização do reativo de anisaldeído sulfúrico com posterior aquecimento em estufa a 110°C seguindo metodologia descrita em MORAES, (1984). O reagente de anisaldeído sulfúrico foi preparado dissolvendo-se 0,5 mL de anisaldeído em 10mL de ácido acético glacial. Em seguida, 85 mL de metanol e 5mL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados (nesta ordem).

As manchas resultantes e fator de retenção (Rf) característico foram comparados com dados da literatura (MORAES, 1984) e com o padrão de referência do 4-NC (concentração de 1 µg/mL), para confirmação do perfil cromatográfico da matéria-prima vegetal.

4.2.2 Obtenção e caracterização do extrato hidroalcoólico de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.

Com a finalidade de se obter um extrato hidroalcoólico das raízes de *Pothomorphe umbellate* bem como avaliar o melhor método de extração, testes de bancada de maceração e percolação foram realizados. Diferentes proporções de etanol e água também foram avaliadas como solventes da extração.

4.2.2.1 Extração por maceração

A maceração foi feita em um recipiente fechado durante 48 horas sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator, em temperatura ambiente.

O processo de maceração foi realizado com dois sistemas de misturas de solventes: etanol e água nas proporções 1:1 e 3:1 (v/v, respectivamente).

A solução extrativa obtida por maceração com etanol:água (v/v) foi feita baseando-se na técnica desenvolvida por Noriega e colaboradores (2008) com algumas modificações relacionadas à adequação da relação entre droga e a mistura dos solventes.

Colocou-se um grama de pó com 50 mL de etanol:água (1:1), em um béquer. O sistema foi deixado à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e com agitação magnética ocasional (duas a três vezes a cada 24 horas) durante 48 horas. O extrato obtido foi filtrado a vácuo e o volume completado para 50mL no intuito de padronizar a concentração final.

O mesmo procedimento foi adotado para a extração com a mistura dos solventes etanol:água na proporção (3:1). As soluções extrativas resultantes foram armazenadas sob refrigeração à temperatura de 3°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) para ser analisada posteriormente quanto ao teor do 4-NC por CLAE.

Os dois procedimentos de extração foram comparados. O procedimento que apresentou maior extração do princípio ativo de interesse verificada através da cromatografia líquida, foi reproduzido utilizando-se 50 gramas de droga vegetal.

4.2.2.2 Extração por percolação

Diferente do apresentado no item 4.2.2.1, a percolação ocorreu com a renovação constante do líquido extrator.

Foram realizadas duas percolações: 1) percolação inicial, com intuito de avaliar as melhores condições da extração; 2) percolação final (Lote Único).

Percolação inicial: foi realizada em percolador de vidro com capacidade de 200 gramas. Primeiramente foram utilizados somente 50 gramas da droga vegetal. A amostra foi umedecida previamente por duas horas.

A montagem do percolador foi feita conforme descrito na Figura 19. Inicialmente foi colocado algodão hidrofílico na parte inferior do percolador. Em seguida, papel de filtro qualitativo foi colocado em cima deste algodão. A droga vegetal já intumescida foi empacotada aos poucos de forma uniforme sem compactação excessiva evitando também a formação de espaços vazios ou canais

que pudessem favorecer o escoamento somente do solvente. Outro papel de filtro foi acrescentado em cima da droga vegetal e depois uma camada de algodão e finalmente outro papel de filtro foi adicionado. Para que o sistema permanecesse nesta ordem de montagem e para que o papel não se movesse, foram acrescentados cacos de porcelana e vidros de relógio como peso.

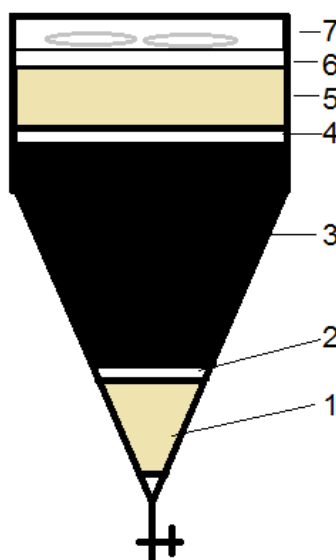


Figura 19: Estrutura esquemática de um percolador comum. 1) Algodão; 2) Papel de filtro; 3) Droga vegetal; 4) Papel de filtro; 5) Algodão; 6) Papel de filtro; 7) Vidro de relógio.

Após a montagem do percolador, o solvente extrator (etanol: água, 3:1) foi adicionado (200 mL) até que cobrisse todo o sistema montado. Após 24 horas, a torneira do percolador foi aberta para dar início à extração. O fluxo de escoamento foi ajustado para 0,3 mL/minuto tendo como recipiente coletor um frasco âmbar de boca estreita com capacidade de 1,0 litro.

A extração foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa foi coletado um volume de 160 mL (80% inicial). Este extrato foi colocado em recipiente âmbar e reservado sob refrigeração em câmara fria ($3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Após a retirada deste volume inicial, a percolação foi continuada com monitoramento da presença do marcador (4-NC). Este monitoramento do esgotamento da droga foi realizado coletando-se alíquotas da solução extratora. A cada coleta, solução de cloreto férrico na concentração de 4,5% era gotejada para verificar a presença do marcador. Essa solução reage com compostos fenólicos alterando a cor original para coloração verde escuro. A percolação foi dada como concluída quando não foi mais notada a mudança de cor do reagente. Isto resultou em um volume final de 750 mL de

percolado. O extrato foi então colocado em balão de fundo redondo de 1,0 litro para rotaevaporação. Este procedimento foi realizado a uma temperatura de 40°C até o volume de 40 mL (20% restante do volume calculado da extração). A soma das duas frações (160 mL iniciais mais 40 mL concentrado da segunda percolação) resultou em uma solução de 200 mL na proporção de 1:4 (droga:solvente).

Percolação final: O extrato hidroalcoólico na percolação final foi obtido utilizando a técnica de esgotamento da droga vegetal com sistema solvente etanol:água (3:1) e vazão de 0,4 mL/minuto. 4,0 kg das raízes pulverizadas foram umedecidos com o sistema de solventes por 2 horas antes da confecção do percolador em um béquer de 5 litros. A extração foi realizada em percoladores de aço inox (com capacidade de 1,0kg) e de vidro (com capacidade para 500 gramas), Figura 20.

Devido o índice de intumescência da droga vegetal, foram colocados em cada percolador de aço inox somente 600 gramas da droga vegetal e 300 gramas nos percoladores de vidro. A renovação dos percoladores de aço inox se deu em média a cada 20 dias e dos percoladores de vidro a cada 10 dias.

Para o monitoramento do esgotamento da droga, foi realizada cromatografia de camada delgada (CCD).

A solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador rotativo (Tecnal® TE-210), até a proporção de 1:4 droga: mistura de solventes. A percolação final (Lote Único) ainda foi caracterizada em relação ao pH, ao teor de sólidos solúveis de acordo com a Farmacopéia Portuguesa VII (2005), ao teor alcoólico de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV (1988) e à concentração do marcador (4-NC).

Para a quantificação do marcador, um método analítico por cromatografia líquida foi desenvolvido e validado seguindo as exigências descritas na resolução RE nº 899/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.



Figura 20: Percoladores utilizados: (A) Percoladores de vidro; (B) Percolador de metal.

4.2.3 Caracterização dos extratos

4.2.3.1 Cromatografia de camada delgada para monitoramento do marcador

Placas de sílica gel 60 (100 x 40 x 0,2mm) com indicador de fluorescência e a fase móvel constituída por hexano:acetato de etila na proporção (7:3, v/v), foram utilizadas com a finalidade de se monitorar o esgotamento do 4-NC durante o processo de extração por percolação.

A presença de 4-NC era verificada através da revelação da placa com o reativo de anisaldeído sulfúrico com posterior aquecimento em estufa a uma temperatura de 110°C.

4.2.3.2 Determinação do pH

O pH do percolado foi avaliado diretamente sem diluição prévia. A leitura foi realizada em triplicata e a média calculada.

4.2.3.3 Determinação de sólidos totais solúveis

Realizou-se a determinação dos sólidos totais solúveis da extração por maceração e percolação.

Para cada ensaio utilizou-se três pesa-filtros, previamente tarados. Em seguida, alíquotas de 2 mL de solução extrativa foram adicionadas. Os pesa-filtros foram colocados em estufa a 105°C durante 2 horas. Após este período, foram deixados em dessecador até atingirem a temperatura ambiente para posterior pesagem. O cálculo para a determinação de sólidos totais solúveis foi feito utilizando-se a massa obtida quando duas leituras sucessivas não indicaram diferença superior a 0,5% (FARMACOPÉIA PORTUGUESA VII, 2005).

Os ensaios foram realizados em triplicata e a média dos resultados foi expressa em porcentagem (%; m/m).

4.2.3.4 Determinação do teor alcoólico.

O teor alcoólico foi determinado pelo método de destilação simples (Figura 21) de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV (1988). Trinta e cinco mililitros do percolado juntamente com 35mL de água foram destilados. 33 mL foram coletados e o volume foi completado para 35mL com água destilada. Determinou-se a densidade por picnometria. Utilizando-se a tabela alcoométrica foi avaliada a porcentagem em volume de álcool.

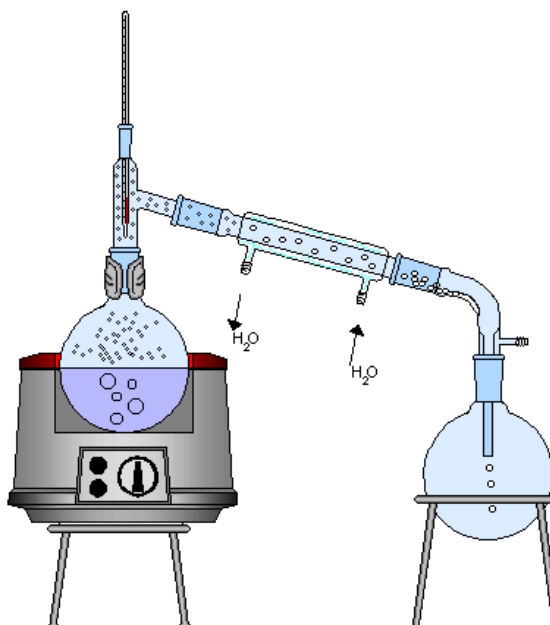


Figura 21: Representação esquemática do sistema de destilação simples para a determinação do teor alcoólico do percolado de *Pothomorphe umbellate*.

4.2.4 Desenvolvimento e validação do método analítico para a quantificação de 4-NC por cromatografia líquida de alta eficiência

Os parâmetros cromatográficos foram testados com base em referências bibliográficas que envolviam a análise de 4-NC.

A coluna cromatográfica escolhida foi a mais utilizada na literatura C18 para a quantificação do 4-NC. O comprimento de onda (282 nm) foi mantido constante durante o desenvolvimento da metodologia. Os parâmetros vazão da fase móvel (0,5 e 1,0 mL/min) e proporção dos constituintes da fase móvel, bem como a acidificação dos mesmos foram testados para otimização do método.

A avaliação dos métodos testados foi feita considerando o denominado “system suitability”, que pode ser definida como um conjunto de testes para garantir que o equipamento e o método utilizado estão aptos a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis (RIBANI *et al.*, 2004).

Os parâmetros medidos para a verificação das melhores condições cromatográficas foram: tempo de retenção do 4-NC (tempo curto mais com resolução entre o pico do solvente; assimetria do pico (<2); número de pratos teóricos (> 2000); desvio padrão relativo entre as injeções (DPR <5%), largura e formato do pico de 4-NC.

As condições cromatográficas utilizadas para a validação do método foram:

- Fase móvel (Fase A 90% e fase B 10%): Fase A: metanol acidificado com 0,1% de ácido acético, Fase B: mistura de água acidificada com ácido acético 0,1% e: acetonitrila; (90:10), em modo isocrático de eluição,
- Fluxo de fase móvel: 1,0 mL/min;
- Volume de injeção da amostra: 10µL.
- Comprimento de onda: 282 nm;
- Temperatura: 25°C
- Tempo de corrida: 8 minutos
- Coluna cromatográfica: fase reversa, ChromSep SS ChromSpher 5 C₁₈, Varian[®], (150mm x 4,6mm x de 5 µm);

As leituras em triplicata das áreas obtidas após injeção das soluções foram realizadas em cromatógrafo líquido Varian[®] com detector UV-Vis. O método foi validado através da especificidade, seletividade, limites de quantificação e detecção (LQ, LD), linearidade, precisão e robustez do método seguindo as exigências descritas na Resolução RE n° 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

4.2.4.1 Avaliação do parâmetro de seletividade e especificidade do método analítico

A verificação do parâmetro de seletividade e especificidade do método cromatográfico foi realizada através de comparação entre soluções padrões do ativo; soluções extrativas hidroetanólicas; soluções das amostras dos pellets contendo o 4-NC e solventes utilizados na preparação das soluções.

4.2.4.2 Avaliação do parâmetro da Linearidade - curva de calibração

Verificou-se a linearidade do método cromatográfico, preparando-se curvas de calibração com sete soluções com diferentes concentrações em

triplicata, cujos pontos foram: 200 µg/mL; 150 µg/mL; 100 µg/mL; 75 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL e 10 µg/mL **de 4-NC, partindo de uma solução padrão de 4-NC a uma concentração de 1,0 mg/mL em etanol.**

As curvas de calibração foram construídas plotando-se as médias das áreas dos picos (Y) versus as concentrações do ativo (X). Foram calculados também os desvios das leituras (DP: Desvio Padrão e DPR: Desvio Padrão Relativo). O método foi avaliado quanto à linearidade considerando o coeficiente de correlação da reta, acima de 0,99 e os desvios entre as leituras menores que 5%.

4.2.4.3 Avaliação do parâmetro da Precisão Intra-corrída (Repetibilidade)

A precisão pode ser estimada através do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV). O cálculo para obtenção do DPR está representado na fórmula abaixo. Considera-se um método preciso quando o CV não é superior a 5% (ANVISA, 2003).

$$\text{DPR (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} \times 100$$

Segundo a Resolução - RE nº 899/03, a precisão é subdividida em 3 níveis: repetibilidade (precisão intra-corrída), precisão intermediária (precisão inter-corrídas) e reprodutibilidade (feita entre laboratórios diferentes).

Seis soluções foram preparadas a partir do extrato hidroetanólico. 1mL do extrato foi colocado em balão volumétrico de 5mL e o volume completado com etanol grau CLAE. A solução resultante foi filtrada utilizando-se membrana 0,45µm de PVDF. 100µL desta solução foi colocada em vial contendo 900µL de etanol. Após agitação em vórtex a preparação foi injetada no CLAE em duplicata.

O desvio padrão relativo entre os resultados (DPR) foi avaliado.

4.2.4.4 Avaliação do parâmetro da Precisão Inter-corrídas (Precisão Intermediária)

Este procedimento foi realizado duas vezes com analistas diferentes em dias diferentes. As soluções foram preparadas da mesma maneira conforme descrito no item anterior: seis soluções partindo da solução do extrato hidroetanólico foram preparadas. Após análise, o desvio padrão relativo entre os resultados (DPR) foi avaliado.

4.2.4.5 Avaliação do parâmetro de Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram calculados de acordo com as equações abaixo, respectivamente, (BRASIL, 2003).

$$\mathbf{LD = DPa \times 3/IC}$$

$$\mathbf{LQ = DPa \times 10/IC}$$

Onde, DPa é o desvio-padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. IC é a inclinação da curva de calibração.

Para a construção das curvas, seis soluções foram preparadas partindo da solução estoque padrão de 4-NC (1mg/mL). As concentrações variaram de 2,5ug/mL a 20ug/mL. Foram realizadas triplicata de injeções de cada um dos vials.

O desvio padrão relativo entre os resultados (DPR) de área, o tempo de retenção, a assimetria dos picos e número de pratos teóricos (NPT- USP) também foram avaliados.

4.2.4.6 Avaliação do parâmetro de Robustez

Um mL do extrato do percolado foi colocado em balão volumétrico de 5 mL e o volume completado com etanol grau CLAE. A solução resultante foi filtrada utilizando-se membrana 0,45µm de PVDF. 100µL desta solução foi colocada em vial contendo 900µL de etanol. Após agitação em vórtex a preparação foi injetada em triplicata no cromatógrafo variando-se os parâmetros descritos a seguir no Quadro 4:

Parâmetro	Especificação
Comprimento de onda	281nm
	282nm
	283nm
Fluxo de fase móvel	0,8mL/min
	1,0mL/min
	1,2mL/min
Proporção de fase móvel (MeOH ácido: Mistura de água e ACN ácida)	88:12
	90:10
	92:8

Quadro 4: Modificações realizadas no método para verificação do parâmetro de robustez.

Foram avaliados os desvios padrão relativo (DPR) das triplicatas das injeções em relação à: área; assimetria, tempo de retenção (Tr) e número de pratos teóricos (NPT).

4.2.5 Avaliação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante da solução de 4-NC padronizado e do percolado foi avaliada utilizando-se espectrofotômetro UV-Vis Cary 50 (Varian®) através da técnica que avalia a atividade seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, (DPPH•), de coloração púrpura que absorve a 517 nm.

Foi feita diluição seriada do percolado em etanol para concentrações de 4-NC na faixa de 125 a 0,98 µg/mL. A mesma diluição foi feita para o 4-NC isolado. Solução de DPPH• (concentração de 0,3 mM) foi adicionada a cada solução. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente ao abrigo da luz por um período de 30 minutos para que a reação ocorresse.

O decréscimo na absorção foi medido em espectrofotômetro a 517 nm. Uma solução contendo apenas etanol e DPPH• foi utilizada como branco. As leituras das amostras foram realizadas em triplicata. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) que corresponde à quantidade de DDPH consumida pelo antioxidante foi calculada pela seguinte equação:

$$\%AA = [(\text{Abs. B} - \text{Abs. A}) / \text{Abs. B}] \times 100$$

onde:

%AA = porcentagem de atividade antioxidante

Abs. B = absorbância do branco

Abs. A = absorbância do percolado testado.

Vitamina E foi utilizada como controle positivo. A concentração efetiva (CE50) que é a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% foi calculada a partir dos ensaios com o percolado.

4.2.6 Obtenção dos pellets

A Figura 22 apresenta um fluxograma das etapas desenvolvidas neste trabalho para a produção dos pellets. Inicialmente foi feito um líquido de granulação com o próprio percolado e após rotaevaporação, o mesmo foi adicionado à mistura de pós para obtenção de uma massa úmida. Posteriormente foi feita extrusão e esferonização da massa úmida para obtenção dos pellets. Os pellets foram secos e depois revestidos. O detalhamento de cada etapa do processo de produção está descrito nos itens a seguir.

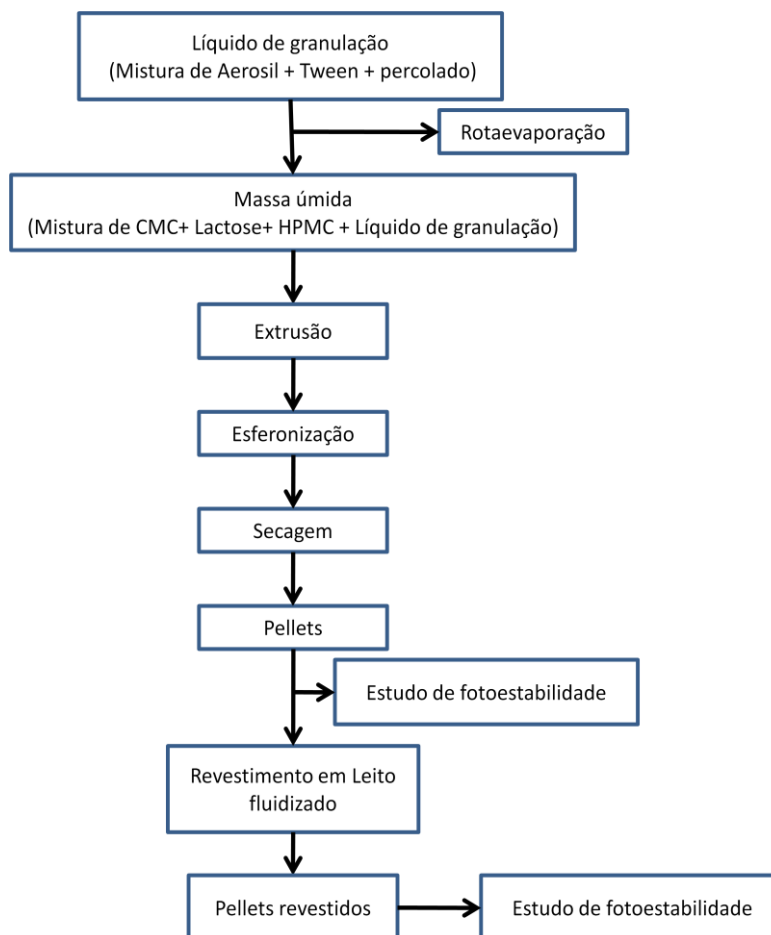


Figura 22: Fluxograma das etapas para a produção de pellets.

Preparação do líquido de granulação: O líquido de granulação foi preparado utilizando-se o percolado (1000mL), Aerosil[®] (2,5g) e Tween[®] 80 (7,5g).

A mistura foi rotaevaporada com rotação média constante e temperatura variando entre 38 e 40°C, obtendo-se uma suspensão final de 250 mL. Desta forma, a suspensão passou a ter uma concentração teórica de 4mg/mL de 4-NC partindo do percolado inicial que tinha concentração média de 1mg/mL de 4-NC determinada por cromatografia líquida através do método descrito no item da validação do método analítico.

Obtenção da massa úmida: Para produção de 500g de pellets utilizou-se como excipientes: 40% de celulose microcristalina PH101; 8% de lactose e 2% de Povidona (PVP-K30). A mistura de excipientes foi feita em batedeira planetária Arno[®] com velocidade baixa e constante. Em seguida foi adicionado o líquido de granulação (Percolado concentrado, Aerosil[®] e Tween[®] 80) e misturada até a formação de uma massa úmida com consistência ideal para a

extrusão avaliada quanto à porcentagem de umidade em balança de infravermelho (Gehaka[®] IV 2000).

Extrusão: A massa úmida foi extrusada em extrusor (Caleva[®], Extruder 20, Figura 23 (A)) equipado com malha de 1 mm de diâmetro de poro, em rotação constante de 20rpm. A massa foi modelada sob a forma de cilindros com diâmetro e tamanho uniformes.

Esferonização: foi feita através da quebra do produto de extrusão em comprimentos uniformes e gradualmente moldados em forma esférica por ação da placa de esferonização. Os “cilindros” obtidos da extrusão foram esferonizados em esferonizador (Caleva[®], Multi Bowl Spheronizer, Figura 23(B)) a uma rotação de 1800rpm por 2 minutos equipado com uma placa de ranhuras radiais.

Secagem: A secagem dos pellets foi realizada logo após a esferonização com auxílio de uma estufa (Lawes[®] 5 Band, Figura 24 (A)) programada com temperatura de 30°C por um período médio de 24 horas. Os pellets foram mantidos ao abrigo da luz para evitar a degradação do princípio ativo.

Revestimento: os pellets foram revestidos utilizando-se leite fluidizado (Mycrolab- H00264-Hüttlin[®]- FS, Figura 24 (B)).

Inicialmente foram avaliados 3 polímeros de revestimento de liberação imediata: HPMC (Opadray YS-1-7006[®]), Povidona (PVP- K30) e copolímero constituído por álcool polivinílico e polietilenoglicol (**Macrogol-poly(vinyl alcohol) graft-copolymer, Polyvinyl alcohol-polyethylene glycol graft-copolymer - Kollicoat IR[®]**) em concentrações descritas na Tabela 1. Foram preparados 200mL de solução de revestimento. A solução foi mantida sob agitação magnética para evitar a precipitação do dióxido de titânio (Figura 25).

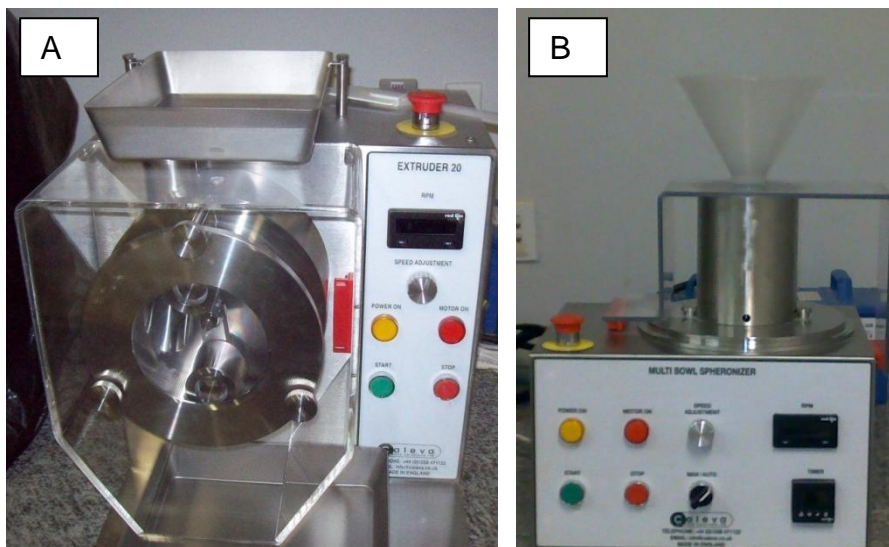


Figura 23: (A) Extrusor (Caleva[®] Extuder 20) e (B) Esferonizador (Caleva[®]. Multi Bowl Spheronizer).

O PEG 6000 foi utilizado como plastificante e o dióxido de titânio como opacificante.

Os três lotes revestidos foram avaliados em estudo de fotoestabilidade para verificar qual polímero apresentava maior proteção para o 4-NC (Tabela 1 e 2).

Os parâmetros utilizados no leite fluidizado foram os seguintes:

- 35g de pellets;
- Temperatura do ar de entrada 39°C;
- Pressão do ar 1,8m³/h;
- Ar de pulverização: 11psi;
- Microclima: 4,5 psi;
- Bomba peristáltica (3rpm; 1,0g/min);
- Temperatura da solução: 35°C;
- Pressão da câmara de secagem: -17KPa.

A eficiência do revestimento foi avaliada pelas características macroscópicas e pelo ganho de peso alcançado após o processo.

Tabela 1: Componentes das formulações para o revestimento dos pellets contendo 4-NC utilizando-se leite fluidizado.

Formulação	Opadray YS-1-7006®	Kollicoat IR®	PVP K30®	PEG 6000	Dióxido de Titânio
1	2%	--	--	3%	3%
2	--	--	3%	3%	3%
3	--	3%	--	3%	3%



Figura 24: (A) Estufa Lawes® e (B) Leito fluidizado (Mycrolab- H00264-Hüttlin®- FS).



Figura 25: (A) Revestimento dos pellets: Bomba peristáltica (Watson Marlow®, 323); (B) Leito fluidizado (Mycrolab- H00264-Hüttlin®- FS).

Tabela 2: Componentes das formulações para o revestimento dos pellets contendo 4-NC utilizando-se Kollicoat IR® e relação de ganho de peso para cada lote.

Formulação	Kollicoat IR®	Talco	PEG 6000	Dióxido de Titânio	Ganho de peso
1	3%	2%	3%	3%	3%
2	3%	2%	3%	3%	6%
3	3%	2%	3%	3%	9%

4.2.7 Caracterização dos Pellets

Distribuição do tamanho: 50g de pellets foram utilizados para a determinação da distribuição do tamanho através da técnica de tamisação (Agitador de tamises – Sonic Sifter Separator®). Foram utilizados os tamises de malha de 300, 425, 600, 850 e 1000, 1400, 1700 e 2000 µm previamente pesados sem pellets. O equipamento foi operado durante 2 minutos em amplitude 4. No final do teste os tamises cheios foram pesados e a distribuição granulométrica foi determinada através de construção de histogramas. O procedimento de tamização foi feito em triplicata.

Morfologia e rugosidade da superfície dos pellets: A visualização da morfologia externa dos pellets foi avaliada através de estereomicroscópio Leica® MZ6 com câmera acoplada (Leica® EC3). A morfologia externa dos pellets bem como a espessura do revestimento foi determinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um Phenom/ FEI. Os pellets foram previamente revestidos por uma fina camada de ouro em um *sputter coater* EM SCD 050/ Leica.

Friabilidade: Seguindo procedimento previsto na Farmacopéia Brasileira 4. ed. (1988), pesou-se 10g de pellets não revestidos as quais foram submetidos à ação de um friabilômetro Ética®. Após cem rotações, durante cinco minutos, o pó presente na superfície dos pellets foi retirado através de jato de ar. Posteriormente, os pellets foram novamente pesados. A diferença entre o peso inicial e final representou a friabilidade, em função da percentagem de pó perdido. O valor aceitável deve ser inferior a 1,5% do peso estabelecido.

4.2.8 Estudo acelerado de fotoestabilidade

A fotoestabilidade do 4-NC foi avaliada na solução extrativa (percolado) e na forma farmacêutica sólida (pellets não revestidos e revestidos). As análises foram

realizadas em câmara de fotoestabilidade Nova Ética (424 CF) equipada com lâmpadas fluorescentes brancas e lâmpada fluorescente UV (15W) com distribuição espectral de 320 a 400 nm, com temperatura controlada (25 °C), opticamente isolada do ambiente externo e com ventilação apropriada. As amostras foram expostas não menos que 1,2 milhões lux/hora, integradas a uma energia de ultravioleta próxima de não menos que 200 watt hora/m².

As análises foram projetadas de forma a acompanhar as características físicas e químicas das amostras. A padronização das condições experimentais foi realizada, seguindo as normas da Conferência Internacional de Harmonização (ICH - Q1B, 1996).

As amostras foram expostas a uma irradiação energética de 98,4 (12 horas), 196,8 (24 horas), 295,2 (36 horas) e 393,6 (48 horas) W/m². A avaliação em CLAE foi realizada ao retirar as amostras da câmara de fotoestabilidade, as quais eram protegidas, por papel alumínio, de qualquer exposição à luz. Um controle escuro foi submetido ao teste para avaliar a possível degradação promovida somente da temperatura.

Após o desenvolvimento dos testes de fotoestabilidade, as amostras foram avaliadas quanto às características físicas e à concentração do princípio ativo.

Em relação ao estudo de fotoestabilidade do percolado, a solução extrativa foi diluída em etanol grau CLAE na proporção (1:1 v/v) e submetida ao teste juntamente com a solução padrão de 4-NC a uma concentração de 0,5 mg/mL. As amostras foram colocadas em vials crimpados de vidro transparente no intuito de diminuir a perda de volume por evaporação durante todo o teste.

O estudo de fotoestabilidade com os pellets foi feito com 1g de amostra tanto de pellets não revestidos quanto dos revestidos. As amostras foram colocadas em placas de petri de vidro com tampa e expostas na câmara de fotoestabilidade. Placas-controle foram envolvidas com papel alumínio e colocadas na câmara. Ao final que cada tempo de exposição, as amostras foram trituradas em gral. 200 mg do pó resultante foram diluídos em etanol obtendo-se um volume final de 10 mL. Após filtração, as soluções foram analisadas por CLAE seguindo as condições cromatográficas descritas na validação analítica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

5.1.1 Determinação do teor de umidade residual (BORGES, 2005)

A presença de quantidade excessiva de água em drogas vegetais propicia o desenvolvimento de microrganismos, além de favorecer a hidrólise e a atividade enzimática levando à deterioração dos constituintes da droga.

As análises realizadas em triplicata mostraram um teor de umidade com média de 6,33 % \pm 0,305.

O baixo conteúdo de umidade indica que houve eficiência durante o processo de secagem, realizada previamente a pulverização da raiz, e que o material é estável (OLIVEIRA *et al.*, 1991).

5.1.2 Determinação do teor de cinzas totais

O teste de teor de cinzas é realizado para verificar uma possível adulteração com substâncias inorgânicas na amostra (ARAUJO *et al.*, 2006). Os testes demonstraram um teor médio de 8,25% \pm 0,61 de cinzas nas amostras analisadas. Esse teor está dentro dos limites aceitáveis descritos na Farmacopéia Brasileira 4ª edição parte 1 (1988) que admite o máximo de 14% de cinzas totais. O resultado indica que a planta possui baixo índice de impurezas inorgânicas não voláteis, que poderiam estar presentes como contaminantes.

5.1.3 Determinação do índice de intumescência (I.I.)

O índice de intumescência descrito pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição, fascículo II (2000) não apresenta um valor limite. Porém, segundo Couto e colaboradores (2009), é a partir deste índice que se torna possível calcular a quantidade necessária de solvente extra para se desenvolver processos extrativos.

O índice intumescência foi realizado com o pó da raiz de *Pothomorphe umbellate* e o valor médio obtido após três determinações foi de 3,30 mL \pm 0,87.

5.1.4 Determinação da granulometria da droga vegetal

Em relação à distribuição granulométrica, a droga vegetal foi classificada como “pó semi-fino” de acordo com a classificação da Farmacopéia Brasileira 4ª edição, parte I (1988). A maior porcentagem das partículas estava na faixa de 125 a 250 μm , como pode ser observado na Figura 26.

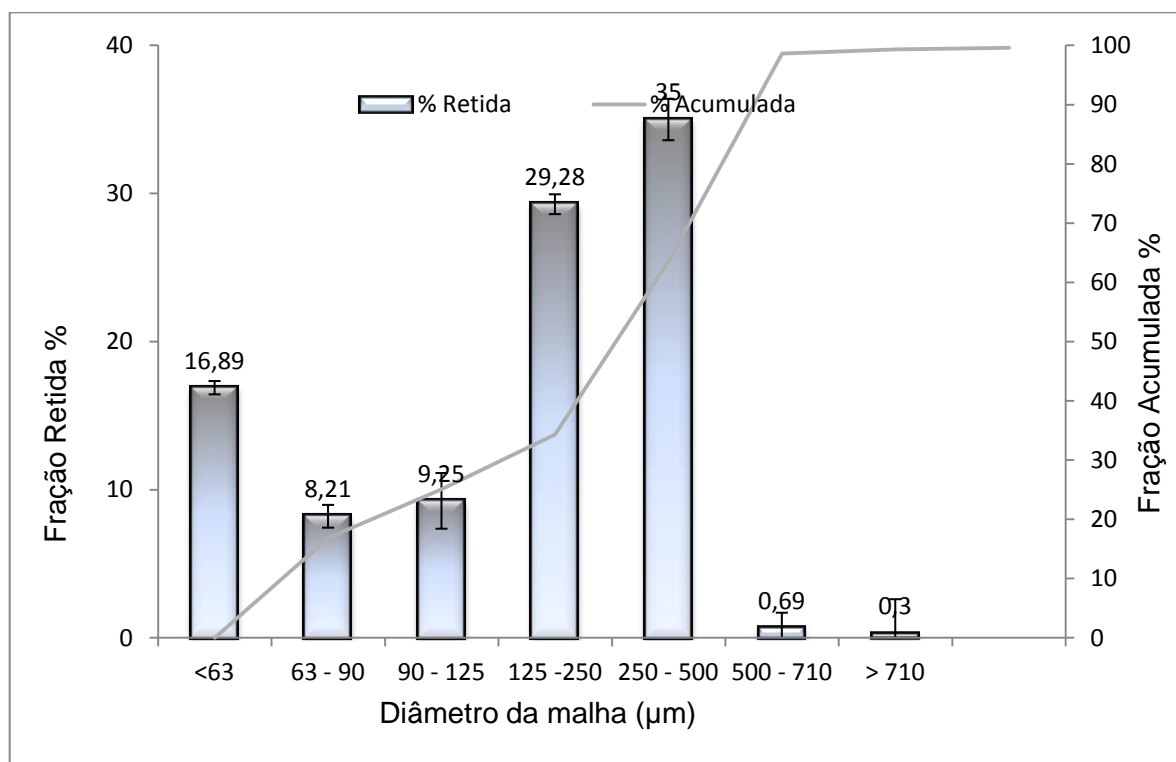


Figura 26: Distribuição granulométrica do pó da raiz da *Pothomorphe umbellate*.

Este perfil granulométrico é considerado favorável para extração, pois facilita a percolação, a lixiviação da droga vegetal, evitando uma compactação excessiva do pó, levando desta forma a uma distribuição uniforme do solvente extrator na matéria-prima disposta dentro do percolador.

5.1.5 Determinação do perfil cromatográfico do 4-NC da matéria-prima vegetal

A determinação de constituintes químicos relevantes para a identificação da droga vegetal faz parte do protocolo de avaliação da qualidade da matéria-prima empregada em fitoterápicos. Das espécies de *Piperaceae* que constam na Farmacopéia Brasileira 4ª Ed. (1988) são poucos os estudos químico-

farmacológicos, tendo Kijioa e colaboradores (1980) isolado das raízes da Pariparoba o composto fenólico 4-NC. Dessa forma, para *Pothomorphe umbellata*, um dos marcadores determinantes é a presença deste fenilpropanóide no perfil cromatográfico em camada delgada (CCD).

Amostras de extrato hidroalcoólico obtido a partir das raízes da espécie apresentaram perfil cromatográfico típico com relação ao 4-nerolidilcatecol, mancha ogival rocheada com Rf 0,575 (Figura 27 (A)), observada após nebulização do reativo de anisaldeido-sulfúrico seguido de aquecimento em estufa 110°C (MORAES, 1984). A mesma placa cromatográfica quando submetida a luz ultravioleta a 366 nm (Figura 27 (B)) foi observada a presença de manchas arredondadas com as seguintes colorações: alaranjada (Rf 0,075), azul (Rf 0,1; Rf 0,25; Rf 0,7) e amarelada (Rf 0,17) (Tabela 3).

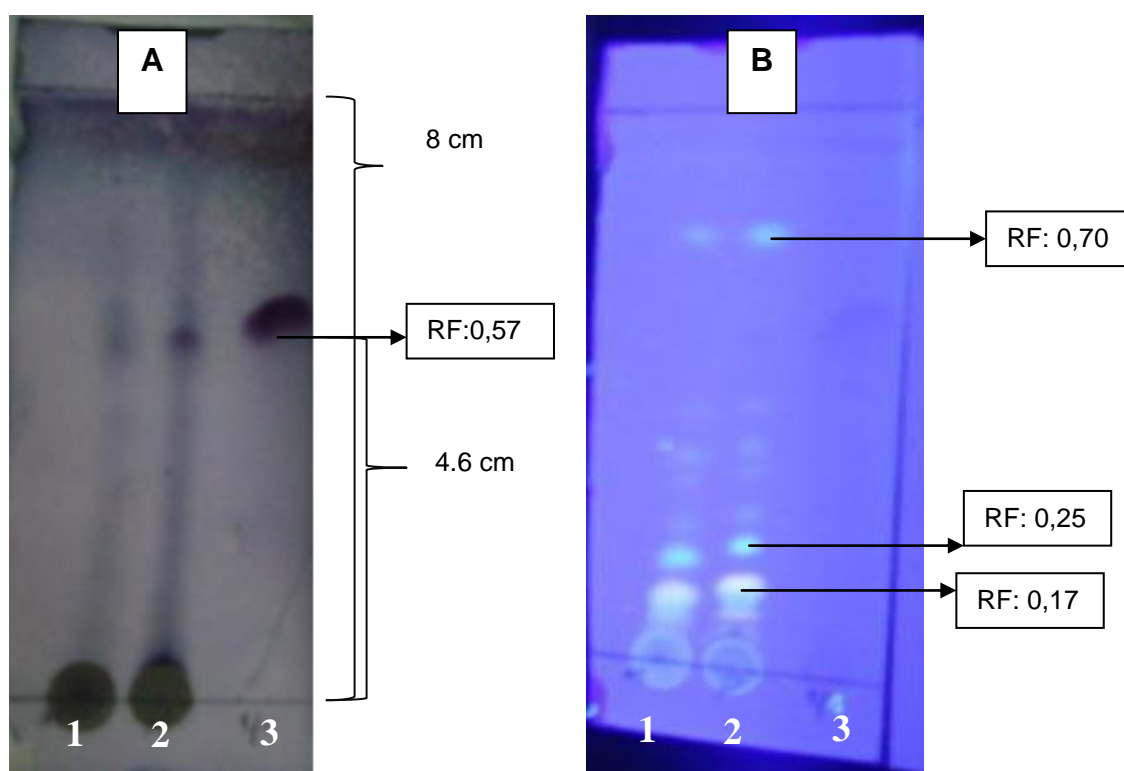


Figura 27: Perfil cromatográfico em camada delgada das soluções extrativas e solução de referência de 4-nerolidilcatecol visualizado sob luz natural (A) e sob luz ultravioleta (B). As manchas 1 e 2 referem-se aos extratos obtidos a partir de *Pothomorphe umbellata* e a mancha 3 corresponde a aplicação da solução referência.

A visualização da placa cromatográfica sob luz UV no comprimento de onda a 366 nm mostrou manchas típicas conforme relatado no trabalho de Kijjoa e colaboradores (1980), com exceção da mancha amarelada (Rf 0,17) não citada pelo autor. O aparecimento dessa mancha pode ser um indício de que o exemplar do espécime coletado por Kijjoa e colaboradores (1980) e o que foi adquirido para a realização deste experimento foram coletados em épocas diferentes do ano, cultivadas em solos com características nutricionais diversas, com idades diferentes.

A produção de novos metabólitos secundários ou a diminuição daqueles que normalmente estão presentes em maior quantidade na espécie vegetal pode ocorrer quando a planta é submetida a condições ambientais diversas como: falta ou excesso de água; solos ácidos ou com composições químicas diferentes (PINHEIRO *et al.*, 2009).

Outra possibilidade para explicar a presença desta mancha é a ocorrência de degradação ou reações químicas que propiciam a produção de bioativos que não estariam presentes na planta antes da sua coleta (DINIZ, *et al.*, 2007). Tais eventos podem ocorrer mesmo depois da espécie ter sido colhida e armazenada. Além do mais, as condições de processamento e armazenamento da raiz realizadas pelo fornecedor não são conhecidas e não estão descritas no laudo da matéria-prima.

Os resultados da caracterização da droga vegetal encontram-se resumidos na Tabela 4.

Tabela 3: Fatores de retenção (Rf's) das manchas de referência e manchas encontradas.

Cor da Mancha	Rf Referência*	Rf Encontrado
Alaranjada	0,070	0,075
Azul	0,140	0,100
Amarelo	--	0,17
Azul	0,27	0,25
Azul	0,64	0,70

* Valores de acordo com Moraes e colaboradores (1984)

Tabela 4: Propriedades físicas do pó das raízes de *Pothomorphe umbellata*.

Ensaio	Resultados
Determinação de Perda por Dessecação (%)	6,33 ± 0,305*
Teor de Cinzas Totais (%)	8,58 ± 0,555*
Índice de Intumescência (mL)	3,30 ± 0,87*
Granulometria (µm)	170,26

* Resultados expressos pela média ± desvio padrão relativo de três determinações.

5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Pothomorphe umbellate* (L.) Miq.

5.2.1 Extração por maceração

A extração do ativo de interesse foi mais eficiente quando a solução de etanol:água (3:1, v/v) foi utilizada. Tal fato pode ser explicado em relação à molécula do 4-nerolidilcatecol que possui caráter apolar devido ao núcleo aromático e a cadeia lateral isoprênica. Além disto, trata-se de um composto pouco solúvel em água, porém, solúvel em etanol o que faz com que a mistura contendo maior quantidade de etanol favoreça a extração do marcador nessas condições. Os resultados estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5: Concentração de 4-nerolidilcatecol após a extração por maceração utilizando duas proporções de etanol:água.

(Etanol:Água)	Concentração 4-NC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)*
1:1	88,90 \pm 0,44
3:1	146,20 \pm 0,61

* Resultados expressos pela media \pm desvio padrão relativo de três determinações.

Conforme mencionado na metodologia, 50g da droga vegetal foi submetida à extração com etanol:água (3:1, v/v) resultando em uma solução de volume final de 200 mL com proporção droga:solvente 1:4 (p/v) e concentração de 191,60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do marcador 4-nerolidilcatecol.

5.2.2 Extração por percolação

De acordo com Sonaglio e colaboradores (2004), 75% a 80% das substâncias passíveis de extração estão presentes no volume inicial de uma percolação fracionada. Levando este dado em consideração, calculou-se o volume desejado para que a concentração droga:solvente fosse de 1:4 (p/V). Desta forma, o volume esperado para o peso de 50g foi um volume de 200 mL de solvente extrator.

A primeira percolação, realizada com 50g da droga vegetal apresentou um teor do 4-NC de 381,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Essa extração foi realizada com o sistema de solventes etanol:água (3:1, v/v), pois mostrou-se mais eficiente na maceração.

Comparando os dois processos extrativos observou-se que a percolação foi mais eficiente em relação à maceração, pois a concentração final do marcador foi cerca de duas vezes maior que o macerado para os mesmos 50g da droga e o mesmo tipo de solvente. A porcentagem de rendimento do 4-NC em relação à quantidade de droga vegetal para o processo de maceração e percolação foi de 0,08% e 0,15%, respectivamente.

A vantagem do rendimento da percolação é explicado pelo fato de que esse método extrativo leva ao esgotamento da droga vegetal. Uma vez que existe a renovação constante do solvente e o fluxo que é contínuo permite retirar totalmente o 4-NC da droga vegetal. Já na maceração, a saturação do solvente extrativo não permite o esgotamento da droga vegetal o que demonstra um menor rendimento desse processo extrativo.

Diante deste resultado, foi verificado que o sistema solvente etanol:água (3:1, v/v) e a percolação ofereceram melhor rendimento em relação ao marcador. Desta forma, procedeu-se a extração final com 6,4 quilos da droga vegetal.

Durante o processo de extração de 6,4 kg da droga vegetal, o acompanhamento do esgotamento do marcador foi realizado através de CCD. Tal procedimento foi realizado uma vez que cromatografia é considerada um método mais sensível quando comparada com o método colorimétrico visual (reação colorimétrica do cloreto férrico a 4,5%) que havia sido empregado na primeira percolação.

A concentração final do marcador na solução extrativa do percolado foi de 1053,20 µg/ mL, em uma solução final de 16 litros, ou seja, 2,76 vezes mais concentrado que a primeira percolação.

Como a percolação é um tipo de extração que exige baixa velocidade de escoamento e constante renovação do solvente, esse processo extrativo exigiu mais tempo para ser realizado quando comparado ao tempo gasto pela maceração. A percolação, mesmo sendo um método mais trabalhoso, sua execução mostrou-se mais vantajosa uma vez que 80% do etanol utilizado foi recuperado no final do processo através de rotaevaporação e a concentração final do ativo foi cerca de 5,5 vezes maior que o apresentado na maceração (Tabela 6).

Tabela 6: Concentração do 4-nerolidilcatecol após processo de extração.

Método	[4-NC] $\mu\text{g/ mL}$
Maceração	191,60 \pm 0,61
Percolação	1053,20 \pm 0,12

* Resultados expressos pela média \pm desvio padrão relativo de três determinações

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO PERCOLADO

5.3.1 Determinação do pH

A determinação do pH do percolado (16 litros) foi feita sem diluição prévia. Foram realizadas determinações em dias diferentes onde pode-se verificar que o valor manteve-se constante com valor médio de $6,80 \pm 0,35$. Este fato demonstra que o percolado estava sendo mantido em condições controladas (câmara fria 3°C e ao abrigo da luz) as quais favoreciam a estabilidade do princípio ativo. Sabe-se que a proliferação de bactérias geralmente provoca a diminuição do valor de pH.

Cardoso (2008) verificou que o 4-NC degrada quando em pH muito ácido.

5.3.2 Determinação de sólidos totais solúveis

Como o percolado mostrou-se mais eficiente pela quantificação obteve-se uma quantidade maior de sólidos solúveis em relação ao macerado. O percolado apresentou resíduo seco de $7,57\text{g} \pm 0,16$ e o macerado $3,33\text{g} \pm 0,61$ expressos pela média de duas determinações.

5.3.3 Determinação do teor alcoólico

A importância da determinação do teor alcoólico no percolado está relacionada com o passo tecnológico farmacotécnico. Uma vez que soluções com alto teor alcoólico não são adequadas para o uso como líquido de granulação. A alta volatilidade do etanol não oferece características uniformes para o granulado o que pode prejudicar tanto a qualidade do produto intermediário quanto do produto final.

O teor alcoólico do percolado foi de $32,72 \pm 0,14\%$. Em relação à produção de pellets este teor foi ainda menor uma vez que para a obtenção do líquido de granulação nova rotaevaporação foi realizada.

O percolado final foi caracterizado de acordo com métodos farmacopéicos e os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Características do Percolado Final.

Ensaio	Resultados
Teor de Sólidos Solúveis (%)	$2,36\% \pm 0,16$
Teor Alcoólico (%)	$32,72\% \pm 0,14$
Densidade	$0,95882 \pm 0,14$
pH da solução extrativa	$6,80 \pm 0,35$
Concentração do 4-NRC	$1,0538 \text{ mg/mL} \pm 0,12$

* Resultados expressos pela média \pm desvio padrão relativo de três determinações

5.4 OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO 4-NC POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Durante o desenvolvimento do método, optou-se em utilizar ácido acético para acidificação da fase móvel o que proporcionou uma melhor simetria no pico do 4-NC.

O método escolhido durante o desenvolvimento para posterior validação foi o que apresentou DPR entre injeções do ativo menor que 5%, assimetria do pico menor que 1,4; NPT maiores que 2000 e tempo de retenção com resolução entre o pico do solvente.

O método desenvolvido em modo isocrático garantiu um tempo de corrida de 8 minutos, tendo tempo médio de retenção do ativo de 5,0 minutos favorecendo análises rápidas. Além disto, a fase móvel constituída por Fase A (90%) de metanol acidificado com 0,1% de ácido acético e Fase B (10%) constituída por uma mistura de água e acetonitrila, acidificada com ácido acético 0,1% (90: 10), em modo isocrático de eluição, foi adequada para obtenção de picos simétricos.

A pressão da bomba foi baixa ficando estável em média a 30bar com fluxo de 1,0mL/min. Este fator é interessante uma vez que a baixas pressões, a vida útil tanto do pistão da bomba quanto da coluna são maiores.

O volume de injeção da amostra de 10 μ L apresentou sensibilidade de detecção mesmo em baixas concentrações do ativo. O comprimento de onda em 282nm foi o escolhido por ser o mais descrito na literatura (Quadro 5).

A coluna utilizada foi a C₁₈ por ser a mais utilizada na detecção do 4-NC descrita na literatura e devido também às características químicas do ativo (Quadro 5).

Os resultados obtidos para todos os parâmetros da validação estão apresentados nos itens a seguir.

Técnica	Coluna	Fase móvel	Fluxo	Detector	Tipo de amostra	Referência
CLAE	C8 (75X4,6mm, 3 μ m)	Modo isocrático: MeOH: água (90:10) para 4-NC e (95:5) para alfa- tocoferol. KCl 2mM e LiClO ₄ 20mM,	1,0 μ L/min	Eletroquímico, potencial 0,600V	Matriz biológica, homogeneizado de pele	ROPKE <i>et al.</i> , 2003.
CLAE	C18 (150X4,6X5mm)	Modo isocrático: MeOH: ACN água (62:20:18),	1,6mL/min	UV: 282nm	Avaliou a farmacocinética do 4-NC em plasma de rato	REZENDE e BARROS, 2004.
CLAE	C18 (250X4,6mmX 5 μ m) com pré-coluna:	Modo gradiente: MeOH: ACN:TFA0,1%: 0-1min: (55:5:40) 1-30min: (67:15:18) 30-50min: (55:5:40)	1,0mL/min	UV: 254 e 282nm	Avaliou os produtos de degradação do 4-NC.	CARDOSO, 2008
CLAE	C18 (250X4,6mmX5 μ m)	Modo isocrático: ACN:água (85:15)	1,0mL/min	UV: 282nm	Avaliou extratos de <i>Pothomorphe umbellate</i>	MATTANA, 2009

Quadro 5: Métodos descritos na literatura para a quantificação do 4-NC em diferentes tipos de amostras.

5.4.1 Avaliação do parâmetro de seletividade do método analítico

A seletividade do método cromatográfico pôde ser determinada através de comparação entre os cromatogramas obtidos a partir da solução padrão e das soluções amostra preparadas a partir do extrato hidroetanólico de 4-NC e dos pellets. A análise dos cromatogramas demonstrou a inexistência de quaisquer interferentes no mesmo tempo de retenção do 4-NC. Não foi observada interferência do solvente ou dos excipientes utilizados na preparação dos pellets no comprimento de onda de detecção (282 nm) do ativo. As Figuras 28, 29 e 30 apresentam os cromatogramas obtidos a partir da solução padrão, da solução amostra e do etanol que é o diluente, respectivamente.

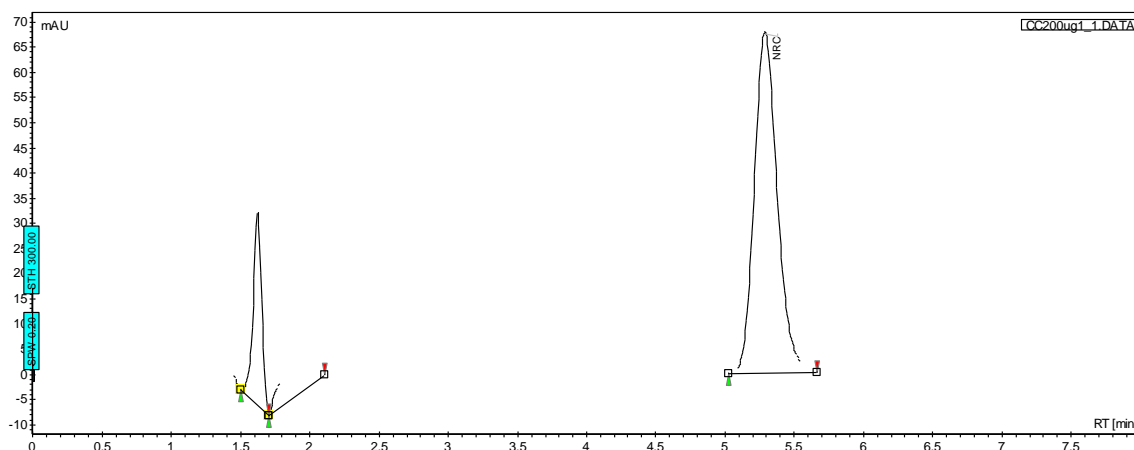


Figura 28: Cromatograma da solução padrão de 4-NC (200ug/mL). Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ (150mm x4,6mm x 5μm), fase móvel: (A:B; 90:10, v/v): (A= metanol acidificado com 0,1% de ácido acético e B = mistura de água e acetonitrila acidificadas com 0,1% de ácido acético (90:10)), em modo isocrático, fluxo de 1,0 mL/min, 10μL de volume de injeção e λ=282nm.

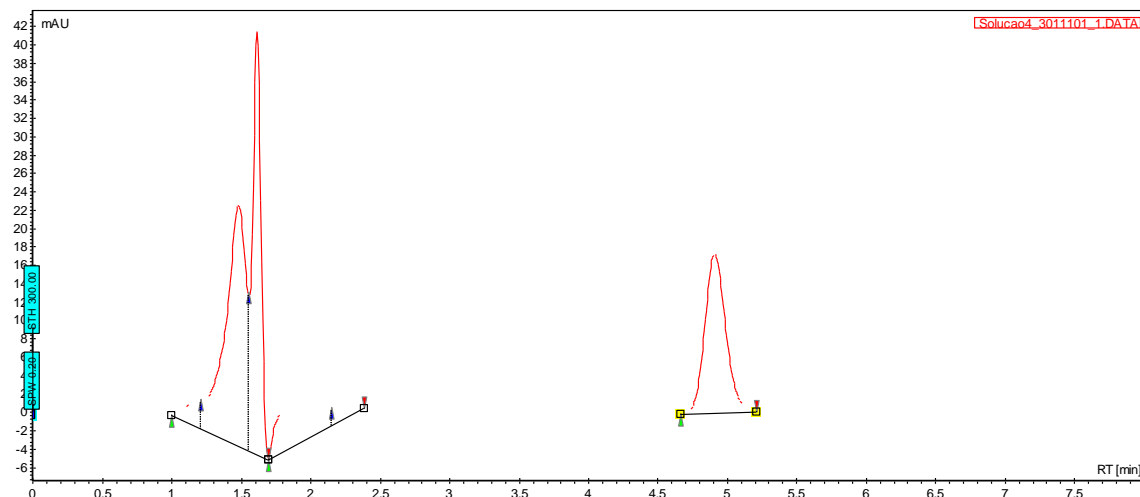


Figura 29: Cromatograma da solução do extrato de 4-NC. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C_{18} (150mm x4,6mm x 5 μ m), fase móvel (A:B; 90:10, v/v): (A= metanol acidificado com 0,1% de ácido acético e B = mistura de água e acetonitrila acidificadas com 0,1% de ácido acético (90:10)), em modo isocrático, fluxo de 1,0 mL/min, 10 μ L de volume de injeção e λ =282nm.

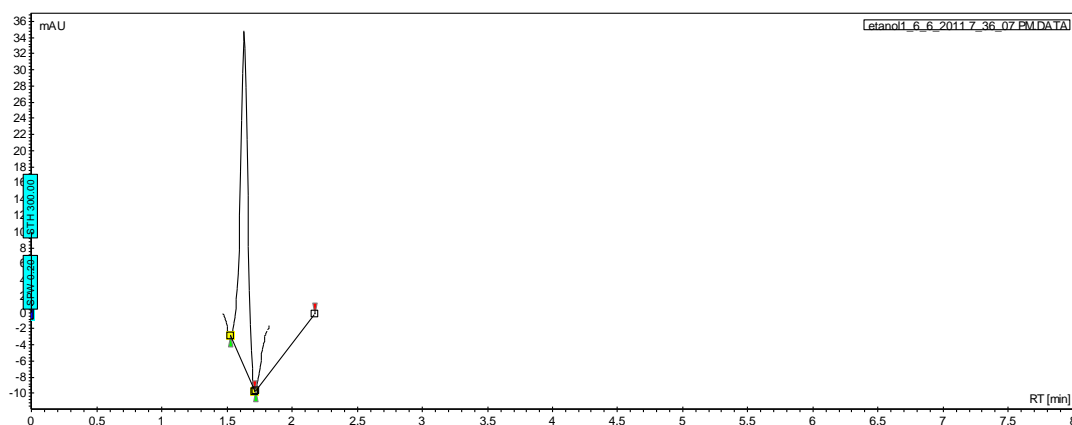


Figura 30: Cromatograma para a verificação da especificidade do método utilizando a injeção de etanol (dilúente do 4-NC). Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C_{18} (150mm x4,6mm x 5 μ m), fase móvel (A:B; 90:10, v/v): (A= metanol acidificado com 0,1% de ácido acético e B = mistura de água e acetonitrila acidificadas com 0,1% de ácido acético (90:10)), em modo isocrático, fluxo de 1,0 mL/min, 10 μ L de volume de injeção e λ =282nm.

5.4.2 Avaliação do parâmetro da Linearidade - curva de calibração

A determinação da linearidade e intervalo foi executada em triplicata, através da elaboração de curvas de calibração. A linearidade do método verificou a proporcionalidade entre as diferentes concentrações do padrão e áreas.

O coeficiente de correlação (r) acima de 0,99 demonstra que as soluções do padrão de 4-NC apresentam correlação linear entre as áreas e as concentrações, indicando que os coeficientes de linearidade são adequados (Figura 31). A linearidade foi verificada no intervalo de concentração de 10 a 200 $\mu\text{g/mL}$ utilizando-se sete valores para a construção da curva. Esta faixa de concentração possibilitou detectar o 4-NC dentro dos limites de interesse e a resposta do detector de ultravioleta conservou-se linear.

Segundo a Resolução - RE nº 899/03 da ANVISA, coeficientes de correlação da curva (r) maior que 0,99 e DPR abaixo de 5% significam linearidade. Assim, a metodologia analítica desenvolvida demonstrou linearidade uma vez que foi capaz de demonstrar que as áreas foram diretamente proporcionais às concentrações de 4-NC presente nas soluções, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9999; 0,9995 e 0,9999 e coeficientes de variação (CV) inferiores a 5,0% conforme demonstrado nas Tabela 8 e 9.

A Figura 32 representa os cromatogramas obtidos após injeção das soluções padrão na faixa de concentração para obtenção da curva de calibração.

Tabela 8: Resultados das áreas dos picos e coeficientes de correlação (r).

[] $\mu\text{g/mL}$	Curva 1	Curva 2	Curva 3
10	38,300	35,567	40,267
25	100,767	97,700	99,700
50	193,133	190,733	191,433
75	296,967	296,433	298,200
100	401,933	406,900	397,500
150	596,633	590,300	598,167
200	793,067	773,800	803,400
	$r = 0,9999$	$r = 0,9995$	$r = 0,9999$
Média de r	0,999766667	DP	0,00023094
		DPR ou CV	0,023099401

r é o resultado da raiz quadrada de R^2 , DP= Desvio Padrão;
DPR= Desvio Padrão Relativo = CV= Coeficiente de variação (%).

Tabela 9: Construção das curvas padrão de 4-NC, relação das concentrações usadas, áreas médias dos picos. * DP = Desvio padrão; ** DPR= Desvio padrão relativo também conhecido como coeficiente de variação CV%.

	[]	Área	DP*	DPR**
	µg/mL	Média		
Curva 1	10	38,3	0,985	2,572
	25	100,767	1,401	1,391
	50	193,133	2,65	1,372
	75	296,967	3,338	1,124
	100	401,933	4,177	1,039
	150	596,633	7,193	1,206
	200	793,067	9,872	1,245
	Curva 2	[]	Área	DP*
µg/mL		Média		
10		35,567	1,021	2,872
25		97,7	2,476	2,534
50		190,733	1,955	1,025
75		296,433	2,136	0,721
100		406,9	2,352	0,578
150		590,3	1,735	0,294
200	773,8	7,093	0,917	
Curva 3	[]	Área	DP*	DPR**
	µg/mL	Média		
	10	40,267	0,404	1,004
	25	99,7	2,74	2,749
	50	191,433	0,945	0,494
	75	298,2	6,815	2,285
	100	397,5	3,724	0,937
	150	598,167	7,392	1,236
200	803,4	2,456	0,306	

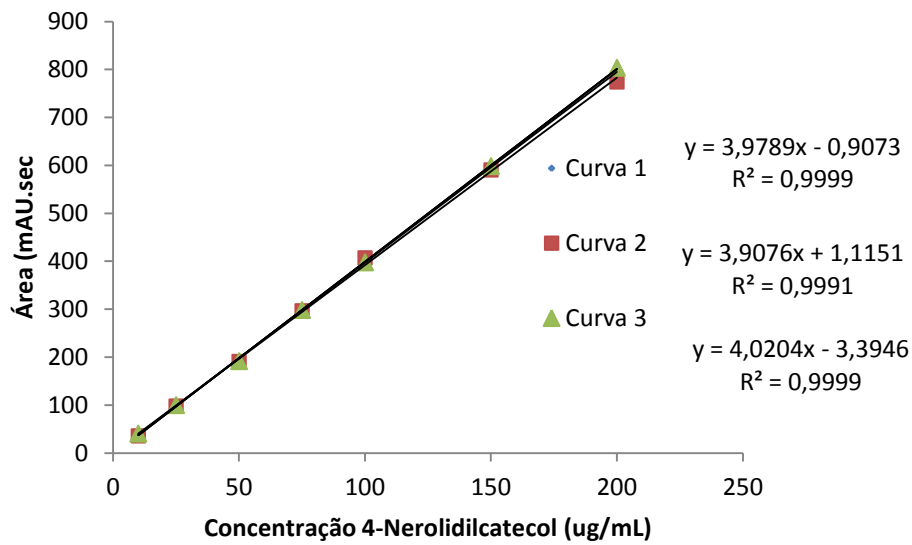


Figura 31: Curvas de calibração do 4-nerolidilcatecol. Dados da Tabela 9. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C_{18} (150mm x 4,6mm x 5 μ m), fase móvel (A:B; 90:10, v/v): (A = metanol acidificado com 0,1% de ácido acético e B = mistura de água e acetonitrila acidificadas com 0,1% de ácido acético (90:10)), em modo isocrático, fluxo de 1,0 mL/min, 10 μ L de volume de injeção e λ =282nm.

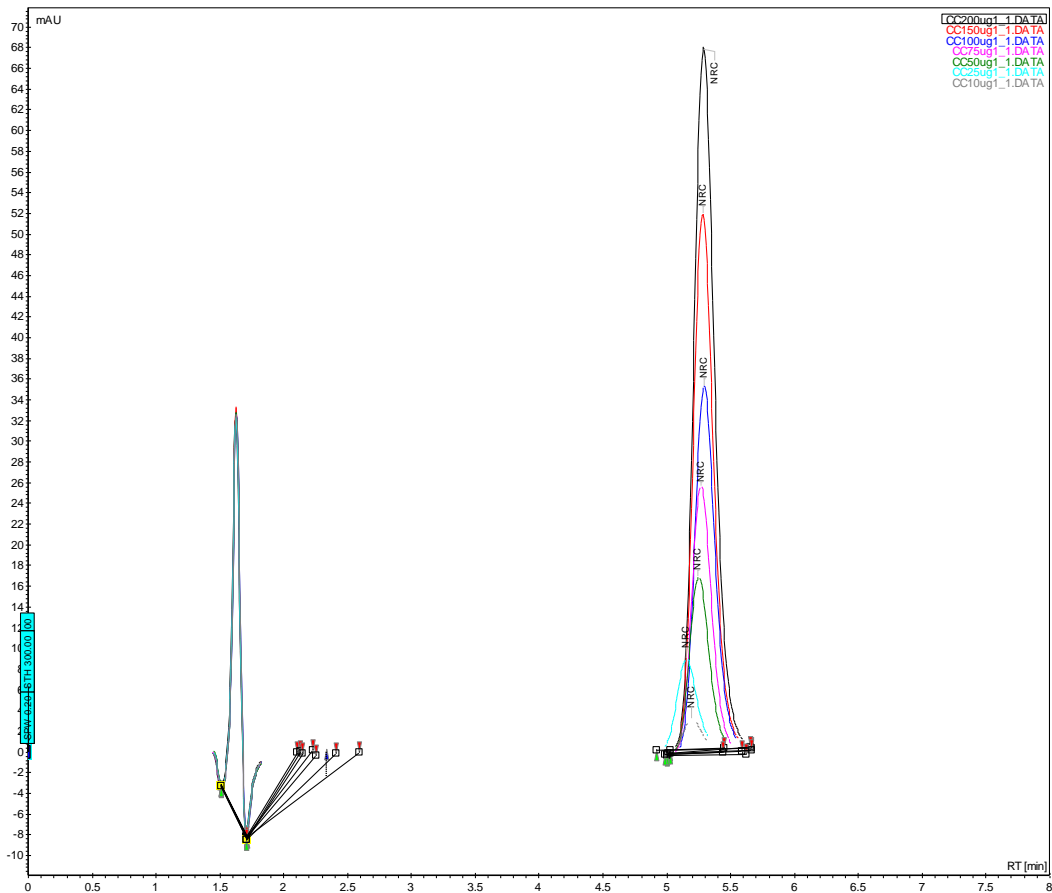


Figura 32: Cromatogramas das soluções padrão de 4-NC (10 μ g/mL a 200 μ g/mL), Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C_{18} (150 mm x 4,6mm x 5 μ m), fase móvel: (A:B; 90:10, v/v): (A= metanol acidificado com 0,1% de ácido acético e B = mistura de água e acetonitrila acidificadas com 0,1% de ácido acético (90:10)), em modo isocrático, fluxo de 1,0 mL/min, 10 μ L de volume de injeção e λ =282nm.

5.4.3 Avaliação do parâmetro de Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (ICH, 1995; INMETRO, 2003).

Neste trabalho, a precisão foi verificada através da repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas) conforme descrito nos itens a seguir.

5.4.3.1 Repetibilidade

É um tipo de precisão intra-corrída (ANVISA, 2003). A repetitividade ou repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento, mesmo local, repetições em um curto intervalo de tempo (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão foi verificada através de 6 determinações. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados do parâmetro de repetibilidade (Precisão intra-corridas).

Amostra	Área 1	Área 2	Média	DP*	DPR*
1	116	116,8	116,4	0,566	0,486
2	115,9	113,6	114,75	1,626	1,417
3	112,6	114,8	113,7	1,556	1,368
4	113,1	115,3	114,2	1,556	1,362
5	114,1	111,3	112,7	1,98	1,757
6	112,5	111	111,75	1,061	0,949
Média	113,9167	DP**	1,623	DPR**	1,424
		DP total	1,887	DPR total	1,657

Amostra	Área 1	Área 2	Média	DP*	DPR*
1	112,4	117,8	115,1	3,818	3,317
2	114,6	116	115,3	0,99	0,859
3	114,8	113,4	114,1	0,99	0,868
4	117,3	122,1	119,7	3,394	2,836
5	121,5	123,3	122,4	1,273	1,04
6	109,2	111,2	110,2	1,414	1,283
Média	116,133	DP**	4,315	DPR**	3,716
		DP total	4,45	DPR total	3,832

DP* = Desvio Padrão entre as injeções; DPR* = Desvio Padrão Relativo entre as injeções;
 DP** = Desvio Padrão dos valores médios; DPR** = Desvio Padrão Relativo dos valores médios;
 DP total = Desvio Padrão de todos os valores; DPR total = Desvio Padrão Relativo de todos os valores. Área 1 e Área 2 representam injeções em duplicata.

5.4.3.2 Precisão Intermediária

A precisão intermediária também é conhecida por precisão inter-corridas. Este parâmetro engloba a concordância entre resultados de um mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes ou com equipamentos diferentes. Segundo a Resolução - RE nº 899/03, recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes (ANVISA, 2003).

Os valores obtidos dos ensaios de precisão intra-corrída e precisão intermediária durante o período de validação estão mostrados na Tabela 11. Todos os valores para o parâmetro de precisão estão de acordo com os limites recomendados pela Resolução - RE nº 899/03.

Tabela 11: Resultados do parâmetro de precisão intermediária, Analista A, primeiro dia e analista B, segundo dia.

Analista A, primeiro dia	Amostra	Área 1	Área 2	Média	DP*	DPR*
	1	125,1	120,1	122,60	3,536	2,884
	2	130,3	129,4	129,85	0,636	0,49
	3	132,4	133,7	133,05	0,919	0,691
	4	130,0	130,9	130,45	0,636	0,488
	5	130,8	128,8	129,80	1,414	1,09
	6	129,7	129,1	129,40	0,424	0,328
	Média	129,1917	DP**	3,486	DPR**	2,698
		DP total	3,54	DPR total	2,74	

Analista B, segundo dia	Amostra	Área 1	Área 2	Média	DP*	DPR*
	1	124,2	128	126,1	2,687	2,131
	2	128,8	124	126,4	3,394	2,685
	3	132,8	129,9	131,35	2,051	1,561
	4	125,7	125,8	125,75	0,071	0,056
	5	130,8	131,8	131,3	0,707	0,539
	6	131	129,1	130,05	1,344	1,033
	Média	128,49	DP**	2,687	DPR**	2,091
		DP total	2,976	DPR total	2,316	

DP* = Desvio Padrão entre as injeções; DPR* = Desvio Padrão Relativo entre as injeções;
 DP** = Desvio Padrão dos valores médios; DPR** = Desvio Padrão Relativo dos valores médios;
 DP total = Desvio Padrão de todos os valores; DPR total = Desvio Padrão Relativo de todos os valores.

5.4.4 Avaliação do parâmetro de Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos para a construção das curvas para a determinação dos limites de detecção e quantificação do 4-NC. A Figura 33 apresenta as três curvas com os R^2 maiores que 0,99, o que demonstrou linearidade na faixa de concentração analisada.

Os limites calculados através das fórmulas apresentadas na metodologia foram: 1,42 e 0,42 $\mu\text{g/mL}$ para LQ e LD, respectivamente.

Tabela 12: Construção das curvas padrão de 4-NC para verificação dos limites de detecção e quantificação. Relação das concentrações usadas e áreas médias dos picos cromatográficos. DP= Desvio Padrão entre as injeções; DPR= Desvio Padrão Relativo entre as injeções.

	[]	Área	DP	DPR
	ug/mL	Média		
Curva 1	2,5	5,667	0,208	3,674
	5	14,833	0,569	3,833
	10	36,567	0,451	1,233
	15	57,2	2,343	4,096
	20	74,967	1,858	2,479
Curva 2	[]	Área	DP	DPR
	ug/mL	Média		
	2,5	6,967	0,208	2,988
	5	16,367	0,115	0,706
	10	38,833	0,751	1,933
Curva 3	15	63,5	0,608	0,958
	20	80,1	0,436	0,544
	[]	Área	DP	DPR
	ug/mL	Média		
	2,5	6,9	0,2	2,899
5	13,867	0,208	1,501	
10	40,2	1,513	3,764	
15	59,1	1,375	2,326	
20	81,4	0,557	0,684	

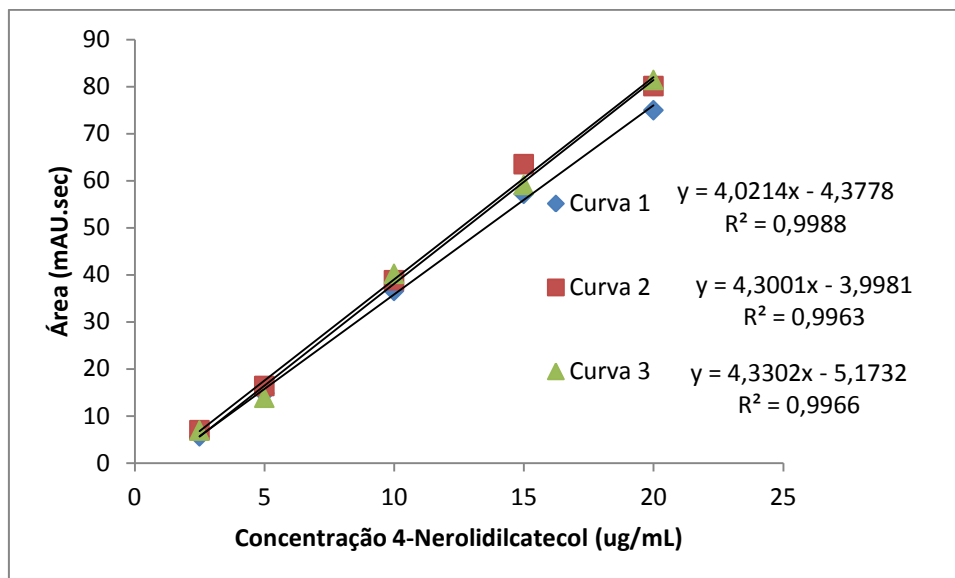


Figura 33: Curvas para determinação dos limites de detecção e quantificação do 4-nerolidilcatecol. Dados da Tabela 12. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ (150 mm x 4,6mm x 5µm), fase móvel: (A:B; 90:10, v/v): (A= metanol acidificado com 0,1% de ácido acético e B = mistura de água e acetonitrila acidificadas com 0,1% de ácido acético (90:10)), em modo isocrático, fluxo de 1,0 mL/min, 10µL de volume de injeção e λ=282nm.

5.4.5 Avaliação do parâmetro de Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos tais como: variação do pH de soluções e da fase móvel, temperatura, diferentes fabricantes de solventes, variação da composição e do fluxo da fase móvel e diferentes lotes ou fabricantes de colunas (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA 2003).

O parâmetro de robustez foi avaliado através de variação do comprimento de onda, fluxo e proporção de fase móvel. Conforme apresentado na Tabela 13, os DPR não foram maiores que 5% nos resultados de área, tempo de retenção, assimetria dos picos e NPT. Isto significa que o método é considerado robusto.

A Tabela 14 apresenta um resumo dos resultados obtidos para os parâmetros avaliados na validação da metodologia analítica.

Tabela 13: Parâmetros modificados para demonstrar robustez do método e valores de área; tempo de retenção; assimetria do pico e NPT após cada modificação.

Parâmetro	Especificação	Área Média (n=3)	DPR**	Média dos TRs (n=3)	DPR**	Média da Ass. (n=3)	DPR**	Média de NPT (n=3)	DPR**
Comprimento de onda	281nm	113,6	1,279	5,17	0,679	1,15	1,506	4856,17	3,021
	282nm	114,0	1,625	5,13	1,351	1,23	0,941	4890,84	4,34
	283nm	113,4	0,954	5,10	1,019	1,16	1,724	4818,04	3,357
Fluxo de fase móvel	0,8mL/min	157,4	0,587	6,40	0,361	1,12	1,546	5370,98	3,959
	1,0mL/min	110,2	1,297	5,23	0,689	1,14	0	4949,61	2,066
	1,2mL/min	90,90	0,855	4,34	1,056	1,13	1,77	4476,23	1,844
Proporção de fase móvel***	88:12:00	124,1	2,772	6,40	0,361	1,12	1,36	5517,17	4,063
	90:10:00	114,1	1,096	5,24	0,331	1,14	4,158	4863,10	3,296
	92:08:00	133,7	1,347	4,19	0,138	1,15	0	4568,47	0,384

DPR**= Desvio Padrão Relativo entre as injeções; TR= tempo de retenção do pico cromatográfico; NPT= Número de pratos teóricos do pico cromatográfico e Ass.= Assimetria do pico cromatográfico.

Tabela 14: Resultados dos parâmetros avaliados na validação da metodologia analítica.

Parâmetros	Resultados
Seletividade/especificidade	Não foi visualizada a presença de outros picos no mesmo tempo de retenção do ativo.
Linearidade	$r > 0,99$ (coeficiente de correlação)
Precisão	Repetibilidade (intra-corrída) , DPR < 5,0% Precisão intermediária (analistas A e B , dias diferentes), DPR < 5,0%
Limites	LQ=1,42µg/mL (calculado) LD=0,42µg/mL(calculado)
Robustez	Varição do comprimento de onda; Varição do fluxo; Varição da proporção de fase móvel. DPR < 5,0%

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar ($R\cdot$), o DPPH \cdot é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH \cdot consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH \cdot em 50% é denominada concentração eficiente (CE_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH \cdot por uma amostra menor será a sua CE_{50} e maior sua atividade antioxidante.

Os resultados da porcentagem de atividade antioxidante obtidas para diferentes concentrações de 4-NC isolado, 4-NC presente no percolado, vitamina E e percolado contendo EDTA estão apresentados na Tabela 15

A Figura 34 apresenta a curva de resposta da concentração efetiva da atividade antioxidante do percolado, do 4-NC isolado, da vitamina E e do percolado contendo EDTA.

Considerando as equações expressas na Tabela15, o valor correspondente a 50% é de 6,88µg/mL de 4-NC presente no percolado sendo um valor menor que o apresentado pela vitamina E (13,23 µg/mL) que foi utilizada como controle da reação. O valor do EC_{50} encontrado para o 4-NC

isolado e para o 4-NC presente no percolado é cerca de duas vezes mais potente que a vitamina E utilizada no estudo.

Desta forma, o 4-NC possui atividade antioxidante maior que o apresentado pela vitamina E.

Tabela 15: Resultados das leituras de absorvância e EC₅₀ obtidas do teste de atividade antioxidante.

Concentração (ug/mL)	%AA			
	4-NC	Vit.E	Percolado	Perc. EDTA
125	96,19	96,62	79,43	87,65
31,25	96,46	94,31	76,86	87,71
15,6	96,52	54,70	75,36	77,22
7,81	69,36	26,59	73,45	64,71
3,9	33,51	11,71	44,84	23,48
1,95	14,72	5,17	19,11	6,60
0,975	10,40	0,00	6,40	2,47
CE50 (ug/mL)	5,62	13,23	6,88	6,03
Equações	$y = 21,023\ln(x) + 13,671$	$y = 21,599\ln(x) - 5,7896$	$y = 16,175\ln(x) + 18,798$	$y = 15,623\ln(x) + 13,572$
	$R^2 = 0,8538$	$R^2 = 0,9022$	$R^2 = 0,7871$	$R^2 = 0,8073$

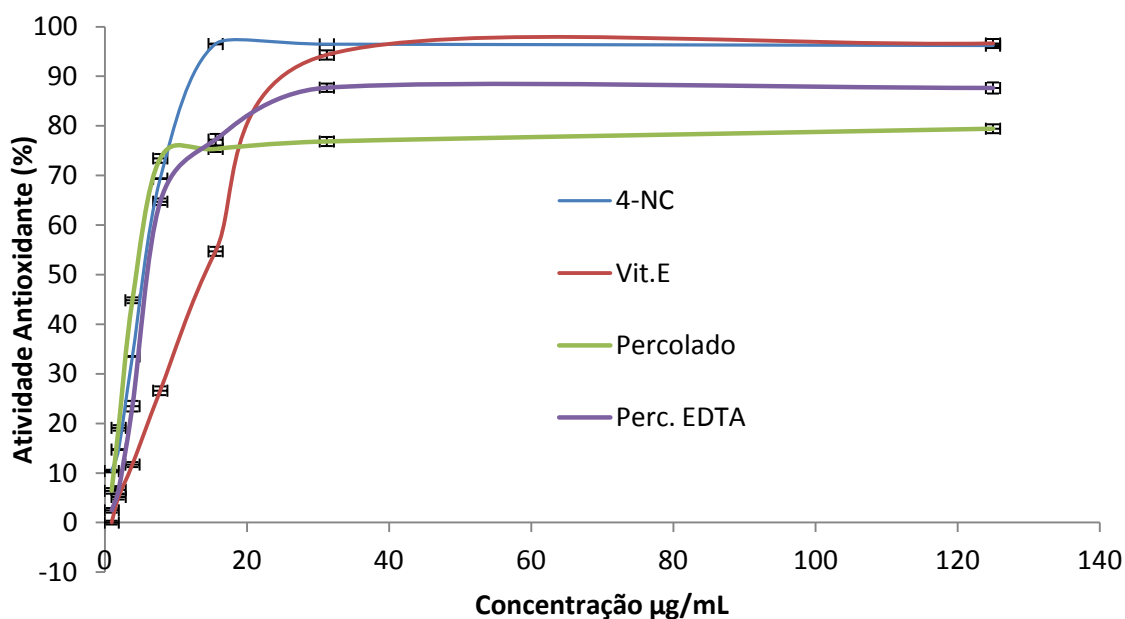


Figura 34: Curva para avaliação da concentração efetiva da atividade antioxidante do 4-NC, da vitamina E, do percolado e do percolado contendo EDTA.

Observa-se que a atividade antioxidante expressa pelo percolado contendo EDTA foi maior quando comparada com o percolado sem a presença do quelante. Isto pode ser justificado pelo fato do percolado ser um extrato

vegetal que contêm uma mistura de substâncias, as quais podem apresentar atividade oxidante. Tais componentes podem diminuir a ação do 4-NC. Com isso, o EDTA provavelmente pode ter reagido com estas substâncias oxidantes o que favoreceu o aumento da atividade antioxidante do 4-NC presente no percolado.

5. 6 OBTENÇÃO DOS PELLETS

Preparação do líquido de granulação: O líquido de granulação foi preparado utilizando-se o percolado (1000mL), dióxido de silício coloidal (SiO_2) (Aerosil 200[®] - 2,5g) e polissorbatos (Tween[®] 80 -7,5g).

O dióxido de silício coloidal (SiO_2) (Aerosil 200[®]) foi utilizado como agente antiaderente. Já o tensoativo (Tween[®] 80) foi adicionado no líquido de granulação para facilitar a solubilização do 4-NC.

Os excipientes foram adicionados ao percolado antes da rotaevaporação com intuito de minimizar as perdas residuais no balão, devido ao aspecto oleoso do percolado, quando em solução de baixo teor alcoólico.

Após a rotaevaporação, o líquido de granulação foi avaliado quanto a concentração de 4-NC através de cromatografia líquida de alta eficiência para verificar se havia degradação durante o processo de evaporação.

6,03mg/mL de 4-NC estavam presentes na solução de granulação o que comprova que não houve a degradação do ativo mesmo com o acréscimo de outros componentes que poderiam reagir ou inativar o 4-NC.

A concentração final de dióxido de silício coloidal e tensoativo no líquido de granulação após rotaevaporação foi de 1% e 3%, respectivamente.

A porcentagem de sólidos presentes no líquido de granulação avaliada por balança de infravermelho foi de $7,75 \pm 2,73\%$.

Obtenção da massa úmida: Os excipientes utilizados para a obtenção dos pellets foram: **celulose microcristalina PH101 (40%); alfa-lactose (8%) e Povidona (PVP- K30) (2%) e líquido de granulação (50%).**

A celulose microcristalina (CMC) foi escolhida uma vez que é amplamente utilizada na fabricação de pellets em decorrência da capacidade diluente e aglutinante.

Estudos têm sido propostos para explicar o uso da CMC durante a extrusão e esferonização. Segundo Dukic-Ott e colaboradores (2009), duas propostas tem sido feitas. A primeira refere-se ao fato de que a CMC funcione como uma “esponja” molecular. As partículas de CMC retêm água e durante a extrusão, a água no interior da estrutura atua como um lubrificante. Após a extrusão, o volume da “esponja” se expande e se apresenta seca e quebradiça com facilidade para quebrar durante a fase inicial da esferonização. A segunda teoria defende que a celulose funcione como um gel cristalino, ou seja, na presença de água na granulação e durante a extrusão, a CMC é quebrada em unidades menores formando um gel com partículas com tamanho coloidal. Esses cristais e as partículas formam uma rede ligante que imobilizam o líquido de granulação.

A adição da alfa-lactose (lactose mono-hidratada) foi necessária para que a massa atingisse a umidade adequada para o processo de extrusão. Segundo Santos e colaboradores (2002), a celulose microcristalina pode ser acompanhada por um polímero hidrófilo (por exemplo, a lactose) visando a melhoria da extrusão e esferonização uma vez que torna estes procedimentos menos sensíveis a alterações das variáveis de processo. Além disso, melhora o rendimento e a esfericidade dos *pellets*.

Por ser um polímero hidrofílico, a lactose facilitou a extrusão e esferonização garantindo desta forma a obtenção de pellets com distribuição de tamanho mais homogênea.

Povidona (PVP-K30) foi utilizada como agente desintegrante por possuir grande capacidade de hidratação e intumescimento.

A Figura 35 mostra o granulado obtido após mistura dos pós e adição do líquido de granulação.

A umidade do granulado determinada foi de 28% o que foi considerada adequada para a extrusão uma vez que não houve formação de pós e nem aglomeração total da massa durante o processo de esferonização. A umidade presente no produto intermediário foi responsável pela a plasticidade desse produto (Figura 36). Essa plasticidade conferiu maleabilidade suficiente para que esse produto fosse moldado em diferentes estágios (Figura 36) até a formação dos pellets (Figuras 37 e 38).

Para produção de pellets as concentrações de 40% de celulose microcristalina PH101; 8% de lactose e 2% de Povidona (PVP-K30[®]) apresentaram melhores características para o produto final com umidade de 28%. Quando utilizou-se 33% de CMC, 15% de lactose e 2% de Povidona a massa resultante apresentou umidade de 31%, o que ocasionou aglomeração dos pellets. Diferentemente, quando utilizou-se 43% de CMC, 5% de lactose e 2% de Povidona, a umidade obtida foi de 24% o que resultou em formação de pó durante o processo de esferonização.



Figura 35: Granulado obtido após mistura dos pós em bateadeira.

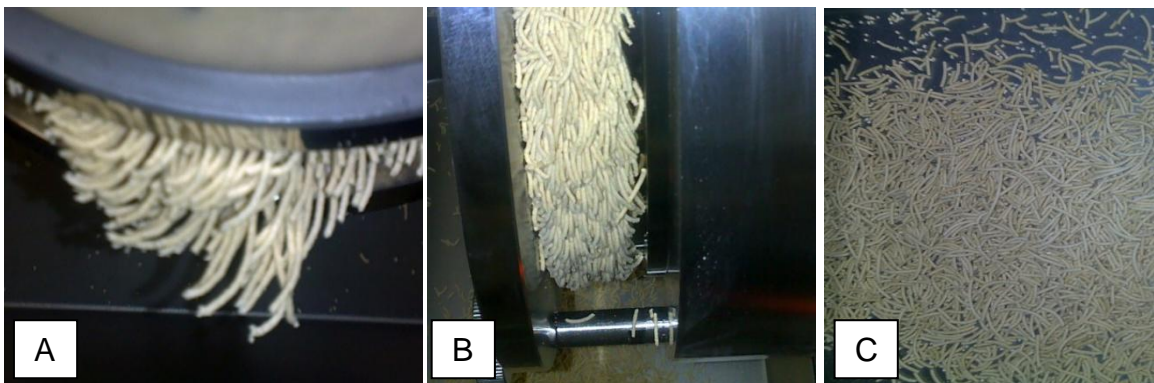


Figura 36: Produto Intermediário: (A) e (B) Extrudes na malha de extrusão; (C) Extrudes após a extrusão.

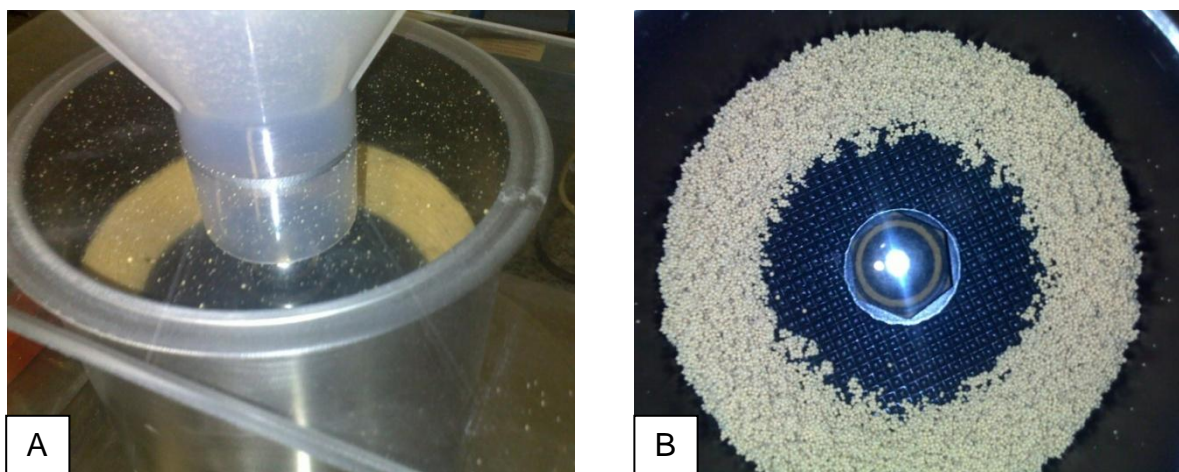


Figura 37: (A) Formação de pellets no esferonizador, (B) Pellets dentro do esferonizador, ao final do processo.

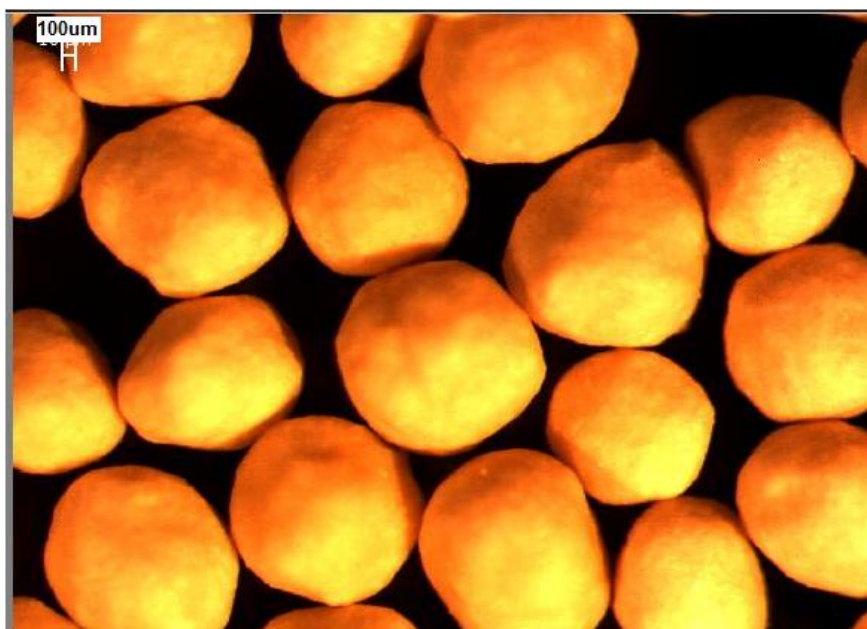


Figura 38: Pellets após processo de secagem, imagem obtida em estereomicroscópio (Leica[®] MZ6, com câmera Leica[®] EC3).

Revestimento dos pellets: Os pellets formados a partir do granulado foram revestidos. Os polímeros escolhidos para o revestimento foram: HPMC (Opadray[®]), Povidona (PVP-K30[®]) e copolímero constituído por álcool polivinílico e polietilenoglicol (Kollicoat IR[®]) uma vez que são usados em sistemas para liberação imediata.

As principais características comuns entre estes três polímeros sintéticos incluem: a hidrosolubilidade, a capacidade de formação de filmes flexíveis e facilidade de aplicação nas formas farmacêuticas (PORTER *et al.*, 2009).

O HPMC (Opadray[®]) é largamente utilizado como excipiente em formulações farmacêuticas orais e tópicas sendo usado também extensivamente em produtos cosméticos e alimentares.

Outro polímero escolhido para revestimento foi a Povidona (PVP – K30) a qual forma filmes duros, transparentes e sedosos. O PVP tem vários graus de viscosidade, dentre os quais o PVP K-30, K-90 e K-120. Neste trabalho, o PVP K-30 foi selecionado como polímero de revestimento.

Kollicoat[®] IR (copolímero constituído por álcool polivinílico e polietilenoglicol) é usado como agente formador de filme para formulações de liberação imediata.

A intenção do trabalho em produzir pellets de liberação imediata se deve ao fato do ativo 4-NC ser degradado em pH básico. Assim, o 4-NC deve ser liberado no estômago.

Dentre os três polímeros utilizados no revestimento dos pellets, o Kollicoat[®] IR foi o que melhor apresentou fotoproteção ao ativo de acordo com os resultados descritos nos itens 5.8.2 e 5.8.3.

Povidona e o HPMC são homopolímeros, já o Kollicoat[®] IR apresenta duas unidades monoméricas. Os homopolímeros apresentam filmes mais pegajosos, com maior viscosidade em relação ao Kollicoat que foi usado na mesma concentração.

As soluções de revestimento com baixa viscosidade formam filmes de melhor aderência. O Kollicoat comparado com os homopolímeros forma uma barreira mais eficiente de proteção contra a umidade e oxidação (PORTER *et al.*, 2009).

5.7 CARACTERIZAÇÃO DOS PELLETS

Distribuição do tamanho: O histograma apresentado na Figura 39 mostra a distribuição do tamanho dos pellets produzidos. A média de tamanho foi de 1000 μm .

Uma distribuição uniforme de tamanho é de fundamental importância para que não haja a segregação dos pellets e conseqüente variação na quantidade do princípio ativo e alteração na biodisponibilidade de uma unidade farmacêutica para outra.

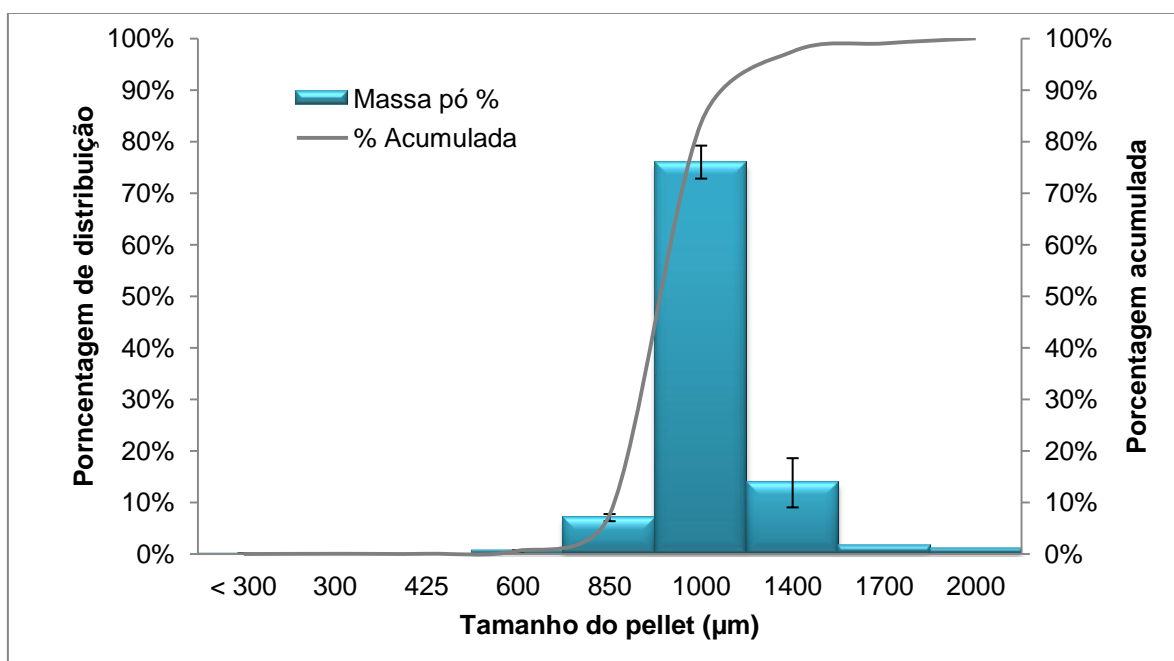


Figura 39: Distribuição do tamanho dos pellets.

Morfologia: A morfologia externa dos pellets foi avaliada através de esteromicroscópio Leica[®] MZ6 com câmera acoplada (Leica[®] EC3), Figura 38, e por Microscopia Eletrônica de Varredura em um Phenom/ FEI (Figura 40). A espessura do revestimento dos pellets feitos com Kollicoat[®] IR estão apresentadas na Figura 40, sendo Figura 40(A) espessura média de 19,3 μm ; Figura 40 (B): 36,2 μm e Figura 40(C) de 41,6 μm .

Friabilidade: Os pellets submetidos ao ensaio de friabilidade apresentaram porcentagem de pó perdido menor que 0,5% o que está dentro do valor aceitável pela Farmacopéia Brasileira (1988).

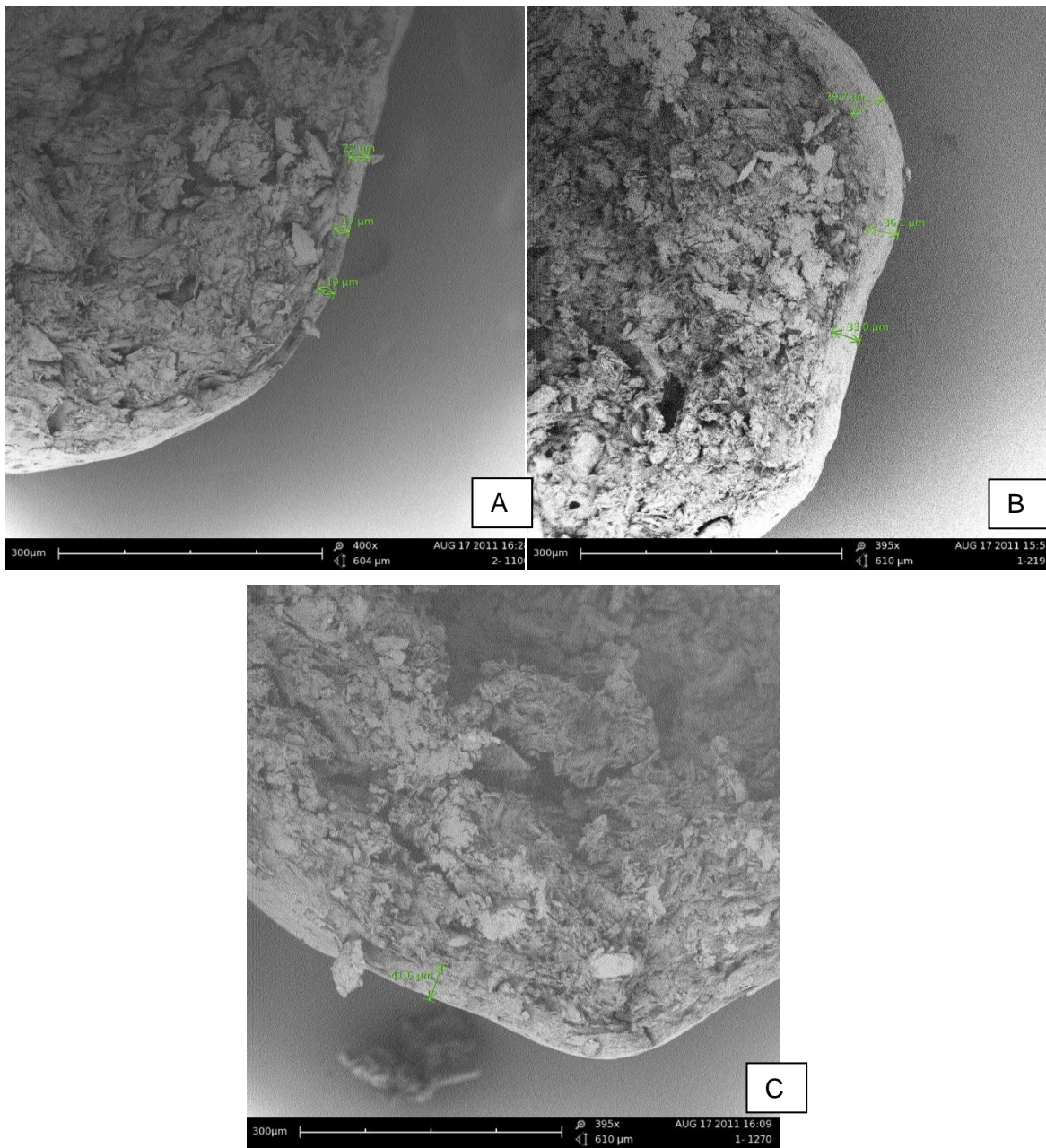


Figura 40: Fotomicrografias dos pellets obtidas por MEV: (A) Pellet revestido com Kollicoat[®] IR com ganho de peso de 3%; (B) Pellet revestido com Kollicoat[®] IR com ganho de peso de 6%; (C) Pellet revestido com Kollicoat[®] IR com ganho de peso de 9%.

5.8 ESTUDO ACELERADO DE FOTOESTABILIDADE

5.8.1 Fotoestabilidade do percolado

De acordo com a Figura 41, no estudo de fotoestabilidade, a solução padrão de 4-NC apresentou maior estabilidade quando comparada ao 4-NC presente no percolado diluído. Apesar do percolado apresentar coloração escura, o que poderia diminuir a incidência de radiação da luz durante o estudo oferecendo maior proteção ao ativo, isto não foi observado. Este fato pode ser explicado pela ocorrência de catálise de degradação do 4-NC por outros componentes presentes no extrato.

Essas substâncias podem diminuir a atividade antioxidante do 4-NC conforme apresentado no estudo de desenvolvido no item de atividade antioxidante.

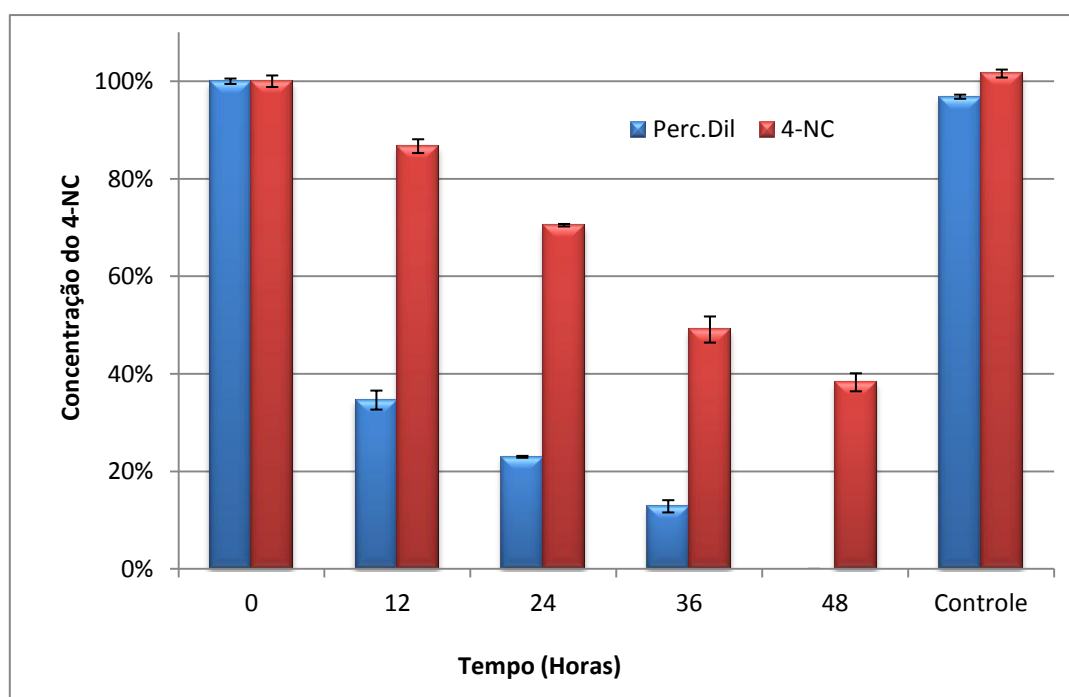


Figura 41: Resultados do estudo de fotoestabilidade do percolado diluído (1:1,v/v) e do 4-NC. O percolado final foi diluído com etanol (1:1, v/v). As amostras controle ficaram protegidas da luz, mas mantidas dentro da câmara de fotoestabilidade durante o tempo de exposição.

A Figura 42 apresenta a tendência de degradação do 4-NC presente nos pellets, no percolado e na solução padrão do ativo. Conforme observado, a cinética de degradação da solução padrão do 4-NC é linear quando plota-se

concentração versus o tempo de exposição, isto é um indicativo que a reação de degradação é de ordem zero. Ou seja, mesmo que ocorra aumento da concentração do reagente a velocidade permanece inalterada.

Em contrapartida, nas mesmas condições, a reação de degradação do 4-NC presente no percolado e nos pellets sem revestimento não é linear. Isto indica que a velocidade de degradação do ativo é dependente da concentração.

A degradação do 4-NC presente nos pellets não revestidos e no percolado foi mais acelerada quando comparada ao padrão.

No percolado, isto pode ser explicado por se tratar de uma solução líquida que continha outros componentes oxidantes oriundos da extração. Já em relação aos pellets sem revestimento, a degradação pode ser explicada considerando que a celulose microcristalina que atua como uma “esponja” molecular (DUKIC-OTT *et al.*, 2009) o que ao ser pressionada ao passar pela rede do extrusor ela acaba expondo o líquido de granulação. Com isso, a maior parte do 4-NC pode ficar exposta na superfície do pellet o que aumenta a fotodegradação do ativo.

Diante deste fato, verificou-se a necessidade de revestir os pellets para evitar a degradação do ativo.

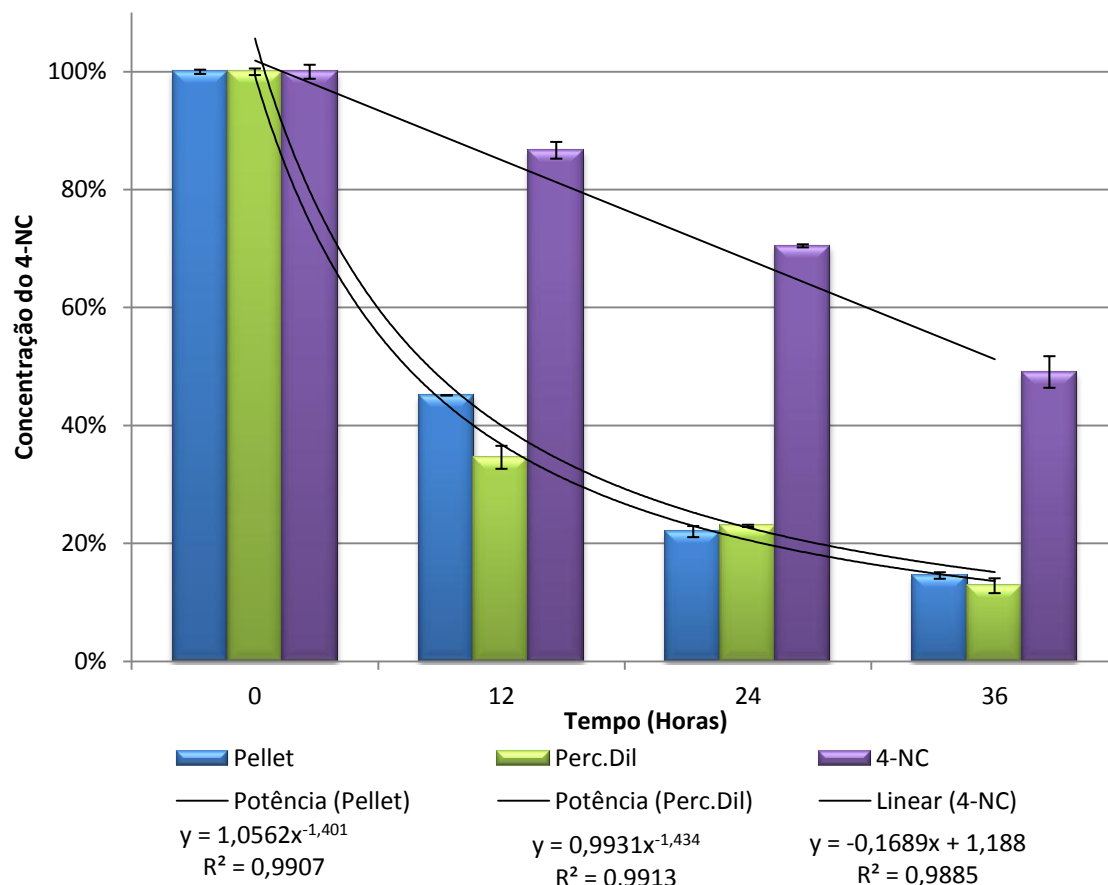


Figura 42: Tendência de degradação do 4-NC presente no pellet sem revestimento (Pellet CMC); no percolado diluído (Perc. Dil.) e do 4-NC padrão em solução etanólica.

5.8.2 Fotoestabilidade dos pellets sem revestimento e revestidos com HPMC, Povidona e Copolímero.

A Figura 43 apresenta os resultados do estudo de fotoestabilidade dos pellets sem revestimento (SR); pellets revestidos com HPMC (Opadray®); pellets revestidos com Povidona (PVP- K30) e pellets revestidos com o copolímero (Kollicoat®IR). Observou-se que o perfil da degradação do 4-NC presente nos pellets não revestidos e os revestidos com HPMC e revestidos com Povidona apresentou uma velocidade maior do que apresentada pelos pellets revestidos com o copolímero (Kollicoat®IR).

Mesmo adicionando-se opacificante (dióxido de titânio) nas soluções de revestimento com HPMC e Povidona, a degradação do ativo foi maior quando comparada com o copolímero (Kollicoat®IR). Estruturalmente, o HPMC e a Povidona são homopolímeros e o Kollicoat®IR é um copolímero. Segundo Porter e colaboradores (2009), os copolímeros apresentam melhor aderência à superfície dos pellets e menor pegajosidade quando comparados com os

homopolímeros.

Desta forma, o Kollicoat[®] foi o polímero escolhido para produção de novos revestimentos variando-se o ganho de peso dos pellets para novo teste de fotoestabilidade.

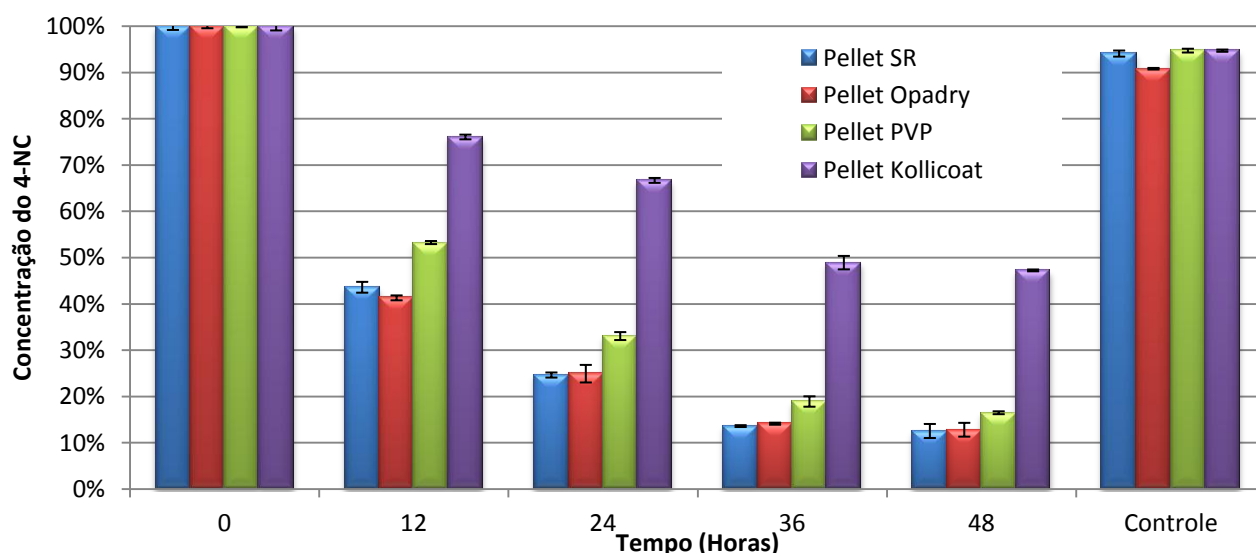


Figura 43: Resultados do estudo de fotoestabilidade dos pellets. Pellets sem revestimento (SR), pellets revestidos com HPMC (Opadry[®]), pellets revestidos com povidona (PVP-K30) e pellets revestidos com copolímero (Kollicoat[®]).

5.8.3 Fotoestabilidade dos pellets revestidos com copolímero (3%, 6% e 9% de ganho de peso)

Os resultados do estudo de fotoestabilidade dos pellets sem revestimento (SR) e pellets revestidos com o copolímero (Kollicoat[®] IR) tendo um ganho de peso de 3%, 6% e 9% estão apresentados na Figura 44.

Observa-se na Figura 44 que os pellets revestidos com o copolímero com 3% de ganho de peso apresentaram menor proteção contra a degradação do ativo devido a camada mais fina de revestimento em relação as formulações de 6% e 9% de ganho de peso.

Os pellets com ganho de peso de 6% apresentaram proteção cerca de 20% maior em relação aos pellets produzidos com o menor ganho de peso. Entretanto, os pellets com o maior ganho de peso ficaram apenas 3% mais protegidos comparados aos pellets com ganho de peso de 6% mesmo o primeiro tendo cerca de 30% a mais de revestimento.

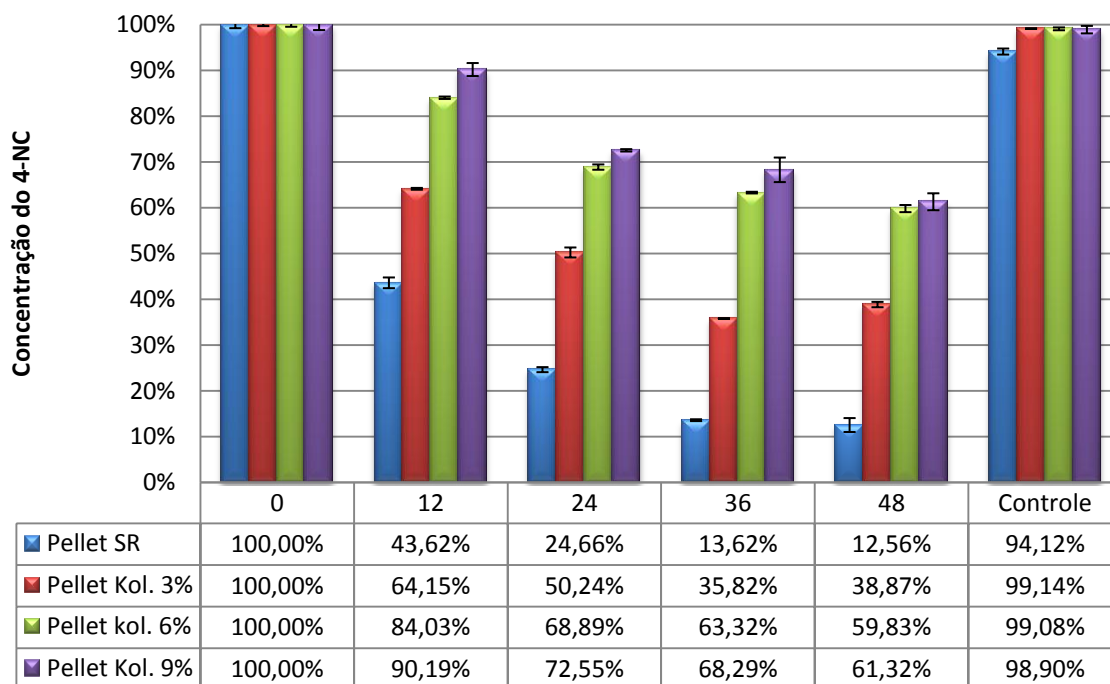


Figura 44: Resultados do estudo de fotoestabilidade dos pellets sem revestimento (SR); pellets revestidos com copolímero (Kollicoat®) 3%, 6% e 9% em ganho de peso.

A Figura 45 compara os perfis de degradação do ativo presente no percolado diluído (Perc. Dil.), nos pellets sem revestimento (Pellet SR), nos pellets revestidos com copolímero com ganho de peso de 9% e o padrão de 4-NC.

Os revestidos com copolímero protegeu cerca de 23% o 4-NC em relação à solução padrão do ativo após 48h e em relação ao percolado cerca de 60%.

Nos pellets sem revestimento o 4-NC ficou cerca de 25% menos protegido quando comparado com a solução padrão de 4-NC e cerca de 10% mais protegido quando comparado com o 4-NC presente no percolado ao final do tempo do experimento.

Na amostra do percolado, no tempo de 48 horas, não foi possível detectar o ativo.

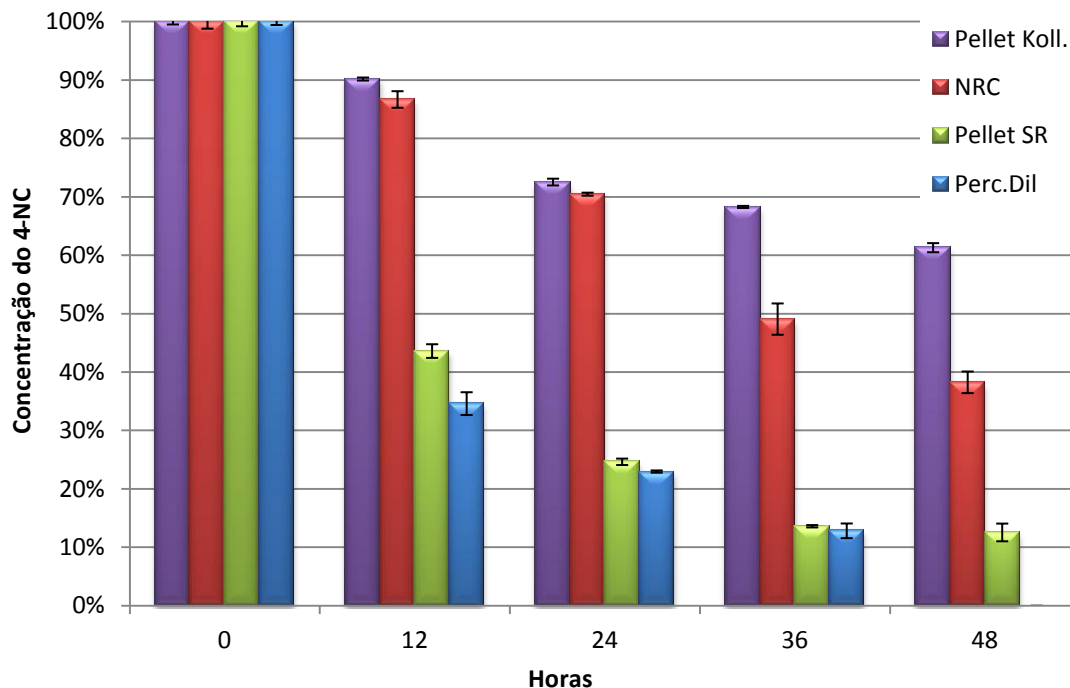


Figura 45: Resultados do estudo de fotoestabilidade do percolado diluído (Perc. Dil.) dos pellets sem revestimento (Pellet SR); do 4-NC e pellets revestidos com copolímero (Kollicoat®) 9% em ganho de peso.

A Figura 46 mostra que a velocidade de degradação do 4-NC presente no percolado em relação ao do 4-NC presente no pellet revestido com o copolímero com ganho de peso de 9% é maior. Conforme apresentado na figura, a tendência de degradação plotada entre a concentração versus o tempo no pellet revestido é linear o que indica que a degradação do 4-NC não depende da concentração do ativo. E o no percolado, como já foi anteriormente explanado, depende da concentração do ativo.

A constante de degradação do 4-NC no padrão é de - 0,1611 e do 4-NC presente no pellet revestido com o copolímero é de -0,0993. A peletização e o revestimento dos pellets contendo o percolado diminuíram em cerca de 60% a velocidade de degradação do ativo quando comparada com a solução do 4-NC isolado.

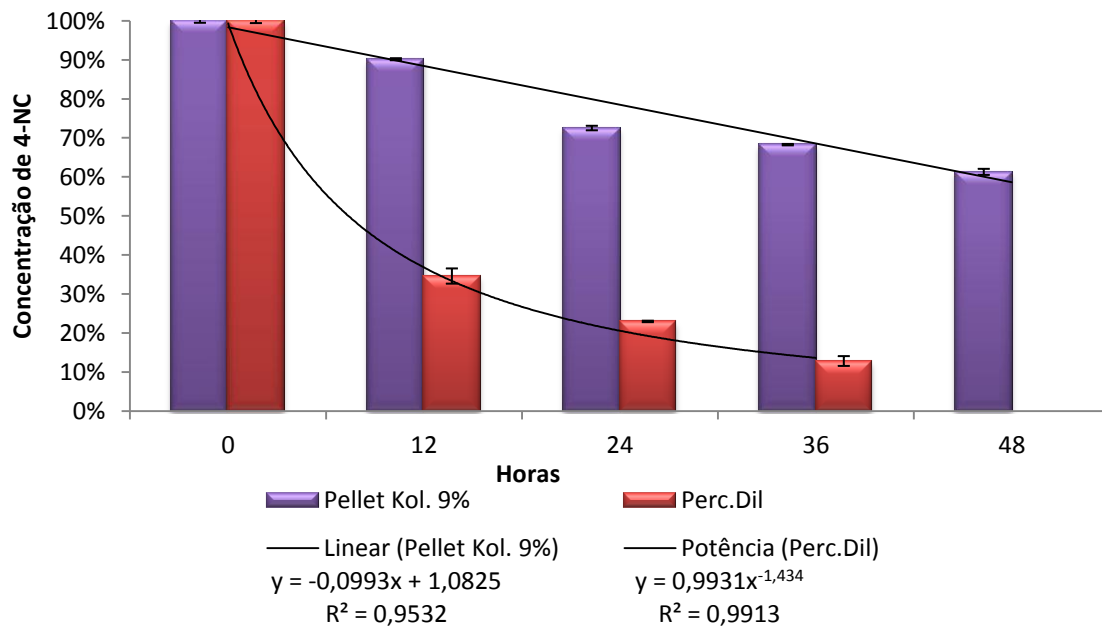


Figura 46: Tendência de degradação do 4-NC presente no pellet revestido (Pellet Kol. 9% em ganho de peso) e do 4-NC no percolado.

6. CONCLUSÕES

- A percolação foi o processo mais eficiente na extração do 4-NC.
- A produção dos pellets a partir da técnica de extrusão/esferonização foi satisfatória apresentando um produto de tamanho uniforme.
- O método analítico apresentou linearidade, precisão e robustez.
- No estudo de fotoestabilidade do 4-NC presente nos pellets revestidos, o copolímero utilizado no revestimento foi o que ofereceu maior proteção para o ativo 4-NC contra a fotodegradação.
- Considerando a inviabilidade de obtenção de formas farmacêuticas sólidas com o ativo puro, o uso do extrato contendo o 4-NC é considerado mais vantajoso uma vez que a tecnologia farmacêutica pode melhorar a estabilidade do ativo contra a degradação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M. M. G. B. **Desenvolvimento de novos comprimidos bucais de nistatina para tratamento de candidíase oral**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia, Programa de Pós Graduação de Ciências Farmacêuticas, Rio de Janeiro, 146p., 2007.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Ansel's pharmaceutical dosage forms and Drug Delivery Systems**. 8. ed. Williams e Wilkins, 738p., 2005.

ALVAREZ, L.; CONCHEIRO, A.; GÓMEZ-AMOZA, J. L.; SOUTO, C.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; Powdered cellulose as excipient for extrusion–spheronization pellets of a cohesive hydrophobic drug. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 55, p. 291–295, 2003.

AMORIM, C. Z. FLORES, C. A.; GOMES, B. E.; MARQUES, A. D.; CORDEIRO, R. S. B. Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. **Journal Ethnopharmacology**, Limerick v. 24, p. 101-116, 1988.

ANDRADE-NETO, V. F.; POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; SILVA, E. C. C.; NOGUEIRA, K. L.; MELO, M. R. S.; HENRIQUE, M. C.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, L. F. R.; COSTA, M. R. F.; NUNOMURA, R. C. S.; NUNOMURA, S. M.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. G. C.; CHAVES, F. C. M.; VIEIRA, P. P. R. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102(3), p. 359-365, 2007.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Publica o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DOU de 02/06/2003.

ARAÚJO, A. A. S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; SÍLVIA STORPIRTIS, S.; MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências**, São Paulo, v. 42, n. 2, 2006.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**, 2.ed. Porto Alegre: Atmed, 677p., 2005.

BANDO, H.; MCGINITY, J. W. Relationship between drug dissolution and leaching of plasticizer for pellets coated with an aqueous Eudragit® S100:L100 dispersion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, p. 11–17, 2006.

BALUNAS, M. J., KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Science**, Oxford, v. 78, p. 431–441, 2005.

BARROS, L. F. M.; BARROS, P. S. M.; RÖPKE, C. D.; SILVA, V. V.; SAWADA, T. C. H.; BARROS, S. B. M.; BELFORT, R. JR. Dose-dependent *in vitro* inhibition of rabbit corneal matrix metalloproteinases by an extract of *Pothomorphe umbellata* after alkali injury. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 40, p. 1129-1132, 2007.

BARROS, S.; ROPKE, C. D.; SAWADA, T. C. H.; SILVA, V. V.; PEREIRA, S. M. M. BARROS, S. B. M. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (Pariparoba). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 53-61, jan./mar., 2005.

BARROS, S. B. M.; TEIXEIRA, D. S.; AZNAR, A. E.; MOREIRA JR, J. A.; ISHII, I.; FREITAS, P. C. D. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* L. Miq. (Pariparoba). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 48, p. 114-116, 1996.

BÉCHARD, S.R.; LEROUX, J.C. Coated pelletized dosage form: effect of compaction on drug release. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 18, p. 1927-1944, 1992.

BÉRGAMO, D. C. B. **Avaliação química dos compostos não voláteis e voláteis e estudo biossintético do 4-nerolidilcotecol em *Pothomorphe umbellata***. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 146p., 2003.

BERNARDES, L. J. L. A Granulação de Materiais. **Cerâmica Industrial**, v. 11 (3), p. 17-22, 2006

BHATTACHARYYA, B.; JOHRI, B. M. **Flowering plants: Taxonomy and Phylogeny**. Berlin: Springer Verlag, p. 175-177, 1998.

BIANCHINI, R.; VECCHIO, C., Oral controlled release optimization of pellets prepared by extrusion-spheronization processing, **II Farmaco**, Pavia, v. 44, p. 645-654, 1989.

BIOKA, D. ; ABENA, A. Psychopharmacological profile of *Piper umbellatum* aqueous extract. **L'Encephale**, Paris, v.16, p. 205-208, 1990.

BORGES, D. B. Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.15, n.3, p.229-236, jul/set. 2005.

BOSCOLO. O. H., MENDONÇA-FILHO, R.F.W., MENEZES, F.S.; SENNA-VALLE, L. Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 1, p. 8-12, 2007.

BROHEM, C. A.; SAWADA, T. C. H.; MASSARO, R. R.; ALMEIDA, R. L.; RIVELLI, D. P.; ROPKE, C. D.; SILVA, V. V.; LIMA, T. M.; CURI, R.; BARROS, S. B. M.; MARIA-ENGLER, S. S. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. **Toxicology in Vitro**, New York, v. 23, p. 111–119, 2009.

BURDOCK, G. A. Safety assessment of hydroxypropyl methylcellulose as a food ingredient. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n.12, p. 2341-2351, 2007.

BURKE, B.; NAIR, M. Phenylpropene, benzoic acid and flavonoid derivatives from fruits of Jamaican Piper species. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, p. 1427-1430, 1986.

CALLE- ALVAREZ, J. Contribucion al estudio de algunas espécies de la familia *Piperaceae*. **Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.**, Bogotá, v.4, p.47-57, 1983.

CARDOSO, F. F. S. S. **Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica, em CLAE-PDA, para avaliação da estabilidade do 4-nerolidilcatecol na presença de seus produtos de degradação**. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, 101p., 2008.

ÇELIK, M., OKUTGEN, E., A feasibility study for the developemnt of a propective compaction functionality test and the establishment of a compaction data base. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v.19, p. 2309-2334, 1993.

COIMBRA, R. **Notas de Fitoterapia**, 2. ed. Ed. Silva Araújo, Rio de Janeiro, p. 292-93, 1958.

CONINE, J. W.; HADLEY, H. R. Preparation of small solid pharmaceutical spheres. **Drug Cosmet Ind**, v.106, p.38–41, 1970.

COUTO; R. O.; VALGAS, A. B.; BARA; M. T. F.; PAULA, J. R. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* Dc.(Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. VI (3), p. 59 - 69, 2009. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF>,. Acesso em: jun. 2011.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, p. 17-23, 80-89, 1981.

DASHEVSKY, A.; KOLTER, K.; BODMEIER, R. pH-independent release of a basic drug from pellets coated with the extended release polymer dispersion Kollicoat® SR 30 D and the enteric polymer dispersion Kollicoat® MAE 30 DP. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 45–49, 2004a.

DASHEVSKY, A.; KOLTER, K.; BODMEIER, R. Compression of pellets coated with various aqueous polymer dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 279, p.19–26, 2004b.

DESMARCHELIER, C.; MONGELLI, E.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Inhibition of lipid peroxidation and iron (II)-dependent DNA damage by extracts of *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.30, p. 85-91, 1997a.

DESMARCHELIER, C.; BARROS, S.; REPETTO, M.; LATORRE, L. R.; KATO, M.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe* spp. scavenges peroxy radicals and inhibits Fe(II)- dependent DNA damage. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 63, p.561- 563, 1997b.

DESMARCHELIER, C.; SLOWING, K.; CICCIA, G. Anti-inflammatory activity of *Pothomorphe peltata* leaf methanol extract. **Fitoterapia**, Milano, v.71, p.556-558, 2000.

DHANASEKHARAN, K.; MOHAN, L. S.; SHARMA, S. Detailed flow modeling of fluid bed processes in the pharmaceutical industry. In: The 2006 **Annual Meeting, Particle Technology Forum**. San Francisco, CA, 2006.

DINIZ, A. C. B.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta botânica brasílica**, São Paulo, v. 21(2), p. 443-450. 2007.

DI STASI, L.; HIRUMA, C.; GUIMARÃES, E.; SANTOS, C. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, Milano, v.65, p.529-540, 1994.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. Revista e ampliada. 2. ed., São Paulo: Editora UNESP, 2002.

DOMIS, M.; OYEN, L. P. A. *Piper umbellatum* L., Protabase Record display. disponível em: <http://database.prota.org/search.htm>. Acesso: dez. 2010.

DREU, R.; SIRCA, J.; PINTYE-HODI, K.; BURJAN, T.; PLANINSEK, O.; SRCIC, S. Physicochemical properties of granulating liquids and their influence on microcrystalline cellulose pellets obtained by extrusion-spheronisation technology. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 291, p. 99-111, 2005.

DUKIC-OTT, A.; DE BEER, T.; REMON, J. P.; BAEYENS, W.; FOREMAN, P.; VERVAET, C. In-vitro and in-vivo evaluation of enteric-coated starch-based pellets prepared via extrusion/spheronisation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v.70, p. 302–312, 2008.

DUKIC-OTT, A.; THOMMES, M.; REMON, J. P.; KLEINEBUDDE, P.; VERVAET, C. Production of pellets via extrusion–spheronisation without the incorporation of microcrystalline cellulose: A critical review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 71, p. 38–46, 2009.

DUKIC-OTT, A.; REMON, J. P.; FOREMAN, P.; VERVAET, C. Immediate release of poorly soluble drugs from starch-based pellets prepared via extrusion/spheronisation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v.67, p.715–724, 2007.

EERIKAINEN, S.; LINDQVIST, A.S., The behaviour of various fillers in spheronized uncoated and film-coated granules containing slightly water-soluble indomethacin. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.75, p. 181-192, 1991.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica, cap. 10, p. 232-234. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, UFRGS Editora, 5. ed., 1102p., 2004.

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 1. ed., 1929, 649 p.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. Parte 1. São Paulo: Atheneu Editora LTDA, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. Fascículo II. São Paulo: Atheneu Editora LTDA, 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. - São Paulo; Atheneu Editora LTDA, 2001.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA. 7. ed., Lisboa, Infarmed, 2005.

FASCINELI, M. L.; GONZALEZ, F. G.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C. Estudo das atividades analgésica e antiulcerogênica de *Pothomorphe umbellata* (L) Miq.. **Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, Ribeirão Preto, v.4, 1999.

FONSECA, E. T. Plantas Mediciniais Brasileiras. **Revista da Flora Medicinal**, Rio de Janeiro, v. 6 (1), p. 37-40, 1939.

FREISE, F. W. **Plantas medicinais brasileiras**. Secretaria da Agricultura Indústria e Comércio do Estado de São Paulo. *Biol. Agric.*, v. 34, 428p., 1933.

FREITAS, P. C.D. **Atividade antioxidante de espécies medicinais da família Piperacea: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. E *Piper regnellii* (Miq.) C. DC.** Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 134p., 1999.

GHEBRE-SELLASSIE, I., Pellets: A general overview. **Pharmaceutical Pelletization Technology**, Dekker, New York, p. 1-13, 1989.

GHEBRE-SELLASSIE I, KNOCH A. Pelletization techniques. In: SWARBRICK J, BOYLAN J.C, editors. **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. 2nd ed. v. 3. New York: Marcel Dekker; p. 2067–80, 2002.

GIBBS, R. D. **Chemotaxonomy of flowering plants**. v. III, Quebec: McGill Queen's University Press, . p. 1532-1537,1974.

GÓMEZ-CARRACEDO, A.; ALVAREZ-LORENZO, C.;COCA, R.; MARTÍNEZ-PACHECO,R.; CONCHEIRO, A.;GÓMEZ-AMOZA, J. L. Fractal analysis of SEM images and mercury intrusion porosimetry data for the microstructural characterization of microcrystalline cellulose-based pellets. **Acta Materialia**, Oxford, v. 57, p. 295–303, 2009.

GÓMEZ-CARRACEDO, A.; SOUTO, C.; MARTÍNEZ-PACHECO,R.; CONCHEIRO, A.; GOMEZ-AMOZA, J. L. Incidence of drying on microstructure and drug release profiles from tablets of MCC–lactose–Carbopol[®] and MCC–dicalcium phosphate–Carbopol[®] pellets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v.69, 675–685, 2008.

GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clinical & Translational Oncology**, Barcelona, v.9, p. 767–776, 2007.

GREIG, N. Introduction. In: DRYER, L. A.; PALMER, A. D. N., orgs. **Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p.1-4, 2004.

GUO, M., KALRA, G.; WILSON, W.; PENG, Y.; AUGSBURGER, L. L. A prototype intelligent hybrid system for hard gelatin capsule formulation development. **Pharmaceutical Technology**, p. 44-60, *set.* 2002.

GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA, J. H.; McMAHON, J. B.; PANNELL, L. K.; CRAGG, G.M.; BOYD, M.R. The peltatols, novel T-ITV-inhibitory catechol derivatives from *Pothomorphe peltata*. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 57, p. 2809-2811, 1992.

HARRISON, P.J.; NEWTON, J.M.; ROWE, R.C. The application of capillary rheometry to the extrusion of wet masses. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.35, p.235–242, 1987.

HANDBOOK of Pharmaceutical Excipients, 5ed. Washington: American Pharmaceutical Society of Great Britain. Eletronic version, 2006.

HICKS, D. C.; FREESE, H.L. Extrusion and spheronizing equipment. **Pharmaceutical Pelletization Technology**, Marcel Dekker Inc., New York and Basel, p. 71-100, 1989.

HOWARD, M. A.; NEAU, S. H.; SACK, M. J. PEO and MPEG in high drug load extruded and spheronized beads that are devoid of MCC. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 307, p. 66–76, 2006.

IOSIO, T.; VOINOVICH, D.; GRASSI, M.; PINTO, J. F.; PERISSUTTI, B.; ZACCHIGNA, M.; QUINTAVALLE, U.; SERDOZ, F. Bi-layered self-emulsifying pellets prepared by co-extrusion and spheronization: Influence of formulation variables and preliminary study on the in vivo absorption. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 69, p. 686–697, 2008.

ISOBE, T., OHSAKI, A., NAGATA, K. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of brazilian medicinal plant, Pariparoba. *Yakugaku Zasshi*, v.122, p. 291–294, 2002.

JALAL, I.M., MALINOWSKI, H.J. AND SMITH, W.E., Tablet granulations composed of spherical-shaped particles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 61, p. 1466-1468, 1972.

JONAT, S. **The mechanism of hydrophilic colloidal silicon dioxide types as glidants**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Química e Farmácia – Univesity of Tubingen, 165p., 2005.

JONES, D. Air suspension coating for multiparticulates. **Drug development and industrial Pharmacy**, v. 20, p. 3175-3206, 1994.

KANBE, H.; HAYASHI, T.; ONUKI, Y.; SONOBE, T. Manufacture of fine spherical granules by an extrusion/spheronization method. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 337, p. 56–62, 2007.

KIJJOA, A.; GIESBRECHT, A. M.; AKISUE, M. K.; GOTTLIEB, O. R.; GOTTLIEB, H. E. 4 –nerolydiccatechol from *Pothomorphe umbellata*. **Planta Medica**, Stuttgart, v.39, p.85-87, 1980.

LANTZ, R.J., MANFORD, J. **Method for preparing sustained release pellets and products thereof**. US Patent nº3146167, 25 agosto 1964.

LE CONTE, P. **A Amazônia Brasileira III – Árvores e plantas úteis**. Belém, Clássica, p. 69-70, 1934.

LE HIR, A. **Noções de farmácia galênica**. 6. ed. São Paulo: Organização Andrei. 444p.,1997.

LIMA NETO, S. A.; PETROVICH, P. R. A celulose na farmácia. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 13, n.1, p. 19-23, 1997.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**. London: Heyden, 374p., 1989.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n.2, p. 143-154, 2005.

MALINOWSKI, H.J. SMITH, W.E., Effects of spheronization process variables on selected tablet properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 63, p. 285-288, 1974.

MARTIN, A.N. **Physical Pharmacy**. 4th ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 622p., 1993.

MATTANA, R. S. **Produção de biomassa foliar, óleo essencial e 4- nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.** Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Botucatu, São Paulo, 138p., 2009.

MEHTA, A.M., Evaluation and characterization of *pellets*. In: GHEBRE-SELLASSIE, I. **Pharmaceutical Pelletization Technology**. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, p.241-266, 1989.

MEHTA, K. A.; REKHI, G. S.; PARIKH, D. M. Extrusion/spheronization as granulation technique. In: **Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology**, Taylor & Francis, 2th edition, Chapter 11, p. 333-364, 2005.

MILLILI, G.P.; SCHWARTZ, J.B. The strength of microcrystalline cellulose pellets: the effect of granulating with water/ethanol mixtures. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 16, p.1411-1426, 1990.

MONGELLI, E.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Investigation of the larvicidal activity of *Pothomorphe peltata* and isolation of the active constituent. **Phytotherapy Research**, London, v. 16, suppl. 1, p. S71-S72, 2002.

MONGELLI, E.; DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Actividad antimicrobiana e interacción com ei ADN de plantas medicinales de la Amazonia Peruana. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v.27, p.199-203, 1995.

MONGELLI, E.; ROMANO, A.; DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Cytotoxic 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe peltata* inhibits topoisomerase I activity. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 65, n. 4, 376-78, 1999.

MORAES, M. S. Considerações sobre a Pariparoba oficial *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 1 (1), p. 101-108, 1986.

MORAES, M. S.; AKISSUE, M. K.; OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G. Caracterização cromatográfica da droga e do extrato fluido de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, São Paulo, v.24, n.1-2, p.1-9, 1984.

MURRAY, T.; ROUGH, S. L.; WILSON, D. I. The effect of drying technique on tablets formed from extrusion-spheronization Granules. **Chemical Engineering Research and Design**, v.85 (A7), p. 996–1004, 2007.

NAKAHARA, US Patent 3277520, October 1966.

NERURKAR, J.*et al.* Controlled-release matrix tablets of ibuprofen using cellulose ethers and carrageenans: effect of formulation factors on dissolution rates. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 61, p. 56-68, 2005.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of natural products**, Cincinnati, v. 66, p. 1022–1037, 2003.

NORIEGA, P.; ROPKE, C. D.; CONSIGLIERI, V. O.; TAQUEDA, M. E. S.; TAVARES, L. C.; WASICKY, A.; BACCHI, E. M.; BARROS, S. B. M. Optimization of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel topical formulations using experimental design. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 353, p. 149–159, 2008.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Análise de Drogas In: **Farmacognosia**, São Paulo; ed Atheneu, p. 23-42, 1991.

OLIVEIRA, W. P. **Recobrimento de partículas em leite de jorro**. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 97p., 1992.

OLSEN, K. W. Fluid bed equipment. In: SELASSIE, I. G. **Pharmaceutical pelletization technology**. New York: Marcel Dekker, chap. 3, p. 39-70, 1989.

OTERO, R.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; NÚÑEZ, V.; EVANS, N.; ALZATE, S. P.; GARCÍA, M. E.; SALDARRIAGA, M.; DEL VALLE, G.; OSORIO, R. G. et al.. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part I: Traditional use of plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 71, n.3, p.493-504, 2000.

PAKER-LEGGIS, S.; NEAU, S. H. Propranolol forms affect properties of Carbopol-containing extruded-spheronized beads. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 361, p.169–176, 2008.

PANIZZA, S. **Plantas que curam: cheiro de mato**. 15.ed. São Paulo: Ibrasa, p. 159-160, 1997.

PARIKH, D. M.; MOGAVERO, M. Batch Fluid Bed Granulation. In: **Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology**, Taylor & Francis, 2th edition, Chap. 9, p. 246-309, 2005.

PECKOLT, W. Contribuição à matéria médica vegetal do Brasil. Estudo farmacognóstico de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth.: *Piperaceae*. **Memórias do Instituto Butantan**, p. 59-70, 1929.

PERAZZO, F. F.; SOUZA, G. H. B.; LOPES, W.; CARDOSO, L. G. V.; CARVALHO, J. C. T.; NANAYAKKARA, N. P. D.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (*Piperaceae*) aerial parts. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 99, p. 215–220, 2005.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007

PILLA, C.M.P. **Implementação de metodologias para avaliação da inibição de crescimento de espécies de cândida através de plantas medicinais**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Ribeirão Preto, São Paulo, 2005.

PINHEIRO, L. C.; SINGULANI, J. L.; CAMPOS, J. M. S.; REIS, A. C.; GOMES, S.S. L; MAINENTI, J. L. L.; EVANGELISTA, N. A. M.; MOUTINHO, A. D.; AMARAL, D. L. A. S. , EL AOUAR-FILHO, R. A.; VICCINI, L. F. Interferência de metabólitos secundários sobre as estimativas de quantidade de DNA por citometria de fluxo – Um modelo de estudo no gênero *lippia* (*Verbenaceae*). **55º Congresso Brasileiro de Genética**, Setembro/2009.

PINTO, A. C. S.; SILVA, L. F. R.; CAVALCANTI, B. C.; MELO, M. R. S.; CHAVES, F. C. M.; LOTUFO, L. V. C.; MORAES, M. O.; ANDRADE-NETO, V. F.; TADEI, W. P.; PESSOA, C. O.; VIEIRA, P. P. R. POHLIT, A. M. New antimalarial and cytotoxic 4-nerolidylcatechol derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 44, p. 2731–2735, 2009.

PODCZECK, F.; ALESSI, P.; NEWTON, J. M. The preparation of pellets containing non-ionic surfactants by extrusion/spheronization. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 36, p. 33–40, 2008.

PODCZECK, F.; KNIGHT, P. E.; NEWTON, J. M. The evaluation of modified microcrystalline cellulose for the preparation of pellets with high drug loading by extrusion/spheronization. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 350, p.145–154, 2008.

PODCZECK, F.; MAGHETTI, A.; NEWTON, J. M. The influence of non-ionic surfactants on the rheological properties of drug/microcrystalline cellulose/water mixtures and their use in the preparation and drug release performance of pellets

prepared by extrusion/spheronization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.37(3-4), p.334-340, 2009.

PODCZECK, F.; RAHMAN, S.R.; NEWTON, J.M. Evaluation of a standardised procedure to assess the shape of *pellets* using image analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.192, p.123-138, 1999.

PORTER, S.; SACKETT, G.; LIU, L. Development, optimization, and scale-up of process parameters: pan coating. In: **Developing Solid Oral Forms: Pharmaceutical Theory and Practice**, Ed. Elsevier Inc, cap. 33, p. 761-804, 2009.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica Farmacêutica e farmácia galênica**. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.

RAVAGNANI, G. **Desenvolvimento e avaliação de um sistema de suspensão em ar para o revestimento de pós**. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 99p., 2003.

REYNOLDS, A.D. A new technique for the production of spherical particles. **Manufacturing Chemist and Aerosol News**, London, v.41, p.40–43, 1970.

REZENDE, K. R., BARROS, S. B. M. Quantification of 4-nerolydylcatecol of *Pothomorphe umbellata* (*Piperaceae*) in rat plasma samples by CLAE UV. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, p. 373–380, 2004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, nº5, p. 771-780, 2004.

RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, Pergamon, v. 20, p. 933–956, 1996.

RIEDEL, O. O.; Subsídios para o estudo farmacognóstico da *Heckeria umbellata* (L.) Kunth. **Trib. Farmac.**, Curitiba, v. 9, 0. 269-283, 1941.

ROPKE, C. D.; MEIRELLES, R. R.; SILVA, V. V.; SAWADA, T. C. H.; BARROS, S. B. M. *Pothomorphe umbellata* Extract Prevents α -Tocopherol Depletion After UV-irradiation. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 78(5), p. 436–439, 2003.

ROPKE, C. D., OSTROSKY, E. A., KANEKO, T. M., CAMILO, C. M., SAWADA, T. C. H., BARROS, S. B. M. Validação de metodologias analíticas para determinação quantitativa de α -tocoferol e 4-nerolidilcatecol. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.39, p. 209–217, 2003b.

ROPKE, C.D; DA SILVA, V. V.; KERA, C. Z.; MIRANDA, D. V.; DE ALMEIDA, R.L; SAWADA, T.C.; BARROS, S.B. *In vitro* and *in vivo* inhibition of skin matrix metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* root extract. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v.82, n.2, p.439-42, 2006.

RORIG, L.R.; VON POSER, G. L. Investigação fitoquímica em espécies de *Piperaceae*. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 72, p. 15-17, 1997.

ROWE, R.C. Spheronisation: a novel pill-making process? **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.6, p.119-123, 1985.

SACOMAN, J. L.; MONTEIRO, K. M.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA, G. M.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirao Preto, v. 41, p. 411-415, 2008.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHTON, T. J. The use of mucoadhesive polymers in bucal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 57, n. 11, p. 166-1691, 2005.

SANDBERG, A., RAGNARSSON, G., JONSSON, U.E. AND SJOGREN, J., Design of a new multiple-unit controlled-release formulation of metoprolol - Metoprolol CR. **European journal of clinical pharmacology**, Berlin, v. 33, p. S3-S7, 1988.

SANTOS, H. M. M.; VEIGA, F. J. B.; PINA, M. E. T.; SOUSA, J. J. M. S. Obtenção de *pellets* por extrusão e esferonização farmacêutica. Parte I. Avaliação das variáveis tecnológicas e de formulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 4, p.455-470, 2004.

SANTOS, H. M. M.; VEIGA, F. J. B.; PINA, E. M. S. T.; SOUSA, J. J. M. S. Obtenção de *pellets* por extrusão e esferonização farmacêutica. Parte II. Avaliação das características física de *pellets*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 3, p.309-318, 2006.

SANTOS, H.; VEIGA, F.; PINA, M.; PODCZECK, F.; SOUSA, J. Physical properties of chitosan pellets produced by extrusion- spheronisation: influence of formulation variables. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 246, p.153-169, 2002.

SCHILCHEER, H. Phytopharmaka: Qualitätssicherung und-kontrolle, neue Verfahren und Zuberitungen. In: MÜLLER, R. H.; HILDEBRAND, G. E. (Hrsg.) **Pharmazeutische Technologie: modern Arzneiformen**, Stuttgart: Wissenschaftliche, 1997.

SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The Chemistry of Piper species: a review. **Fitoterapia**, Milano, v. 58, p. 147-166, 1987.

SHARGEL, L.; YU, A. B. C. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. 4 ed., Appleton & Lange, 768p., 1999.

SILVA, M. W. **Estudo do recobrimento de celulose microcristalina em leite fluidizado pulsado rotativo.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas, 100p., 2006.

SILVA, R. A. D. *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil.* São Paulo: Ed. Nacional, p.444, 649 e 946, 1929.

SILVA, R. A. D. *Pharmacopoeia dos Estados Unidos do Brasil.* Ed. Nacional, São Paulo, 1926.

SILVA, V. V.; ROPKE, C. D.; ALMEIDA, R. L.; MIRANDA, D. V.; KERA, C. Z.; RIVELLI, D. P.; SAWADA, T. C. H. ; BARROS, S. B. M. Chemical stability and SPF determination of *Pothomorphe umbellata* extract gel and photostability of 4-nerolidylcatechol. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 303, p. 125–131, 2005.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 57, n. 11, p. 1556-1568, 2005.

SOARES, L. A. L.; PETROVICH, P. R. Física da compressão. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 15, n.2, p. 65-79, 1999.

SOERJATO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **Journal of ethnopharmacology**, Limerick, v. 51, p. 1-15, 1996.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. Cap. 13, p. 313-318. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, UFRGS Editora, 5ed., 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática:** guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II, Nova Odessa, Instituto Plantarum, 640p., 2005.

SPONCHIADO JÚNIOR, E. C. **Atividade antibacteriana contra o *Enterococcus faecalis* de uma medicação intracanal contendo ativos fitoterápicos de *Pothomorphe umbellata*.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Biotecnologia, área da saúde. 136 p. 2006.

SRIAMORNSAK, P.; NUNTHANID, J.; LUANGTANA-ANAN, M.;
PUTTIPIPAKHACHORN, S. Alginate-based pellets prepared by

extrusion/spheronization: A preliminary study on the effect of additive in granulating liquid. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 67, p. 227–235, 2007.

SRIAMORNSAK, P.; NUNTHANID, J.; LUANGTANA-ANAN, M.; WEERAPOL, Y.; PUTTIPIPAKHACHORN, S. Alginate-based pellets prepared by extrusion/spheronization: Effect of the amount and type of sodium alginate and calcium salts. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v.69, p. 274–284, 2008.

STECKEL, H.; MINDERMANN-NOGLY, F. Production of chitosan pellets by extrusion/spheronization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 57, p.107–114, 2004.

SUDHAKAR, Y. KUOTSU, K.; BANDYOPADHYAY, A. K. Bucal bioadhesive drug delivery – a promising option for orally less efficient drugs. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 114, p. 15-40, 2006.

SUMMERS, M.; AULTON, M. Granulação, cap. 25, p. 369-383. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**, 2ed. Porto Alegre: Atmed, 677p., 2005.

SWARBRICK, J. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**, 3.ed.: Informa Healthcare, v. 1-6, 4372p., 2007.

TABOPDA, T. K.; NGOUPAYO, J.; LIU, J.; MITAINE-OFFER, A.-C.; TANOLI, S. A. K.; KHAN, S. N.; ALI, M. S.; NGADJUI, B. T.; TSAMO, E.; LACAILLE-DUBOIS, M.-A.; LUU, B. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. **Phytochemistry**, New York, v.69, p.1726–1731, 2008.

TAN, G., GYLLENHAAL, C., SOEJARTO, D. D., Biodiversity as a source of anticancer drugs. **Current Drug Targets**, Hilversum, v. 7, p. 265–277, 2006.

VALADARES, M. C.; REZENDE, K. R.; PEREIRA, E. R. T.; SOUSA, M. C.; GONÇALVES, B.; ASSIS, J. C.; KATO, M. J. Protective effects of 4-nerolidylcatechol against genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, p. 1975–1978, 2007.

VERVAET, C.; BAERT, L.; REMON, J. P. Extrusion-spheronisation. A literature review. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.116, p. 131-146, 1995.

VIANA, O. S.; JÚNIOR, J. B.; SILVA, R. M. F.; MEDEIROS, F. P. M.; JÚNIOR, S. G.; ALBUQUERQUE, M. M.; NETO, P. J. R. Desenvolvimento de formulações e tecnologia de obtenção de comprimidos revestidos de efavirenz – terapia anti-HIV. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 505-511, n. 4, 2006.

VILLANOVA, J. C. O.; SÁ, V. R. **Excipientes, guia prático para padronização. Formas Farmacêuticas Orais sólidas e líquidas.** 2. ed. Pharmabooks, São Paulo, 417p., 2009.

WADE, A., WELLER, P.J. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 2. ed., The American Pharmaceutical Association (USA), The Pharmaceutical Press (England), 1994.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 51, p. 239-254, 1996.

WAN, D.S.; JEYABALAN, T. A simple apparatus for measuring the crushing strength of *pellets*. **Acta. Pharm. Technol.**, v.32, p.197-199, 1986.

YUEN, K.H., DESHMUKH, A.A.; NEWTON, J.M., Development and in vitro evaluation of a multiparticulate sustained release theophylline formulation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v.19, p. 855-874, 1993.

YUNKER, T.G. **The Piperaceae of Brazil - I. Hohna** 2, p.19-366, 1972.

YUNKER, T.G. **The Piperaceae of Brazil - II. Hohna** 3, p.29-284, 1973.


ZHANG, G., SCHWARTZ, J.B., SCHNAARE, R.L., WIGENT, R.J.; SUGITA, E.T. Bead coating: II. Effect of spheronization technique on drug release from coated spheres. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v.17, p. 817-830, 1991.

ANEXO

Artigos publicados:



Impact of ultrasound-assisted extraction on quality and photostability of the *Pothomorphe umbellata* extracts

Fernanda Steger de Oliveira Costa^a, César Aparício de Araújo Júnior^a, Emmanuelle de Jesus Silva^a, Maria Teresa Freitas Bara^b, Eliana Martins Lima^a, Marize Campos Valadares^c, Ricardo Neves Marreto^a,  

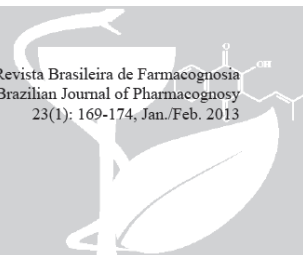
Preparation of pellets containing *Pothomorphe umbellata* extracts by extrusion-spheronization: improvement of 4-nerolidylcatechol photostability

César A. de Araújo-Júnior,¹ Fernanda S. de Oliveira Costa,¹ Stephânia F. Taveira,¹ Ricardo N. Marreto,¹ Marize C. Valadares,² Eliana M. Lima^{*1}

¹Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Brazil,

²Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Brazil.

Revista Brasileira de Farmacognosia
Brazilian Journal of Pharmacognosy
23(1): 169-174, Jan./Feb. 2013



Article

Received 14 May 2012
Accepted 25 Aug 2012
Available online 6 Nov 2012