



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

DEYSIANE OLIVEIRA BRANDÃO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO DE USO INTRACANAL COM
ATIVIDADE ANTIMICOBIANA OBTIDA A PARTIR DE UMA PLANTA DO
SEMIÁRIDO BRASILEIRO.**

**CAMPINA GRANDE – PARAÍBA
FEVEREIRO DE 2014**

DEYSIANE OLIVEIRA BRANDÃO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO DE USO INTRACANAL COM
ATIVIDADE ANTIMICOBIANA OBTIDA A PARTIR DE UMA PLANTA DO
SEMIÁRIDO BRASILEIRO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como exigência para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Dantas de Medeiros (UEPB)

**CAMPINA GRANDE – PARAIBA
FEVEREIRO DE 2014**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

B819d Brandão, Deysiane Oliveira.

Desenvolvimento de uma formulação de uso intracanal com atividade antimicrobiana obtida a partir de uma planta do semiárido brasileiro [manuscrito] / Deysiane Oliveira Brandão. - 2014.
130 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

Orientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Departamento de Farmácia.

1. Ximenia americana. 2. Plantas medicinais. 3. Ácido gálico. 4. Atividade antimicrobiana. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

DEYSIANE OLIVEIRA BRANDÃO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO DE USO INTRACANAL COM
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA OBTIDA A PARTIR DE UMA PLANTA DO
SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 17 de Fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Ana Cláudia D. de Medeiros

Prof. Dr.^a Ana Cláudia Dantas de Medeiros – UEPB
Orientadora

Raissa Mayer Ramalho Catão

Prof.^a Dr.^a Raissa Mayer Ramalho Catão – UEPB
Membro Interno

Ana Paula Barreto Gomes

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Barreto Gomes – UFRN
Membro Externo

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

REITOR

Prof. Dr. Antonio Guedes Rangel Júnior

VICE-REITOR

Prof. Dr. José Ethan de Lucena Barbosa

PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Prof.^a Dr.^a Maria José Lima da Silva

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Prof.^a Dr.^a Dilma Maria de Brito Melo Trovão

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

**COORDENADORA ADJUNTA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof.^a Dr.^a Karina Lidiane de Alcantra Saraiva

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO DE USO INTRACANAL COM ATIVIDADE ANTIMICOBIANA OBTIDA A PARTIR DE UMA PLANTA DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Devido a ausência de uma formulação intracanal totalmente eficaz, é necessária a pesquisa de novas medicações a partir de plantas medicinais. Nesse caso a *Ximenia americana* L., planta da catinga, amplamente utilizada pela medicina tradicional como antibacteriano, pode ser indicada para desenvolvimento de formulações intracanais. Todavia, não existe uma padronização do seu extrato pela indústria farmacêutica, no que diz respeito a estudos de pré-formulação e padronização de técnicas analíticas para determinação de sua segurança, eficácia e qualidade. Nesse contexto, com esse estudo pretendeu desenvolver a partir de *X. americana* L. uma pasta intracanal, com atividade antimicrobiana, aplicando parâmetros de validação de processo para os ensaios de potencia microbiológica, doseamento do componente químico majoritário, estudos toxicológicos e de compatibilidade fármaco excipiente. Foram obtidos dois tipos de extratos a partir da casca de *X. americana* L, hidroalcoólicos que posteriormente foi selecionado nebulizado em *spray dryer* e extrato etanólico que foi concentrado em evaporador rotativo. Para determinação, da atividade antimicrobiana, utilizou os extratos hidroalcoólicos aplicando a técnica de difusão ágar/cilindros. Os ensaios toxicológicos consistiram na determinação da toxicidade aguda e citotoxicidade. A análise fitoquímica foi baseada na determinação quantitativa de polifenóis totais, flavonoides totais, taninos condensados e saponinas totais. O composto químico majoritário foi identificado como ácido gálico através da cromatografia líquida de alta eficiência, assim como seu doseamento, o qual foi validado de acordo com os compêndios oficiais. Foi realizado o processo de validação do doseamento microbiológico da *X. americana* em relação ao padrão (ácido gálico). O estudo de compatibilidade fármaco/excipientes foi realizado aplicando técnicas termo analíticas e espectroscopia na região do infravermelho. *X. americana* L, apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus oralis* e *Klebsiella pneumoniae*. Quanto a segurança biológica, essa planta não apresentou toxicidade nos ensaios analisados. A análise fitoquímica demonstrou níveis aceitáveis de concentrações de metabólitos secundários. O marcador foi identificado e quantificado na concentração de 12µg/mL. Quanto ao doseamento microbiológico, esse apresentou linearidade, precisão exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez dentro das especificações. Quanto ao estudo de compatibilidade os excipientes que foram incompatíveis nas técnicas termoanalíticas, na espectroscopia essas incompatibilidades não foram tão intensas, no que respeito a supressão de grupos funcionais dos excipientes e do extrato seco. Assim estudos que mostrem o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico, bem como a caracterização e padronização do extrato de *X. americana* L são importantes, devido falta de metodologia oficial que comprove a qualidade, segurança e eficácia de destes produtos.

Palavras-chaves: *Ximenia americana*, endodontia, pré-formulação, ácido gálico, doseamento microbiológico.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A FORMULATION OF USE INTRA ROOT WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY GOT FROM A PLANT OF BRAZILIAN SEMI-ARID

Due to the absence of a fully effective intracanal formulation, the search for new drugs from medicinal plants is necessary. In this case the *Ximenia americana* L., stink plant widely used in traditional medicine as antibacterial, may be used to develop new formulations intracanal. However, there is no standardization of their extract by the pharmaceutical industry, with regard to studies of pre-formulation and standardization of analytical techniques to determine its safety, efficacy and quality. In this context, this study aimed to develop from *X. americana* L. one intracanal paste, with antimicrobial activity, applying parameters validation process for testing and microbiological potency determination of major chemical component, toxicological studies and drug excipient compatibility. Two types of extracts were obtained from the bark of *X. americana* L., hydroalcoholic which was subsequently sprayed in spray dryer and that ethanol extract was concentrated on a rotary evaporator. For determination of antimicrobial activity, used the hydroalcoholic extracts applying the technique of agar / cylinder diffusion. Toxicological tests consisted in acute toxicity and cytotoxicity. Phytochemical analysis was based on quantitative determination of total polyphenols, total flavonoids, tannins condensed and total saponins. The major chemical compound was identified as gallic acid by high performance liquid chromatography efficiency as well as its determination, which was validated according to the official compendia. The validation of microbiological assay was performed *X. americana* compared to standard (gallic acid). The study drug / excipient compatibility was accomplished by applying analytical techniques and term spectroscopy in the infrared region. *X. americana*, showed activity against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus oralis* and *Klebsiella pneumoniae*. As biosecurity, this plant showed no toxicity in the assays analyzed. Phytochemical analysis showed good concentrations of secondary metabolites. The marker was identified and quantified in the concentration of 12 µg/mL. Regarding the microbiological assay, this presented, linearity, accuracy, precision, limits of detection and quantification and robustness. As for the compatibility study excipients that were incompatible in thermoanalytical techniques, spectroscopy, these incompatibilities were not as intense, with respect to removal of functional groups of excipients and the dry extract. Thus studies that show the development of a herbal medicine, as well as the characterization and standardization of the extract of *X. americana* L are important because lack of official methodology that proves the quality, safety and efficacy of these products.

Keywords: *Ximenia americana*, endodontics, gallic acid, microbiological dosing.

*Não tenho palavras pra agradecer Tua bondade
Dia após dia me cercas com fidelidade
nunca me deixes esquecer
Que tudo o que tenho
Tudo o que sou
O que vier a ser
Vem de Ti Senhor
Dependo de Ti
Preciso de Ti
Sozinho, nada posso fazer.
Descanso em Ti
Espero em Ti
Sozinho, nada posso fazer.
(Diante do Trono)*

Dedicatória

- Ao meu Pai Celestial, amigo e conselheiro, Deus;
- A todos os meus familiares;
- Aos meus pais científicos, o casal Ana Cláudia Dantas e Germano Veras;
- A todos os estudantes de escolas públicas que não olham suas condições econômicas, mais onde querem chegar;
- A todos que fazem parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

- Ao amor da minha vida, aquele que é a minha inspiração, a minha força, o meu socorro bem presente, ao meu melhor amigo, ao meu salvador Jesus Cristo, por toda força e graça que me fez caminhar e finalizar mais essa etapa.
- A minha família pela minha formação de caráter e por todo apoio em todas as áreas da minha vida, em especial a meus pais Ednaldo e Goretti e a minha avó Geralda por todo esforço que fizeram durante este tempo.
- A minha Orientadora Ana Cláudia Dantas de Medeiros, pela oportunidade de aprendizado que me proporcionou, por sua amizade, dedicação, confiança, paciência, estímulo à pesquisa, por tudo que conquistei durante esse tempo e por ter se tornado um exemplo pra minha vida. Sou muita grata a você “Doutora”. Quando que crescer, eu quero ser como você.
- Ao professor Germano Veras, por todo conhecimento estatístico passado durante esse tempo e por toda paciência dedicada.
- Ao pessoal do LABDEM/LQAQ por todo apoio e confiança que recebi durante esses anos. Ao meu querido trio Alinne, Fernanda e Renér, por sempre me socorrer quando eu precisei, aos mais novos participantes Ana Michele, Jéssica e Lucas, aos novos mestrandos Jofilly, Pedro e Emmanuel, a Jocimar e aos meus queridos amigos de longa data Fernando Ramos, Felipe Hugo, Lianne Alencar, Cleildo Santana, Karla Monik, Thiago Pereira e Elaine Laíse, obrigada por tudo que vocês representam na minha vida.
- A turma do mestrado de 2012 do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (UEPB), em especial a Fernando Ramos, Nathália Cartaxo, Renata Alencar, João Paulo Tavares e Paulo César, pelo tempo de amizade desde a graduação.
- Ao pessoal do Laboratório New Lab, por todo conhecimento passado e por toda confiança recebida.
- A professora Raíssa Mayer por diversos conhecimentos microbiológicos passados e pela disponibilidade de participar dessa banca.
- A professora Ana Paula Barreto pela grande disposição de estar participando desse momento final.
- Ao CERTIBIO/UEPB por permitir a realização de diversas análises.
- Ao grande professor Ivan Coelho Dantas (*In memoriam*), pelo lindo trabalho que executou, assim como por despertar o interesse pelas plantas medicinais.
- A Universidade Estadual da Paraíba por me acolher durante sete anos, onde cursei a graduação e mestrado.
- Ao PPGCCF/UEPB, pela oportunidade de ingresso no mestrado.
- A CAPES e ao CNPQ pelo financiamento da pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
3.1. DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS FITOTERÁPICOS	24
3.2. INFECÇÕES ENDODÔNTICAS E FITOTERAPIA	26
3.2.1 Características das infecções endodônticas.....	26
3.2.2 Aplicação da fitoterapia na endodontia.....	28
3.3. <i>Ximenia americana</i> L	29
3.3.1. Características Gerais.....	29
3.3.2. Atividade Biológica e uso Etnofarmacológico.....	30
3.3.3. Composição Fitoquímica	32
3.4. DOSEAMENTO DE ANTIBIÓTICOS	33
3.4.1 Considerações Gerais	33
3.4.2. Doseamento por Método Microbiológico.....	34
3.4.3. Métodos Microbiológicos Utilizados no Doseamento de Antibióticos.	35
3.4.3.1. Método difusão em ágar.....	35
3.4.3.2. Método turbidimétrico.....	37
3.4.4. Análise estatística aplicada ao doseamento de antibióticos.....	38
3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	40
3.5.1 Parâmetros de Validação	41
3.5.1.1. Especificidade.....	41
3.5.1.2. Linearidade.....	43
3.5.1.3. Exatidão	43
3.5.1.4. Precisão	44
3.5.1.5. Sensibilidade do método: O Limite de detecção(LD) e o Limite de quantificação (LQ).....	45
3.5.1.6. Robustez.....	45
3.6. ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO APLICADOS A	

SUMÁRIO

FITOTERÁPICOS.....	46
3.6.1. Técnicas analíticas aplicadas no desenvolvimento, avaliação e controle da qualidade de fitoterápicos.....	47
3.6.1.1 Espectroscopia na Região do infravermelho.....	47
3.6.1.2. Análises Térmicas.....	48
3.6.1.2.1. Termogravimetria (TG).....	49
3.6.1.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	49
REFERÊNCIAS	51
CAPÍTULO I	62
Avaliação do potencial antimicrobiano, toxicológico e identificação e quantificação do composto químico e majoritário da casca de <i>Ximenia americana</i> L.....	63
RESUMO.....	63
1. INTRODUÇÃO	64
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.1. Material vegetal e obtenção dos extratos.....	65
2.2. <i>Screening</i> Microbiológico.....	67
2.3 Ensaio toxicológicos.....	68
2.3.1. Ensaio de toxicidade aguda com ratos.....	68
2.3.2. Ensaio de citotoxicidade por hemólise.....	68
2.4. Testes Fitoquímicos.....	69
2.4.1. Determinação do teor de polifenóis totais.....	69
2.4.2. Determinação do teor de flavonóides.....	69
2.4.3. Determinação do teor de saponinas totais.....	70
2.4.4. Determinação do teor de taninos condensados.....	70
2.5. Determinação do Composto Químico Majoritário.....	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.1. <i>Screening</i> Microbiológico	71
3.2. Ensaio toxicológicos.....	73
3.2.1. Ensaio de toxicidade aguda com ratos.....	73
3.2.2. Ensaio de citotoxicidade por hemólise.....	74
3.3. Testes Fitoquímicos.	75

SUMÁRIO

3.5. Determinação do Composto Químico Majoritário.....	76
3.6. Validação do método para doseamento do ácido gálico.....	76
CONCLUSÃO	79
AGRADECIMENTOS	79
REFERÊNCIAS	80
CAPÍTULO II	85
Desenvolvimento e validação do doseamento microbiológico de um novo Ingrediente Ativo Farmacêutico obtido a partir de <i>Ximenia americana</i> L.....	85
RESUMO	86
1. INTRODUÇÃO	87
2. MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1. Coleta e aquisição das amostras.....	89
2.2. Ensaio de Potência Antimicrobiana	89
2.2.1. Preparação da amostra e padrão.....	89
2.2.2. Cepas Microbianas.....	89
2.2.3. Preparação da Suspensão Microbiana e técnica de difusão em ágar.....	90
2.3. Construção da Curva de Calibração.....	90
2.4. Validação do Método de difusão em ágar.....	92
2.4.1. Linearidade.....	92
2.4.2. Precisão e exatidão.....	92
2.4.3. Limite de detecção.....	94
2.4.4. Limite de quantificação.....	95
2.4.5. Robustez.....	95
2.4.5.1. pH do meio.....	95
2.4.5.2. Tempo de pré incubação.....	96
2.5. Cálculo da potência pelo delineamento 5x1.....	96
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	98
3.1. Correção do Fator de Calibração.....	98
3.2. Análise da Curva de Calibração e verificação da linearidade.....	99
3.3. Precisão e Exatidão.....	102
3.4. Limite de detecção.....	103

SUMÁRIO

3.5. Limite de quantificação.....	103
3.6. Robustez.....	104
3.5.1. pH do meio de cultura.....	104
3.5.2. Variação do tempo de pré incubação.....	105
3.6. Cálculos da Potência.....	106
CONCLUSÃO	106
AGRADECIMENTOS	106
REFERÊNCIAS	107
Capítulo III	110
Estudo de uma formulação candidata a medicação intracanal a partir de Labdem – IA37.....	111
RESUMO	111
1. INTRODUÇÃO	112
2. MATERIAL E MÉTODOS	113
2.1 Obtenção do extrato.....	113
2.2. Misturas Binárias analisadas.....	113
2.3. Caracterização Térmica.....	114
2.3.1. Calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	114
2.3.2. Termogravimetria (TG).....	114
2.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	114
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	115
3.1. Análises termoanalíticas.....	115
3.1.1. Extrato LABDEM IA-37.....	115
3.1.2. Misturas Binárias.....	116
3.1.2.1 Extrato + agentes flavolizantes.....	116
3.1.2.2. Extrato + agentes diluentes.....	117
3.1.2.3. Extrato + agentes emolientes.....	121
3.2. Espectroscopia na região do infravermelho.....	123
3.2.1. Extrato LABDEM IA-37.....	123
3.2.2. Misturas Binárias.....	124
CONCLUSÃO	127

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	127
REFERÊNCIAS	128
CONSIDERAÇÕES FINAIS	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	Agente diluente
AE	Agente emoliente
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
AOAC	Association of official analytical chemical
AT	Agente antisséptico
ATCC	American Type Culture Collection
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CertBio	Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute procedures
CV	coeficiente de variação
DL50	Dose letal capaz de causar morte em 50% da população
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
DSC	Análise térmica calorimétrica exploratória diferencial
DTA	Análise térmica diferencial
EC50	Concentração citotóxica efetiva 50%
EH	Extrato hidroalcoólico
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
ICH	International conference on harmonisation
INMETRO	Instituto Nacional de metrologia
IV	Infra vermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MH	água Muller Hinton
NCTC	National Collection of Type Cultures
pH	Potencial hidrogênico
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas
RDC	Resolução Diretiva Colegiada.
RMN	Ressonância magnética nuclear

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

rpm	Rotação por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
TG	Termogravimetria
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UV	Ultra violeta
%	porcentagem
µg	Micogramas
µL	Microlitros
A	Concentração da mostra
kg	Kilograma
mg	Miligramas
min	minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
nm	Nanômetros
°C	Graus Celsius
P	Concentração do padrão
Δ	Varição de calor
p/v	partes por volume
Pc	Concentração corrigida
r²	Coefficiente de correlação Linear
UI	Unidades Internacionais
x	Eixo das abcissas
y	Eixo das ordenadas

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Cromatograma do extrato de *Ximênia americana* L. (A) e do padrão de ácido gálico (B) em 280 nm..... 76

Figura 2. Curva de calibração do padrão de ácido gálico em 271 nm..... 77

CAPÍTULO II

Figura 1. Disposição dos cilindros na placa, para obtenção do fator de correção..... 91

Figura 2. Disposição dos cilindros na placa, para obtenção da precisão e exatidão..... 93

Figura 3. Curvas de calibração obtidas com o padrão e a amostra..... 99

Figura 4. Gráficos dos Resíduos para o padrão de Ácido Gálico..... 101

Figura 5. Gráficos dos Resíduos para o Extrato nebulizador..... 102

CAPÍTULO III

Figura 1. Curva TG e DSC do extrato nebulizado..... 116

Figura 2. TG e DSC do extrato, dos agentes antissépticos e das misturas..... 118

Figura 3. TG e DSC do extrato, dos agentes diluentes e das misturas..... 120

Figura 4. TG e DSC do extrato, dos agentes emolientes e das misturas..... 122

Figura 5. Espectros na região do infravermelho do extrato nebulizado L, misturas binárias e excipientes correspondentes..... 126

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1. Dados etnofarmacológicos de <i>X. americana</i> L	31
Tabela 2. Classificação dos testes segundo sua finalidade.....	42
Tabela 3. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	42

CAPÍTULO I

Tabela 1. Dados etnofarmacológicos de <i>X. americana</i> L.....	66
Tabela 2. Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) do extrato hidroalcólico obtido de <i>Ximenia americana</i> L. para as cepas microbianas analisadas.....	72
Tabela 3. Ensaio de citotoxicidade. Leitura visual da hemólise das suspensões de hemácias testadas com extratos nebulizado de <i>X. americana</i>	75
Tabela 4. Teor de polifenóis , flavonoides totais, taninos condensados e saponinas totais do extrato de <i>X.americana</i> L obtidos por espectroscopia na região do visível.....	75
Tabela 5. Precisão do padrão de ácido gálico e do extrato analisados em dois dias diferentes.....	78
Tabela 6. Ensaio de recuperação de amostras fortificadas com o padrão de ácido gálico em três níveis de concentração (75, 100 e 125%).....	78
Tabela 7. Medidas das áreas e do tempo de retenção dos picos no ensaio de robustez para o doseamento do padrão de ácido gálico.....	78

CAPÍTULO II

Tabela 1. Valores calculados de L e H e das doses correspondentes da amostra em relação ao padrão.....	98
Tabela 2. Parâmetros de curva analítica (intercepto - a, inclinação - b, e coeficiente de determinação - r^2) para o padrão do ácido gálico na faixa de 10 a 160 mg/mL.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. Parâmetros de curva analítica (intercepto - a, inclinação - b, e coeficiente de determinação - r^2) para a amostra (extrato nebulizado da <i>X. americana</i> L) na faixa de 10 a 160 mg/mL.....	101
Tabela 4. Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão para precisão e exatidão intra e inter-dias da amostra em três diferentes níveis de concentração.....	103
Tabela 5. Valores do limite de quantificação, desvio padrão e coeficiente de variação calculado intradia e interdias.....	104
Tabela 6. . Médias dos halos de inibição (mm) obtidos com diferentes tempo de incubação.....	105

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da medicina popular e o uso de plantas medicinais tem importância fundamental para o setor farmacêutico no desenvolvimento de novos medicamentos pelas indústrias farmacêuticas, pois as plantas além de apresentarem algumas atividades farmacológicas, possuem grandes chances de apresentar baixa toxicidade, e de serem de baixo custo e fácil acesso (COSTA et al, 2008).

Associado a esses fatos, a evolução biológica traz consigo a resistência de patógenos aos fármacos já comercializados causando sérios problemas para população mundial. Portanto, por não existir no mercado um fármaco antimicrobiano que apresentem 100% de eficácia, que impeçam as evoluções dos microrganismos e apresentem ausência de efeitos colaterais, se faz necessária a pesquisa de novas alternativas terapêuticas para o tratamento destas infecções, principalmente a partir de produtos naturais (DUARTE, 2009).

Um dos objetivos da terapia endodôntica consiste na desinfecção do sistema de canais radiculares. A permanência de grande número de microrganismos viáveis em associação a condições favoráveis a seu crescimento impede a reparação dentária determinando o fracasso do tratamento. Microrganismos que sobrevivem ao preparo químico-cirúrgico podem rapidamente aumentar em número entre as sessões de tratamento, sinalizam a necessidade para a utilização de medicações antimicrobianas (PAISANO; BOMBANA, 2010).

Nesse contexto, têm sido desenvolvidas pesquisas que demonstram a atividade antimicrobiana *in vitro* de plantas, frente a microrganismos da cavidade oral (PINHEIRO; ANDRADE 2008; SILVA et al, 2010; SILVA et al., 2012). Sendo assim, já é possível encontrar no mercado extratos de plantas como a salvia, menta e camomila incorporados as fórmulas dentais com o intuito de reduzir mau hálito e combater gengivites e infecções intracanal (BARRETO, et al.,2005; SOUZA, FELFILI, 2006, RAMOS et al., 2010).

Sob esta visão, os fitoterápicos, são entendidos como produtos farmacêuticos tecnicamente elaborados, constituídos exclusivamente de matérias-primas terapeuticamente ativas de origem vegetal, destinados a intervir no organismo animal, com benefício da saúde do usuário e caracterizados pelo conhecimento e pela manutenção de sua eficácia, segurança e especificações técnicas (ANVISA, 2006).

No entanto, o problema da qualidade dos fitoterápicos no Brasil vem sendo apontado há muito tempo. Para a manutenção e fortalecimento da indústria farmacêutica considera-se

Introdução

necessária, a melhoria da qualidade destes produtos, atendendo as exigências crescentes dos consumidores e dos órgãos de fiscalização, com a finalidade de se colocar no mercado produtos com segurança e eficácia estabelecidas (FARIAS et al., 2008).

Dessa forma, o controle da qualidade de um produto envolve várias etapas que vão desde a obtenção da matéria-prima, passando por todo o processo de produção, culminando com a análise do produto final, o medicamento fitoterápico. A qualidade da matéria-prima não garante a eficácia do produto, mas é fator determinante para a mesma (SOUZA; FERRÃO, 2006). Para fitoterápicos os parâmetros de controle de qualidade variam de espécie para espécie e podem ser encontrados nas monografias contidas nas farmacopeias. O que dificulta o trabalho é a ausência de padrões para muitas plantas, de monografias farmacopeicas e de métodos validados contidos nas monografias existentes de vegetais (NASCIMENTO et al., 2008; FARIAS et al., 2008).

Nesse contexto a *Ximenia americana* L. também conhecida como 'ameixa', 'ameixa-do-mato', uma árvore ou arbusto espinhoso pertencente à família Olacaceae, é apreciada pela medicina popular com ações antimicrobianas, cicatrizantes, antiinflamatórias, anticancerígenas e analgésicas (BRAGA, 1976; ALMEIDA et al., 2006, 2010, 2012; URSO et al., 2013), todavia não existe uma padronização do seu extrato pela indústria farmacêutica local, nem monografias específicas em compêndios oficiais, tornando necessário investimentos no desenvolvimento de técnicas analíticas ou bioanalíticas para determinação de sua estabilidade e janela terapêutica aplicada a diversas formulações, entre essas, formulações de uso endodôntico.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver a partir de extratos hidroalcoólicos da *Ximênia americana* L. uma pasta Intracanal, com atividade antimicrobiana, para uso odontológico.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos da *Ximênia americana* L. em diferentes proporções de misturas hidroalcoólicas.
- Realizar um *screening* microbiológico nos extratos produzidos;
- Realizar um *screening* fitoquímico, dos extratos que possuem melhor atividade antimicrobiana;
- Determinação qualitativa e quantitativa o composto químico majoritário (marcador químico).
- Obter extrato nebulizado, com estabilizante farmacotécnico, dos extrato que possuir a melhor atividade antimicrobiana;
- Determinar a potência microbiológica do extrato nebulizado;
- Desenvolver o processo de validação do doseamento da potência microbiológica;
- Realizar ensaios de toxicidade aguda e citotoxicidade no extrato nebulizado;
- Realizar estudo de pré-formulação;
- Avaliar o comportamento térmico do extrato nebulizado e das misturas binárias produzidas (extrato nebulizador: excipientes), através de técnicas termoanalíticas;
- Desenvolver uma formulação de pasta intracanal a partir do componente ativo farmacêutico de origem vegetal, com atividade antimicrobiana;

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS FITOTERÁPICOS.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, (2006), fitoterápicos são medicamentos preparados exclusivamente com plantas ou partes de plantas medicinais, que possuem propriedades reconhecidas de cura, prevenção, diagnóstico ou tratamento sintomático de doenças, validadas em estudos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou ensaios clínicos de fase III.

Na cadeia de produção de medicamentos fitoterápicos são necessários, inicialmente, estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos. O primeiro está relacionado com a coleta de informações junto à população a respeito da nomenclatura, dos usos e significados culturais das plantas (LIMA; SANTOS, 2006). Enquanto que, o segundo consiste em combinar as informações adquiridas junto a usuários da flora medicinal (comunidades e especialistas tradicionais), com estudos químicos e farmacológicos (ELISABETSKY, 2009).

O mercado desses produtos tem se expandido em todo mundo, todavia esse aumento não tem refletido na qualidade dos fitoterápicos disponíveis à população, pois são grandes as intervenções para efetuação do controle de qualidade e a comprovação de segurança e eficácia desses medicamentos. Isso ocorre devido à complexidade química dos derivados de drogas vegetais (NASCIMENTO et al., 2008; FARIAS et al., 2008). No Brasil, outro fator que contribui para estabelecer essas dificuldades é a falta de investimentos das indústrias farmacêuticas em pesquisa com plantas nativas, preferenciando o registro de produtos baseados em plantas exóticas, por essas possuírem uma maior literatura científica publicada (CARVALHO, 2012).

Dessa forma, o estabelecimento e a manutenção da qualidade de produtos farmacêuticos de origem vegetal apresentam grandes problemas ligados à insuficiência de dados fitoquímicos sobre muitas matérias-primas vegetais, bem como o desconhecimento das substâncias responsáveis pelas atividades terapêuticas relatadas pois para muitas dessas drogas, as normas farmacopéicas de identificação e qualidade se limitam apenas à identificação botânica da matéria-prima, o que, isoladamente, não garante a qualidade dos produtos (ARAGÃO, 2002; FARIAS et al., 2008).

No entanto muitos vegetais foram estudados quimicamente e farmacologicamente, e esses trabalhos encontram-se publicados em revistas especializadas ou em monografias e podem ser utilizados como recurso na elaboração de técnicas apropriadas de controle de

Fundamentação Teórica

qualidade. Também para a elaboração de bulas, processos de licenciamento e desenvolvimento de produtos é indispensável o acompanhamento dos trabalhos realizados ou em andamento (CARVALHO et al, 2008; NASCIMENTO et al., 2008).

Algumas importantes ações da ANVISA foram estabelecidas. A primeira foi a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada através do Decreto nº 5.813 em 22 de junho de 2006 e em 2011 foi publicada a 1ª edição do Formulário Nacional de Fitoterápico integrada a Farmacopeia Brasileira, trazendo 83 monografias de medicamentos, como infusões, xaropes e pomadas que são reconhecidas como farmacopeias. (BRASIL, 2006; BRASIL, 2011). Outra ação desenvolvida pela ANVISA foi à publicação da Resolução Diretiva Colegiada, nº 14 de 31 de março de 2010, que visa normatizar o registro de medicamentos fitoterápicos. Além disso, através da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 10/2010, a ANVISA regulou o uso popular de plantas medicinais na forma de drogas vegetais (CARVALHO et al., 2012). Esses programas apresentam em suas diretrizes o incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos que possam ser disponibilizados com qualidade, segurança e eficácia à população, priorizando a biodiversidade do país. A etapa seguinte é acompanhar o seu uso, com a finalidade de fiscalizar a produção destes fitoterápicos para preservar a saúde do consumidor (BRASIL, 2007).

Dentre os requisitos e parâmetros exigidos pela RDC 14/2010, estão a necessidade do controle de qualidade, com métodos analíticos que incluam resultados de prospecção (*screening*) fitoquímica ou perfis cromatográficos por cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) cromatografia gasosa (CG), quando cabível, além de comprovação de segurança de uso, incluindo estudos de toxicidade pré-clínica.

Dessa forma no controle da qualidade dos fitoterápicos que perpassa pelos derivados da droga vegetal, excipientes até o produto tecnologicamente acabado, deve-se utilizar metodologia descrita em farmacopéia ou formulários oficiais reconhecidos pela ANVISA (BRASIL, 2007), ou validar uma metodologia analítica desenvolvida, obedecendo aos parâmetros especificados para a validação de métodos analíticos apresentados na RE 899/03 – ANVISA.

É exigido ainda Certificado de Boas Práticas de Fabricação e Controle para as linhas de produção da empresa, os quais devem atender aos critérios determinados na RDC nº 17/03 que dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de Fabricação para as indústrias de medicamentos, para a obtenção de tal certificado. Cabe ressaltar que as normas exigidas para

a produção de fitoterápicos são as mesmas estabelecidas para os demais medicamentos (CARVALHO, et al., 2007).

No mercado de fitoterápicos brasileiro, a maioria dos produtos é constituída por cápsulas contendo pós de plantas, para as quais não existem comprovações de eficácia e segurança e nem mesmo tradição do uso. Existe ainda uma falta de tradição das indústrias farmacêuticas brasileiras em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), principalmente na indústria de fitoterápicos. A integração dessas empresas junto com universidades pode ter como objetivo garantir a qualidade, eficácia e segurança de seus produtos (SIMÕES; SCHENKEL, 2007).

3.2 INFECÇÕES ENDODONTICAS E FITOTERAPIA

3.2.1 Características das infecções endodônticas.

Endodontia é o ramo da odontologia que estuda alterações na polpa dentária. O tratamento endodôntico consiste na retirada dessa polpa. Dependendo da situação do dente, são necessárias varias repetições de retirada para total efetivação desse tratamento (SOLANKI, 2012).

Muitas vezes os microrganismos que causam infecções na região do canal dentária sobrevivem às sessões de retirada da polpa dentária. Quando isso ocorre, a medicação intracanal é aconselhada, com o objetivo de eliminar esses microrganismos, controlando assim, os processos infecciosos e inflamatórios que possam surgir nessa região (RAMOS et al., 2012).

Para uma maior eficiência do tratamento endodôntico é necessário que a medicação utilizada nesse processo possua algumas particularidades, como, não ter efeito irritativo aos tecidos periapicais, ter uma boa adesão às paredes do canal, possuir uma boa absorção local, possuir propriedades antimicrobianas, ser de fácil manipulação, ter características organolépticas satisfatorias como cor, odor entre outras além de possuir baixo custo. Todavia, ate o momento nenhum medicamento com todas essas características foi formulado (CUNHA et al., 2005; RAMOS et al., 2012).

O hidróxido de cálcio se tornou a medicação de primeira escolha na terapia endodôntica, por apresentar eliminação bacteriana quando usado por mais de sete dias. Entretanto, há relatos de resistência de alguns microrganismos a essa substância o que

Fundamentação Teórica

incentivou pesquisadores a associarem a mesma a outros fármacos, buscando uma melhor atividade antimicrobiana, (SIQUEIRA JÚNIOR et al., 1997; DOTTO et al., 2006; MANZUR et al., 2007). Outra pasta utilizada em endodontia é a pasta CTZ, sendo composta de cloranfenicol, tetraciclina, óxido de zinco e eugenol, sendo indicada para uma técnica de endodontia em que não é necessária a instrumentação dos canais radiculares. Sua composição é de uma parte de cloranfenicol (500 mg), uma parte de tetraciclina (500 mg), e duas partes de óxido de zinco (1 g) e uma gota de eugenol (GONZÁLEZ-NÚÑEZ et al., 2010).

Entre os microrganismos causadores dessas infecções existe um predomínio das bactérias anaeróbias. Todavia a espécie bacteriana frequentemente associada as infecções em canais radiculares é *Enterococcus faecalis*. *Enterococcus* compõe um gênero de bactérias Gram-positivas associadas a infecções endodônticas em odontologia (SAKAMOTO et al., 2007). A capacidade de penetração nos tubos dentinários tem sido demonstrada em vários estudos podendo penetrar em até 1000 µm, dificultando sua remoção e fazendo com sejam capazes de resistir ao preparo mecânico do canal radicular (ROCAS et al., 2004; ZOLETTI et al., 2006; KANUMURU et al., 2012).

Quanto as características microbiológicas, *Enterococcus* sp apresentam poucas exigências para o seu crescimento, sendo capazes de crescer em temperatura de 10 a 45 °, ph 9,6 em 6,5% de solução salina, e de sobreviver a 60 °C por, 30 minutos. São microrganismos facultativos, catalases negativos, e possuem a capacidade de hidrolisar esculina na presença de bile. Essa espécie bacteriana impede a liberação de enzimas hidrolíticas por células polimorfunucleadas, o que pode explicar o seu domínio em infecções pulpares. (PARADELLA, KOGA-ITO e JORGE, 2007).

Por possuir uma grande flexibilidade genética, *E. faecalis* tem uma capacidade de habitar em diferentes locais (FISHER e PHILLIPS, 2009). Estudos mostram a capacidade de colonização e formação de biofilme em canais radiculares de dentes humanos, sendo as bactérias capazes de sobreviver em ambientes com baixa disponibilidade nutricional, para crescerem quando a nutrição estiver favorável (GEORGE et al., 2005; WANG et al., 2011).

O isolamento de *E. faecalis* de canais radiculares tem relação com a baixa sensibilidade a agentes antimicrobianos e com a habilidade de inativá-los. A inativação do Hidróxido de Cálcio ocorre provavelmente pela inibição do efetivo sistema de prótons que mantém os níveis de pH ótimo no citoplasma da bactéria, assim, as propriedades antimicrobianas do hidróxido de cálcio podem ser atribuídas ao seu potencial alcalino e sua habilidade de destruir a membrana citoplasmática, causando danos no DNA bacteriano.

Fundamentação Teórica

Muitos casos clínicos mostram canais radiculares infectados com *E. faecalis* que permaneceram assintomáticos por anos, por não responderem a terapia endodôntica convencional sendo descobertos por radiografias que revelaram lesões periapicais em estado avançado (PANZARINI et al., 2012).

3.2.2. Aplicação da fitoterapia na endodontia

De acordo com dados levantados pelo Ministério da Saúde em 2004, em todos os municípios brasileiros observou-se que a fitoterapia está presente em 116 municípios, contemplando 22 unidades federadas. A publicação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), Portaria nº 97114, de 3 de maio de 2006, resultou-se de anos de ensaios referentes a este assunto. A política de caráter nacional recomenda a implantação e a implementação de ações e de serviços no Sistema Único de Saúde (SUS), o que inclui a fitoterapia, com o objetivo de garantir a prevenção de agravos, a promoção e a recuperação da saúde com ênfase na atenção básica à saúde (ROSA, 2011).

No Brasil, em 1986, no Relatório Final da VIII Conferência Nacional de Saúde, aparece pela primeira vez, em documento oficial, a proposta de introdução de práticas alternativas de assistência à saúde, no âmbito de serviços de saúde, possibilitando ao usuário o direito democrático de escolher a terapêutica preferida e a inclusão no currículo de ensino em saúde do conhecimento de praticas alternativa (ALVES et al., 2003).

Dessa forma tem-se observado um crescente interesse dos profissionais de saúde pelas formulações fitoterápicas, visto que são viáveis, considerando-se a grande variedade de plantas medicinais com atividade antimicrobiana, antiinflamatória, ansiolítica ou sedativa, demonstradas em estudos clínicos (PINHEIRO E ANDRADE, 2008).

A descoberta de novos compostos bioativos, é de grande importância para a odontologia, pois infecções na cavidade bucal são frequentes, sejam de origem bacteriana ou fúngica. Além de *E. faecalis*, outras bactérias como *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* estão associados a problemas endodônticos e periodontais, além de serem microrganismos envolvidos na cárie dentária (SILVEIRA et al., 2011).

Várias substâncias são utilizadas na medicina popular como agentes antissépticos, tais como o tomilho e o cacau, e as que mais se destacam na odontologia são a aroeira, a própolis e a romã, devido às suas propriedades terapêuticas e pelo fato de possuírem uso bastante

Fundamentação Teórica

difundido dentro da medicina popular no tratamento de diversas afecções bucais (FRANCISCO, 2010).

Estudos concluíram que grande parte da população emprega fitoterápicos no tratamento dos agravos à saúde, muitas vezes para tratar afecções bucais. As principais indicações de uso estavam relacionadas ao controle da dor, da inflamação e reparo tecidual, sendo que as formas de utilização mais comuns desses produtos foram a decocção, a maceração e a infusão (LIMA et al., 2012).

Porto et al., (2002), investigaram o efeito anti-inflamatório do óleo da *Chamomila recutita* associado ao hidróxido de cálcio em inflamação experimentais em ratos. Os autores concluíram que o óleo essencial de camomila, associado ou não ao hidróxido de cálcio, possui efeito antiinflamatório e que, estudos devem ser realizados com o intuito de viabilizá-lo como veículo na medicação intracanal em Endodontia.

Madhubala et al., (2011) verificou a atividade do extrato etanólico de própolis como medicação intracanal e comparou com hidróxido de cálcio e com uma mistura de antibióticos contendo ciprofloxacina, metronidazol e minociclina. A bactéria utilizada para teste também foi *E. faecalis*, e os resultados mostraram que em apenas dois dias a própolis foi capaz de reduzir a quantidade de cepas presentes, seguida pela mistura de antibióticos e com o hidróxido de cálcio apresentando os piores resultados.

Ramos et al., (2012) fizeram uma avaliação *in vivo* da irritação dos tecidos periapicais de dentes de cães após pulpectomia, frente a própolis quando usada em associação com uma medicação intracanal, os resultados sugeriram que este produto poderia ser considerado como uma opção para a medicação do canal radicular após pulpectomia, por possuir pequeno potencial irritativo e grande atividade antimicrobiana frente a *E. faecalis*.

3.3. *Ximenia americana* L

3.3.1. Características Gerais.

A espécie *X. americana* L. pertence a família Olacaceae. Essa família possui uma distribuição pantropical, e contém 27 gêneros com aproximadamente 200 espécies, dos quais 13 gêneros e cerca de 60 espécies, são encontrados no Brasil entre elas a *Ximenia americana* L (BURKILL, 1997, BRASILEIRO et al., 2009; SILVA et al, 2008).

X. americana L. também conhecida como 'ameixa', 'ameixa-do-mato', apresenta casca

Fundamentação Teórica

avermelhada, lisa, muito adstringente. É um arbusto muito ramificado a partir da base, espinhoso e possui ramos finos, podendo chegar a atingir até 5 m de altura. Possui folhas alternas, inteiras, elípticas e delgadas, chegando a apresentar um comprimento de 4cm a 10 cm de largura. Possuem inflorescência do tipo cimeira e axilar. O fruto da ameixa é uma baga e, apesar de não ser considerada fruta comercial, é comestível (BRAGA, 1976; SORO, TRAORES, AKANDE, 2009; FRANCO & BARROS 2006, URSO et al., 2013).

De acordo com Fernandez & Bezerra (1990), a ameixa faz parte do extrato arbustivo-arbóreo da Caatinga, figurando como uma das principais espécies. No período seco, quando a maioria das espécies da Caatinga perde as folhas, essa planta destaca-se por apresentar-se com as folhas totalmente verdes, o que caracteriza uma planta resistente à seca. O período de frutificação é muito curto e concentra-se nos meses de dezembro a janeiro.

3.3.2. Atividades Biológicas e uso Etnofarmacológico

Na medicina popular, uma série de usos terapêuticos, de todas as partes da *X. americana*, foram relatadas por diversos pesquisadores (MATOS, 2007; MEVY, 2006).

Dentre as atividades biológicas determinadas, pode-se citar a antimicrobiana (MAIKAI MAIKAI E KOBO, 2010; SILVA et al., 2012; GEYID et al., 2005; JAMES et al., 2007; OGUNLEYE et al., 2003; KONÉ et al., 2004; KUBMARAWA et al., 2007), anti-inflamatória (OLABISSI et al., 2011), anti-trypanosoma (MAIKAI et al., 2009; MAIKAI, 2010), anticonvulsivante (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2002), antiviral (ASRES et al., 2001), anticâncer (VOSS et al., 2007) e antioxidante (LAMIEN-MEDA et al., 2008; MAIKAI, 2010).

O extrato da casca da *X. americana* demonstrou atividade antimicrobiana e pode conter substâncias alternativas para o tratamento endodôntico. No estudo realizado por Silva et al. (2012), o extrato de casca da *X. americana* apresentou atividade bacteriana contra *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *Streptococcus oralis*. Em estudo realizado por Costa, (2011), também foi encontrada atividade contra a *E. faecalis*.

Ao avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos clorofórmicos, metanólicos e aquosos da casca, das folhas e das raízes de *X. americana*, verificou-se que todos os extratos mostraram atividade, mas o extrato metanólico foi o mais ativo (OMER, ELNIMA, 2003). A ação de 67 extratos etanólicos de 50 espécies de plantas entre elas a *X. americana* L., foi avaliada contra: *Escherichia. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*,

Fundamentação Teórica

Streptococcus pyogenes e *Bacillus subtilis*. Dos extratos testados, 31 mostraram atividade antibacteriana apenas para bactérias gram positivas. A *X. americana* apresentou atividade antibacteriana com uma concentração inibitória de 94 mg/ml apenas contra *E. faecalis* e *S. pyogenes* (KONÉ et al., 2004).

Tabela 1- Dados etnofarmacológicos de *X. americana* L

Uso etnofarmacológico	Parte da planta	Referências
Antisséptico, psicotrópico, antiictérico, antipirético, antiviral, analgésico (dores de dente)	Raízes e folhas	Omer e Enilma, 2003
Antisséptico, cicatrizante, anti-inflamatório e vasoconstritor.	Casca do caule	Morais et al.,2005
Antisséptico.	folhas	Magassouba et al., 2007
Vermífugo, laxante, antiemético, analgésico, antipirético, antidiarreico, uso oftálmico e antitussígeno.	Raízes, casca, folhas e frutos	Soro et al, 2009
Uso tópico como antisséptico.	Folhas	Muralidharan e Narasimhan, 2012;
Analgésico, antiviral, antibacteriano de uso oftálmico.	Folhas, casca e raízes	Wurochekke et al.,2008
Antissépticos, antiinflamatórios e no combate a cólicas menstruais.	Folhas, casca'	Cartaxo et al.,2010
Antimicrobianos, cicatrizante e antiasmático.	frutos	Silva et al.,2008
Analgésico, antimicrobiano para infecções respiratórias, antiinflamatório, antireumático, anticancerígeno e vasoconstritor.	Casca do caule	Chaves e Barros, 2012
Antiulcerogênico, antidiarreico, antirreumático e anticancerígeno.	Casca, frutos	Mevy et al., 2006
Anticancerígeno, e contra dermatites	Frutos	Sawadogo et al, 2012
Utilizado contra lepra, sífilis, desintéria, febre, tuberculose, dores de dente, e cicatrizante.	Raízes e folhas	Maikai et al, 2008

Fundamentação Teórica

As atribuições do seu uso etnofarmacológicos da *X. americana* L. estão relatados na tabela 1, onde estão identificados o seu uso, as partes utilizadas e os estudos referenciados.

3.3.3 Composição fitoquímica.

Triagens fitoquímicas realizadas em extratos mostraram a presença de vários metabolitos secundários como taninos, esteróis, terpenos, flavonoides, alcaloides, saponinas e quinonas (OMER & ELNIMA, 2003; GEYID et al., 2005; MAIKAI et al., 2009;).

As sementes de *X americana* possuem óleo, glicosídeo cianogenético e benzaldeído (MATOS, 1987). A casca possui alcalóides, taninos pirogálico, fenóis, flavonóides, flavona, flavonóis, xantona, albumina, antocianina, antocianidina, chalcona, aurona, saponina, resina, amido e glicose (BAYER, et al., 2012).

Os constituintes químicos dos extratos aquosos e metanólicos das folhas, da casca do caule e da raiz da *X. americana*, foram analisados e verificou-se que os referidos extratos possuem carboidratos, na forma de açúcares, e amido solúvel, exceto para o extrato aquoso das folhas. Saponinas, glicosídeos cardiotônicos e antraquinonas foram observados em todos os extratos, exceto nos extratos das folhas, onde não foram encontradas antraquinonas. Flavonóides e taninos foram observados em todas as partes da planta já mencionadas, enquanto que os alcalóides estiveram sempre ausentes (JAMES et al., 2007).

Análise fitoquímica de *X. americana* indica a presença de flavonóides e taninos. Os flavonoides são fenóis que possuem inúmeras atividades biológicas incluindo efeito antiinflamatório, antialérgico e vasoprotetor; enquanto os taninos são utilizados como protetor de regiões inflamadas na cavidade bucal e no tratamento de feridas (OGUNLEY, IBITOYE, 2003).

Tran Le et al., (2012), verificando a bioatividade de polifenóis identificaram pela primeira vez o Ácido Gálico na casca da *X. americana*, atribuindo a esse composto a atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos.

3.4. DOSEAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

3.4.1 Considerações Gerais

Os agentes antimicrobianos são considerados uma classes de medicamentos mais prescritos nos países em desenvolvimento. O uso irracional e excessivo de antibióticos não só resultam no surgimento de cepas bacterianas resistentes, mas também em reações adversas e um aumento no gasto econômico do sistema nacional de saúde (SHEHADEH, et al., 2012).

Para o sucesso terapêutico de substâncias antimicrobianas também é necessário que a potência dessas substâncias esteja correta nas apresentações farmacêuticas que serão administradas ao paciente. Se a potência estiver abaixo da necessária, o fármaco pode não atingir no plasma uma concentração capaz de exercer a atividade esperada. Por outro lado, se a concentração estiver muito alta, poderá provocar toxicidade. Nesse aspecto, é crescente a preocupação com a qualidade dos medicamentos inovadores, a questão dos genéricos, a bioequivalência e a estabilidade das formulações (LI; NEKKA, 2013).

A atividade e a potência dos antibióticos pode ser demonstrada sob condições específicas através de seu efeito inibitório sobre o crescimento de microrganismo-padrão sensível (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

Os ensaios para determinar essa potência têm sido realizados por métodos biológicos, sendo uma alternativa a outros métodos, tais como HPLC que têm sido amplamente adotados. Uma importante vantagem dos métodos físico-químicos é a rapidez das análises, embora que os equipamentos necessários sejam frequentemente caro. A Farmacopéia Americana traz recomendação quanto à utilização de procedimentos microbiológicos para a determinação da potência dos antibióticos nas apresentações farmacêuticas. Essas recomendações consistem no microrganismo, meio de cultura e diluente específico para cada antibiótico assim como o método de análise empregado, geralmente são aplicados dois métodos, o do cilindro em placa e/ou turbidimétrico (ESMERINO et al, 2004).

Nos métodos biológicos a potência dos antibióticos geralmente é determinada, comparando-se a dose com a qual se inibe o crescimento de um microrganismo adequado e susceptível com a dose da preparação do antibiótico de referência nas mesmas condições de trabalho. Uma redução na atividade antimicrobiana pode revelar mudanças não demonstráveis por métodos químicos (LOURENÇO; PINTO, 2011).

Dessa forma a determinação da potência antimicrobiana é extremamente importante

Fundamentação Teórica

para o controle e garantia de qualidade em produtos e preparações farmacêuticos, portanto, é necessário o desenvolvimento de práticas e procedimentos de baixo custo que possa ser aplicado na validação e dosagem de drogas (LOURENÇO; PINTO, 2009).

3.4.2. Doseamento por Método Microbiológico

A dosagem de antibióticos pode ser determinada por métodos químicos e físico-químicos, todavia os ensaios microbiológicos são, em geral, os métodos de escolha para eliminar dúvidas quanto a perda de atividade, não demonstradas pelos outros métodos. Estes ensaios aplicam-se com frequência aqueles antibióticos de origem biológica, que podem conter misturas de substâncias com efeitos sinérgicos, antagônicos ou competitivos e cuja potência não pode ser determinada em termos de composição química (HEWITT, 2007; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009; PINTO, KANECO e PINTO, 2010;).

Esses ensaios são procedimentos destinados a avaliar a potência de princípios ativos contidos nas matérias-primas e preparações farmacopeicas utilizando marcadores biológicos, tais como microrganismos, animais, fluidos e órgãos isolados de animais (FARMACOPEIA BRASILEIRA, V EDIÇÃO, 2010).

Um ensaio microbiológico é definido como um procedimento prático no qual a potência desconhecida de um material é avaliada por comparação de seus efeitos em um sistema biológico (cultura de microrganismos) com aqueles do padrão de referência, cuja potência é conhecida. O principal uso dos doseamentos microbiológicos é na determinação da potência de substâncias inibidoras de crescimento (principalmente antibióticos) e de compostos promotores de crescimento (aminoácidos e vitaminas) (BOTELHO, LOURENÇO, PINTO, 2013). Tal potência é expresso como a razão entre o a dose que inibe o crescimento de um microrganismo sensível, em relação à dose de substância padrão que produz inibição similar (LEONEL, SOARES e SIQUEIRA, 2012).

Existe uma variabilidade marcante nos reativos biológicos diferenciando dos reativos físico-químicos já que estes podem ser padronizados e fornecem resultados parecidos em todos os laboratórios, fato que se torna impossível com os reativos biológicos. Esse fato faz com que torne imprescindível o emprego de padrões de referência adequados para se obter potências relativas e o emprego de métodos estatísticos para delineamentos experimentais e análise dos resultados (LOURENÇO, 2009).

Os estudos biológicos não requerem equipamentos especializados nem solventes de

Fundamentação Teórica

alta toxicidade. Sendo assim, testes microbiológicos são geralmente escolhidos para eliminar questionamentos a respeito de uma possível perda da atividade (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

3.4.3. Métodos Biológicos Utilizados no Doseamento de Antibióticos.

As farmacopeias, em geral, preconizam dois métodos para realização de doseamentos microbiológicos de antibióticos: o método por difusão em ágar e o turbidimétrico. Vários antibióticos têm os dois métodos descritos, apresentando a vantagem de poder ser escolhido o método que melhor se adequa a uma determinada situação (SOLANO et al., 2011).

O primeiro se baseia na difusão do antibiótico contido em um cilindro vertical, através de uma camada de ágar solidificado em uma placa de Petri, em uma extensão tal, que o crescimento do microrganismo agregado se detenha em uma área circular ou “halo de inibição” ao redor do cilindro que contém a solução do antibiótico. Já o método turbidimétrico se baseia na inibição do crescimento de um cultivo microbiano em uma solução uniforme do antibiótico, em um caldo que favorece o seu rápido crescimento na ausência desse fármaco (ESMERINO et al, 2004).

Os métodos prescritos nas farmacopeias tem sofrido transformações com o passar do tempo, principalmente no que diz respeito à natureza do diluente, microrganismo teste e inóculo empregado, concentração da curva padrão e composição do meio de cultura, embora o fundamento tem permanecido o mesmo (TRAPLE et al., 2013).

3.4.3.1 Método difusão em ágar

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é utilizado como revelador e utilizado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relacionando o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo, e desafiando com a concentração da substância ensaiada (OSTROSKY, 2009).

O método avalia a capacidade de um dado microrganismo de se multiplicar na presença de concentrações presumíveis de uma substância antimicrobiana aplicado no interior de um cilindro, sobre uma camada do ágar em uma placa de petri. O antimicrobiano se difunde no ágar, em concentrações decrescentes, e a cepa bacteriana semeada cresce até

Fundamentação Teórica

encontrar a concentração inibitória mínima, e a partir do ponto de aplicação se forma um halo de inibição ao redor do cilindro. Esse halo é determinado em milímetros e é diretamente proporcional à concentração da substância antimicrobiana. Assim, à medida que se aumenta a concentração do antimicrobiano, são obtidos halos maiores, até que se esgote a capacidade de difusão do antimicrobiano no ágar. Nesse ponto, o aumento na concentração da substância antimicrobiana não mais aumenta o halo de inibição (FARAGO et al., 2006).

Os estudos envolvendo ensaios de difusão para antibióticos eram inicialmente restritos, não permitindo extrapolações abrangentes aos novos antibióticos que surgiram. Assim, justificava a investigação dos fatores de interferências sobre zonas de inibição e tratamento teórico quanto a inclinação das curvas dose-resposta (SOLANO et al., 2011).

Em 1930, Friedman estudou a difusão de algumas substâncias em ágar e verificou que alguns fatores influenciavam no processo de difusão como a concentração de ágar, a adição de algumas substâncias (como glicerol) ao meio de cultura e o peso molecular do difusor.

Em estudo realizado Cooper e Woodman, em 1946 consideraram a constituição do meio, volume do cilindro, espessura do ágar e temperatura de incubação como sendo fatores que determinam a otimização do ensaio. Essas considerações foram estabelecidas utilizando clortetraciclina e *Bacillus cereus*, quando a temperatura de incubação e nível de nutrientes no meio de cultura foram inferiores aos normalmente utilizados, os halos de inibição.

Em 1949, Mitchison e Spicer empregaram tubos contendo ágar nutriente inoculado com *S. aureus* NCTC 7361 para determinar a potência de estreptomicina em líquidos corporais. Neste estudo, assim como o de Friedamn, foram testados alguns fatores que poderiam influenciar o doseamento de antibióticos, como pH do líquido ensaiado e a concentração do inóculo empregado. A difusão nesse caso foi dita linear e descrita pela equação de Fick. Os autores concluíram que tanto a teoria quanto a prática demonstraram que o quadrado da profundidade da zona de inibição apresentou uma relação aproximadamente linear com o logaritmo da concentração de estreptomicina.

Humphrey e Lightbown (1952) consideraram que a difusão do antibiótico em placas de Petri, a partir de recipientes colocados na superfície do meio de cultura, bem como a espessura da camada de ágar. Pode-se expressar a concentração do antibiótico ao redor do cilindro onde o mesmo é colocado através de uma equação envolvendo a concentração inicial a uma dada distância, a espessura da camada de ágar, a constante de difusão e o tempo envolvido. Dai a importância de procedimentos técnicos padronizados durante o experimento para garantir a resultados fidedignos, ocorrendo o mínimo de alteração possível.

Fundamentação Teórica

Nesse estudo foi percebido que quando camadas do meio com espessura menor que 1 cm foram utilizadas, o tamanho das zonas de inibição de crescimento apresentava menor sensibilidade a variações deste elemento. A validade desta equação foi confirmada pela medida da constante de difusão da penicilina, estreptomicina e da concentração crítica dessas substâncias para inibir os microrganismos reveladores. Foram determinados os valores do tamanho do halo de inibição de crescimento após variar o período de difusão. Além disso, foi observado que os fatores determinantes na inclinação da curva dose-resposta é a constante de difusão do antibiótico e o tempo, pois quando prolongado poderia aumentar a inclinação da reta.

Finn (1959) apresentou uma revisão onde relatou a teoria de difusão e sua aplicação em análise de antibiótico, detectando erros e interferências de natureza técnica. Esse autor estabeleceu dois tipos de difusão onde um tipo estava relacionado com a concentração da substância e no outro essa difusão estava relacionada com a quantidade da substância difusa, apresentando assim, dois métodos, sendo um por difusão linear (unidimensional) e outro por difusão radial(multidimensional). Os resultados mostraram que o método de difusão linear apesar de ser mais simples, apresentou resultados mais inadequados do que o método de difusão radial, sendo esse último, portanto, o mais indicado, pois a concentração do antibiótico nos cilindros foi considerada constante durante as primeiras 8 horas.

A teoria de Cooper e Wodman (1946) baseou-se na difusão linear. E depois algumas equações foram propostas, todavia apresentaram desvantagens por considerar a difusão do antibiótico através de meio de cultura homogêneo, desprezando a partição entre as fases líquidas e sólida, respectivamente da solução e do ágar, mesmo assim os autores ainda afirmam que as equações proporcionam base teórica para a equação de Copper, apresentando-se vantajosos devido a praticidade de sua forma simplificada.

3.4.3.2. Método turbidimétrico

No método turbidimétrico, o meio de cultura líquido é inoculado com microrganismo teste e concentrações seriadas da amostra e do padrão do fármaco, as quais são adicionadas para permitir o contato entre o meio e a solução. A resposta do microrganismo teste a ação do antimicrobiano é evidenciada pela alteração da turvação do meio de cultura, sendo medida em espectrofotômetro. Os resultados obtidos para as soluções da amostra são comparados aos do padrão, permitindo assim, a determinação da concentração ativa do fármaco presente no

produto (TRAPLER, 2013)

O método de turbidimetria apresenta a vantagem de ser mais sensível que o por difusão em ágar, já que responde às concentrações menores de antibiótico. Por outro lado, tem desvantagens como: soluções turvas e coloridas interferirem na determinação da resposta; a necessidade das soluções da amostra e do padrão estarem estéreis; a interferência causada pela presença de substâncias inibidoras e ativadoras de crescimento microbiano, como por exemplo, solventes orgânicos utilizados em processos extrativos e substâncias presentes na amostra (LOURENÇO; PINTO, 2009; SOLANO, 2012).

Considerando a exatidão e precisão do método turbidimétrico em relação ao de difusão em ágar, esse apresenta uma maior vantagem. Esse ensaio apresenta inclinação da curva padrão adequado na faixa de absorvância entre 0,4 a 1,2. Destacando-se também a importância da seleção de espectrofotômetro usado para medir o crescimento bacteriano com a finalidade de assegurar medidas exatas (SOLANO, 2009).

Alguns equipamentos fotométricos, em particular aqueles que permitem o uso de microplacas com leitura cinética, são considerados de grande utilidade e versatilidade para laboratórios de microbiologia, tendo aplicado em ensaios cromogênicos, imunogênicos e turbidimétricos. A leitura cinética envolve as medidas de melhoramento dos parâmetros como densidade óptica, fluorescência ou bioluminescência observados na solução ou suspensão analisada a intervalos de tempo crescentes. O emprego do método de microplacas com leitura cinética para dosagem de antibióticos apresenta um grande interesse, uma vez que proporciona reduzir a quantidade de material e tempo de análise necessário e permite o doseamento de inúmeras amostras ao mesmo tempo com leituras e cálculos automatizados (SOLANO, et al., 2012; LOURENÇO; PINTO, 2011).

3.4.4. Análise estatística aplicada a doseamento de antibióticos

A análise estatística de tais experiências exige o estabelecimento de uma relação matemática das respostas médias (y), com as concentrações crescentes (tratamentos) ou doses de antibiótico. A maioria dos modelos utilizam linhas paralelas, em que todos os padrões de referência (S) e preparações desconhecidas devem ser testados com o mesmo número de doses (LEONEL, SOARES E SIQUEIRA, 2012).

O cálculo de potência se baseia na análise de duas linhas retas, uma referente às respostas da solução padrão e outra referente as respostas da soluções testes. Essas linhas são

Fundamentação Teórica

obtidas traçando em um plano cartesiano, onde os diâmetros dos halos de inibição estão em função da concentração da substância em questão (HEWITT, 2007; FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2011) O método dos mínimos quadrados é o mais utilizado para verificar a linearidade das curvas, e, por conseguinte, verificar se a resposta do padrão de referência é a mesma das respostas desconhecidas. Este método é ainda baseado no pressuposto de que as respostas seguem uma distribuição normal (FARIAS et al, 2008).

A determinação da potência antimicrobiana pode ser realizada empregando-se o delineamento 5x1, conforme descrito na Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIAL, 2009) em que se empregam quatro concentrações da amostra para obtenção da curva analítica e uma da preparação do padrão. Portanto, é um ensaio assimétrico. Foi classificado por Hewitt (2007) e Pinto (2010), como sendo um ensaio de retas paralelas devido à base do cálculo ser a mesma do ensaio de retas paralelas: a resposta, ou halo de inibição deve ser diretamente proporcional à concentração correspondente.

Neste delineamento cada placa contém apenas dois tratamentos: a solução do padrão correspondente à concentração intermediária da curva analítica e uma das outras quatro soluções do padrão ou a solução da amostra teste. Devido à variação entre as placas, as respostas do padrão devem ser corrigidas a partir da resposta da solução de referência presente em todas as placas (PINTO, KANECO e PINTO, 2010).

O procedimento de correção do U.S. Food and Drug Administration (FDA) consiste em calcular a média das respostas de todas as placas para cada concentração do padrão ; a média da solução de referência para cada nível de concentração e a média de todas as respostas da solução de referência.

As respostas corrigidas são empregadas para obtenção da curva analítica. O método da farmacopéia americana (UNITED STATES PHARMACOPEIAL, 2009) consiste em calcular as respostas para as concentrações mais baixa e mais alta da curva, a partir das respostas corrigidas de todas as concentrações. A inclinação da reta resultante da união desses dois pontos será utilizada no cálculo da potência. A partir deste procedimento, não é possível avaliar o ajuste dos dados ao modelo linear proposto.

A farmacopéia mexicana, 2004, Hewitt (2007) e Pinto, Kaneco Pinto, 2010 apresentam um cálculo em que se faz a correção individual dos halos e todas as respostas são empregadas para obtenção da curva analítica, o que permite avaliar se o modelo é adequado.

Em 1979, Kavanagh empregou o delineamento 5x1 para o doseamento de cefalexina e avaliou a forma de correção das respostas segundo o método do FDA. Ele verificou que este

Fundamentação Teórica

procedimento não acarreta erro somente quando a média do diâmetro da solução de referência for idêntica ao ponto central da melhor curva analítica. Quando a correção foi realizada tanto nos halos do padrão quanto da amostra, a estimativa da potência a partir da equação de regressão evitou estes erros (SOLANO, 2009).

Para ensaios de antibióticos com delineamento experimental é requerido um conhecimento de vários métodos farmacopéicos, uma familiaridade com hipóteses estatísticas, e uma interpretação correta dos parâmetros de validação. É importante ressaltar que ensaios microbiológicos de antibióticos são realizados, entre outros motivos, em estudos de equivalência farmacêutica e para fins de registro ou renovação de registro dos medicamentos genéricos. No Brasil, com o advento da política de medicamentos genéricos estabelecidos em 1999, a agência reguladora admite muitos compêndios farmacêuticos estrangeiros como referências oficiais para o controle de qualidade de matérias-primas e produtos farmacêuticos, na ausência de uma monografia na Farmacopéia Brasileira (LEONEL, SOARES E SIQUEIRA, 2012).

3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um método pode também ser entendida como um processo, baseado na obtenção, documentação e análise de dados, os quais permitem tanto descrever o mesmo de forma detalhada, como identificar e controlar os fatores de variação. O objetivo último da validação é assegurar a reprodutibilidade dos resultados e o estabelecimento de limites de aceitação do erro analítico, através da aplicação sistemática de testes de precisão e exatidão (RIBEIRO et al., 2008). Sendo assim, antes de um método analítico ser implementado na rotina, deve primeiro ser validado para demonstrar que é adequado para seu propósito (ROZET et al, 2007).

Portanto, a validação de um método assegura a especificidade, exatidão e precisão de um ensaio analítico e estima a estabilidade do analito durante a estocagem e manipulação, tendo como objetivo garantir que o procedimento analítico forneça resultados reprodutíveis e confiáveis, que sejam adequados aos fins para os quais tenha sido planejado (LAVRA et al., 2008).

Algumas resoluções e compêndios oficiais foram publicados, tratando sobre a validação de métodos analíticos. No Brasil, a resolução RE nº 899 de 2003, apresenta-se como um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Além dessa, existem guias

Fundamentação Teórica

do *Food and Drug Administration* (FDA), da *International conference on harmonisation* (ICH), do Instituto Nacional de metrologia (INMETRO), da Association of official analytical chemical (AOAC) e outros.

O processo de validação deve ser aplicado a métodos novos ou aqueles descritos em compêndios oficiais, que tenham sido utilizados com algumas alterações. Sendo assim, a escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para o procedimento do controle de qualidade de uma substância ativa ou forma farmacêutica. A validação de um método analítico não significa que este possa ser aplicado sem restrições para diferentes medicamentos com o mesmo princípio ativo, uma vez que os resultados das análises são influenciados por inúmeros fatores como: a estrutura química do fármaco; o nível das doses terapêuticas, e as diferenças nas fórmulas de um laboratório para outro. Para cada caso há necessidade de resultados experimentais evidentes, que garantam a funcionalidade do método, bem como do tratamento analítico adequado, da avaliação estatística dos resultados e da definição dos critérios de aceitação (VALENTINI, SOMMER, MATIOLI, 2007).

Segundo a Resolução nº 899 de maio de 2003, os testes são classificados em quatro categorias conforme seu objetivo (Tabela 2) e os parâmetros a serem avaliados durante o processo de validação dependem de sua classificação (Tabela 3) (BRASIL, 2003).

3.5.1 Parâmetros de Validação

3.5.1.1. Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). A legislação brasileira não distingue o conceito de especificidade e seletividade. Pode ser demonstrada comparando os resultados dos testes de amostras contendo impurezas ou produtos de degradação, ou ainda através do placebo, com valores encontrados após análise da amostra sem os interferentes (ROZET, 2007).

Segundo o INMETRO (2003), um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. Como poucos métodos respondem somente a um analito, o termo seletividade ao invés de especificidade deve ser utilizado para a maioria dos casos de metodologias analíticas.

Fundamentação Teórica

Tabela 2. Classificação dos testes segundo sua finalidade.

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).
IV	Testes de identificação

Fonte: Brasil, 2003

Tabela 3. Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Repetibilidade					
Precisão Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: Brasil, 2003.

(*) pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

(**) se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

3.5.1.2. Linearidade

A linearidade é a propriedade que o método tem de produzir resultados que são diretamente, ou através de transformações matemáticas, proporcionais à concentração da substância em análise na amostra, dentro de uma variação determinada. Este atributo da validação pode ser estabelecido pela avaliação visual de um diagrama de sinais em função da concentração ou conteúdo analisado. Havendo uma relação linear, os resultados da análise devem ser avaliados com base em apropriados métodos estatísticos, como por exemplo, o método dos quadrados mínimos (VALENTINI, SOMMER, MATIOLI, 2007).

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é: $y = ax + b$, onde y é a resposta medida (absorbância, halo de inibição, altura ou área do pico, etc), x é a concentração da solução, a é a inclinação da curva de calibração (sensibilidade) e b é a intercessão com eixo y (quando $x=0$).

A RDC 899, afirma que no mínimo seis diferentes concentrações do analito devem ser utilizadas para obtenção da curva analítica no caso de métodos bioanalíticos. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados como o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Para as curvas obtidas, devem ser calculados o coeficiente de correlação linear, o coeficiente angular e o intercepto da reta. Como critério de avaliação, o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003).

Quando o método dos mínimos quadrados ordinário é utilizado, alguns requisitos devem ser cumpridos: as variâncias das respostas nos diferentes níveis de concentração devem ser homogêneas e os resíduos independentes. A normalidade dos resíduos deve ser comprovada para que a análise de variância seja utilizada na análise de regressão. Desta forma, testes estatísticos são empregados para comprovar tais premissas. Além disso, o teste de desvio de linearidade também é realizado com o objetivo de verificar se o modelo linear é adequado. Assim, não somente o coeficiente de correlação (r) é empregado na avaliação da curva analítica (MONTGOMERY et al, 2001; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005).

3.5.1.3. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados por ele obtidos comparados ao valor verdadeiro ou teórico. Estes resultados são calculados pela diferença

Fundamentação Teórica

entre o valor da concentração considerado como verdadeiro e o valor experimental, obedecendo a intervalos de segurança (VALENTINI, SOMMER, MATIOLI, 2007).

Deve ser determinada utilizando, no mínimo, três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, cinco determinações por concentração. É preconizado que seja determinada a exatidão intra e interdias, e a variação máxima permitida é de $\pm 15\%$ do valor de referência, exceto para o limite quantificação, cuja variação é de $\pm 20\%$. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2003).

A determinação da tendência total com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos. A tendência pode ser expressa como recuperação analítica (valor observado/valor esperado). A tendência deve ser corrigida ou demonstrada ser desprezível, mas em ambos os casos, a incerteza associada com a determinação da tendência permanece como um componente essencial da incerteza global. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são entre outros: uso de materiais de referência, comparação de métodos, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (LOURENÇO, 2009).

A proximidade dos resultados encontrados ao valor aceito como verdadeiro é resultante da soma de erros sistemáticos e randômicos ou aleatórios, isto é, do erro total associado ao resultado. Portanto, a exatidão é estudada como duas componentes: veracidade - trueness (bias) e precisão (desvio padrão) (HUBERT et al, 2007; ROZET et al, 2007).

3.5.1.4. Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra em condições definidas. A precisão é geralmente expressa como desvio padrão (dp) ou desvio padrão relativo (DPR) (SOLANO, 2010).

A precisão é o grau de concordância entre os resultados de cada teste quando aplicado repetidamente a várias amostragens de uma mesma amostra. A partir dos valores obtidos, são calculados a média e o Desvio Padrão (DP), determinando-se o Coeficiente de Variação (CV), expresso em termos de percentagem de uma série de medidas, nas quais duas delas podem ser a reprodutibilidade e a repetibilidade do método analítico sob condições normais de operação.

Fundamentação Teórica

Neste contexto, a reprodutibilidade refere-se ao uso de procedimentos analíticos em diferentes laboratórios, diferentes analistas e em diferentes dias, enquanto que a repetibilidade refere-se ao uso de procedimentos analíticos num curto espaço de tempo utilizando os mesmos analistas e os mesmos equipamentos. Para inúmeros propósitos, a repetibilidade é o critério que interessa em um método analítico oficial (VALENTINI, SOMMER, MATIOLI, 2007).

3.5.1.5. Sensibilidade do método: o Limite de detecção (LD) e o Limite de quantificação (LQ)

A sensibilidade de um método é definida pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O LD é a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental, enquanto o LQ é a mais baixa concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método durante as operações de rotina do laboratório, em condições usuais. Uma das formas de estimar os limites de detecção e de quantificação é levando em consideração a técnica analítica utilizada e o grau de confiabilidade estatística necessária: método visual, método da relação sinal-ruído, e método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBEIRO et al., 2008).

3.5.1.6. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

A robustez de um método pode ser estimada variando-se os parâmetros analíticos e comparando a precisão obtida em cada determinação. A ANVISA (RDC 89/03) e o ICH indicam uma lista de parâmetros a serem avaliados nos testes de robustez de metodologias analíticas para as técnicas de preparo de amostras, espectrofotometria, cromatografia líquida e cromatografia gasosa.

3.6. ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO APLICADOS A FITOTERAPICOS.

Matérias- primas vegetais como plantas e seus derivados (extratos, tinturas, óleos essenciais ou produtos secos) têm sido largamente empregadas em farmácias magistral e estabelecimentos de produção industrial.

O estudo inicial para o desenvolvimento de um novo medicamento é denominado de pré-formulação. Esta fase de desenvolvimento é caracterizado como a avaliação das propriedades físico-químicas do fármaco isolado ou associado a diversos excipientes farmacêuticos, sendo a eficácia e segurança do medicamento desenvolvido, dependente de criteriosos estudos de pré-formulação e produção em concordância com as boas práticas de fabricação (BPF), visando a adequada biodisponibilidade da substância ativa (ALLEN JÚNIOR, 2007).

Todo fitoterápico, assim como todo fármaco possui características químicas e físicas importantes que precisam ser estudadas antes de sua incorporação em um veículo farmacêutico. Entre estes parâmetros, estão a solubilidade, coeficiente de partição, velocidade de dissolução, forma física de apresentação e estabilidade (ANSEL et al, 2000), que poderão ser avaliados através de metodologias como: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia na região do infravermelho (IV), termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) entre outros (SILVA JÚNIOR, 2006).

Assim, para a realização dos estudos de pré-formulação torna-se indispensável a realização de estudos de estabilidade do fármaco ou droga na presença de adjuvantes, pois o fármaco/droga e os adjuvantes devem ser compatíveis uns com os outros para produzir um medicamento, ou seja, estável, eficaz, atrativo, fácil de administrar e seguro.

Com os resultados dos estudos de pré-formulação elabora-se um informe que definirá a viabilidade da forma farmacêutica proposta e a metodologia a ser seguida no desenvolvimento na fase de formulação e elaboração (NUNES et al., 2009).

3.6.1 Técnicas analíticas aplicadas no desenvolvimento, avaliação e controle da qualidade de fitoterápicos.

3.6.1.1. Espectroscopia no infravermelho.

A espectroscopia na região do infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção que usa a região do infravermelho no espectro eletromagnético. Assim como, as demais técnicas espectroscópicas, ela pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra, e se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (VIANNA-FILHO, et al., 2013).

A radiação infravermelha corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. A porção de maior utilidade para a química orgânica está situada entre 4000 e 400 cm^{-1} faixa que se converte, quando absorvida por uma molécula orgânica, em energia de vibração molecular. O processo é quantizado, como uma série de bandas, pois cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças de níveis de energia rotacional (SILVERSTEIN et al. 2007).

O espectro no infravermelho de um composto químico é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características e, por conta disto, a espectroscopia na região do infravermelho tem extensa aplicação na identificação de compostos. Atualmente, esse tipo de espectroscopia é largamente usada tanto na indústria quanto na pesquisa científica pois ela é uma técnica rápida e confiável para medidas, controle da qualidade e análises dinâmicas (VIANNA-FILHO, et al., 2013).

A Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica de análise para colher o espectro infravermelho e acumular maior quantidade de dados. Pois, ao invés de se coletar os dados variando-se a frequência da luz infravermelha (IV) a cada comprimento de onda, essa luz (com todos os comprimentos de onda da faixa usada) é guiada através de um interferômetro. Depois de passar pela amostra o sinal medido é o interferograma. Realizando-se uma transformada de Fourier no sinal resulta-se em um espectro idêntico ao da espectroscopia IV convencional (dispersiva). Esta técnica espectroscópica complementar pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra (NUNES et al., 2009).

Fundamentação Teórica

Os dados de análise em infravermelho além de fornecer características estruturais do material ativo, também auxiliam na seleção de componentes da formulação. Dependendo da natureza química da substância em estudo, há várias opções de instrumentos analíticos que podem auxiliar no estudo de pré-formulação e doseamento como: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG), ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , análise térmica, etc. Com isso, a espectroscopia na região do IV auxilia nos estudos de pré-formulação, na qual as características químicas de cada excipiente podem ser avaliadas isoladamente e/ou em associação com o ingrediente ativo farmacêutico (SILVA JÚNIOR, 2006; ALVES, 2008; NUNES, 2009).

3.6.1.2. Análise térmica

Análise térmica é um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura. Os métodos térmicos têm sido utilizados na determinação do ponto de fusão de uma substância pura, estudo de interação fármaco/excipientes, caracterização de polimorfismo, na avaliação da cinética de reação, estabilidade e decomposição, entre outros. Sendo que os métodos mais empregados são: Termogravimetria (TG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) (COSTA et al., 2013).

As técnicas termoanalíticas possuem importância crescente em todas as áreas de conhecimento da química básica e aplicada. A utilização dessa metodologia, dotada de grande potencialidade, foi favorecida pela disponibilidade de instrumentos controlados por microprocessadores, capazes de fornecer informações quanto ao comportamento térmico dos materiais de forma precisa e num tempo relativamente curto. Tais métodos estão sendo largamente utilizados no controle da qualidade de produtos naturais ou sintéticos, pois fornecem, com rapidez, dados sobre a estabilidade do material analisado, em relação ao seu comportamento térmico. Além de que dados preliminares sobre o material analisado, levam a pensar que se conhecendo o comportamento térmico do componente majoritário de uma planta, pode-se identificar a autenticidade de um extrato bruto (CAMELO, et al., 2012).

Portanto pode-se afirmar que são extensas as aplicações da análise térmica na indústria farmacêutica em torno da investigação físico-química de produtos. Por isso, tem sido extensivamente utilizada como ferramenta analítica confiável e essencial para o controle da qualidade e desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, bem como para o estudo

da estabilidade, compatibilidade e das possíveis interações entre fármacos e excipientes e suas misturas, contribuindo dessa forma para estudos de pré-formulação (ALVES et al., 2011).

3.6.1.2.1 Termogravimetria (TG)

Termogravimetria é a técnica na qual a mudança da massa de uma substância é medida em função da temperatura, enquanto esta é submetida a uma programação controlada. Esta técnica determina as perdas ou ganhos de massa de uma substância em função da temperatura ou do tempo. Os experimentos para avaliar as variações de massa de um material em função da temperatura são executados através da termobalança, permitindo o trabalho sob as mais variadas condições experimentais. As curvas geradas possibilitam a obtenção de informações quanto à estabilidade térmica da amostra, composição e estabilidade dos compostos intermediários e do produto final (ARAÚJO, 2003; AMICO, et al, 2011).

Nas curvas termogravimétricas convencionais ou dinâmicas são registradas as massa da amostra (m) em função da temperatura (T) ou tempo (t). Nessas curvas, os graus em relação ao eixo das ordenadas correspondem às variações de massa sofrida pela amostra e permitem a obtenção de dados que podem ser utilizados com finalidades quantitativas (COSTA, 2013).

3.6.1.2.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

DSC é a técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, termicamente inerte em função da temperatura, enquanto a substância e a referência são submetidas a uma programação controlada de temperatura. De acordo com o método de medida utilizado, há duas modalidades: calorimetria exploratória diferencial com compensação de potência e a calorimetria exploratória diferencial com fluxo de calor (CORDOBA, 2011).

Na DSC com compensação de potência, a amostra e a referência são aquecidas em compartimentos distintos, assim é possível mantê-las em condições isotérmicas. Neste caso, a amostra sofre variações de temperatura devido a eventos endotérmicos ou exotérmicos em função do aquecimento ou resfriamento, ocorre uma modificação na potência de entrada do forno correspondente, proporcionando a anulação desta diferença (ANDRADE et al., 2007).

Na DSC com fluxo de calor, a amostra e a referência são colocadas em cadinhos

Fundamentação Teórica

idênticos, localizados sobre um disco termoeletrico e aquecidos por uma única fonte de calor. Assim, o calor é transferido através do disco para amostra e referência, sendo que o fluxo de calor diferencial entre ambas é monitorado por termopares localizados abaixo dos cadinhos. Dessa forma, a diferença no fluxo de calor da amostra e da referência é diretamente proporcional à diferença de potência das junções dos termopares (OLIVEIRA,et al., 2011).

Com base nos conceitos e aplicações de cada técnica, a pequena quantidade de amostra utilizada, a rapidez de resultados, a limpeza da técnica e a possibilidade de visualização do seu perfil termoanalítico, fazem dessas técnicas, ferramentas úteis no estudo de padronização das matérias-primas vegetais e ensaios de pré-formulação para o desenvolvimento tecnológico de medicamentos fitoterápicos (ARAGÃO et al., 2002; NUNES, et al., 2009).

REFERÊNCIAS

ALLEN Jr, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2007.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; MAIA, M. B. S. Medicinal plants popularly used in the Xingó region – a semi-arid location in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. v. 2, n. 15, 2006.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; RAMOS, M. A.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.127 pp. 674–684, 2010.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; RAMOS, M. A.; SILVA, R. R. V.; MELO, J. G.; MEDEIROS, M. F. T.; ARAÚJO, T. A. S.; ALMEIDA, A. L. S.; AMORIM, E. L. C.; ALVES, R. R. N.; ALBUQUERQUE, U. P. Intracultural Variation in the Knowledge of Medicinal Plants in an Urban-Rural Community in the Atlantic Forest from Northeastern Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Volume 2012, doi:10.1155/2012/679373, 2012.

ALVES, A.R.; SILVA, M.J.P. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**. v. 37, n. 4, p. 85-91, 2003.

ALVES, M. S. M. ; MENDES, P. C. ; JARDIM, M. A. G. ; VIEIRA, J. G. P. ; COSA, R. M. R. ; BARBOSA, W. L. R. ; SILVA JUNIOR, J. O. C. . Physicochemical and Phytochemical of *Arrabidaea chica* (H & B) Verlot. Leaf Power and Standardized Tincture. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 30, p. 804-804, 2011.

ALVES, M.S.M. **Caracterização farmacognóstica, química, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação da *Arrabidaea chica* (HUBM. & Bonpl) B. Verlt.** 2008. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

AMICO, S.C.; FREITAGI, C.P.M.; RIEGELII, I.C.; PEZZINIII, S.H. Efeito da incorporação de talco nas características térmicas, mecânicas e dinâmico-mecânicas de poliuretanos termoplásticos. **Revista Matéria**, v. 16, n. 1, p. 597 – 605, 2011.

ARAGÃO, C. F. S. Desenvolvimento de metodologias analíticas para a padronização de extratos de *Cissampelos sympodialis Eichl* (milona). 225 p. **Tese (doutorado)** – Universidade Federa da Paraíba. João Pessoa. 2002.

ASRES K, BUCAR F, KARTNIG T, WITVROUW M, PANNECOUQUE C, DE CLERCQ E. Antiviral Activity Against Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) and Type 2 (HIV-2) of Ethnobotanically Selected Ethiopian Medicinal Plants. **Phytother. Res**. v. 15, p. 62–69, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC**. 16.ed. v.1, Arlington,pt.1, p.18, 1995.

BARRETO,L.V.; FEITOSA,M.S.C.A; ARAÚJO, J. T; CHAGAS, K.F.; COSTA, K.L.; Acción antimicrobiana *in vitro* de dentífricos conteniendo fitoterápicos. **Revista. Avances em Odontoestomatología**. Vol. 21, n. 4 ,2005.

BAYER H.; EY, N.; WATTENBERG, A.;VOSS, C.; BERGE, M. Purification and characterization of riproximin from *Ximenia americana* fruit kernels. **Protein Expression and Purification**. v. 08. p 97–105, 2012.

BOTELHO, T. S; LOURENCO, F. R ; PINTO, T.JA. Vancomycin Microbial Assay Using Kinetic-Reading Microplate System. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 9, p. 172-176, 2013.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceara**. 3. ed. Mossoró: ESAM. 1976.540 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução- RDC, nº 48, de 16 de março de 2010**. Dispões sobre normas de registro de medicamentos fitoterápicos. Diário oficial da república federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 de Março de 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução- RDC, nº 48, de 16 de março de 2010** Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto a ANVISA.Diário oficial da república federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 de Março de 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução- RDC, nº 899, de 29 de maio de 2003**. Dispões sobre o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial da república federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de Junho de 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 391, de 9 de agosto de 1999**. Dispões que estabelece as bases legais para concessão de registro de medicamentos genéricos; Diário oficial da república federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 de agosto de 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Brasília: Anvisa,p.126, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.60 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico**. Brasília, 2007. 35p.

BRASILEIRO, M.T.; EGITO, A.A. ; LIMA, J.R. ; RANDAU, K.P.; PEREIRA, G.C.; ROLIMNETO, P.J. *Ximenia americana* L.: botânica, química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmácia**. v.89, n.2, p. 164-7, 2008.

British Pharmacopeia Volume III, 2009.

BURKILL, H.M. **The Useful Plants of West Tropical Africa, Families M-R**, 2nd ed. Royal Botanic Gardens, Kew, 1997.

CAMELO, S. R. P. ;, R. S. ; VASCONCELOS, F. ; TEIXEIRA, F. M. ; RIBEIRO-COSTA, R. M ; BARBOSA, W. L. R. ; SILVA JUNIOR, J. O. C. . Physicochemical Characterization and Quantification of Total Anthraquinones of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, p. 2064-2070, 2012.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** 131, p. 326–342 (2010).

CARVALHO A.C.B. Regulação brasileira em plantas medicinais e fitoterápicos. **Fitos**, v.7, p.6-16, 2012.

CARVALHO ACB; BALBINO EE; MACIEL A; PERFEITO, JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. V. 18, n. 2, 2008.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; MAHMUD, N.S.; SHUQAIR, S. A.L.Q.; NETTO, E. M. Aspectos da Legislação no Controle dos Medicamentos Fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v. 5, n.11, 2007.

CHAVES, E.M.F.; BARROS, R.F.M. Diversidade e uso de recursos medicinais do carrasco na APA da Serra da Ibiapaba, Piauí, Nordeste do Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.14, n.3, p.476-486, 2012.

COOPER, K., WOODMAN, D. The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup assay method of estimating the activity of penicillin. **J. Pathologic and Bacteriologic.**, v. 58, p. 75-84, 1946.

CORDOBA. A. Y. M. Estudo da combustão direta da glicerina bruta e loira como alternativa de aproveitamento energético sustentável. Escola de Engenharia. Universidade Estadual de São Paulo. **Tese de doutorado**. 2011.

COSTA, E. M. M. B. BARBOSA, A.S.; ARRUDA, T.A.; OLIVEIRA, P.T.; DAMETTO, F.R.; CARVALHO, R.A.; MELO, M.D. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2011.

COSTA, J.G M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; PEREIRA, C.K.B.; SOUZA, E.O.; CALDAS, G.F.R.; SILVA, M.R.; SANTOS, M.L.M.; SANTOS, P.F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton*

zehntneri (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 18, n. 4, p. 583-586, Out./Dez, 2008.

COSTA, R.S.; NEGRÃO, C.A.B.; CAMELO, S.R. P.; COSTA, R. M. R.; BARBOSA, W.L. R.B.; COSTA, C. E. F.; SILVA-JÚNIOR, J. O. C. Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. **J Therm Anal Calorim**, 111:1959–1964, 2013.

CUNHA, C.B.C.S.; BARCELOSS, R.; PRIMO, L.G.; Soluções irrigadoras e Materiais Obturadores Utilizados na Terapia Endodôntica de Dentes Decíduos. **Pesq. Bras. Odontoped Clin. Integr**, v. 5, n. 1, p. 75-83, 2005.

DOTTO, S. R.; TRAVASSOS, R. M. C.; FERREIRA, R. Avaliação da ação antimicrobiana de diferentes medicações usadas em endodontia. **Revista Odonto Ciência**, v. 21, n. 53, p. 266-69, 2006.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P.M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol.17, n.1, p. 06-08, 2009.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Revista Ciência e Cultura**. v.55, n.3, p. 35-36, 2009.

ESMERINO, L.A.; PEREIRA, A.V.; ADAMOWICZ, T.; BORGES, D. M.; TALACIMON, E.A. SCHELESKY, M. E. Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. **Ciência Biologia e Saúde, Ponta Grossa**, v.10 n. 1 53-60, 2004.

FARAGO, P. V.; ESMERINO, L. A.; PAULA, J. P.; JACOB, J. S.; SERVAT, L. Método Microbiológico para o Doseamento da Potência da Amoxicilina em Suspensões Oraís. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 1, p. 112-6, 2006.

FARIAS, MR; SCHENKEL, E. P.; BERGOLD, A. M.; PETROVICK, P. R. O Problema da Qualidade dos Fitoterápicos. **Caderno de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 73-82, 2008.
FARMACOPEA de los Estados Unidos mexicanos. 7.ed. Mexico: Secretaria da Salud, 2004.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4 ed. Editora Atheneu, 1988.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed. Editora Atheneu, 2010.

FERNANDEZ, A.; BEZERRA, P. **Estudo fitogeográfico do Brasil**. Fortaleza: Stylus comunicações, 1990.

FINN, R. Theory of agar diffusion methods for bioassay. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 6, p. 975 – 977, 1959.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 1749-57, 2009.

FRANCISCO, K. S. F. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**, v. 4, n.1, p. 18–24, 2010.

FRANCO, E.A.P.; BARROS, R.F.M. Uso e diversificação de plantas medicinais no quilombo olho d'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.8, n.9, p.78-88, 2006.

FRIEDMAN, L. Structure of agar gels from studies of diffusion. **The Journal of the American Chemical Society**, v. 52, n. 4, p. 1311 – 1314, 1930.

GEORGE, S.; KISHEN, A.; SONG, P. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. **Jornal of Endodontics** v. 31, p. 867–72, 2005.

GEYID, A.; ABEBE, D.; DEBELLA, A.; MAKONNEN, Z.; ABERRA, F.; TEKA, F.; KEBEDE, T.; URGA, K.; YERSAW, K.; BIZA, T.; MARIAM, B. H. & GUTA, M. Screening of medicinal plants of Ethiopia for their anti-microbial properties and chemical profiles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, pp. 421-427, 2005.

GONZÁLEZ-NÚÑEZ, D.; TREJO-QUIROZ, P.; DE LEÓN-TORRES, C., CARMONA-RUIZ, D. Non instrumented endodontic technique using CTZ paste. **Revista Portuguesa de Estomatologia**, v. 18, n. 2, p. 27-32, 2010.

HEWITT, W. **Microbiological assay – an introduction to quantitative principles and evaluation**. Academic Press, inc. Orland: , 284p, 1977.

HEWITT, W. **Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis: A Rational Approach**. 1 ed. INTERPHARM, 2007, 260p.

HUBERT, P.; NGUYEN-HUU, J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P.; COHEN, N.; COMPAGNON, P.; DEW'E, W.; FEINBERG, M.; LALLIER, M.; LAURENTIE, M.; MERCIER, N.; MUZARDI, G.; NIVET, C.; VALAT, L.; ROZET, E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, P. 70 81, 2007.

HUMPHREY, J.; LIGHTBOWN, J. A general theory for plate assay of antibiotics with some practical applications. **Journal Genétics Microbiologic.**, v. 7, p. 129 – 143, 1952.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, normalização e qualidade industrial – INMETRO DOQ-CGCRE-008 Revisão 1 – Março/2003 – Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos – Rio de Janeiro, 2003, 35p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH Topic Q2B Validation of analytical procedures: methodology. Geneva: ICH Secretariat, 1996, 9p.

JAMES, D. B.; ABU, E. A.; WUROCHEKKE, A. U. & ORGI, G. N. Phytochemical and Antimicrobial Investigation of the Aqueous and Methanolic Extracts of *Ximenia americana*. **Journal of Medical Science**. v. 7, N. 2, p. 284-288, 2007.

KANUMURU, N. R.; BOLLA, N.; KUMAR, R.; KULANDAIVELU, A. Evaluation of the bactericidal effect of Nd: YAG Laser on *Enterococcus faecalis* versus Calcium Hydroxide in the root canal system – An *in vitro* study. **Jornal of Endodontics**, v. 6, 2012.

KAVANAGH, F.W; RAGHEB, H.. Microbiological assays for antibiotics and vitamins: considerations for assuring accuracy. **Journal off Association of Analytical Chemists.**, v. 62, n.4, p. 943 – 950, 1979.

KONÉ WM, ATINDEHOU KK, TERREAUX C, HOSTETTMANN K, TRAORÉ D, DOSSO M. Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology** 93 p. 43–49. 2004.

KUBMARAWA D, AJOKU GA, ENWEREM NM, OKORIE DA. Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of 50 medicinal plants from Nigeria. **African Journal of Biotechnology**. v. 6, n.14, p. 1690-1696, 2007.

LAMIEN-MEDA A, LAMIEN CE, COMPAORÉ MMY, MEDA RNT, KIENDREBEOGO M, ZEBA B, MILLOGO JF, NACOULMA OG. Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Fourteen Wild Edible Fruits from Burkina. Faso. **Molecules**. v. 13, 581-594, 2008.

LAVRA, Z. M.M.; SÔNEGO, F.; SILVA, R.M.F.; MEDEIROS, F.P.M. Desenvolvimento e validação de método analítico para nistatina creme vaginal por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**. v. 44, n. 4, 2008.

LEONEL, M. F. V.; SOARES, C. D. V.; SIQUEIRA, A. L. Comparison of pharmacopeial statistical methods applied in microbiological assay for antibiotics potency determination using parallel lines and three-dose level. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.48, n.3, 2012.

LI, J.; NEKKA, F. A rational quantitative approach to determine the best dosing regimen for a target therapeutic effect: A unified formalism for antibiotic evaluation. **Journal of Theoretical Biology**. v. 319, p.88–95, 2013.

LIMA, M, R.; SANTOS, M, R, A.; Aspectos Etnobotânicos da Medicina Popular no Município de Buritis, Rondônia. **Revista Fitos**. v.2, n. 2, p. 36-41, 2006.

LIMA, R. K. P.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; FARIA-JÚNIOR, N. B.; TANOMARU-FILHO, M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 45, p. 311–6, 2012.

LOURENÇO, F.R.; PINTO, T.J.A. Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 47, n. 3, 2011.

LOURENÇO, F.R.; PINTO, T.J.A. Comparison of three experimental designs employed in gentamicin microbiological assay through agar diffusion. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 45, n. 3, 2009.

MADHUBALA, M. M.; SRINIVASAN, N.; AHAMED, S. Comparative Evaluation of Propolis and Triantibiotic Mixture as an Intracanal Medicament against *Enterococcus faecalis*. **Jornal of Endodontics**, v. 37, n. 9, 2011.

MAGASSOUBA, F.B.; DIALLO, A.; KOUYAT'E, M.; MARA, F.; MARA, O.; BANGOURA. O; CAMARA, A.; TRAOR'E, S.; DIALLO, A.K; ZAORO. M; LAMAH. K;

DIALLO, S.; CAMARAS, G.; TRAOR'E. S.; K'EITA, A.; CAMARA, M.K.; BARRY, R.; K'EITA, S.; OULAR'E, K.; BARRY, M.K; DONZO, M.; CAMARA, K.; TOT'E. K.; VANDEN BERGHE, D.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; BALD'E, A.M. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology** vol. 114 p.44–53, 2007.

MAIKAI V.A.; MAIKAI B.V.; KOBO, P. I.; Antimicrobial Properties of Stem Bark Extracts of *Ximenia Americana*. **Journal of Agricultural Science** v. 1, n 2, 2009.

MAIKAI VA. *In Vitro* and *in Vivo* Evaluation of Anti-trypanosomal Activity of Stem Bark of *Ximenia Americana*. **International Journal of Biology** v. 2, n. 2, p. 50-54. 2010.

MAIKAI, V. A.; KOBO, P. I.; MAIKAI, B. V. O. Antioxidant properties of *Ximenia americana*. **African Journal of Biotechnology**. v. 9, n.45, p. 7744-7746, 2010.

MANZUR A, GONZALEZ AM, POZOS A, SILVA-HERZOG D, FRIEDMAN S. Bacterial quantification in teeth with apical periperiodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. **Jornal of Endodontics**. v.33, n.2, p.114-8, 2007.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Imprensa Universitária, p.122-124, 2007.

MATOS, J. M. D. **O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha**. Fortaleza, 1987.

MEVY, J.P.; BESSIERE, J.M.; GREFF, S.; ZOMBRE, G.; VIANO, J. Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia americana* L. **Biochemistry System Ecology**. V.34, p.549- 553, 2006.

MITCHISON, D.; SPICER, C. A method of estimating streptomycin in serum and other body fluids by diffusion through agar enclosed in glass tubes. **Journal Génétics. Microbiologic.**, v. 3, p. 184 – 203, 1949.

MONTGOMERY, D.; PECK, E.; VINING, G. **Introduction to linear regression analysis**. New Cork: Wiley Interscience Publication.641 p. 2001.

MORAIS. S.N; DANTAS, J. D.P.; SILVA, A.R.A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.15 n. 2 p. 169-177, 2005.

MURALIDHARAN R. NARASIMHAN D. Plants used for topical application from Gingee hills, Tamil Nadu, India. **Current Botany**,v. 3; n. 4, p. 49-52, 2012.

NASCIMENTO, VT; LACERDA, E.; MELO, JG; LIMA, CSA, AMORIM, ELC. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**.V.7, n.3, 56-64, 2008.

NUNES, K. M.; BARBOSA, W. L. R.; OZELA, E. F.; SILVA JUNIOR, J. O. C. Padronização da tintura de *Calendula officinalis* L. para seu emprego em formulações semi-sólidas fitoterápicas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 344- 350, 2009.

OGUNLEYE, D. S.; IBITOYE & TROP, S. F. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. **Journal of Pharmaceutical Research**. v. 2, n. 2, p. 239-241, 2003.

OLABISSI OA, MOUSSA O, MOUSTAPHA O, EDGARD ZF, ELÉONORE K, MARIUS L, PIERRE GI. Acute toxicity and anti-inflammatory activity of aqueous ethanol extract of root bark of *Ximenia americana* L. (Olacaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 5. n.7, p. 806-811, 2011.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**. v. 34, n. 7, 2011.

OMER, M.E.F.A.; ELNIMA, E.I. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. **Fitoterapia**. v.74, p.122–126, 2003.

OSTROSKY, E. A. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 12, n. 2, p. 301-307, 2009.

PAISANO, A.F.; BOMBANA, A.C. Fagoterapia como alternativa no combate às Infecções endodônticas. **Revista Gaúcha de Odontologia**. v. 58, n. 2, p. 243-252, abr./jun., 2010.

PANZARINI, S. R.; TREVISAN, C. L.; BRANDINI, D. A.; POI, W. R.; SONODA, C. K.; LUVIZUTO, E. R.; SANTOS, C. L. V. Intracanal dressing and root canal filling materials in tooth replantation: a literature review. **Dental Traumatology**, v. 28, p. 42-8, 2012.

PARADELLA, T.C; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O.C.; *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 36. n. 2, p. 163-68, 2007.

PINHEIRO, M. L. P.; ANDRADE, E. D. Fitoterápicos como alternativa ao uso de medicamentos convencionais em odontologia. **Revista da Associação Brasileira de Odontologia**. v.16, n.2, p.107-110, 2008.

PINHEIRO, M. L. P.; ANDRADE, E. D. Fitoterápicos como alternativa ao uso de medicamentos convencionais em odontologia. **Revista Associação Brasileira de Odontologia**. v.16, n.2, p.107-110, 2008.

PINTO, TJA.; KANEKO, T M.; PINTO, AF. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2010, 780 p.

PORTO P. O.B, CARVALHO C.M, MEDEIROS L, SOUZA J. R E, SILVA C. H. Efeito anti-inflamatório de um óleo essencial associado ao hidróxido de cálcio em inflamações experimentais em ratos. **Revista de Pesquisa Odontológica**. v. 16, p.220, 2002.

QUINTANS-JÚNIOR LJ, ALMEIDA RN, FALCÃO ACGM, AGRA MF, SOUSA MFV, BARBOSA-FILHO JM. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. **Acta Farmacêutica. Bonaerense**. v.21, n.3,p. 179-84, 2002.

RAMOS, I. F. A. S.; BIZ, M.T.; PAULINO, N.; SCREMIN, A.; DELLA BONA.;

BARLETTA.; FIGUEIREDO. Histopathological analysis of corticosteroid-antibiotic preparation and propolis paste formulation as intracanal medication after pulpectomy: an in vivo study. **Journal of Applied Oral Science.**, v. 20, n. 1, 2012.

RAMOS, I.F.A.S.; BIZ, M.T; PAULINO, N.; SCREMIN, A.; DELLA BONA, A.; BARLETTA, F.B.; FIGUEIREDO, J.A.P. Histopathological analysis of corticosteroidantibiotic preparation and propolis paste formulation as intracanal medication after pulpectomy: an in vivo study. **Journal of Applied Oral Science.** Vol.1, n.1., p. 50 a 56, 2010.

RIBEIRO, F.A.L; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Revista Química Nova**, v. 31, n. 1, p.164-171, 2008.

ROCAS IN, SIQUEIRA JF JR, SANTOS KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **Jornal of Endodontics.** v.30, p.315-20, 2004.

ROSA, C.; CAMARA, S. G.; BERIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência e Saúde Coletiva.** Vol.16, n.1, pp. 311-318, 2011.

ROZET, E.; CECCATP. A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBER, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography** , v. 1158, p. 111–125, 2007.

SAKAMOTO, M.; SIQUEIRA JR., J. F.; RÔÇAS, I. N.; BENNO, Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 22, n. 1, p. 19-23, 2007.

SAWADOGO, W.R.; SCHUMACHER M.; MARIE-HELENE, T.; DICATO, M.; DIEDERICH, M.; Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. **Biochemical Pharmacology.** v.84, p. 1225–1240, 2012.

SHEHADEH M.; SUAIFAN, G, DARWISH, R. M. WAZAIFY, M; ZARU, L.; ALJA'FARI S. Knowledge, attitudes and behavior regarding antibiotics use and misuse among adults in the community of Jordan. A pilot study. **Saudi Pharmaceutical Journal.** v.20, p. 125–133, 2012.

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

SILVA, G.G, SOUZA, P.A.; MORAIS, P. L. D.; SANTOS, E. C.L.; MOURA, R.D.; MENEZES J. B. Caracterização do fruto de ameixa silvestre (*Ximenia americana* L.). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 2, p. 311-314, Junho 2008.

SILVA, M. S. P.; BRANDÃO, D. O.; CHAVES, T. P., FORMIGA FILHO, A. L. N.; COSTA, E. M. M. B.; SANTOS, V. L.; MEDEIROS, A. C. D. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012.

SILVA, V. A.; FREITAS, A. F. R.; PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, A. V.; HIGINO, J. S. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n. 4, p. 452-455, 2010.

SILVEIRA, C. F. M., CUNHA, R. S.; BUENO, C. E. Assessment of the antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine paste and other intracanal medications against bacterial pathogens. **European Journal of Dentistry**, v. 5, p. 2-7, 2011.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. p. 70-122.

SIMÕES, C. M. O. SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Rev. bras. farmacogn.** [online] v.12, n.1, p. 35-40, 2007.

SIQUEIRA JR. JF, LOPES HP, MAGALHÃES FAC, UZEDA M. Atividade antibacteriana de pastas de hidróxido de cálcio/paramonoclorofenol canforado/glicerina contendo diferentes proporções de iodofórmio sobre bactérias anaeróbias estritas e facultativas. **Revista Paulista de Odontologia**.v. 19, n.2, p.17-21, 1997.

SOLANKI, G. RECENT ADVANCEMENT IN ROOT CANAL TREATMENT. **International Journal of Biomedical Research**, v.3, n.1, p. 15-23, 2012.

SOLANO, A.G.R. **Desenvolvimento de Métodos Microbiológicos para doseamento de Gramicidina Matéria-Prima**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação de mestrado. Belo Horizonte, 2010.

SOLANO, A.G.R.; PEREIRA L.M.C.S.; LEONEL, M. F. V.; NUNAN, E.A. Development of agar diffusion method for dosage of gramicidin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 47, n. 3, 2011.

SORO, T.Y.; TRAORE. F.; SAKANDE, J.; Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). **C.omptes Rendus Biologies** v. 332 371–377, 2009.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região do Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Revista Acta Botanica Brasílica**. Vol.20, n. 1, p. 135-142, 2006.

SOUZA, J S; FERRÃO, M F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I : Dosagem por regressão multivariada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**.vol. 42, n. 3, jul./set., 2006.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

TRAN LEA, N.H; MALTERUDA, K. E; DIALLOB, D.; PAULSENA, B. S.; NERGÅRDA, C.S.; WANGENSTEENA, H. Bioactive polyphenols in *Ximenia americana* and the traditional

use among Malian healers. **Journal of Ethnopharmacology**. 139, p.858– 862. 2012.

TRAPLE, M. A. L.; SAVIANO, A. M.; FABIANE, L.F. FELIPE REBELLO LOURENÇO. Measurement uncertainty in pharmaceutical analysis and its application. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. 2013.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**. Rockville, 2001, 22p.

UNITED STATES PHARMACOPEIAL 30/ NF 25. Vol. 31, n.1, p. 59, 2009.

URSO V, SIGNORINI MA, BRUSCHI P. Survey of the ethnobotanical uses of *Ximenia americana* L. (mumpeke) among rural communities in South Angola. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 7, n.1, p. 7-18, 2013.

VALENTINI, S.R.; SOMMER, W.A.; MATIOLI G. Validação de Métodos Analíticos. **Arq Mudi**. v. 11, n.2, p.26-31. 2007.

VIANNA-FILHO, R. ; PETKOWICZ, C.L.O.; SILVEIRA, JOANA, L.M. Rheological characterization of O/W emulsions incorporated with neutral and charged polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, p. 266-272, 2013.

VOSS C, EYOL E, BERGER MR. Identification of potent anticancer activity in *Ximenia americana* aqueous extracts used by African traditional medicine. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 211 p. 177–187, 2007.

WANG, L.; DONG, M.; ZHENG, J.; SONG, Q.; YIN, W.; LI, J.; NIU, W. Relationship of Biofilm Formation and gelE Gene Expression in *Enterococcus faecalis* Recovered from Root Canals in Patients Requiring Endodontic Retreatment **Jornal of Endodontics**, v. 37, n. 5, p. 631-36, 2011.

WUROCHEKKE, A. U.; ANTHONY, A. E.; OBIDAH, W. Biochemical effects on the liver and kidney of rats administered aqueous stem bark extract of *Ximenia Americana*. **African Journal of Biotechnology**. v. 7, n. 16, p. 2777-2780, 2008.

ZOLETTI GO, SIQUEIRA JF JR, SANTOS KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. **Jornal of Endodontics**. v.32, p. 722-6, 2006.

CAPÍTULO I

Avaliação do potencial antimicrobiano, toxicológico e identificação e quantificação do composto químico majoritário da casca de *Ximenia americana* L.

Avaliação do potencial antimicrobiano, toxicológico e identificação e quantificação do composto químico e majoritário da casca de *Ximenia americana* L.

Deysiane Oliveira Brandão, Thiago Pereira Chaves, Felipe Hugo Alencar Fernandes, Paulo César Dantas da Silva, Maria Suênia Pereira da Silva, Vanda Lúcia dos Santos Silva, Ana Cláudia Dantas de Medeiros.

RESUMO

Ximenia americana L. faz parte do extrato arbustivo-arbóreo da Caatinga, figurando como uma das principais espécies. A utilização da sua casca é relatada em diversos estudos etnofarmacológicos, onde descrevem o emprego dessa planta como antimicrobiano entre outras atividades farmacológicas. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar seu potencial antimicrobiano, quantificar os principais constituintes químicos, o componente químico majoritário desta planta além de avaliar sua toxicidade aguda e potencial citotóxico. A planta foi coletada na região semiárida do Estado da Paraíba. Foram preparados extratos hidroalcolicos pelo método de maceração e etanólicos por percolação. O extrato hidroalcolico que apresentou melhor atividade antimicrobiana foi seco em aparelho *Spray drier*. Para avaliação da atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus parasanguinis* (ATCC 903), *Streptococcus sanguis* (ATCC 10557) *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29219) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 009877), foi realizada a técnica difusão em ágar-cilindro. Para avaliação da toxicidade aguda, foi realizado experimento com ratos visando determinar alterações comportamentais e anatômicas, já a citotoxicidade foi realizada pelo método de hemólise. A análise fitoquímica foi realizada, tendo em vista a quantificação de polifenóis totais, flavonoides totais, taninos e saponinas totais. O marcador químico/farmacológico estudado foi o ácido gálico, onde esse foi determinado no vegetal através da aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência, onde o método aplicado foi validado de acordo com os compêndios oficiais regulamentares. A *X. americana* L obteve boa atividade antimicrobiana contra *S. aures*, *E. faecalis*, *K pneumoniae* *S. oralis*. O extrato testado neste estudo apresentou baixa toxicidade nas condições avaliadas, assim como na citotoxicidade em que em nenhuma das concentrações testadas chegou a ser a concentração citotóxica efetiva 50% (EC50). A quantificação de metabólitos secundários obteve resultados satisfatórios onde foram determinados concentrações de 34,20 µg/mL para polifenóis totais, 10,33 µg/mL correspondente a flavonóides, 66,68 µg/mL para taninos condensados e 611,34 µg/mL para saponinas totais. O componente majoritário (ácido gálico) foi determinado na concentração de 12µg/mL, onde o método para quantificação foi validado de acordo com os compêndios oficiais. Com base nos resultados demonstrados, percebe-se que a *X. americana* L é fonte de um vasto potencial farmacológico e fitoquímico podendo seu extrato ser indicado para obtenção de ingrediente ativo com atividade antimicrobiana utilizada em diversas formas farmacêuticas.

Palavras chaves: semiárido, uso etnofarmacológico, ameixa, ácido gálico,

CAPÍTULO I

1. Introdução.

O grande conhecimento tradicional relacionado às plantas medicinais é a base da medicina popular no Brasil, que é derivado de uma mistura de culturas indígenas brasileiras e as influências europeias e africanas desde o período de colonização. A grande biodiversidade brasileira e esse rico conhecimento tradicional que a população dispõe com relação ao uso de plantas medicinais favorecem os estudos de produtos naturais, porém, pesquisas mostram que menos de 15% das plantas medicinais do Brasil tiveram seu potencial terapêutico estudado (BRIGHENTI et al., 2012).

Neste sentido, a Caatinga (semiárido) representa a quarta maior área coberta por uma vegetação única formada no Brasil, sendo responsável por cerca de 60% do território do nordeste e estendendo-se até uma pequena parte da região sudeste de Minas Gerais. Tem ocorrido um crescente interesse para adquirir conhecimento sobre a utilização das plantas medicinais dessa região (CARTAXO et al., 2010).

Além de serem amplamente conhecidas e utilizadas pelas comunidades locais, muitas plantas medicinais da caatinga são utilizadas para obtenção de produtos naturais. Algumas dessas vegetais têm propriedades medicinais que foram comprovadas cientificamente. E muitos pesquisadores têm mencionado que muitas plantas dessa região podem possuir um grande potencial fitoquímico e farmacológico para diversos fins medicinais, todavia, necessitam de mais estudos que comprovem as atividades farmacológicas assim como a composição fitoquímica dessas plantas (ALMEIDA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2010; ALBUQUERQUE, 2010; ALMEIDA et al., 2012; SILVA et al., 2012).

Ximena americana L. faz parte do extrato arbustivo-arbóreo da Caatinga, figurando como uma das principais espécies. No período seco, quando a maioria das espécies da caatinga perde as folhas, essa planta destaca-se por apresentar-se com as folhas totalmente verdes, o que caracteriza uma planta resistente à seca. O período de frutificação é muito curto e concentra-se nos meses de dezembro a janeiro (FERNANDEZ; BEZERRA, 1990).

Na medicina popular, uma série de usos terapêuticos, de todas as partes da *X. americana*, foram relatadas por diversos pesquisadores (MATOS, 2007; MEVY et al., 2006).

Outros estudos etnofarmacológicos relatam que no uso popular a casca dessa planta é empregada como vermífugo, laxante e antiemético, antipirético. Ainda relatam que a casca é eficaz contra dor de dentes, caxumba, conjuntivite, doenças venéreas, infecções, ferimentos e falta de ar (SILVA et al., 2008; WUROCHEKK, ANTHONY E OBIDAH, 2008; SORO, TRAORE E SAKANDE, 2009).

CAPÍTULO I

Em investigações com plantas medicinais da caatinga brasileira, utilizadas pela população local, mostram o emprego da casca da ameixa para fins antissépticos, anti-inflamatórios, para combater cólicas menstruais, com ação vasoconstritora e anticancerígenas (CARTAXO, et al., 2010; CHAVES E BARROS 2012). Na tabela 1 encontram-se diversos estudos etnofarmacológicos realizados com *Ximenia americana* L.

Dentre as atividades biológicas determinadas, pode-se citar a antimicrobiana (MAIKAI MAIKAI E KOBO, 2010; SILVA et al., 2012; GEYID et al., 2005; JAMES et al., 2007; OGUNLEYE et al., 2003; KONÉ Et al., 2004; KUBMARAWA et al., 2007), anti-inflamatória (OLABISSI et al., 2011), anti-trypanosoma (MAIKAI et al., 2008; MAIKAI, 2010), anticonvulsivante (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2002), antiviral (ASRES et al., 2001), anticâncer (VOSS et al., 2007) e antioxidante (LAMIEN-MEDA et al., 2008; MAIKAI, 2010).

Devido a esses atributos medicinais, suas propriedades fitoquímicas e farmacológicas tem sido estudadas. Triagens fitoquímicas realizadas em extratos mostraram a presença de vários metabolitos secundários como taninos, esteróis, terpenos, flavonoides, alcaloides, saponinas e quinonas (GEYID et al., 2005; MAIKAI, MAKAI E KOBO, 2009; OMER & ELNIMA, 2003).

Nesse contexto, considerando a relevância medicinal de *X. americana*, este estudo teve como objetivo avaliar seu potencial antimicrobiano, quantificar os principais constituintes químicos e o componente químico majoritário desta planta, além de avaliar sua toxicidade aguda e potencial citotóxico.

2. Material e métodos.

2.1. Material vegetal e obtenção dos extratos

X. americana foi coletada na região semiárida do Estado da Paraíba e sua exsiccata foi depositada no Herbário Professor Jayme Coelho de Moraes da Universidade Federal da Paraíba, sob número de registro EAN-14049. O material vegetal foi seco em estufa com circulação de ar e pulverizado em moinho com granulometria de 10 mesh.

Foram preparados dois extratos. O primeiro hidroalcoólico pelo método de maceração nas seguintes proporções de água destilada/etanol: 10:90, 20:80, 30:70, 50:50, 70:30 (v/v), sendo denominados respectivamente de EH01, EH02, EH03, EH04 e EHO5 o melhor extrato

CAPÍTULO I

foi nebulizado em aparelho *spray dryer*. E o segundo extrato foi o etanólico que foi preparado por percolação com etanol e posteriormente concentrado em evaporador rotativo a 40°C.

Tabela 1- Dados etnofarmacológicos de *X. americana* L.

Uso etnofarmacológico	Parte da planta	Referências
Antisséptico, psicotrópico, antiictérico, antipirético, antiviral, analgésico (dores de dente)	Raízes e folhas	Omer e Enilma, 2003
Antisséptico, cicatrizante, anti-inflamatório e vasoconstritor.	Casca do caule	Morais et al.,2005
Antisséptico.	folhas	Magassouba et al., 2007
Vermífugo, laxante, antiemético, analgésico, antipirético, antidiarreico, uso oftálmico e antitussígeno.	Raízes, casca, folhas e frutos	Soro et al, 2009
Uso tópico como antisséptico.	Folhas	Muralidharan e Narasimhan, 2012;
Analgésico, antiviral, antibacteriano de uso oftálmico.	Folhas, casca e raízes	Wurochekke et al.,2008
Antissépticos, antiinflamatórios e no combate a cólicas menstruais.	Folhas, casca'	Cartaxo et al.,2010
Antimicrobianos, cicatrizante e antiasmático.	frutos	Silva et al.,2008
Analgésico, antimicrobiano para infecções respiratórias, antiinflamatório, antireumático, anticancerígeno e vasoconstritor.	Casca do caule	Chaves e Barros, 2012
Antiulcerogênico, antidiarreico, antirreumático e anticancerígeno.	Casca, frutos	Mevy et al., 2006
Anticancerígeno, e contra dermatites	Frutos	Sawadogo et al, 2012
Utilizado contra lepra, sífilis, desintéria, febre, tuberculose, dores de dente, e cicatrizante.	Raízes e folhas	Maikai et al, 2009

CAPÍTULO I

2.2. Screening Microbiológico

2.2.1. Ensaio por ágar difusão

O ensaio foi realizado utilizando os extrato hidroalcolico, pelo método de difusão em ágar, pela técnica do cilindro, utilizando cepas padrão American Type Culture Collection (ATCC) *Streptococcus mutans* (25175), *Streptococcus parasanguinis* (903), *Streptococcus oralis* (10557) *Escherichia coli* (25922), *Staphylococcus aureus* (25923), *Pseudomonas aeruginosa* (27853) e *Enterococcus faecalis* (29219) e *Klebsiella pneumoniae* (009877), as quais foram disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ).

O inóculo bacteriano foi padronizado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm, na absorbância de 0,08 a 0,1 a qual é equivalente a 10^6 UFC/mL, conforme preconizado no Clinical and Laboratory Standards Institute procedures (CLSI) (2009).

Foi utilizado o meio Mueller-Hinton para as análises necessárias. O ensaio foi realizado pela técnica de difusão em ágar, método do cilindro, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira, V edição. Portanto, foi produzida uma camada base através da adição de 20 mL de meio de cultura fundido nas placas de Petri (90 x 15 mm). Após o endurecimento do ágar, foi preparada a camada de superfície, adicionando 1 mL do inóculo previamente determinado, para 100 mL de meio de cultura que será fundido e resfriado entre 48 a 50 °C. Adicionou-se 5 mL da camada de superfície na placa de petri contendo o meio base. Após o endurecimento do meio de superfície colocou-se cilindros de aço inoxidável, nos quais foram adicionados 100 µL da solução teste do extrato controle positivo. As placas foram deixadas por uma hora em temperatura ambiente e depois incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, durante um período de 24 horas. Após o período de incubação a leitura dos testes foi realizada medindo em milímetro o diâmetro dos halos de inibição ao redor do cilindro com o auxílio de um paquímetro digital. Foi considerada como possuidora de atividade antimicrobiana, o extrato que apresentou um halo de inibição de crescimento igual ou superior a 8 mm de diâmetro. (DANTAS et al.,2010). Os controles positivos utilizados foram os seguintes: Cefaloxina (200mg/mL) para cocos gram positivos, gentamicina (40mg/mL) para cocos gram-negativos e nistatina (100.000 UI/mL) para as cândidas. O teste foi realizado em quintuplicata e foram calculadas as médias dos halos de inibição.

2.3. Ensaio toxicológicos

2.3.1. Ensaio de toxicidade aguda com ratos

Realizado com ratos Wistar adultos de ambos os sexos, com peso entre 130 e 250 g, fornecidos pelo Biotério da faculdade de Medicina da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura de 22 ± 3 °C e umidade relativa do ar de $50\% \pm 20\%$, em grupos de cinco, alimentados com ração e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas, em seguida foi administrado o extrato de *X. americana* (2000 mg/ kg) por via oral e colocados em caixas individuais. No período de 30 min., 1, 2 e 4 horas após a administração do extrato, os animais foram mantidos em vigilância constante, com a finalidade de se observar o surgimento de alteração comportamental e morte, com base na metodologia preconizada por ALMEIDA *et al.* (1999). Os animais foram observados por período de 14 dias após a administração do extrato para ser contabilizadas as mortes, mensurados o consumo diário de água e ração e o peso dos animais, registrando-se os valores médios de cada grupo. No 14º dia os animais foram eutanasiados, os órgãos vitais como coração, fígado, baço, pulmão e rins foram retirados, pesados e feito a relação entre o peso de cada órgão e o peso corporal de cada animal para avaliação de um possível efeito tóxico do extrato nestes órgãos. Um grupo controle foi tratado com solução salina. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal CEPA/LTF/UFPB com numero do registro nº 0513/05.

2.3.2 Ensaio de Citotoxicidade dos Extratos

Preparou-se uma suspensão de hemácias 4% em solução salina 0,9%. Em seguida, 1 mL desta suspensão foi distribuída em tubos de ensaio e homogeneizadas com 1 mL do extratos nebulizado diluídos em diferentes concentrações a fim de se obter 80, 70, 60, 50 e 40 mg/mL. Após 1 hora, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos e foi realizada a leitura visual, levando em consideração a quantidade de hemácias que sofreram lise. A visualização da hemólise foi classificada como: – (0% de hemólise), + (25% de hemólise), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise) de acordo com Luize *et al.* (2005). Essa leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm, (Shimadzu® UV mini – 1240), utilizando como branco a solução salina 5% para confirmar os resultados da leitura visual. Foram utilizados dois

controles negativos, sendo um a suspensão de hemácias 4% e o outro o extrato etanólico diluído e controle positivo a solução hemolizante Líquido de Turk.

2.4 Testes Fitoquímicos

2.4.1. Determinação de polifenóis totais

O conteúdo de polifenóis totais dos extratos vegetais foi mensurado por meio de espectroscopia na região do visível através do método de Folin-Ciocalteu descrito por Chandra e Mejia (2004) com adaptações. Os extratos etanólicos (25 mg) foram dissolvidos em água destilada, e filtrados conforme o caso, e posteriormente transferidos para um balão volumétrico de 25 mL. Estas soluções foram diluídas de modo a obter uma concentração final de 300 e 200 $\mu\text{g/mL}$. De cada solução, uma alíquota de 1 mL foi adicionada a 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N. Esta mistura permaneceu em repouso durante 2 minutos antes da adição de 2 mL da solução de Na_2CO_3 a 20% (p/v). A solução foi deixada em repouso pelo período de 10 minutos e posteriormente foi realizada a leitura no comprimento de onda de 757 nm em espectrofotômetro UVmini – 1240, marca Shimadzu, tendo como “branco” água destilada. A curva de calibração foi obtida com solução estoque de ácido gálico (1mg mL^{-1}), da qual foram feitas diluições seriadas nas concentrações 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em balões volumétricos de 10 mL. As leituras foram realizadas da mesma forma descrita anteriormente, substituindo-se as amostras dos extratos vegetais pelas soluções de ácido gálico. O conteúdo total de polifenóis foi expresso em miligramas equivalentes do padrão utilizado.

2.4.2. Determinação de Flavonoides totais

O total de flavonoides foi determinado através do método descrito por Meda e colaboradores (2005). Inicialmente 5 mL dos extratos vegetais diluídos em metanol nas seguintes concentrações: A 5 mL de cada solução foi adicionado o mesmo volume da solução de AlCl_3 a 2% em metanol (p/v). Esta mistura permaneceu em repouso durante 10 minutos antes da leitura da absorbância no comprimento de onda de 415 nm. Foram realizadas ainda leituras dos extratos com metanol no lugar da solução de AlCl_3 e o valor da absorbância da leitura anterior foi subtraído do valor desta para que a coloração dos extratos não

influenciassem na absorvância, superestimando a quantidade de flavonoides. A amostra do “branco” consistiu em metanol. O total de flavonoides foi determinado utilizando a curva de calibração utilizando quercetina (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) nas concentrações 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e expresso em mg equivalente de quercetina.

2.4.3. Determinação do teor de saponinas totais

A quantificação de saponinas totais seguiu o método descrito por Makkar, Siddhuraju e Becker (2007). Adicionou-se 250 μL de uma solução de vanilina (8% em etanol) a 250 μL da solução do extrato (em metanol 80%), em seguida, adicionou-se 2,5 mL de ácido sulfúrico (72%). Os tubos foram colocados em banho-maria a 60 °C, por 10 minutos, sendo transferido para um banho de gelo, onde permaneceram por 4 minutos. Foi feita a leitura da absorvância a 544 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, metanol 80% e ácido sulfúrico.

A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a 500 $\mu\text{g/mL}$, preparada pela dissolução de 10 mg de disogenina em 20 mL de metanol a 80%. A partir dessa solução, foram feitas diluições em triplicata, obtendo-se soluções de disogenina nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de flavonóides foi expressa em miligramas equivalentes a disogenina. As análises foram realizadas em triplicata.

2.4.4. Determinação do teor de taninos condensados

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de Makkar e Becker (1993), no qual 0,5 mL da amostra do extrato vegetal foi adicionado a 3 mL de uma solução de vanilina (4% p/v em metanol); em seguida, adicionou-se 1,5 mL de HCl concentrado (37%). A reação ocorreu em tubos de ensaio, mergulhados em água a cerca de 22 °C. A leitura foi feita a 500 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, HCl e uma solução de etanol 50% (v/v) em água.

A curva de calibração para este ensaio foi obtida a partir de uma solução padrão de catequina obtida pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram realizadas diluições de forma a obter soluções de catequina nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina. As análises foram realizadas em triplicata.

2.4.5. Determinação do marcador fitoquímico.

A análise cromatográfica foi feita utilizando um cromatografo liquido UPLC Pominence, marca Shimadzu, com detector UV-Vis acoplado ao software LC solution da Shimadzu. A coluna utilizada foi de fase reversa a modelo Gemini NX C-18, marca Phenomenex, 250 X 4,6 mm com partículas de 5 µm de diâmetro e pré-coluna Gemini NX, marca Phenomenex, 4 X 30.

A fase móvel consistiu de ácido acético à 0,1% (Fase A) e metanol (fase B) em sistema de gradiente: 90-10% B (0-10 minutos), 10-90% B (11-24 minutos) e 90-10% B (25-30 minutos), totalizando 30 minutos de análise. A fase móvel constituída de ácido acético foi escolhida a fim de impedir ou diminuir a ionização do ácido gálico(ARAPITSAS, 2012).

Como padrão foi utilizado o Ácido Gálico (C₇H₈O₆) Anidro (VETEC, Lote: 0904265).

Foi submetido o extrato hidroalcoólico diluído em metanol (10%) na proporção de 1:5 a análise cromatográfica a fim de se detectar a presença e a concentração do ácido gálico no extrato. Em seguida, a partir dessa concentração, desenvolveu-se os parâmetros de validação do método analítico, levando em consideração os parâmetros de precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação e robustez.

3. REULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. *Screening* Microbiológico

No *screening* microbiológico da *X. americana* L. foi verificado que a planta apresentou atividade microbiana contra as cepas padrão de *S. aureus*, *E. faecalis*, *S.oralis*, *K.pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Não apresentando atividade contra as demais cepas testadas (Tabela 01). Porém pode-se observar que apenas frente a *S. aureus*, *E. faecalis* e *K.pneumoniae* os cinco tipos de extratos hidroalcoólicos foram ativos, e o extrato do 05 frente a *S. oralis*. e *P. aeruginosa*.

James et al., (2007) compararam a atividade antimicrobiana de extratos aquosos e metanólicos produzidos com todas as partes de *X. americana* L. frente a microrganismos patogênicos isolados de pacientes dentre os microrganismos testados, estavam *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae*, os autores observaram que, a atividade do extrato metanólico da raiz foi mais pronunciada em *K. pneumoniae* e *S. aureus*, principalmente, quando comparada com o extrato metanólico das folhas e do caule

CAPÍTULO I

Tabela 2 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) do extrato hidroalcoólico obtido de *Ximenia americana* L. para as cepas microbianas analisadas.

Extrato hidroalcoólico	<i>S.a</i>	<i>E.c</i>	<i>K.p</i>	<i>P.a</i>	<i>E.f</i>	<i>S.m</i>	<i>S.o</i>	<i>S.p</i>
EH 01	12,34	0,00	11,50	0,00	15,15	0,00	0,00	0,00
EH 02	14,28	0,00	11,72	0,00	12,27	0,00	0,00	0,00
EH 03	15,09	0,00	10,93	0,00	13,66	0,00	0,00	0,00
EH04	14,69	0,00	11,03	0,00	12,65	0,00	0,00	0,00
EH 05	13,42	0,00	11,13	10,23	12,07	0,00	11,05	0,00
Gentamicina	-	28,77	28,96	25,81	-	-	-	-
Cefalotina	23,47	-	-	-	14,51	12,95	12,63	12,51

S.a - *Staphylococcus aureus*, *E.c* - *Escherichia coli*, *K.p* - *Klebsiella pneumoniae*, *P.a* - *Pseudomonas aeruginosa*, *E.f* - *Enterococcus faecalis*, *S.m* - *Streptococcus mutans*, *S.o* - *Streptococcus oralis*, *S.p* - *Streptococcus parasanguinis*.

A atribuição desses resultados não deve ser referenciada a diferença a presença ou ausência dos lipopolissacarídeos estruturais da membrana externa, o que diferencia bactérias gram positivas e gram negativas. Embora, que de maneira geral as bactérias Gram negativas são mais resistentes do que as bactérias Gram-positivas (PAZ et al., 1995; MARTINS et al., 2008), no entanto, nos resultados apresentados *X. americana* L. mostrou atividade antimicrobiana com bactérias Gram positiva (*S. aureus*, *E. faecalis*, *S.oralis*) assim como Gram negativas (*K.pneumoniae*). Portanto, o mecanismo de ação dos constituintes químicos com ação antimicrobiana pode não estar relacionado a membrana externa a qual pode atuar como uma forte barreira à penetração de agentes antimicrobianos devido aos lipopolissacarídeos estruturais, enquanto bactérias gram-positivas são mais susceptíveis de ter apenas uma camada de peptidoglicano no exterior, não tão eficaz contra a permeabilidade aos antimicrobianos (BAPTISTA, 2013). Sendo assim, em outro estudos, onde foi avaliado a casca *X. americana* L. contra cepas bacterianas Gram-positivas (*S. aureus*, *E. faecalis* e *S. pyogenes*) e Gram-negativas (*E. coli* e *P.aeruginosa*) o vegetal apresentou-se eficaz contra as Gram positivas *S. aureus* e *E. faecalis* e ineficaz contra a Gram negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* (KONÉ et a, 2004). COSTA et al. (2011), também avaliaram a atividade desta mesma planta frente a *E. faecalis* e obtendo resultado semelhante ao nosso.

3.2. Ensaios toxicológicos

3.2.1. Ensaio de toxicidade aguda com ratos

A investigação da toxicidade aguda é o primeiro passo na análise toxicológica de drogas vegetais. Neste ensaio de toxicidade aguda com ratos, o grupo tratado não apresentou alterações de comportamento após a administração do extrato de *X. americana*, na dose de 2000 mg/kg via oral, exceto respiração forçada na segunda hora e, a analgesia aos 30 minutos, uma, duas, três e quatro horas após a administração do referido extrato. Não houve mortes durante o período de observação, o que inviabiliza a determinação da DL50.

Quanto à análise dos órgãos, os animais do grupo tratado com o extrato de *X. americana* não exibiram alteração no peso dos rins, coração e pulmões, embora tenha havido redução significativa do peso do fígado quando comparados com os animais do grupo controle, o que sugere que o extrato possui algum potencial hepatotóxico. James et al., (2007) ao avaliar efeitos hepáticos e hematológicos de extratos aquosos da raiz, caule e folhas dessa planta, observaram o aumento sérico de alanine transaminase e aspartate transaminase, o que sugere dano em células hepáticas. De forma similar Wurochekke et al., (2008) observaram aumento de alanine transaminase. Por outro lado, no estudo realizado por Maikai et al., (2008), os pesos relativos dos órgãos (coração, fígado, baço, rim e pulmão) não diferiram de forma significativa do grupo controle.

Ao observar o peso corporal dos animais entre os períodos de 24, 48 e 72 horas após tratamento, constatou-se que não houve diferença significativa entre os grupos. Entretanto, o grupo tratado com o extrato apresentou uma diminuição no consumo de água e ração em relação aos outros grupos. Alguns autores atribuíram a perda de peso à presença de taninos e outros compostos fenólicos interferem com a absorção de nutrientes, tais como proteínas e sais minerais, resultando em perda de peso (MAIKAI, KOBO e ADAUDI, 2009).

Alguns estudos também demonstraram *X. americana*, não apresenta grandes riscos de toxicidade quando avaliaram a toxicidade do extrato aquoso da entrecasca de (até 5000 mg/kg via oral e intraperitoneal) em camundongo (MAIKAI, KOBO & ADAUDI, 2009, SILVA et al., 2012).

No entanto, outros estudos avaliando o extrato hidroalcoólico de cascas de *X. americana* via intraperitoneal determinaram a toxicidade ao observar agitação, cólicas abdominais, sonolência, tendência a agrupamento, perda do instinto de exploração e morte dos animais e determinaram a DL50 de 345 mg/kg. Esta ação tóxica também foi verificada

para extratos da raiz de *X. americana* (VOSS et al., 2007, SORO et al., 2009, OLABISSI et al., (2011).

A diferença na toxicidade apresentada por *X. americana* nos estudos citados anteriormente é resultado das diferentes partes da planta utilizadas, assim como do solvente utilizado na obtenção dos extratos. Entretanto, foram observadas diferenças mesmo em estudos que utilizaram a mesma parte e o mesmo solvente, o que pode ser explicado pela influência exercida pelas condições ambientais do local de coleta da planta sobre seus metabólitos secundários, além de fatores intrínsecos da planta como a fase de desenvolvimento e diferenciação dos tecidos (CHAVES et al., 2013; MIRDEHGHAN e RAHEMI, 2007; NCUBE et al., 2010).

Embora uma substância ou planta não tenha sido potencialmente letal em uma determinada condição de experimento, este resultado pode ser variado ao se trabalhar com outras condições em que a DL50 avalia apenas a letalidade, ignorando assim outros efeitos adversos que muitas vezes é extremamente prejudicial a saúde do indivíduo embora não sejam letal (JAMES et al., 2008).

De acordo com os dados obtidos, sugere-se que o extrato testado neste estudo apresentou baixa toxicidade nas condições avaliadas.

3.2.3. Ensaio de citotoxicidade com hemólise

Em todas as concentrações estudadas o extrato nebulizado de *X. americana* L apresentou uma citotoxicidade equivalente a 25% em relação ao controle positivo (TABELA 3), dessa forma nenhuma das concentrações testadas chegou a ser a concentração citotóxica efetiva 50% (EC50), ou seja que é capaz de hemolisar 50% de uma suspensão a 4% de eritrócitos (SCHULZ, et al., 2009).

Sabe-se que muitas plantas medicinais utilizadas pela população na forma de chás e infusões não são suficientemente estudadas quanto à presença de substâncias citotóxicas que podem causar efeitos adversos e conseqüentemente danos à saúde (BAGANTINI; SILVA; TEDESCO, 2007). A citotoxicidade de plantas medicinais deve ser considerada um problema de saúde pública, pois efeitos adversos, intoxicação e interações com outras drogas comumente ocorrem, o que não foi observado nesse estudo, mas, algumas plantas utilizadas apresentaram efeito hemolítico nas concentrações que mostraram atividade antimicrobiana (VEIGA JUNIOR, PINTO E MACIEL, 2008).

CAPÍTULO I

Tabela 3: Ensaio de citotoxicidade. Leitura visual da hemólise das suspensões de hemácias testadas com extratos nebuizado de *X. americana*. Utilizou-se como referência: – (0% de hemólise), +(25% de hemólise, ou abaixo de 25%), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise).

Concentrações (mg/mL)	Absorbância	Intensidade de hemólise
80	0,321	+
70	0,286	+
60	0,252	+
50	0,220	+
40	0,185	+
<i>Liquido de Turk</i> (controle positivo)	1,200	++++

3.3. Testes Fitoquímicos

Os compostos fenólicos são os principais metabólitos secundários presentes em *X. americana*. O conteúdo total destes compostos estão apresentados na Tabela 4. Estudo semelhante a este foi realizado por Lamien-Meda et al., (2008), que determinaram a concentração de polifenóis e flavonoides dos extratos metanólico (MeOH 70%) e Acetona (Ac 70%) dos frutos de *X. americana*. Os autores mostraram que os polifenóis apresentaram de valores de 2230.00 µg/mL ± 76.09 (MeOH 70%) e 2086.67 µg/mL ± 55.11 (Ac 70%), enquanto os flavonoides de 30.95 µg/mL ± 3.76 (MeOH 70%) e 23.60 µg/mL ± 1.75 (Ac 70%). Os estudos fitoquímicos com a casca dessa planta encontrados na literatura foram apenas qualitativos (OMER e ENILMA, 2003; OGUNLEY e IBITOYE, 2003; GEYID et al.,2005).

Tabela 4 – Teor de polifenóis , flavonoides totais, taninos condensados e saponinas totais do extrato de *X.americana L* obtidos por espectroscopia na região do visível.

Constituintes fitoquímicos	Concentração µg/mL
Polifenóis totais	34,20 ± 1,62
Flavonóides totais	10,33 ± 0,44
Taninos condensados	66,68 ± 3,88
Saponinas Totais	611,34±14,36

3.4. Determinação do Componente químico majoritário

Na análise cromatográfica preliminar foi observado a presença do ácido gálico no extrato hidroalcolólico de *X. americana* L. (Fig.1).

Tran Le et al., 2012, verificando a bioatividade de polifenóis da *Ximènia americana* identificaram pela primeira vez o Ácido Gálico na casca da *X. americana*, atribuindo a esse composto a atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos. Outros estudos relataram também a presença do ácido gálico associado a presença de polifenóis na *Ximènia americana* L (BAYER, et al., 2012, OMER & ELNIMA, 2003, JAMES et al., 2007).

3.5. Validação do método para doseamento de ácido gálico

A linearidade foi realizada através da injeção de ácido gálico nas seguintes concentrações 6, 9, 12, 15 e 18 µg/mL. Assim foi construída uma curva de calibração de onde obteve uma equação da reta de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e realizada a análise da adequação do modelo proposto. Além disso, calculou-se o coeficiente de correlação linear (r^2) que, segundo a resolução brasileira 889/2003. (BRASIL, 2003) deve ser igual ou superior a 0,98 para que se considere a curva analítica adequada. O valor encontrado para o método proposto foi de 0,9975, apontando uma provável existência de uma correlação linear (Fig. 2).

Figura 1 – Cromatograma do extrato de *Ximènia americana* L. (A) e do padrão de ácido gálico (B) em 280 nm.

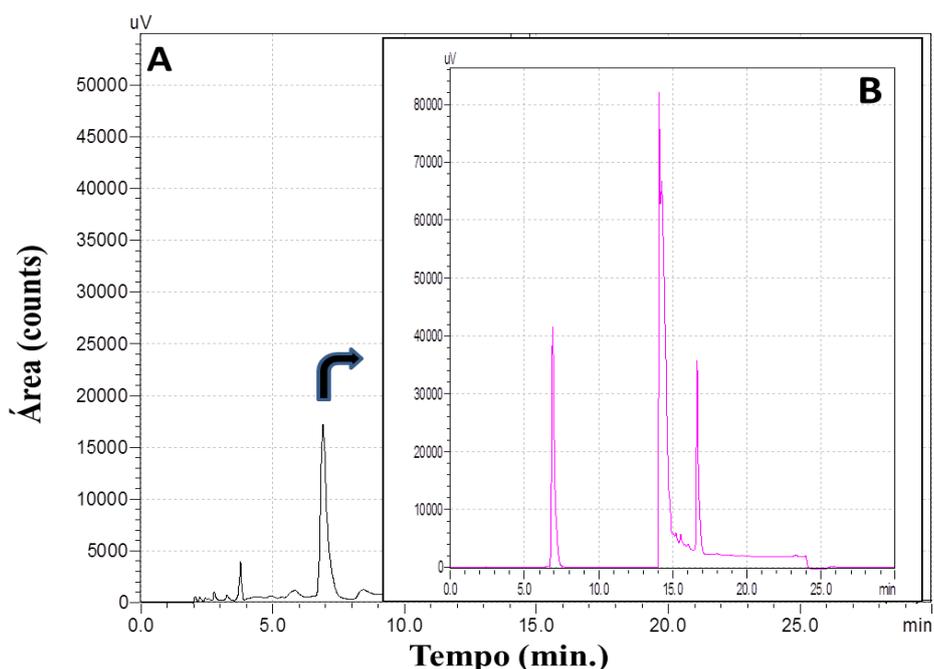
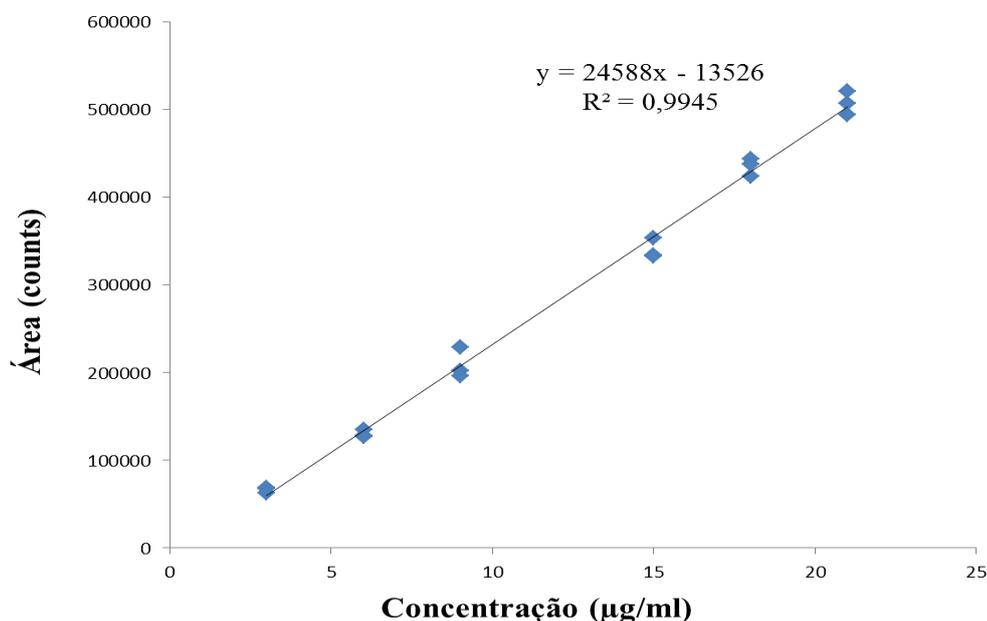


Figura 2 – Curva de calibração do padrão de ácido gálico em 271 nm.



O coeficiente de correlação (r^2) é a fração da variância total de Y que é explicada pela variação em X, ou seja, a proporção da variação total da área do pico do ácido gálico que é explicada pela variação da concentração da substância antimicrobiana. Essa variação linear também foi explicada pelo teste da falta de ajuste, apresentando um valor de teste igual a 3,26 abaixo do valor tabelado (3,34).

Pela análise da curva de calibração foi possível determinar com 95% de confiança, o limite de detecção (LD = 1,22 µg/mL) e o limite de quantificação (LQ = 3,82 µg/mL).

A precisão foi avaliada quanto à repetitividade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdias), os valores de desvio padrão e coeficiente de variação foram considerados para determinação desse parâmetro (Tabela 5). É recomendável desvio padrão superior e inferior de 5% ou menos, sendo aceitos valores limites de até 10% como nesse estudo indicando que o método desenvolvido apresenta boa precisão (U.S. FOOD, 2001).

Para avaliação da exatidão três níveis de concentração, baixo (75%), médio (100%) e alto (125%), foram utilizados para avaliar a repetitividade e exatidão dos resultados. Sendo assim, em relação à exatidão, os valores da recuperação estão de acordo com o critério de validade: valor médio entre 85 e 115% do valor teórico (Tabela 6). Dessa forma, o método foi considerado exato, uma vez que o intervalo de tolerância, para a concentração relativa da amostra testada no nível em questão, estava inserido no limite de $\pm 15\%$ (MONTGOMERY et. al., 2001; U.S. FOOD., 2001).

CAPÍTULO I

Tabela 5 – Precisão do padrão de ácido gálico e do extrato analisados em dois dias diferentes. DP – Desvio padrão; CV – Coeficiente de variação.

	Media (área -counts)	DP	CV (%)
Ácido gálico (12 µg/mL)	362010,70	5302,89	1,46
Extrato (1º dia)	313689,30	55659,20	0,98
Extrato (2º dia)	315059,10	36001,00	0,97

Tabela 6 – Ensaio de recuperação de amostras fortificadas com o padrão de ácido gálico em três níveis de concentração (75, 100 e 125%). CV – Coeficiente de variação.

Níveis	75%	100%	125%
CV (%)	0,46	0,97	1,04
Recuperação (%)	91,75%	93,07%	87,80%

Para avaliar a robustez do método testaram-se alterações nos seguintes fatores da avaliação do ácido gálico a 12µg /mL : comprimento de onda (280 e 271nm) variação da proporção da fase móvel ácido acético a 0,1% (10 e 12%) e a temperatura do forno (variando $\pm 5^{\circ}\text{C}$ entre 30 e 35°C). Todavia, não houve variações na área do pico ou no tempo de retenção em nenhuma das condições testadas de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7 – Medidas das áreas e do tempo de retenção dos picos no ensaio de robustez para o doseamento do padrão de ácido gálico.

	Comprimento de onda		Proporção da fase-móvel		Temperatura do forno	
	(nm)		(%)		(°C)	
	271	280	12	10	30	35
Área do pico (counts)	354125.4	361524.8	3517319	36866.1	354121.8	348873.1
Tempo de retenção (min.)	6.817	6.200	6.182	6.246	6.163	6.152

Esses fatores podem influenciar na pressão interna da coluna cromatográfica que por sua vez influencia no tempo de retenção do pico e na sua área, todavia alguns métodos podem ser

CAPÍTULO I

resistentes a essas alterações, não ocorrendo tanta variação em suas respostas (MARQUES et al., 2013).

CONCLUSÃO

X.americana é fonte de fitocomplexos com atividade antibacteriana, principalmente contra bactérias gram-positivas como o *E. faecalis*. Além disso, essa planta possui uma toxicidade e citotoxicidade relativamente baixas além de ser constituído de boas concentrações de metabólitos secundários. Esses, atuam na formação de fitocomplexos responsáveis pelas suas atividades farmacológicas. Um dos seus constituintes que pode atuar como marcador químico e/biológico é o ácido gálico que teve seu doseamento validado de acordo com as especificações dos compêndios oficiais. Dessa forma, *X. americana* L é fonte de um vasto potencial farmacológico e fitoquímico podendo seu extrato ser indicado para obtenção de ingrediente ativo com atividade antimicrobiana utilizada em diversas formas farmacêuticas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ pelo financiamento da pesquisa e ao CERTIBIO/UEPB pelas análises realizadas.

RERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; MAIA, M. B. S. Medicinal plants popularly used in the Xingó region – a semi-arid location in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. v. 2, n. 15, 2006.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; RAMOS, M. A.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.127 p. 674–684, 2010.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; RAMOS, M. A.; SILVA, R. R. V.; MELO, J. G.; MEDEIROS, M. F. T; ARAÚJO, T. A. S.; ALMEIDA, A. L. S.; AMORIM, E. L. C.; ALVES, R. R. N.; ALBUQUERQUE, U. P. Intracultural Variation in the Knowledge of Medicinal Plants in an Urban-Rural Community in the Atlantic Forest from Northeastern Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2012.

ALMEIDA, R. N. et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p.72-76, 1999.

ARAPITSAS, P.; Hydrolyzable tannin analysis in food. **Food Chemistry**. v.135, n.3, p. 1708-1717, 2012.

ASRES K, BUCAR F, KARTNIG T, WITVROUW M, PANNECOUQUE C, DE CLERCQ E. Antiviral Activity Against Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) and Type 2 (HIV-2) of Ethnobotanically Selected Ethiopian Medicinal Plants. **Revista Phytothermic**. v. 15, p. 62–69, 2001.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.

BAYER H.; EY, N.; WATTENBERG, A.; VOSS, C.; BERGE, M. Purification and characterization of riproximin from *Ximenia americana* fruit kernels. **Protein Expression and Purification**. v. 08. p 97–105, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução- RDC, nº 899, de 29 de maio de 2003**. Dispões sobre o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial da república federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de Junho de 2003.

BRIGHENTI, F. L.; GAETTI-JARDIM JR., E.; DANELON, M.; EVANGELISTA, G. V.;

DELBEM, A. C. B. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on enamel demineralisation and dental biofilm composition in situ. **Archives of oral biology**, v.57, p. 1034–1040, 2012.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** 131, p. 326–342, 2010.

CHANDRA, S. , MEJIA, EG. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguayensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal Agricola Food Chemistry**. v. 52, 2004.

CHAVES, E.M.F.; BARROS, R.F.M. Diversidade e uso de recursos medicinais do carrasco na APA da Serra da Ibiapaba, Piauí, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais Botucatu**, v.14, n.3, p.476-486, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE: Normas de desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo v. 25, n. 1, 2009.

COSTA, E. M. M. B. BARBOSA, A.S.; ARRUDA, T.A.; OLIVEIRA, P.T.; DAMETTO, F.R.; CARVALHO, R.A.; MELO, M.D. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2011.

DANTAS, P.J.; FERREIRA, S.B.; SOUZA, J.H.; ALMEIDA, J.M.; FIGUEIREDO, M.C.; PEQUENO, A.S; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P; CATÃO, R.M.R. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 42(1): 33-37, 2010.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed. Editora Atheneu, 2010.

FERNANDEZ, A.; BEZERRA, P. **Estudo fitogeográfico do Brasil**. Fortaleza: Stylus comunicações, 1990.

GEYID, A.; ABEBE, D.; DEBELLA, A.; MAKONNEN, Z.; ABERRA, F.; TEKA, F.; KEBEDE, T.; URGU, K.; YERSAW, K.; BIZA, T.; MARIAM, B. H. & GUTA, M. Screening of medicinal plants of Ethiopia for their anti-microbial properties and chemical profiles. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 97, p. 421-427, 2005.

JAMES, D. B.; ABU, E. A.; WUROCHEKKE, A. U. & ORGI, G. N. Phytochemical and Antimicrobial Investigation of the Aqueous and Methanolic Extracts of *Ximenia americana*. **Journal of Medical Science**. v. 7, N. 2, p. 284-288, 2007.

JAMES, D. B.; ABU, E. A.; WUROCHEKKE, A. U. & ORGI, G. N. Phytochemical and Antimicrobial Investigation of the Aqueous and Methanolic Extracts of *Ximenia americana*. **Journal of Medical Science**. v. 7, N. 2, p. 284-288, 2007.

KONÉ WM, ATINDEHOU KK, TERREAUX C, HOSTETTMANN K, TRAORÉ D, DOSSO M. Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v.93 p. 43–49. 2004.

KUBMARAWA D, AJOKU GA, ENWEREM NM, OKORIE DA. Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of 50 medicinal plants from Nigeria. **African Journal of Biotechnology**. v. 6, n.14, p. 1690-1696, 2007.

LAMIEN-MEDA A, LAMIEN CE, COMPAORÉ MMY, MEDA RNT, KIENDREBEOGO M, ZEBA B, MILLOGO JF, NACOULMA OG. Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Fourteen Wild Edible Fruits from Burkina. **Faso Molecules**. v. 13, 581-594, 2008.

LUIZE, P. S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of Leishmania (L.) amazonensis and Trypanosoma cruzi. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2005.

MAGASSOUBA, F.B.; DIALLO, A.; KOUYAT'E, M.; MARA, F.; MARA, O.; BANGOURA. O; CAMARA, A.; TRAOR'E, S.; DIALLO, A.K; ZAORO. M; LAMAH. K; DIALLO, S.; CAMARAS, G.; TRAOR'E. S.; K'EITA, A.; CAMARA, M.K.; BARRY, R.; K'EITA, S.; OULAR'E, K.; BARRY, M.K; DONZO, M.; CAMARA, K.; TOT'E. K.; VANDEN BERGHE, D.; TOT'E, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; BALD'E, A.M. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology** v. 114 p.44-53, 2007.

MAIKAI VA, NOK JA, ADAUDI AO, ALAWA CBI. In vitro antitrypanosomal activity of aqueous and methanolic crude extracts of stem bark of *Ximenia americana* on *Trypanosoma congolense*. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 2, n. 3, p. 055-058, 2008.

MAIKAI VA. *In Vitro* and *in Vivo* Evaluation of Anti-trypanosomal Activity of Stem Bark of *Ximenia Americana*. **International Journal of Biology** v. 2, n. 2, p. 50-54. 2010.

MAIKAI, V. A.; MAIKAI, B. V. KOBO, P. I. (2009). Antimicrobial Properties of Stem Bark Extracts of *Ximenia americana*. **Journal of Agricultural Science**., V.1, N. 2, p. 30-34, 2009.

MAIKAI, V. A.; MAIKAI, B. V. O; KOBO, P. I. Antioxidant properties of *Ximenia americana*. **African Journal of Biotechnology**. v. 9, n.45, p. 7744-7746, 2010.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vannilin-HCL method for condensed tannins: effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 4, p. 613-621, 1993.

MAKKAR, H.P.S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K.; Methods in Molecular Biology, vol.393: **Plant Secondary Metabolites**. Humana Press, Totowa, NJ, 2007.

MARQUES, G.S.; LEÃO, W.F.; LYRA, M.A.M.; PEIXOTO, M.S.; MONTEIRO, R.P.M.; ROLIM, L.A.; XAVIER, H.S.; ROLIM NETO, P.J.; SOARES, L.A.L. **Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata***. v. 23, n.1, p. 51-57, 2013.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Imprensa Universitária, p.122-124, 2007.

MEDA, A.; LAMIEN, C.E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkin Fasan honey, as

well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**. v.91, n. 3, p. 571-577, 2005.

MEVY, J.P.; BESSIERE, J.M.; GREFF, S.; ZOMBRE, G.; VIANO, J. Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia americana* L. **Biochemistry System Ecology**. v.34, p.549- 553, 2006.

MIRDEHGHAN, S.H., RAHEMI, M. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. **Science Hortics**. v. 111, 120–127, 2007.

MONTGOMERY, D.; PECK, E.; VINING, G. Introduction to linear regression analysis. New Cork: **Wiley Interscience Publication**, 2001. 641 p.

MORAIS. S.N; DANTAS, J. D.P.; SILVA, A.R.A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.15 n. 2 p. 169-177, 2005.

MURALIDHARAN R. NARASIMHAN D. Plants used for topical application from Gingee hills, Tamil Nadu, India. **Current Botany**,v. 3; n. 4, p. 49-52, 2012.

OGUNLEYE, D. S.; IBITOYE & TROPS, S. F. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. **Journal of Pharmmaceutical Research**. vol. 2, No. 2, p. 239-241, 2003.

OLABISSI OA, MOUSSA O, MOUSTAPHA O, EDGARD ZF, ELÉONORE K, MARIUS L, PIERRE GI. Acute toxicity and anti-inflammatory activity of aqueous ethanol extract of root bark of *Ximenia americana* L. (Olacaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 5. n.7, p. 806-811, 2011.

OMER, M.E.F.A.; ELNIMA, E.I. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. **Fitoterapia**. v.74, p.122–126, 2003.

PAZ, E.A., CERDEIRAS, M.P., FERNANDEZ, J., FERREIRA, F., MOYNA, P., SOUBES, M., VS, ZQUEZ, A., VETO, S. AND ZUNINO, L. Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v.45, 67 70, 1995.

QUINTANS-JÚNIOR LJ, ALMEIDA RN, FALCÃO ACGM, AGRA MF, SOUSA MFV, BARBOSA-FILHO JM. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. **Acta Farmacêutica Bonaerense**. v.21, n.3,p. 179-84, 2002.

RABE T, VAN STADEN J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. **Journal of Ethnopharmacology**. . v. 56.n. 1. p. 81-7. 1997.

SAWADOGO, W.R.; SCHUMACHER M.; MARIE-HELENE, T.; DICATO, M.; DIEDERICH, M.; Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**. v.84, p. 1225–1240, 2012.

SCHULZ, D; SIMÕES, C.M.O.; FRÖHNER, C.R.A.; GABILAN, N.H.; BATISTA, C.R.V. Citotoxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* frente a hemácias de carneiro e células vero. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 2, 2005.

SILVA, G.G, SOUZA, P.A.; MORAIS, P. L. D.; SANTOS, E. C.L.; MOURA, R.D.; MENEZES J. B. Caracterização do fruto de ameixa silvestre (*Ximenia americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 311-314, 2008.

SILVA, M.S.P.; BRANDÃO, D.O.; CHAVES, T. P.; FORMIGA FILHO, A.L.N.; COSTA, E.M.M.B.; SANTOS, V.L.; MEDEIROS, A.C.D. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semi-arid Northeast: contribution to the control of oral microorganisms. **Evidence-Basedn Complementary andAlternative Medicine**. Article 6 páginas, 2012.

SORO, T.Y.; TRAORE. F.; SAKANDE, J.; Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). **C.omptes Rendus Biologies** v. 332, p. 371–377, 2009.

TRAN LEA, N.H; MALTERUDA, K. E; DIALLOB, D.; PAULSENA , B. S.; NERGÅRDA, C.S.; WANGENSTEENA, H. Bioactive polyphenols in *Ximenia americana* and the traditional use among Malian healers. **Journal of Ethnopharmacology**. 139, p.858– 862. 2012.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**. Rockville, 2001, 22p.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VOSS C, EYOL E, BERGER MR. Identification of potent anticancer activity in *Ximenia americana* aqueous extracts used by African traditional medicine. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 211 p. 177–187, 2007.

WUROCHEKKE, A. U.; ANTHONY, A. E.; OBIDAH, W. Biochemical effects on the liver and kidney of rats administered aqueous stem bark extract of *iemenia Americana*. **African Journal of Biotechnology**. v. 7, n. 16, p. 2777-2780, 2008.

CAPÍTULO II

Desenvolvimento e validação do doseamento microbiológico
de um novo Ingrediente Ativo Farmacêutico obtido a partir de
Ximenia americana L

Desenvolvimento e validação do doseamento microbiológico de um novo Ingrediente Ativo Farmacêutico obtido a partir de *Ximenia americana* L.

Deysiane Oliveira Brandão; Fernando José de Lima Ramos Júnior; Lailane Batista Alencar; Alinne Souza Barbosa, Fernanda Pontes Nóbrega; Renner Monteiro Araújo, Germando Veras, Ana Cláudia Dantas de Medeiros

Resumo

O mercado de produtos fitoterápicos tem crescido em todo mundo, todavia esse aumento não tem refletido na qualidade dos fitoterápicos disponíveis à população. No caso da *X. americana* L., planta amplamente utilizada pela medicina tradicional como antibacteriano não existe uma padronização do seu extrato pela indústria farmacêutica local, tornando necessário investimentos no desenvolvimento de técnicas analíticas ou bioanalíticas para determinação potência antimicrobiana, entre outros parâmetros. Sendo assim, esse trabalho propõe procedimentos para desenvolvimento e validação do estudo de doseamento de substâncias antibacterianas, por método microbiológico do extrato nebulizado de *X. americana* L. O extrato hidroalcoólico dessa planta foi obtido pelo método de percolação e em seguida nebulizado em *Spray dryng*. A técnica utilizada para a obtenção da resposta (halos de inibição) foi a técnica difusão em ágar-cilindro, microrganismo revelador utilizado foi o *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Foi obtida uma curva de calibração abrangendo as concentrações de 10 a 160 mg/mL do extrato seco e do padrão utilizado (ácido gálico). Em seguida, o doseamento da potencia microbiológica do extrato foi realizado de acordo com o delineamento 5x1, onde esse processo foi validado de acordo com a Resolução 889/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, entre outros compêndios oficiais. Os parâmetros utilizados para validação do método analítico foram linearidade, curva analítica, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. De acordo com a linearidade o método foi considerado válido, pois apresentou-se exato e preciso nos testes de falta de ajuste, análises de resíduos e teste da significância da regressão. Quanto a precisão e exatidão os testes apresentaram desvio padrão e coeficiente de variação interdia e intradia dentro dos recomendados (5 a 10%). O limite de detecção para o ácido gálico foi de 1,14 mg/mL e para o extrato nebulizado de 1,41mg/mL. O limite de quantificação também apresentou precisão e exatidão ficando dentro dos valores utilizados na curva de calibração. Quanto a robustez, o método apresentou-se robusto quanto a variação do pH do meio, recomendando a utilização do pH 7,0 para melhor performance do método e quanto a variação do tempo de pré incubação, houve variação no diâmetro dos halos de inibição com a variação do tempo, permanecendo halos maiores no tempo de 120 minutos. Com a aplicação do método observou-se que o ácido gálico na *X. americana* L. possui uma potência em relação ácido gálico dentro das especificações dos compêndios oficiais. No entanto, por se tratar de uma espécie vegetal, precisa-se tratar com critério a atribuição da atividade antimicrobiana total ao ácido gálico, levando em consideração a presença de um fitocomplexo presente no vegetal.

Palavras chaves: ameixa, validação, difusão em ágar, *Enterococcus faecalis*, potencia microbiológica.

1. Introdução

Ingredientes ativos farmacêuticos são matérias primas de origem vegetal ou sintética que possuem uma substância ou um conjunto de substância capaz de desenvolver uma ação farmacológica. Nesse contexto, fitoterápicos, são entendidos como produtos farmacêuticos tecnicamente elaborados, constituídos exclusivamente de ingrediente ativo de origem vegetal, destinados a intervir no organismo animal, com benefício da saúde do usuário e caracterizados pelo conhecimento e pela manutenção de sua eficácia, segurança e especificações técnicas (ANVISA 2006).

O mercado desses produtos tem crescido em todo mundo, todavia esse aumento não tem refletido na qualidade desses medicamentos disponíveis à população, pois são grandes as intervenções para efetuação do controle de qualidade e a comprovação de segurança e eficácia dos medicamentos fitoterápicos. Isso ocorre devido à complexidade química dos derivados de drogas vegetais (NASCIMENTO et al., 2008; FARIAS et al., 2008). O controle da qualidade de um produto envolve várias etapas que vão desde a obtenção da matéria-prima, passando por todo o processo de produção, culminando com a análise do produto final. Apesar da qualidade da matéria prima não garantir a eficácia do produto, é fator determinante da mesma (SOUZA; FERRÃO, 2006).

No caso de *X. americana* L. planta amplamente utilizada pela medicina tradicional como antibacteriano (MATOS, 2007; MEVY, 2006; MORAIS et al, 2005; SILVA et al. 2012; CARTAXO, SOUZA E ALBUQUERQUE, 2010), não existe uma padronização do seu extrato pela indústria farmacêutica brasileira, tornando necessário investimentos no desenvolvimento de técnicas analíticas ou bioanalíticas para determinação de sua estabilidade, marcador químico, potência antimicrobiana, entre outros. Tran Le et al., 2012, verificando a bioatividade de polifenóis identificaram pela primeira vez o ácido gálico na casca da *X. americana*, atribuindo a esse composto a atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos.

A potência de substância antimicrobiana pode ser demonstrada sob condições específicas através de seu efeito inibitório sobre o crescimento de microrganismo-padrão sensível. (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

A dosagem de antibióticos pode ser determinada por métodos químicos e físico-químicos, todavia os ensaios microbiológicos são, em geral, os métodos de escolha para eliminar dúvidas quanto a perda de atividade, não demonstradas pelos métodos químicos e

CAPÍTULO II

físico-químicos. Estes ensaios aplicam-se com frequência àqueles antibióticos de origem biológica, que podem conter misturas de substâncias com efeitos sinérgicos, antagônicos ou competitivos e cuja potência não pode ser determinada em termos de composição química, como no caso dos medicamentos e ingredientes ativos de origem fitoterápica (PINTO, KANECO E PINTO, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013; HEWITT, 1977). Dessa forma, nos métodos biológicos a potência dos antibióticos geralmente é determinada, comparando-se a dose com a qual se inibe o crescimento de um microrganismo adequado e susceptível com a dose da preparação do antibiótico de referência nas mesmas condições de trabalho (LOURENÇO; PINTO, 2011).

A Farmacopeia Americana traz recomendação quanto a utilização de procedimentos microbiológicos, para a determinação da potência dos antibióticos nas apresentações farmacêuticas. Geralmente são empregados dois métodos, o do cilindro em placa e o turbidimétrico (ESMERINO et al, 2007). O primeiro se baseia na difusão do antibiótico contido em um cilindro vertical, através de uma camada de ágar solidificado em uma placa de Petri, em uma extensão tal, que o crescimento do microrganismo agregado se detenha em uma área circular ou “halo de inibição” ao redor do cilindro que contém a solução do antibiótico. Já o método turbidimétrico se baseia na inibição do crescimento de um cultivo microbiano em uma solução uniforme do antibiótico, em um caldo que favorece o seu rápido crescimento na ausência desse fármaco. Vários antibióticos têm os dois métodos descritos nos compêndios oficiais, apresentando a vantagem de poder ser escolhido o método que melhor se adequa a uma determinada situação (SOLANO et al., 2011).

A determinação da potência antimicrobiana é extremamente importante para o controle e garantia de qualidade em produtos e preparações farmacêuticas, inclusive de drogas vegetais, sendo assim, é necessário o desenvolvimento de práticas e procedimentos econômicos que possa ser aplicado na validação e dosagem de drogas (LOURENÇO; PINTO, 2009).

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e realizar o doseamento microbiológico de *Ximênia americana* L, em relação ao ácido gálico.

2. Materiais e Métodos

2.1 Coleta e aquisição das amostras

X. americana L foi coletada na região semiárida do Estado da Paraíba e sua exsicata foi depositada no Herbário Professor Jayme Coelho de Moraes da Universidade Federal da Paraíba, sob número de registro EAN-14049. O material vegetal foi seco a 40 °C, pulverizado em moinho de facas, com granulometria de 10 mesh. O extrato hidroalcoólicas foi preparados pelo método maceração na proporção de 30:70 (v/v) e em seguida foi submetido à secagem por nebulização em um *Spray Dryer*, da marca LabPlant, utilizando 20% de aerosil como estabilizante farmacotécnico.

2.2 Ensaio de Potencia Antimicrobiana do Ácido Gálico

2.2.1. Preparação da amostra e padrão

O extrato nebulizado da *X. Americana L* onde o mesmo foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% nas seguintes concentrações: 160, 150, 140, 130,120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 e 10 mg/mL. O padrão utilizado foi o ácido gálico, tendo em vista que a literatura científica (OMER & ELNIMA, 2003, JAMES et al., 2007; BAYER, et al., 2012; TRAN LE et al.,2012) relata que essa substância está presente nas cascas de *Ximênia americana* L. Sendo assim, o ácido gálico foi diluído em DMSO a 10% nas mesmas concentrações do extrato nebulizado.

2.2.2. Cepas Microbianas

Para avaliação da potência antimicrobiana do extrato nebulizado da *X. americana* L. foi utilizada cepa padrão American Type Culture Collection (ATCC) de *Enterococcus faecalis* (29212), fornecido pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), a qual mostrou-se sensível, em estudos anteriores deste grupo, ao extrato dessa planta.

2.2.3 Preparação da Suspensão Microbiana e técnica difusão em ágar

O inóculo bacteriano foi padronizado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm, na absorbância de 0,08 a 0,1 a qual é equivalente a 10^6 UFC/mL, conforme preconizado no *Clinical and Laboratory Standards Institute procedures* (CLSI) (2009). Foi utilizado o meio Mueller-Hinton para as análises necessárias. O ensaio foi realizado pela técnica de difusão em ágar, método do cilindro, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira, V edição (2010).

Foi produzida uma camada base através da adição de 25 mL de meio de cultura fundido nas placas de Petri (120 x 30 mm). Após o endurecimento do ágar, foi preparada a camada de superfície, adicionando 1 mL do inóculo previamente determinado, para 100 mL de meio de cultura que será fundido e resfriado entre 48 a 50 °C. Adicionou-se 15 mL meio de superfície na placa de petri contendo o meio base. Após o endurecimento do meio de superfície colocou-se cilindros de aço inoxidável, nos quais foram adicionados 100 µL da solução teste do extrato e/ou do padrão de referência (ácido gálico). As placas foram deixadas por uma hora em temperatura ambiente e depois incubadas em estufa bacteriológica a $37\text{ °C} \pm 0,5$, durante um período de 24 horas. Após este período foi realizada a leitura dos testes dos halos de inibição, ao redor do cilindro, com o auxílio de um paquímetro digital.

2.3. Construção da Curva de Calibração

Para a construção da curva de calibração foram preparadas concentrações descritas no tópico 2.2.1 do extrato da *X. americana* L. denominados de A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11 e A12, A13 e A14. Foram também testadas as mesmas concentrações do padrão (ácido gálico), denominados de P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11 e P12, P13 e P14. Para cada concentração da amostra e do padrão foram preparadas placas em triplicata com quatro cilindros em cada placa, obtendo assim um número de réplicas igual a nove ($n = 9$) para a substância teste, assim como para o padrão.

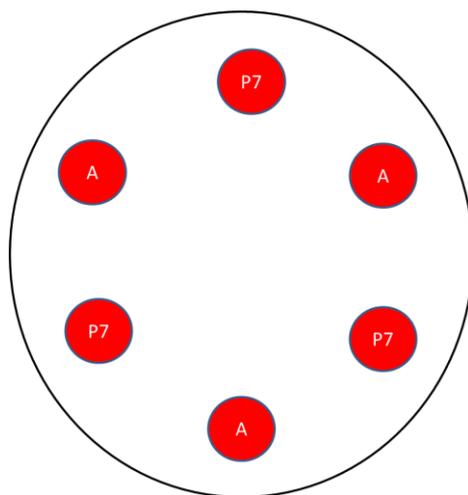
Com as medidas dos halos em milímetros, foi traçado um gráfico, onde o eixo das abscissas representa a concentração da substância teste e o eixo das ordenadas representa a medida dos halos de inibição. Esse gráfico foi utilizado como referência para se determinar a potência antimicrobiana dos extratos nebulizados em relação ao padrão de referência utilizado.

- **Correção do Fator de Calibração**

Para determinação da Potência após a validação do método escolheu-se o delineamento 5x1, o qual é recomendado quando se tem diversas amostras ou uma quantidade grande de concentrações da mesma amostra. Nesse tipo de estudo, quatro concentrações da amostra são analisadas e uma concentração do padrão, essa concentração do padrão precisa estar no ponto médio das concentrações da amostra. (PINTO, KANECO E PINTO, 2010).

Para o ensaio de difusão em ágar (blocos incompletos) recomenda-se utilizar um fator de correção para minimizar diferenças entre placas. Sendo assim, repetiu-se a técnica de difusão, empregando fator de correção da solução do padrão de referência P4, ou seja, a concentração de 40 mg/mL do ácido gálico. Além disso, foram escolhidas quatro concentrações da amostra teste, onde a concentração do padrão (40 mg/mL), foi considerada como o ponto central. Dessa forma, escolheu-se as concentrações de 160, 80, 20, 10 mg/mL do extrato nebulizado. Foram colocados em cada placa seis cilindros, onde três foram preenchidos com a amostra teste nas, concentrações correspondentes, e três com a concentração do padrão de 40mg/mL, em posições alternadas, de acordo com a representação da Figura 1. Dessa forma, no final do ensaio obteve-se 12 medidas de halo de inibição para cada concentração e 36 para o de referência.

Figura 1: Disposição dos cilindros na placa, para obtenção do fator de correção.



A= amostra; P7= concentração do Ácido Gálico na concentração de 40 mg/mL

Com esse resultado foi determinada a resposta da menor dose (L) e a resposta da maior dose (H), em relação a resposta do padrão utilizado, através dos seguintes cálculos

abaixo indicados pela Farmacopeia Brasileira, V edição, (2010) adaptado por Pinto, 2010, no qual a dose menor estabelecida deverá fornecer como resposta um halo de inibição maior que L, e doses acima da dose correspondente de H fornecerá a respostas equivalentes, independente do aumento da dose.

Resposta em baixa dose (L):

$$L = 3 * (1C + [2 * 2C] + 3C - \frac{5C}{5})$$

Resposta em alta dose (H):

$$H = 3 * (5C + [2 * 4C] + 3C - \frac{1C}{5})$$

Onde: 1c= Média dos halos obtido da menor concentração;

2c= Média dos halos obtidos da segunda menor concentração;

3c= Média do padrão utilizado (ácido gálico);

4c= Média dos halos obtidos da segunda maior concentração;

5c=Média dos halos obtidos da maior concentração.

2.4. Validação do Método de difusão em ágar

A validação foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pela Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Official Methods of Analysis of AOAC International* (AOAC INTERNATIONAL, 1995) e *International Conference on Harmonization* (ICH, 1995), através da determinação dos parâmetros de limite de quantificação, limite de detecção, linearidade, exatidão, precisão e robustez.

2.4.1. Linearidade

Para cada curva analítica foi obtida a equação da reta de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e realizada a análise da adequação do modelo proposto. Além disso, calculou-se o coeficiente de correlação linear (r) que, segundo a resolução brasileira (RDC 889/03) deve ser igual ou superior a 0,98 para considerar a curva analítica adequada. Além disso, foi realizado o teste da falta de ajuste, o teste de significância da regressão e análise dos resíduos.

2.4.2. Precisão e Exatidão

Três níveis de concentração foram utilizados para avaliar a repetitividade e exatidão dos resultados.

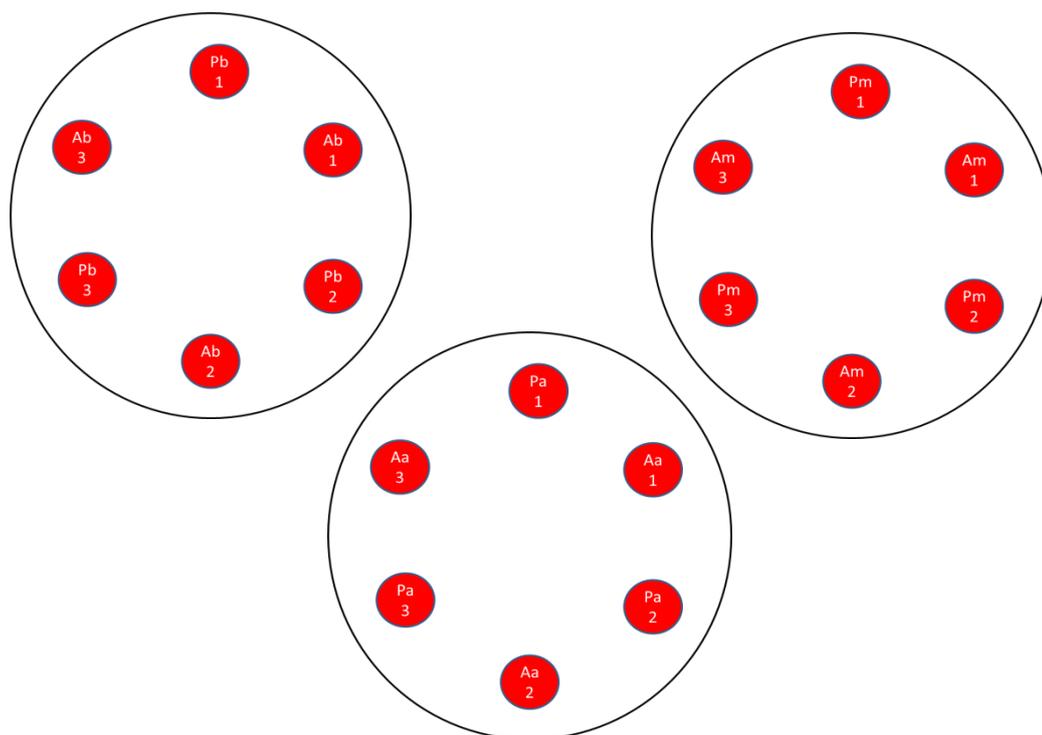
CAPÍTULO II

Soluções do padrão e da amostra foram preparadas em DMSO (10%), nas concentrações: 10, 20, 40 mg/mL para a avaliação do nível a 50 % do valor real; 20, 40 e 80 mg/mL para o nível a 100 % e 40, 80 e 160 mg/mL para o nível de 150 %.

Para cada uma das três faixas de concentração foram preparadas quatro séries de soluções, realizando desta forma, quatro doseamentos a cada nível, sendo realizados dois experimentos em um único dia e mais três experimentos em dias diferentes, avaliando assim a precisão intermediária e a exatidão intradia e interdia.

Para cada doseamento foram empregadas três placas, sendo que em cada placa foram adicionadas as três soluções da série padrão e as três da série teste, de acordo com a Figura 2, caracterizando um bloco completo. Dessa forma, a precisão foi avaliada através da determinação do desvio padrão e do coeficiente de variação, entre as diferentes concentrações do padrão e da amostra.

Figura 2: Disposição dos cilindros na placa, para obtenção da precisão e exatidão.



Ab1, Ab2 e Ab3= 1^a, 2^a e 3^a concentração da amostra no nível baixo, respectivamente; **Am1, Am2 e Am3**= 1^a, 2^a e 3^a concentração da amostra no nível médio, respectivamente; **Aa1, Aa2 e Aa3**= 1^a, 2^a e 3^a concentração da amostra no nível alto respectivamente; **Pb1, Pb2 e Pb3**= 1^a, 2^a e 3^a concentração do ácido gálico no nível baixo, respectivamente; **Pa1, Pa2 e Pa3**= 1^a, 2^a e 3^a concentração do ácido gálico no nível médio, respectivamente; **Pa1, Pa2 e Pa3**= 1^a, 2^a e 3^a concentração do ácido gálico no nível alto, respectivamente.

CAPÍTULO II

Os resultados obtidos foram utilizados para avaliação tanto da exatidão, quanto da precisão intradia e interdia do método. A potência média do ácido gálico em cada nível (50, 100 e 150 %) e o desvio padrão foram calculados ($n = 3$). O valor do desvio padrão do doseamento de antibiótico em cada nível deve ser no máximo 15 % e o valor médio da potência deve estar entre 85 e 115 % (BRASIL., 2003; U.S. FOOD, 2001).

Para efetuação dos cálculos de potência, utilizou-se as seguintes expressões matemáticas (LOURENÇO, 2006, SOLANO, 2008, PINTO, KANECO E PINTO, 2010).

Diferença entre as doses (E):

$$E = \frac{1}{2} * (3Pc - 1Pc)$$

Onde: $3Pc = 3^a$ concentração do padrão.

$1Pc = 1^a$ concentração do padrão.

Diferença entre as preparações da menor resposta da amostra e do padrão:

$$F = L - 2Pc$$

Onde: $L =$ menor resposta calculada da amostra

$2Pc = 2^a$ concentração do padrão.

Razão Logaritma das doses (I):

$$R = \frac{3Pc}{2Pc} + \frac{2Pc}{1Pc}$$

$$I = \log R$$

Inclinação da Curva (b):

$$b = \frac{E}{I}$$

Potencia da amostra (P):

$$P = \frac{F}{b} * 100$$

2.4.3. Limite de detecção

O limite de detecção é a menor concentração do analito, que é possível detectar pelo

método. Assim, foram preparadas placas com soluções de ácido gálico nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 mg/mL e do extrato nebulizador nas mesmas concentrações. Além disso, placas com cilindros contendo o diluente (DMSO 10 %) sem o extrato e a solução padrão de referência a 40 mg/mL também foram preparadas a fim de se comparar a média dos diâmetros dos halos do diluente para determinação do limite de detecção. Além disso calculou-se o limite de detecção também pela curva de calibração.

2.4.4. Limite de quantificação

Utilizou-se a curva de calibração do tópico 2.3.1, para determinação do limite de quantificação, que é a menor concentração que pode ser quantificada com exatidão e precisão.

Dois procedimentos foram realizados: no mesmo dia e em três em dias diferentes; e foram calculados o desvio padrão e coeficiente de variação para determinação da exatidão e precisão.

2.4.5. Robustez

Os resultados dos métodos analíticos podem variar por uma série de fatores, o que afetaria a sua reprodutibilidade. Assim, deve-se avaliar a robustez do método, isto é, a sua capacidade em resistir a pequenas variações (EMER, JOHN e MILLER, 2005).

A robustez do método foi avaliada de acordo com a variação do pH do meio e variação do tempo de pré-incubação.

2.4.5.1. pH do meio

O ágar Muller Hinton (HIMEDIA- M173-500G) foi preparado conforme descrito pelo fabricante, porém no lugar de se utilizar o pH 7,2, foi ajustado para 6,0, para verificar crescimento microbiano e conseqüentemente a medição dos halos de inibição em meio ácido. Também foi testado o MH com o pH ajustado para 8,0 com hidróxido de sódio a 1 mol/L afim de ver o mesmo processo descrito acima em meio básico. Esse meio foi utilizado como camadas base (25,0 mL) e superfície (15,0 mL) em placas, nas quais foram adicionadas as soluções do padrão e da amostra em nas concentrações de 70, 60, 50, 40, 30, 20, e 10 mg/mL.

A distribuição das soluções nas placas foi realizada de acordo com o item 2.2.3.

2.4.5.2. Tempo de pré-incubação

Houve uma variação no tempo de repouso das placas antes de serem colocadas na estufa, ou seja, variação no tempo de pré-incubação. Dessa forma, as placas foram colocadas na estufa com 30, 60 e 120 minutos após, o término das análises. Foram utilizadas as mesmas concentrações do item 2.3.5.1. O período de incubação de 120 minutos foi utilizado como controle para comparação entre as curvas.

2.5. Cálculo da potência pelo delineamento 5x1

Depois do método validado, foi calculada a potência do ácido gálico na amostra em relação ao padrão. Para efetuação do cálculo de potência do ácido gálico no extrato nebulizado de *Ximênia Americana* L, utilizou-se as seguintes expressões matemáticas: (LOURENÇO, 2006, SOLANO, 2008, PINTO, KANECO E PINTO, 2010).

- Delineamento 5x1

Correção dos pontos individuais da curva:

1ª Concentração corrigida (1Pc).

$$1Pc = P1 + (3Pc - 3Pp1)$$

Onde: **P1**= Média dos halos de inibição da concentração 1 do padrão (10mg/mL);

3Pc = 3ª concentração corrigida do padrão;

3Pp1= Média dos halos de inibição da 3ª concentração (padrão a 40mg/mL), na placa correspondente ao ensaio da 1ª concentração do padrão.

2ª Concentração corrigida (2Pc).

$$2Pc = P2 + (3Pc - 3Pp2)$$

Onde: **P2**= Média dos halos de inibição na concentração 2 do padrão (20 mg/mL);

3Pc = 3ª concentração corrigida do padrão;

3Pp2= Média dos halos de inibição da 3ª concentração (padrão a 40mg/mL) na placa correspondente ao ensaio da 2ª concentração.

3ª Concentração corrigida ($3Pc$).

$$3Pc = \frac{1}{4} * (3Pp1 + 3Pp2 + 3Pp4 + 3Pp5)$$

Onde: $3Pp1$ = Média dos halos de inibição da 3ª concentração do padrão na placa, que corresponde ao ensaio da 1ª concentração. (10mg/mL);

$3Pp2$ = Média dos halos de inibição da 3ª concentração do padrão na placa, que corresponde ao ensaio da 2ª concentração. (20mg/mL);

$3Pp4$ = Média dos halos de inibição da 3ª concentração do padrão na placa, que corresponde ao ensaio da 4ª concentração. (40mg/mL);

$3Pp5$ = Média dos halos de inibição da 3ª concentração do padrão na placa, que corresponde ao ensaio da 5ª concentração. (80 mg/mL).

4ª Concentração corrigida ($4Pc$)

$$4Pc = P4 + (3Pc - 3Pp4)$$

Onde: $P4$ = Média dos halos de inibição na concentração 4 do padrão (80 mg/mL).

$3Pc$ = 3ª concentração corrigida

$3Pp4$ = Média dos halos de inibição da 3ª concentração (padrão a 40 mg/mL) na placa correspondente ao ensaio da 4ª concentração.

5ª Concentração corrigida ($5Pc$)

$$5Pc = P2 + (3Pc - 3Pp5)$$

Onde: $P5$ = Média dos halos de inibição na concentração 5 do padrão (160 mg/mL);

$3Pc$ = 3ª concentração corrigida;

$3Pp5$ = Média dos halos de inibição da 3ª concentração na placa (padrão a 40mg/mL) correspondente ao ensaio da 5ª concentração.

Diferença entre as doses (E):

$$E = \frac{1}{10} * (2 * 5Pc + 4Pc + 2PC - 2 * 1PC)$$

Diferença entre as preparações da menor resposta da amostra Amostra (L) e do padrão:

$$F = L - 3Pc$$

Onde: L = menor resposta calculada da amostra.

Razão das doses (R):

$$R = \frac{5P_c}{4P_c} = \frac{4P_c}{3P_c} = \frac{3P_c}{2P_c} + \frac{2P_c}{1P_c}$$

Razão logarítmica da razão entre as doses (I)

$$I = \log R$$

Inclinação da Curva (b):

$$b = \frac{E}{I}$$

Potência da amostra (P)

$$P = \frac{F}{b} * 100$$

Para efetuação dos cálculos foram realizados ensaios utilizando as concentrações de 10, 20, 40, 80 e 160 mg/mL, na qual a concentração de 40 mg/mL se refere ao ponto central da curva de calibração e a concentração do padrão no delineamento 5x1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Correção do Fator de Calibração

Com base nas equações 1 e 2 apresentadas no item 2.3.2, foram calculados a menor (L) e maior (H) resposta da amostra, em relação a concentração do padrão. Com base na equação da reta da amostra ($y = 0,0534x + 10,059$) do primeiro dia foram calculadas as concentrações (x) correspondentes a menor e maior respostas (y) (TABELA 1).

Tabela 1. Valores calculados de L e H e das doses correspondentes da amostra em relação ao padrão.

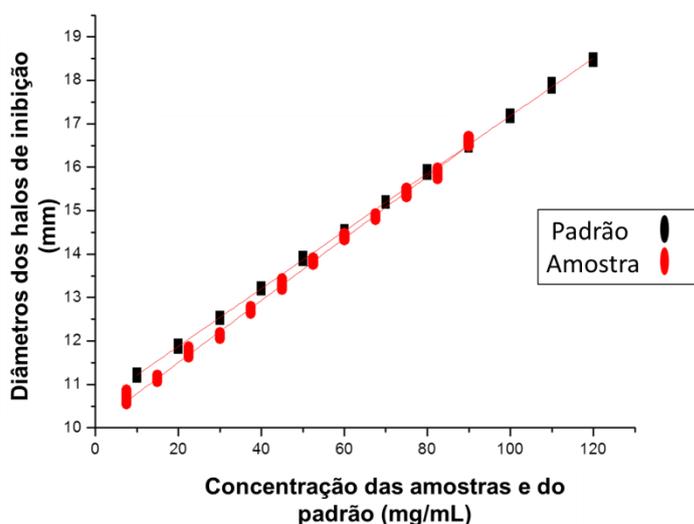
Respostas	Halos de inibição (y)	Concentração correspondente (x)
Menor (L)	11,89 mm	34,28 mg/mL
Maior (H)	17,44 mm	138,22 mg/mL

Observa-se que a menor resposta (L) está incluída entre as concentrações da curva de calibração. Isso significa que acima da concentração de 34,28 mg/mL, a amostra já tem uma eficácia em relação a resposta do padrão. No caso da maior resposta (H), essa não está incluída na curva de calibração, mostrando assim que todas as concentrações da curva de calibração apresentam uma resposta dependente da concentração (PINTO, KANECO E PINTO, 2010).

3.2. Análise da Curva de Calibração e verificação da linearidade

Pelo teste da falta de ajuste, teste da significância da regressão e observação do coeficiente de linearidade, percebe-se que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Dessa forma, o modelo possui linearidade e o termo curva analítica (linearidade) foi aqui adotado como um parâmetro de validação. (Fig.3)

Figura 3: Curvas de calibração obtidas com o padrão e a amostra.



Foram obtidas cinco curvas analíticas, sendo duas no mesmo dia (avaliação intradia) e as demais em dias diferentes (avaliação interdias). O modelo linear foi adequado para as cinco curvas apresentando normalidade, independência dos resíduos (homoscedasticidade) significativos e desvio de linearidade (regressão) não significativa (ERMER, JOHN e MILLER, 2005). As cinco retas apresentaram coeficiente de correlação (r) superior ou igual a 0,98, conforme critério estabelecido pela resolução brasileira (BRASIL, 2003) (TABELA 2). As duas retas obtidas no ensaio intradia foram comparadas e as diferenças entre os

CAPÍTULO II

coeficientes linear e angular não foram significativas. Resultado equivalente foi verificado quando a comparação foi realizada entre as cinco retas obtidas nos quatro dias de ensaio e entre o padrão e a amostra com doze repetições (N), verificando assim o paralelismo entre as retas (ERMER, JOHN e MILLER, 2005). (TABELA 2 E 3)

O coeficiente de determinação (r^2) é a fração da variância total de y que é explicada pela variação em x, ou seja, a proporção da variação total do diâmetro dos halos de inibição que é explicada pela variação da concentração da substância antimicrobiana. Desta forma, um valor de r^2 igual a 0,9996 (para o padrão) e 0,9988 (para a amostra) do primeiro dia, significa que 99,96 % e 99,88% da variabilidade do diâmetro dos halos de inibição é explicada pela concentração do ácido gálico padrão e do ácido gálico na *X. americana L*, respectivamente (MONTGOMERY et. al., 2001).

Tabela 2. Parâmetros de curva analítica (intercepto - a, inclinação - b, e coeficiente de determinação - r^2) para o padrão do ácido gálico na faixa de 10 a 160 mg/mL.

Retas	Coefficiente linear (a)	Coefficiente angular (b)	Coefficiente de determinação (r^2)	N
1º Dia A	0,0664	10,549	0,9996	12
1º Dia B	0,0664	10,546	0,9996	12
2º Dia	0,0664	10,550	0,9995	12
3º Dia	0,0663	10,548	0,9997	12
4º Dia	0,0662	10,557	0,9997	12

CAPÍTULO II

Tabela 3. Parâmetros de curva analítica (intercepto - a, inclinação - b, e coeficiente de determinação - r^2) para a amostra (extrato nebulizado da *X. americana* L) na faixa de 10 a 160 mg/mL.

Retas	Coefficiente linear (a)	Coefficiente angular (b)	Coefficiente de determinação (r^2)	N
1º Dia A	0,0534	10,059	0,9988	12
1º Dia B	0,0532	10,102	0,9984	12
2º Dia	0,0539	10,068	0,9983	12
3º Dia	0,0538	10,071	0,9979	12
4º Dia	0,0537	10,074	0,9978	12

A normalidade e independência de resíduos (homoscedasticidade) são requisitos necessários para que o método dos mínimos quadrados seja empregado na análise de regressão linear (SOLANO, 2008). Portanto, se algum deles estiverem fora dos limites de controle limita o método de ajuste. Dessa forma, os resultados do estudo dos parâmetros do modelo linear construído apresentaram para os resíduos uma distribuição normal e sem dependência entre os mesmos (Figuras 4 e 5), a regressão foi adequada para representar a atividade do ácido gálico padrão frente a *E. faecalis*, assim como do ácido gálico no extrato de *X. americana* L.

Figura 4: Gráficos dos Resíduos para o padrão de Ácido Gálico

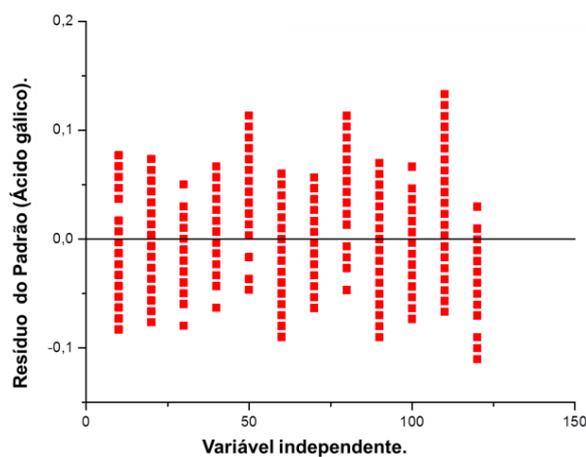
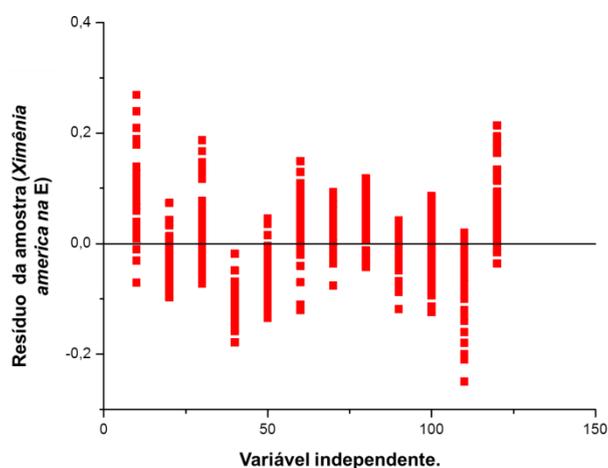


Figura 5: Gráficos dos Resíduos para o Extrato nebulizado



3.3. Precisão e Exatidão

A precisão foi avaliada quanto à repetitividade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdias), assim como a exatidão. A exatidão pode ser vista como composta pela veracidade (trueness)-(bias) e pela precisão (desvio padrão) como demonstrados na Tabela 4. Desta forma, pode ser considerada como a estimativa do erro total do processo analítico. A veracidade está relacionada com os erros sistemáticos do procedimento analítico e em alguns casos é referenciada como exatidão. (ROZET et al., 2007, HUBERT 2007).

É recomendável desvio padrão menor do que 5 % em relação à potência calculada, sendo aceitos valores limites de até 10 %, indicando que o método desenvolvido apresenta precisão (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Em relação à exatidão intradia e interdias, os valores médios de potência estão de acordo com o critério de validade: valor médio da potência entre 85 e 115 % do valor teórico. Dessa forma, o método foi considerado exato, uma vez que o intervalo de tolerância para a concentração da amostra no nível em questão estava inserido no limite de ± 15 % (variação máxima permitida para avaliação da exatidão segundo resolução brasileira e guia do FDA) (BRASIL, 2003; U.S. FOOD., 2001).

Tabela 4. Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão para precisão e exatidão intra e inter-dias da amostra em três diferentes níveis de concentração.

Análises	Potência e intervalo de confiança a 95 % (%)		
	50 %	100 %	150 %
1º dia A	50,30	101,00	151,10
1º dia B	50,28	101,51	152,80
2º dia	51,51	101,50	151,46
3º dia	50,75	100,75	150,22
4º dia	50,45	101,96	151,79
Média	50,59	101,34	151,35
Desvio padrão	5,15	4,75	9,44
Coef. de variação	1,010	0,468	0,623

3.4. Limite de detecção

Foi calculada na análise deste item a média corrigida do diâmetro dos halos de inibição para as diferentes soluções, inclusive o branco (solvente-DMSO a 10%). Verificou-se que a diferença entre essas médias foi significativa e a menor concentração do ácido gálico no extrato que produziu halos de diâmetro maior que o obtido com o diluente (DMSO 10 %), isto é, apresentou atividade antimicrobiana detectável pelo método foi igual a 10 mg/mL visto que o diluente não apresentou atividade antimicrobiana. Portanto, a concentração de 10 mg/mL foi determinada como limite de detecção do método desenvolvido. Pela curva de calibração, calculou-se o limite de detecção, sendo esse igual a 1,14 mg/mL para o ácido gálico (padrão) e de 1,41 para o extrato nebulizado analisado.

3.5. Limite de quantificação

Como demonstrado na tabela 5, foram calculados o limite de quantificação pela curva de calibração intradias e interdias além do desvio padrão e coeficiente de variação. Dessa forma, observa-se que o ácido gálico padrão apresenta um menor LQ do que a amostra. Esse valor é o esperado já que na amostra não possui apenas o ácido gálico puro, mais sim uma

CAPÍTULO II

variedade de compostos químicos, por isso, precisa-se de uma maior concentração do extrato para obter a mesma resposta do padrão (LOUSADA, et al., 2012).

Tabela 5. Valores do limite de quantificação, desvio padrão e coeficiente de variação calculado intradia e interdias.

Análises	Amostra	Padrão
1º dia A	4,320	3,478
1º dia B	4,343	3,477
2º dia	4,284	3,480
3º dia	4,293	3,483
4º dia	4,298	3,488
Desvio padrão	0,023	0,004
Coeficiente de variação	0,552	0,127

3.6. Robustez

A literatura científica relata que no doseamento microbiológico podem ocorrer variações de pH do meio de cultura e variação do tempo de pré-incubação podem alterar o diâmetro do halo de inibição (HEWITT, 2007; KAVANAGH, 1979, SOLANO, 2008). Desta forma, testaram-se alterações nesses fatores.

3.6.1. pH do meio de cultura

Nas placas preparadas com ágar Mueller-Hinton(MH) pH 6,0 foram observados halos menos nítidos devido ao crescimento escasso do microrganismo teste. No entanto, foi possível medir o seu diâmetro. Em relação às placas com ágar MH pH 8,0 o microrganismo apresentou um crescimento mais abundante quando comparado com MH pH 7,0 e 6,0, tornando os halos mais bem definidos. Todavia, as médias dos halos foram a mesmas para todos os casos, embora que para melhor performance do método o pH deve ser ajustado para 7,0. (LOURENÇO et al, 2011).

3.6.2. Variação do tempo de pré- incubação

Quanto a variação do tempo de pré-incubação das placas percebeu-se de acordo com a tabela 6 que houve uma variação na média dos diâmetros dos halos de inibição para todas as concentrações.

O tempo de pré-incubação é o tempo que as placas ficam em repouso após a distribuição da substância teste no reservatório (cilindros). Esse tempo permite a difusão das substâncias antes do início do desenvolvimento dos microrganismos. Dessa forma, ocorrendo uma variação nesse tempo, ocorre também uma variação da atividade antimicrobiana, como ocorreu nos tempos de 30 e 60 minutos. Isso ocorre devido ao fato de não ter completado o processo de difusão do líquido teste antes do crescimento microbiano (ALVES et al., 2008). A Farmacopeia brasileira V edição (2010) recomenda o tempo de pré-incubação de 120 minutos, já que a maioria dos líquidos obedecem à esse tempo para sua difusão total.

Tabela 6. Médias dos halos de inibição (mm) obtidos com diferentes tempo de incubação.

Concentração (mg/mL)	Amostra			DP	CV	Padrão			DP	CV
	30 min	60 min	120 min			30 min	60 min	120 min		
70	12,79	13,05	13,82	0,535	4,051	14,07	14,55	15,19	0,561	3,8477
60	12,33	12,97	13,29	0,488	3,800	13,25	14,12	14,53	0,653	4,679
50	11,94	12,34	12,76	0,410	3,321	13,12	13,39	13,86	0,374	2,782
40	11,65	11,97	12,22	0,285	2,391	12,03	12,89	13,20	0,606	4,770
30	11,17	11, 42	11,69	0,260	2,275	11,96	12, 19	12,54	0,292	2,388
20	10,77	11, 02	11,16	0,197	1,798	11,23	11,56	11,87	0,320	2,770
10	10,09	10, 25	10,63	0,277	2,686	10,69	11, 18	11,21	0,291	2,649

Legenda> DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

3.7. Cálculos de Potência

Depois da validação do método, calculou-se a potência do ácido gálico na amostra em relação ao padrão pelo delineamento 5x1 de acordo com item 2.3.6, sendo esse valor igual a 94,63 %. Esse resultado está de acordo com as especificações vigentes que permitem uma variação de 85 a 115 % (BRASIL, 2003).

4. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o ensaio microbiológico do método de difusão em ágar pela técnica do cilindro oferece boa precisão, exatidão, bem como uma curva de calibração apropriada no intervalo de concentração de 10 a 160 mg/mL, sendo efetivo para estabelecer a potência antimicrobiana da planta em relação ao padrão ácido gálico.

Com a aplicação do método observou-se que o extrato nebulizador de *X. americana* L. possui uma potência, em relação ao padrão, dentro das especificações descritas nos compêndios oficiais. No entanto, por se tratar de uma espécie vegetal, precisa-se tratar com critério a atribuição da atividade antimicrobiana total ao ácido gálico, levando em consideração a presença de um fitocomplexo presente no vegetal.

Agradecimentos

Ao CNPQ pelo financiamento da pesquisa

REFERÊNCIAS

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A. H.C.; CASEMIRO, L. A; JACOMETTI, N. A.; FURTADO, C; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; CUNHA, C. H.G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**. v. 31, n. 5, p.1224-1229, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC**. 16.ed. v.1, Arlington, 1995. pt.1, p.18.

BAYER H.; EY, N.; WATTENBERG, A.; VOSS, C.; BERGE, M. Purification and characterization of riproximin from *Ximenia americana* fruit kernels. **Protein Expression and Purification**. v. 8. p 97–105, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução- RDC, nº 899, de 29 de maio de 2003**. Dispõe sobre o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial da república federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de Junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.60 p.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** 131 (2010) 326–342.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE: Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo V. 25, n.1, 2009.

ERMER, J.; JOHN H.; MILLER, M.; **Method Validation in Pharmaceutical Analysis**. 3ª Edição. Library, British, 2008.

ESMERINO, L.A.; PEREIRA, A.V.; ADAMOWICZ, T.; BORGES, D. M.; TALACIMON, E.A. SCHELESKY, M. E. Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. **Ciência Biologia e Saúde**, Ponta Grossa, Vol.10 nº1 53-60, mar. 2007.

FARIAS, MR; SCHENKEL, E. P.; BERGOLD, A. M.; PETROVICK, P. R. O Problema da Qualidade dos Fitoterápicos. **Caderno de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 73-82, 2008.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed. Editora Atheneu, 2010.

HEWITT, W. **Microbiological assay – an introduction to quantitative principles and evaluation**. Academic Press, inc. Orland: 1977, 284p.

HEWITT, W. **Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis: A Rational Approach**. 1 ed. INTERPHARM, 2007, 260p.

HUBERT, P.; NGUYEN-HUU, J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P.; COHEN, N.; COMPAGNON, P.; DEW'E, W.; FEINBERG, M.; LALLIER, M.; LAURENTIE, M.; MERCIER, N.; MUZARDI, G.; NIVET, C.; VALAT, L.; ROZET, E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal – Part II. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, V. 45, P. 70 – 81, 2007.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. *Validation of analytical procedures: methodology, Q2B* (CPMP/ICH/281/95, 1995. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder>>. Acesso em: 09 out 2012.

JAMES, D. B.; ABU, E. A.; WUROCHEKKE, A. U. & ORGI, G. N. Phytochemical and Antimicrobial Investigation of the Aqueous and Methanolic Extracts of *Ximenia americana*. **Journal of Medical Science**. v. 7, N. 2, p. 284-288, 2007.

KAVANAGH, F.W; RAGHEB, H.. Microbiological assays for antibiotics and vitamins: considerations for assuring accuracy. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 62, n.4, p. 943 – 950, 1979.

LOURENÇO, F.R.; PINTO, T.J.A. Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 47, n. 3, 2011.

LOURENÇO, F.R.; PINTO, T.J.A. Comparison of three experimental designs employed in gentamicin microbiological assay through agar diffusion. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 45, n. 3, 2009.

LOURENÇO, R.F. **Doseamento microbiológico de gentamicina por difusão em agar-proposta de delineamento experimental**. São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, 2006. Dissertação de mestrado.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Imprensa Universitária, p.122-124, 2007.

MEVY, J.P.; BESSIERE, J.M.; GREFF, S.; ZOMBRE, G.; VIANO, J. Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia americana* L. **Biochemistry System Ecology**. Vol.34, p.549- 553, 2006.

MONTGOMERY, D.; PECK, E.; VINING, G. Introduction to linear regression analysis. New Cork: **Wiley Interscience Publication**, 2001. 641 p.

MORAIS. S.N; DANTAS, J. D.P.; SILVA, A.R.A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 15(2): 169-177, Abr./Jun. 2005.

NASCIMENTO, VT; LACERDA, E.; MELO, JG; LIMA, CSA, AMORIM, ELC. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**.V.7, n.3, 56-64, 2008.

OMER, M.E.F.A.; ELNIMA, E.I. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. **Fitoterapia**. v.74, p.122–126, 2003.

PINTO, TJA.; KANEKO, T M.; PINTO, AF. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2010, 780 p.

ROZET, E.; CECCATP. A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBER, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111–125, 2007.

SILVA, M.S.P.; BRANDÃO, D.O.; CHAVES, T. P.; FORMIGA FILHO, A.L.N.; COSTA, E.M.M.B.; SANTOS, V.L.; MEDEIROS, A.C.D. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semi-arid Northeast: contribution to the control of oral microorganisms. **Evidence-Basedn Complementary andAlternative Medicine**. Article ID 681207, 6 páginas, 2012.

SOLANO, A. G. R; PEREIRA, L. M.C.S.; LEONEL, M. F. V.; NUNAN, E. A. Development of agar diffusion method for dosage of gramicidin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, 2011.

SOLANO. A. G. R. **Desenvolvimento de métodos microbiológicos para doseamento de Gramicidina matéria-prima**. Belo Horizonte. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008. Dissertação de mestrado.

SOUZA, J S; FERRÃO, M F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I : Dosagem por regressão multivariada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**.vol. 42, n. 3, jul./set., 2006.

TRAN LEA, N.H; MALTERUDA, K. E; DIALLOB, D.; PAULSENA , B. S.; NERGÅRDA, C.S.; WANGENSTEENA, H. Bioactive polyphenols in *Ximenia americana* and the traditional use among Malian healers. **Journal of Ethnopharmacology**. 139 (2012) 858– 862.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. Rockville, 2001, 22p.

UNITED STATES PHARMACOPEIAL 30/ NF 25. Vol. 33, n.1, p. 59. 2013.

CAPÍTULO III

**Estudo de uma formulação candidata a medicação
intracanal a partir de Labdem –IA37**

Estudo de uma formulação candidata a medicação intracanal a partir de Labdem –IA37

Deysiane Oliveira Brandão; Cleildo Pereira Santana; Felipe Hugo Alencar Fernandes; Ana Cláudia Dantas de Medeiros

RESUMO

O tratamento endodôntico consiste na retirada da polpa dentária, todavia, os microrganismos que causam infecções nessa região podem sobreviver às sessões de retirada da polpa, e quando isso ocorre, a medicação intracanal é aconselhada com o objetivo de eliminar esses microrganismos. Todavia, não existe uma formulação totalmente eficaz, sendo necessária a pesquisa de novas medicações a partir de plantas. Porém todo fitoterápico, assim como todo fármaco possui características químicas e físicas importantes que precisam ser estudadas antes de sua incorporação em um veículo farmacêutico, surge então a importância dos estudos de pré formulação. Dessa forma, realizou-se um estudo de pré-formulação do Extrato Labdem-IA37 utilizando análises termoanalíticas e espectroscopia no infravermelho, tendo em vista a formulação de uma pasta intracanal a partir do extrato nebulizado dessa planta. O extrato hidroalcoólico dessa planta foi obtido pelo método de percolação e em seguida nebulizado em *Spray dryng*. Foram produzidas misturas binárias entre os extratos nebulizados e os excipientes farmacêuticos antissépticos, diluentes e emolientes que são utilizados na produção de uma pasta intracanal. O estudo de pré formulação foi realizado através de técnicas termoanalíticas (termogravimetria-TG e calorimetria exploratória diferencial- DSC) e espectroscopia na região do infravermelho visando avaliar a incompatibilidade ingrediente-ativo/excipiente. Nas análises térmicas os excipientes flavolizantes 1 e 2, diluente 4 e emolientes 1 e 2 mostraram incompatíveis com o extrato todavia as análises na espectroscopia na região do infravermelho mostraram que essas incompatibilidades não apresentaram muita intensidade. Dessa forma, percebe-se que tanto as análises termoanalíticas quanto a espectroscopia no infravermelho são técnicas que constituem uma boa ferramenta para caracterização do ingrediente ativo farmacêutico obtido a partir do extrato do extrato Labdem-IA37, assim como para estudos de pré-formulação com os excipientes utilizados no desenvolvimento de uma pasta intracanal de uso endodôntico.

Palavras chaves: pré-formulação, fitoterápicos, tratamento endodôntico, análise térmica, espectroscopia.

1. Introdução

Infecções endodônticas são alterações que ocorrem na polpa dentária, devido à proliferação bacteriana neste local. O tratamento endodôntico consiste na retirada dessa constituição dentária, todavia, os microrganismos que causam infecções nessa região podem sobreviver às sessões de retirada da polpa, e quando isso ocorre, a medicação intracanal é aconselhada com o objetivo de eliminar esses microrganismos, controlando assim, os processos infecciosos e inflamatórios que possam surgir nessa região (RAMOS et al., 2012).

Para uma maior eficiência do tratamento endodôntico é necessário que a medicação utilizada nesse processo possua algumas particularidades, entre essas, não ter efeito irritativo aos tecidos periapicais, ter uma boa adesão às paredes do canal, possuir uma boa absorção local, possuir propriedades antimicrobianas, ser de fácil manipulação, ter características organolépticas satisfatórias e possuir baixo custo. Todavia, até o momento nenhum medicamento com todas essas características foi formulado. Sendo assim, a descoberta de novos compostos bioativos, é de grande importância para a odontologia, pois infecções na cavidade bucal são frequentes, sendo o *Enterococcus faecalis*, principal microrganismo envolvido neste tipo de infecções (SILVEIRA et al., 2011; RAMOS et al., 2012).

O extrato Labdem-IA37 demonstra atividade antimicrobiana e contém compostos bioativos, que poderão ser utilizados como substâncias alternativas para o tratamento endodôntico, principalmente em *E. faecalis*. Dessa forma a incorporação do Labdem-IA37, em formulações para uso endodôntico pode ser útil na eliminação e/ou diminuição da carga bacteriana nestas infecções.

Porém todo fitoterápico, assim como todo fármaco possui características químicas e físicas importantes que precisam ser estudadas antes de sua incorporação em uma formulação. E, os, estudos de uma formulação candidata são conduzidos a fim permitir a detecção de mudanças químicas nos compostos de uma formulação, mesmo a níveis muito baixos. Nesta fase do desenvolvimento farmacotécnico, é fundamental a avaliação da compatibilidade entre droga e excipientes. Isto porque interações podem afetar a natureza química da composição, conseqüentemente sua segurança e eficácia (TITA et al., 2011). Esses estudos ajudam na seleção de excipientes que aumentam a probabilidade do desenvolvimento de uma forma de dosagem mais estável. Em particular, aquelas pouco solúveis e que possuem baixa disponibilidade (MOYANO et al., 2010).

Com base nisso, a análise térmica oferece vantagens significativas na realização destes

estudos, devido à economia de tempo e a baixa quantidade de amostra utilizada neste ensaio, o que torna possível detectar o grau de compatibilidade/ incompatibilidade diretamente na mistura física (fármaco/excipiente), evitando o demorado processo de análise por outra técnica analítica (BRUNI et al., 2010).

São extensas as aplicações da análise térmica na indústria farmacêutica em torno da investigação físico-química de produtos. Por isso, tem sido extensivamente utilizada como ferramenta analítica confiável e essencial para o controle da qualidade e desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, bem como para o estudo da estabilidade, compatibilidade e das possíveis interações entre fármacos e excipientes (ALVES et al., 2011).

As análises em infravermelho além de fornecer características estruturais do material ativo, também auxiliam na seleção de componentes da formulação, na qual as características químicas de cada excipiente podem ser avaliadas isoladamente e/ou misturando com os componentes da formulação (SILVA JÚNIOR, 2006; NUNES et al., 2009; ALVES, 2011).

Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar o estudo de uma medicação intracanal, a partir do extrato Labdem-IA37.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção do extrato

A planta foi coletada na região semiárida do Estado da Paraíba. O material vegetal foi seco a 40 °C e pulverizado em moinho de facas, com granulometria de 10 mesh. O extrato hidroalcolólico foi preparado pelo método maceração e em seguida foi submetido à secagem por nebulização em um aparelho Spray Dryer, da marca LabPlant, utilizando 20% de Aerosil 200[®], como estabilizante farmacotécnico.

2.2. Misturas Binárias analisadas

As misturas binárias foram preparadas, usando o extrato nebulizado (Labdem-IA37) e os seguintes excipientes farmacêuticos: agente diluente 1, 2, 3 e 4 (AD1, AD2, AD3 e AD4), flavolizante 1 e 2 (AF1 e AF2) e agente emoliente 1, 2 e 3 (EM1, EM2 e EM3). As misturas binárias foram produzidas nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1.

2.3 Caracterização Térmica

Além das misturas binárias, também foram analisados o extrato e os excipientes isoladamente.

2.3.1 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A caracterização térmica foi obtida em um equipamento DSC, modelo Q20, marca TA Instruments, utilizando-se amostra de 2,0 mg, em atmosfera de nitrogênio (50 mL min^{-1}), na faixa de temperatura de 25 a 400 °C, com razão de aquecimento de 10 °C min^{-1} . As curvas foram plotadas utilizando o software Universal Analysis 2000.

2.3.2 Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas em um analisador simultâneo SDT Q600 (TA Instruments), também em atmosfera de nitrogênio (50 mL min^{-1}), na faixa de temperatura de 25 a 900 °C, com razão de aquecimento de 10 °C min^{-1} . As curvas foram plotadas utilizando o software Universal Analysis 2000.

2.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Foram realizadas análises por FT-IR das misturas binárias, que apresentou possível incompatibilidade, além do extrato e dos excipientes.

As análises de FT-IR serão realizadas em um aparelho Perkin-Elmer modelo 1600, utilizando discos KBr, no intervalo de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. As curvas foram plotadas, utilizando o software Perkin Elmer UV WinLab.

3. Resultados e discussões

3.1 Análises termoanalíticas

3.1.1 Extrato nebulizado

A curva TG do extrato de Labdem-IA37, mostrou a ocorrência de quatro eventos de decomposição térmica (Fig. 1). O primeiro ocorreu numa faixa de temperatura de 50,00 a 173,00 ° C, representando a perda de massa da amostra em aproximadamente 5,63%. Esse evento foi atribuído à perda de água e de alguns produtos voláteis da amostra. O segundo ocorreu dentro de um intervalo de temperatura de 186,13 a 223,29 °C, possuindo uma perda de massa de 9,80%, correspondendo à primeira etapa de decomposição do extrato. A perda de massa mais significativa do extrato foi observado entre as temperaturas de 223,00°C e 443,00°C, com perda de 31,66%. Este evento provavelmente está relacionado com a decomposição térmica de hidratos de carbono e outros compostos orgânicos presentes na espécie. E o quarto evento apresentou um resíduo mineral de 39,10%, que corresponde ao teor de cinzas da amostra, esse resíduo também pode ser atribuído ao Aerosil 200[®], que compõe 20% da amostra.

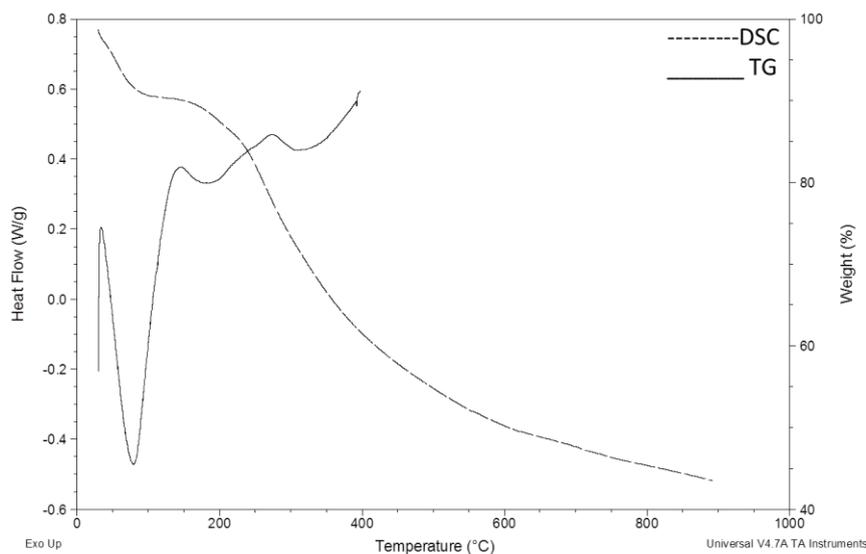
A TG é uma eficaz técnica para determinar o teor de umidade da planta e com estes resultados, é possível estabelecer parâmetros físicos para a secagem eficiente e boa conservação do material (COSTA et al, 2013).

As curvas DSC do extrato mostraram que os processos térmicos ocorreram no intervalo de temperatura entre 33,50 a 118,58 °C. Foi observado um pico endotérmico em 83,16°C ($\Delta=246,60$ J/g), que pode estar relacionado à vaporização da amostra, com perda de água e de constituinte voláteis da amostra (Fig. 1). Os processos de decomposição começam acima de 208,94° C, os quais possivelmente se referem à decomposição inicial de metabólitos secundários presente na amostra como alcaloides, flavonoides, taninos entre outros (COSTA, 2013).

Todavia, algumas dificuldades são encontradas na obtenção de picos reprodutíveis de extratos de plantas nas curvas de DSC. Isso ocorre pelo fato de que esses extratos são uma mistura de substâncias que interagem entre si, na matriz vegetal. Além disso, muitas vezes os produtos de degradação são formados em diferentes concentrações devido a vários fatores,

como a forma e imperfeições das partículas, perda de produtos gasosos e a taxa de aquecimento da amostra. Além do que, as impurezas presentes em extratos de plantas, tem um efeito direto sobre a largura dos picos obtidos no processo endotérmico (FERNANDES, et al 2012 e COSTA et al., 2013).

Figura 01 - Curva TG e DSC do extrato nebulizado



3.1.2 Misturas binárias

3.1.2.1 . Extrato + agente flavolizantes

A curva TG do AFl isolado (Fig. 2A) demonstrou quatro eventos térmicos. O primeiro que ocorreu numa faixa de 26,14 a 176,60° C, com perda de 42,74%, o qual trata-se da perda de produtos voláteis. O segundo evento ocorrido entre 187,43 a 212,71°C com perda de 15,57%, sugerindo o início da decomposição térmica de hidrocarbonetos presentes na amostra, já que o excipiente é de origem orgânica. O terceiro evento ocorreu entre a faixa de temperatura de 241,00 a 398,30° C, com perda de 16,97%, e o último ocorreu na faixa de 406,93 a 481,13 °C, perdendo 10,29% de massa.

Na curva DSC do AFl (Fig. 2B) observou-se a presença de dois picos endotérmicos o primeiro em 143,81°C e o segundo em 253,74°C. O primeiro pico endotérmico corresponde à perda de produtos voláteis do produto, enquanto que o segundo pico pode ser atribuída à etapa de maior degradação da amostra, como evidenciada na curva TG.

Nas curvas DSC (Fig. 2B) as misturas praticamente apresentaram o perfil do excipiente testado, mostrando provável incompatibilidade com o extrato. Nas curvas TG (Fig. 2A) percebeu-se uma antecipação da perda de massa da primeira etapa, tanto do extrato (de 173,00° C para 156,13°C), como do AF1(do intervalo de 26,14 a 176°C para a o intervalo de 35,76 a 156,13°C).

Nas curvas TG do AF2, (Fig. 2 C) percebeu-se apenas uma etapa de decomposição na faixa de temperatura entre 27,34 a 159,75°C, com perda de massa de 99,85%, o que demonstra que a matéria se transformou rapidamente do estado sólido, para gasoso, com o aumento da temperatura. Portanto, nesse processo foi onde ocorreu à vaporização de água e de terpenos, indicando o AF2 era sensível a temperatura e foi facilmente decomposto e vaporizado por ela.

A curva DSC do AF2 (Fig. 2D) apresentou dois picos endotérmicos, um na temperatura de 92,02°C, envolvendo uma perda de calor de 1,231J/g provavelmente relacionado com a perda de água. E o outro pico na temperatura de 167,92°C, correspondente ao pico de decomposição do AF2.

Nas curvas TG (Fig. 2C) das misturas entre AF2 e o extrato não foi observados indícios de incompatibilidade, pois, tanto o extrato como o excipiente se degradaram nas suas faixas de temperatura, quando tratados isoladamente. Já, em relação às curvas DSC (Fig. 2D) houve o surgimento de três picos endotérmicos. O primeiro refere-se à decomposição do extrato em torno de 208,00 °C, com perda de calor em torno de 8,71J/g; o segundo em 157,00 °C, com calor de reação em 13,32 J/g; e o terceiro relacionado provavelmente a degradação de produtos referentes a mistura na temperatura de 226,00 °C, com calor em 109,80J/g.

3.1.2.2 Extrato + agentes diluentes ou de enchimento

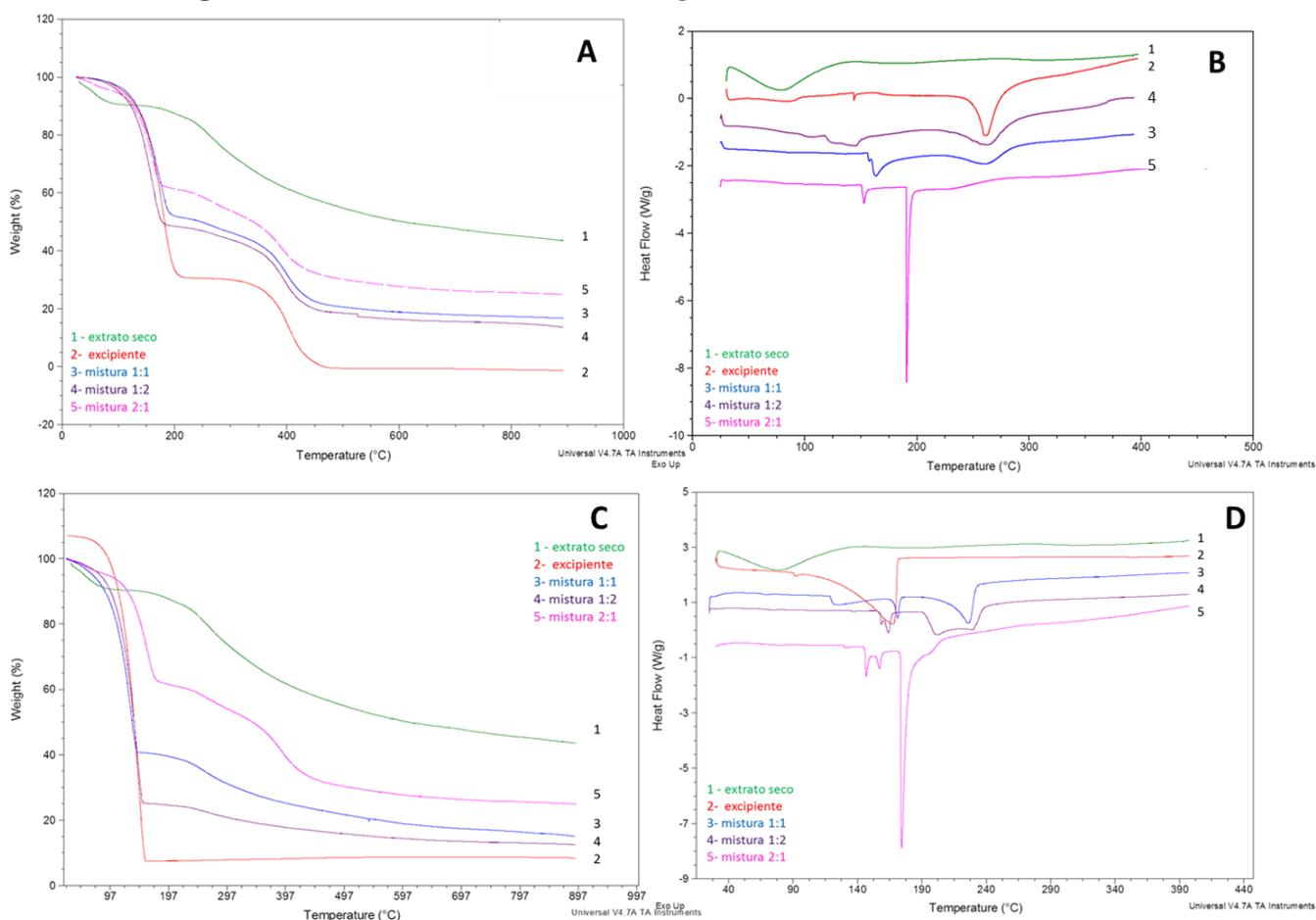
A análise termogravimétrica do AD1 (Fig. 3A) apresentou quatro etapas de perda de massa. A primeira corresponde apenas a 0,78% da massa total, possivelmente relacionada a algum resíduo de água e alguns produtos voláteis da amostra.

Dessa forma, a amostra permaneceu praticamente estável até a temperatura próximo de 350,00°C. Em 343,51°C foi observado uma perda de massa de 20,30%, possivelmente relacionado ao início de decomposição da amostra. As duas últimas etapas ocorreram em menor intensidade perdendo apenas 1,11% e 2,24% nos intervalos de 549,68 a 620,77°C e 630,25 a 690,68°C, respectivamente. Depois dessas perdas observou-se que a amostra

CAPÍTULO III

permaneceu praticamente estável, tendo um resíduo de 74,50% até a temperatura de 800,00 °C. Na curva DSC, (Fig.3A) esse excipiente apresenta apenas um pico exotérmico em 400,00 °C, com calor de reação em 148,00 J/g, provavelmente referente à sua temperatura de transição de fase.

Figura 2 - TG e DSC do extrato, dos agentes flavolizantes e das misturas



Legenda: A- TG do extrato, do AF1 e das misturas binárias; B-DSC do extrato, do AF1 e das misturas binárias; C- TG do extrato, do AF2 e das misturas binárias; D- DSC do extrato, do AF2 e das misturas binárias.

Nas misturas binárias não houve incompatibilidade, pois permaneceram os picos típicos da degradação do extrato, assim como do excipiente. Apenas na mistura 1:2 pode ter ocorrido a formação de evento eutético decorrente da interação entre o extrato e o excipiente.

Os dados de termogravimetria (Fig. 3C) do AD2 indicaram que o excipiente foi termicamente estável até 800,00 °C, nas condições empregadas no experimento. Além disso, ele possui uma baixa umidade relativa do ar, não sendo possível, portanto, a visualização de nenhum evento térmico relacionado à dessorção de água,(AMICO et al., 2011). O AD2 é de origem inorgânica e devido a essa natureza, não são detectáveis quaisquer eventos térmicos na

CAPÍTULO III

faixa de aquecimento realizada na curva DSC (Fig. 3D) (ARAÚJO et al.,2012). O comportamento térmico das misturas binárias do extrato com o AD2, individualmente, mostrou as mesmas características endotérmicas e exotérmicas do extrato, indicando assim que não há incompatibilidades entre eles.

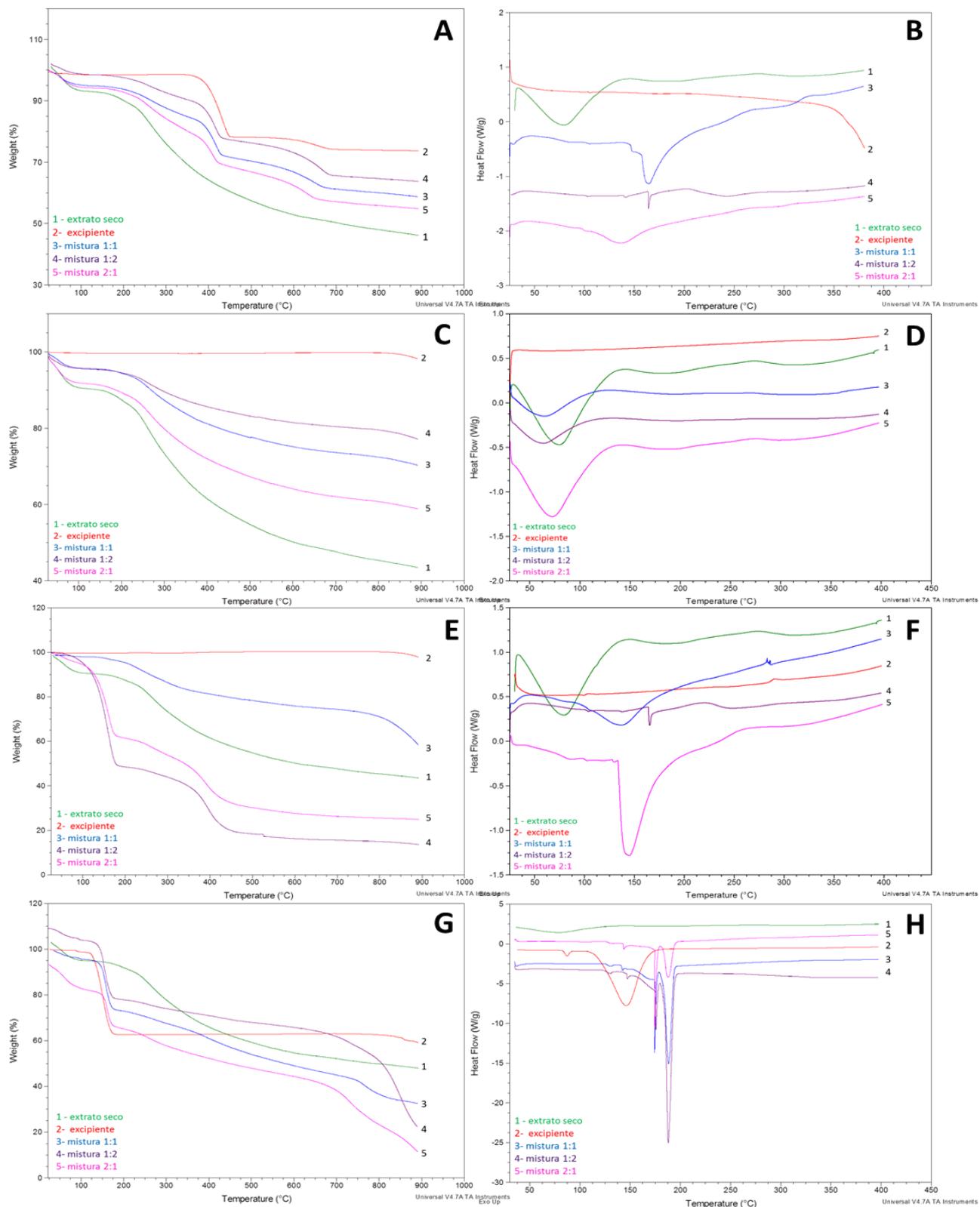
A curva TG (Fig. 3E) do AD3 mostrou apenas uma perda de massa em torno de 3,00 %, antes da sua degradação total na faixa de temperatura de 735,70 a 770,06 °C. A curva de DSC (Fig. 3F), nas condições efetuadas, mostrou picos relacionados as transições de fases da amostra em 103,4°C e 289,83°C (OLIVEIRA, 2012).

Ao analisarem-se as misturas binárias do AD3 com o extrato, por termogravimetria (Fig 3E), observou-se que não houve interação, pois os processos de decomposição do extrato e do excipiente foram mantidos. Já, nas curvas DSC (Fig. 3F) houve apenas um aumento do pico endotérmico do extrato de 83,16°C ($\Delta=246,60$ J/g), para a 139,46°C ($\Delta= 69,60$ J/g), na mistura 1:1; para 165,24°C na mistura de 1:2; e para 145,39°C ($\Delta=194,80$) na mistura 2:1. Todavia, esse pico não foi suprimido, o que pode ser útil na estabilidade da formulação final, já que retardou o pico de decomposição do extrato. Além disso, ocorreu na mistura 1:1, na temperatura de 283,19 °C, um pico de cristalização, que provavelmente estar relacionado a decomposição da amostra.

Na análise termogravimétrica do AD4 (Fig. 3G) observou um processo de decomposição, que ocorreu na faixa de temperatura de 26,90 a 105,35°C, possivelmente relacionada a perda de água e constituintes voláteis na amostra. A segunda etapa de decomposição ocorreu de 106,53 a 178,81°C, sucedendo nesse evento uma maior perda de massa (35,96%). Os dois próximos eventos ocorridos em 781,91 a 853,00 °C e entre 857,74 a 891,94°C pode ter sido referente à decomposição final do produto de degradação, originado na segunda etapa. Na curva DSC (Fig 3H) pode-se observar dois eventos endotérmicos, o primeiro ocorrido na temperatura de 86,82°C, com calor de reação de 18,57 J/g. E o segundo ocorrendo em 146,85°C, com uma variação de calor de 1250,00 J/g. O primeiro pico esta relacionado com a vaporização de água e produtos voláteis e o segundo pico com a temperatura de mudança de fase ou decomposição da amostra, correlacionando esses eventos com os demonstrados nas curvas TG.

CAPÍTULO III

Figura 3 - TG e DSC do extrato, dos agentes diluentes e das misturas.



Legenda: A- TG do extrato, do AD1 e das misturas binárias; B-DSC do extrato, do AD1 e das misturas binárias; C- TG do extrato, do AD2 e das misturas binárias; D- DSC do extrato, do AD2 e das misturas binárias; E- TG do extrato, do AD3 e das misturas binárias; F- DSC do extrato, do AD3 e das misturas binárias; G-TG do extrato, do

AE4 e das misturas binárias; D- DSC do extrato, do AE4 e das misturas binárias.

Quanto às misturas binárias, a análise termogravimétrica (Fig 3G) não mostrou provável incompatibilidade entre o AD4 e o extrato nebulizado, visto que, os processos de decomposição ocorreram na mesma faixa de temperatura das duas substâncias analisadas isoladamente. Enquanto que, nas curvas DSC (Fig 3H) observou-se indícios de incompatibilidade entre as amostras, pois houve um retardo do primeiro pico do excipiente (de 86,82°C para a faixa em torno de 146°C) nas três misturas, e além disso houve o aparecimento de um novo pico endotérmico, que pode ter sido resultante da interação entre o AD4 e o extrato analisado, esse evento pode ter sido caracterizado como um evento eutético

3.1.2.3. Extrato + agentes emolientes.

A curva termogravimétrica do AE1(Fig 4A) apresentaram três etapas de decomposição térmica. A primeira refere-se a uma faixa de temperatura que foi de 25,96 a 132,60°C, com perda de massa de 6,94 %, provavelmente essa perda está relacionada com a saída de água e outras substâncias voláteis associadas ao seu processo de fabricação. Na temperatura de 148,00 a 228,58°C ocorreu a maior perda de massa do componente, provavelmente relacionada à decomposição de seus principais constituintes. A terceira etapa de perda de massa ocorreu na faixa de temperatura de 239,24 a 408,68°C, possivelmente relacionada à queima de produtos de decomposição oriundos da segunda etapa.

A curva DSC do AE1 (Fig 4B) apresentou um pico endotérmico em 292,22°C, ($\Delta=32,23$ J/g) possivelmente relacionado à mudança de estado da amostra (transição vítrea); e o outro pico endotérmico em 316,00°C ($\Delta=2167$ J/g) relacionado a decomposição da amostra.

Em relação as misturas binárias, as curvas TG demonstraram que não houve incompatibilidade entre o AE1 e o extrato seco.

Nas curvas DSC (Fig. 4B) houve o aparecimento de ruídos que podem ter sido resultantes da dissolução do extrato no excipiente formando alguns produtos, além disso, houve um adiantamento da degradação da AE2 de 316,00°C para 294,83°C ($\Delta= 446,4$ J/g), sugerindo uma incompatibilidade desse componente com o extrato.

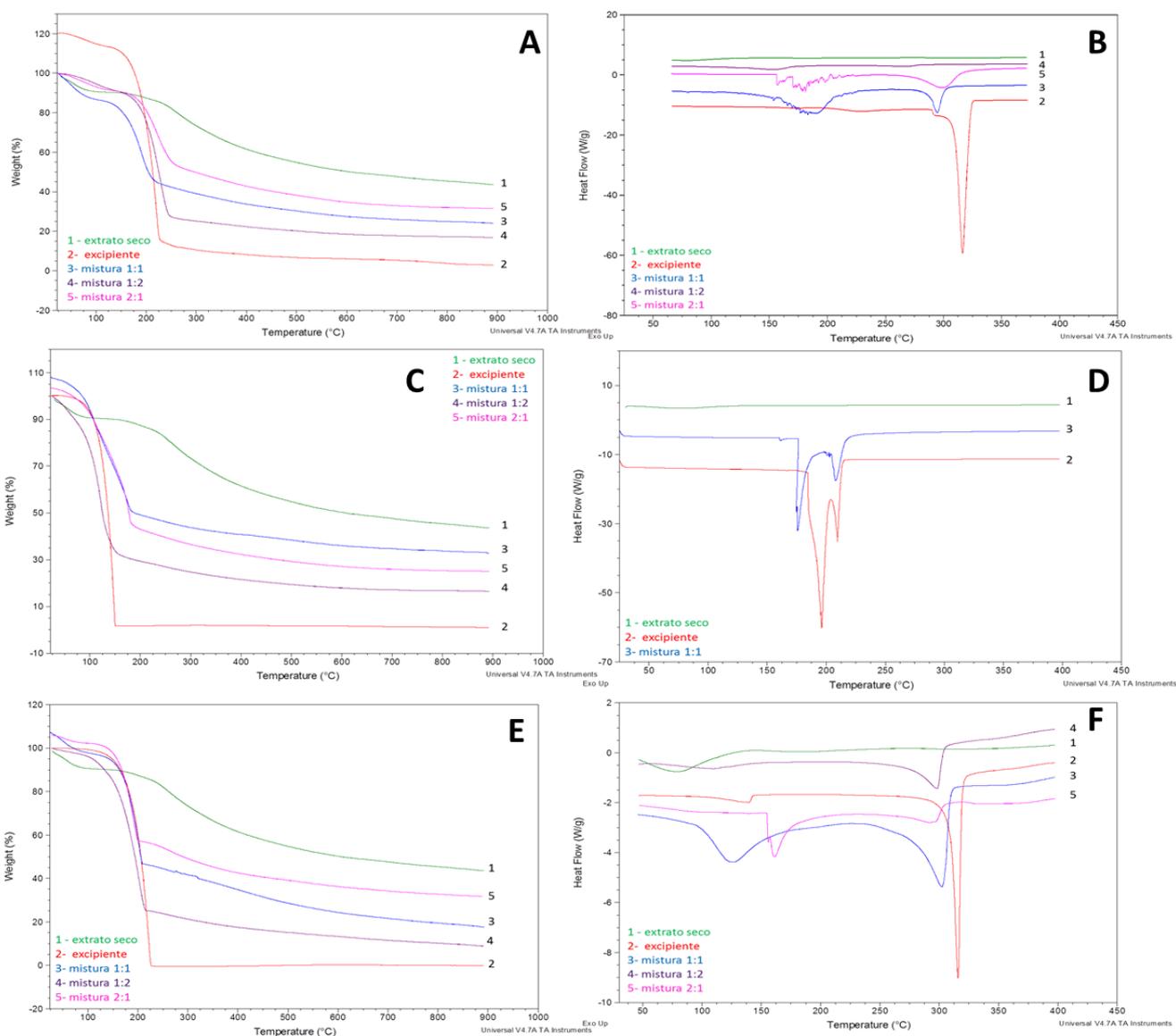
Analisando a curva TG do AE2, (Fig. 4C) observa-se apenas uma etapa de decomposição, iniciando em 23,43°C e se estendendo até 149,99°C, onde houve uma perda de massa de 98,36%. Na curva DSC desse excipiente (Fig. 4D) foram observados dois picos endotérmicos típicos do AE2, referentes aos processos de transições de fase da amostra, sendo

CAPÍTULO III

assim, um ocorreu em 196,23°C ($\Delta = 2077$ J/g) e outro em 209,59°C ($\Delta = 337,8$ J/g).

Nas misturas binárias houve provável incompatibilidade entre o extrato vegetal e o excipiente, pois nas curvas TG, (Fig. 4C) observa-se apenas a predominância do perfil termogravimétrico do excipiente. Assim como, nas curvas DSC (Fig. 4D), que observou-se uma supressão dos picos endotérmicos do extrato, permanecendo apenas picos do AE2

Figura 4 - TG e DSC do extrato, dos agentes emolientes e das misturas.



Legenda: A- TG do extrato, do AE1 e das misturas binárias; B-DSC do extrato, do AE1 e das misturas binárias; C- TG do extrato, do AE2 e das misturas binárias; D- DSC do extrato, do AE2 e das misturas binárias; E- TG do extrato, do AE3 e das misturas binárias; F- DSC do extrato, do AE3 e das misturas binárias

As curvas TG do excipiente AE3 (Fig. 4E) observa-se que a amostra permaneceu estável até a temperatura de 87,00 °C, a partir desta etapa é visualizado o processo de decomposição

do excipiente, finalizando na temperatura de 226,00 °C, com perda de massa de 99,84%. A curva DSC (Fig. 4F) do AE3 revelou dois picos endotérmicos, um em 139,86°C ($\Delta=7,43\text{J/g}$), e outro em 315,88°C ($\Delta=315,88\text{ J/g}$) relacionado à temperatura de decomposição do AE3. Nas curvas analisadas não foram observados indícios de incompatibilidade, pois o excipiente não modificou as características térmicas do extrato.

3.2 Espectroscopia na região infravermelho

O espectro obtido no infravermelho forneceu um agregado muito rico de bandas de absorção. A análise das bandas características de determinados grupos funcionais de uma molécula, fornece através de um simples exame do espectro e consulta a tabelas de dados, um conjunto valioso de informações sobre a estrutura da molécula (BARBETTA e MAGINI, 2006). Assim foram realizadas as análises dos seguintes excipientes, AF1 e AF2, AD4, AE1 e AE2, e das misturas com o extrato Labdem-IA37, os quais mostraram-se possível incompatibilidade nas curvas de termogravimetria e análise calorimétrica exploratória diferencial.

3.2.1. Extrato Labdem-IA37

No espectro do extrato Labdem-IA37 foi observado bandas de absorção no intervalo de 2,974-2,847 cm^{-1} , característica de ligações do tipo C-H. A presença dessas ligações é atribuída à natureza orgânica dos compostos no extrato (presença de hidrocarbonetos). Em 1447 a 1600 cm^{-1} , a deformação ocorre em ligações do tipo Sp^2 em alcenos.

Os picos mais evidentes na região de 1,307-1,025 cm^{-1} estão relacionados com ligações carbono-oxigênio das carbonilas em éter, ésteres e em ácidos carboxílicos e fenóis. Já os picos entre 1026 e 808 cm^{-1} são relativos à presença da carboxila em ácidos carboxílicos. Essas ligações são indicativas de uma ampla variedade de metabolitos, tais como polifenóis, taninos, flavonóides e antraquinonas, entre outros. Essa característica é também mostrada pelos picos nas regiões 1,702-1,685 cm^{-1} (típicos da carbonila) e em 1,607-1,516 cm^{-1} que evidenciam ligações duplas do tipo C = C dos anéis aromáticos, e em 788-674 cm^{-1} (ligações CH aromáticas substituídas) (SANSONE et al., 2011 e FERNANDES et al., 2011).

3.2.2. Misturas binárias

Ao analisar o espectro de AF1 (Fig. 5B) foi possível perceber a presença de carbonos do tipo Sp³ em grupamento metil, os quais demonstrados nas bandas em 1370 e 1450 cm⁻¹ e nos estiramento nas regiões de 2871 e 2959 cm⁻¹. A presença de carbonos do tipo Sp² e de grupamentos alcenos no óleo é evidenciada nas bandas de 1465 e 722 cm⁻¹, assim como nos estiramentos e bandas em 2860 e 2930 cm⁻¹, todas essas ligações confirmam a natureza orgânica do flavorizante. Observa-se também a presença de saturações do tipo C=C em cadeias alifáticas evidenciadas nos picos da região que vai de 650 a 1000 cm⁻¹, o que é confirmado pela presença de um grupo etileno ligado ao seu anel aromático. As bandas de absorção observadas em 910 e 990 cm⁻¹ são características da presença de um grupamento vinil (C=CH₂). Já os estiramentos nas regiões 1514, 1608 e 1637 cm⁻¹ são típicos da presença de ligações duplas entre carbonos presentes em estruturas aromáticas. Observando a mistura binária percebeu-se que essa assume praticamente o perfil do AF1, todavia, as características funcionais e estruturais do extrato não foram suprimidas, não ocorrendo incompatibilidade. Provavelmente o que houve foi um destaque nos estiramentos das regiões em 2860 e 2930 cm⁻¹, evidenciando a permanência da saturação em etilenos, que é típica em amostras de natureza orgânica como o excipiente estudado (DHOOT et al., 2009).

Nas análises do espectro de AF2 (Fig. 3C), observou-se banda intensa típica de carbonila na região de 1733 a 1716 cm⁻¹. Como também, estiramentos e bandas de intensidade média na região por volta de 2800 a 3000 cm⁻¹, típicos de ligações C-H₃ de compostos orgânicos. Na região de 1500 a 1700 não ocorreu os estiramentos e bandas típicos de ligações duplas em aromáticos, visto que esse composto é constituído apenas por cadeias alifáticas e cíclicas comuns, sem a presença de um anel aromático (FADZILAHA, DAYANAA, e RUSOPA, 2013). Quanto à mistura binária com o extrato foi observado que essa mistura apresentou praticamente o perfil do extrato, não ocorrendo incompatibilidade. Todavia, esse evento pode ser atribuído também a grande volatilidade do AT2, permanecendo, portanto, o extrato seco em maior quantidade na mistura. (SCALIA, TURSILLI e IANNUCELLI, 2007).

Os espectros do AD4 (Fig. 3D) apresentaram as bandas características de estiramento axial de O-H em, 2229 cm⁻¹ e estiramento axial de C=O, em torno de 1551 cm⁻¹. O estiramento axial de C=O ocorre em número de onda mais alto, pois a constante de força da

CAPÍTULO III

ligação carbonila é aumentada pela tendência do átomo de oxigênio adjacente atrair elétrons (efeito indutivo) (SALES et al., 2008). Esse pequeno estiramento permaneceu nas misturas binárias, todavia, observando o espectro dessas misturas percebeu-se que essas assumiu praticamente em toda sua extensão, o perfil do extrato aumentando apenas o pico referente à presença das carboxilas do extrato, podendo ter ocorrido alguma reação química entre o oxigênio livre do sal e a carboxila nessa região, ou da carbonila típicos de fenóis nessa região.

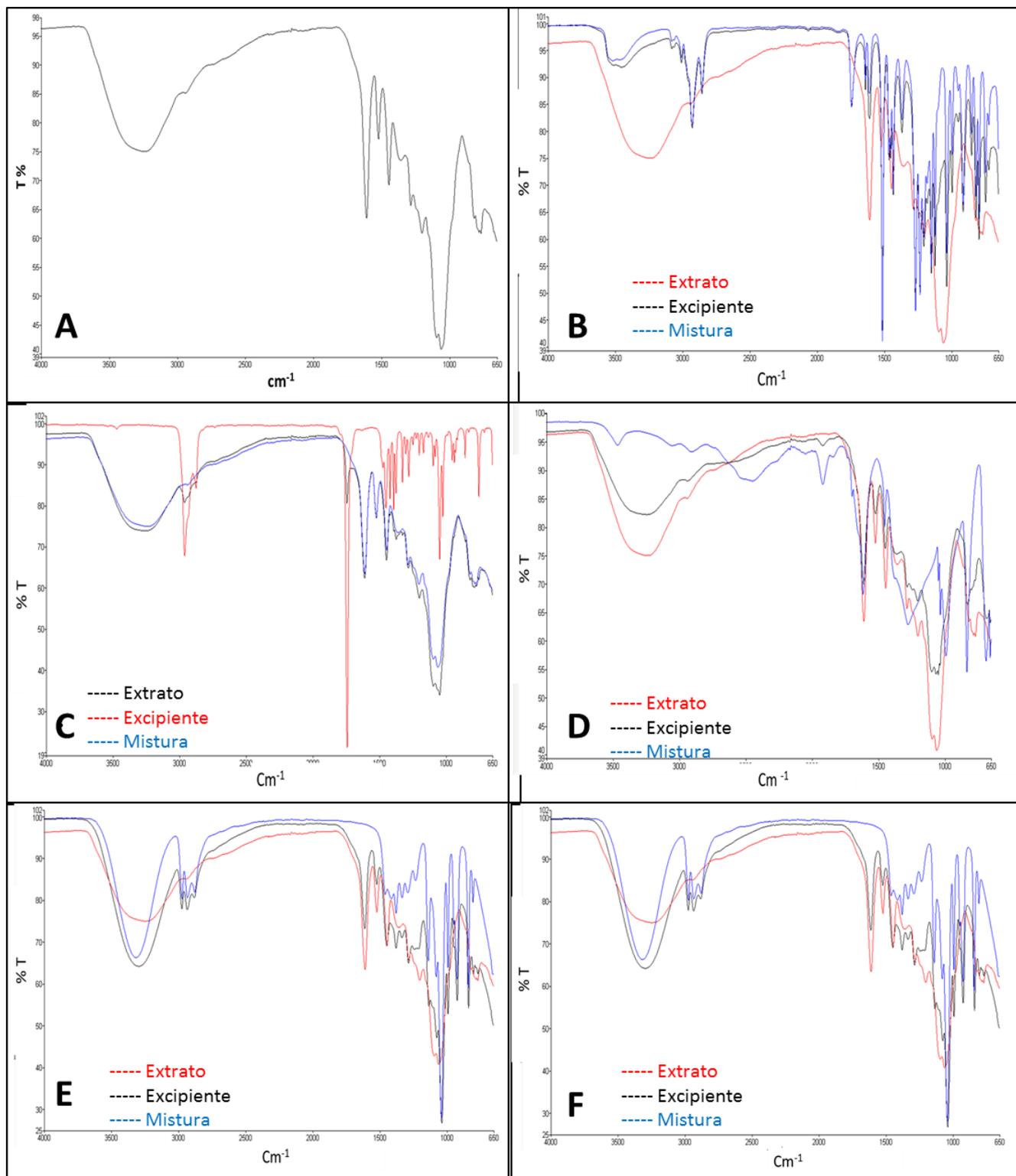
No espectro infravermelho do AE1(Fig. 3E) observa-se que na região de 1016 cm^{-1} existe uma banda de absorção característica das ligações C-O em álcoois, assim como a banda larga e distorcida acima de 3000 cm^{-1} . Em 1708 cm^{-1} , observa-se a presença de uma banda típica da carbonila de ácidos graxos e ésteres. A presença de carbonos do tipo Sp^3 em grupamento metil, os quais são demonstrados nas bandas em 1360 e 1430 cm^{-1} e nos estiramentos nas regiões de 2800 e 2900 cm^{-1} . A presença carbonos do tipo Sp^2 de grupamentos alcenos não foi evidenciada nas bandas de 1400 e 700 cm^{-1} , estando de acordo com a natureza orgânica e composição do AE1.

Na mistura binária houve uma predominância do perfil do excipiente AE1, todavia, houve uma diminuição da intensidade da banda mais larga, a qual é referente ao grupamento –OH presente na mistura, sugerindo a eficiência da reação de esterificação com ácidos carboxílicos presente no extrato, o que também é possível confirmar por meio do surgimento das duas bandas de deformação axial da ligação C-O do éster produzido.

O espectro correspondente ao AE2 (Fig. 3F) mostra bandas cuja absorção características são: 3303 cm^{-1} é característica do grupo hidroxila proveniente de álcoois; duas bandas de absorção em 2971 e 2930 cm^{-1} características da ligação C-H (de alcanos) e uma banda intensa de absorção em 1000 cm^{-1} característica da ligação C-O proveniente de alcoóis. Observa-se que a mistura binária formada com o AE2 mais o extrato assumiu o perfil do excipiente, com aumento de intensidade das bandas características da ligação do C-O, podendo ter aumentando a quantidade dessas ligações na mistura.

CAPÍTULO III

Figura 5. Espectros na região do infravermelho do extrato nebulizado, misturas binárias e excipientes correspondentes



Legenda: A- Infravermelho do extrato; B- Infravermelho do ATI, extrato e mistura; C- Infravermelho do AT2, extrato e mistura; D- Infravermelho do AD4, extrato e mistura; E- - Infravermelho do AEI, extrato e mistura; F- Infravermelho do AE2, extrato e mistura.

4. CONCLUSÃO

Nas curvas TG e DSC observou-se indícios de incompatibilidade entre o extrato e os excipientes (AF1, AF2, AD4, AE1 e AE2), contudo as análises na espectroscopia na região do infravermelho mostraram que essas incompatibilidades não apresentaram muita intensidade, no que diz respeito a supressão de grupos funcionais dos excipientes e do extrato isolado e nem na formação de novos grupos funcionais resultantes da interação ingrediente ativo/excipiente. Dessa forma, percebeu-se que tanto as análises termoanalíticas, quanto as espectroscópicas são técnicas que constituem uma boa ferramenta para caracterização de ingrediente ativo farmacêutico, assim como para o desenvolvimento de formulações candidatas a medicação intracanal.

Agradecimentos

Ao CNPQ pelo financiamento da pesquisa e ao CERTIBIO/UEPB pela realização das análises.

REFERÊNCIAS

ALVES, M. S. M. ; MENDES, P. C. ; JARDIM, M. A. G. ; VIEIRA, J. G. P. ; COSA, R. M. R. ; BARBOSA, W. L. R. ; SILVA JUNIOR, J. O. C. . Physicochemical and Phytochemical of *Arrabidaea chica* (H & B) Verlot. Leaf Power and Standardized Tincture. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 30, p. 804-804, 2011.

AMICO, S.C.; FREITAGI, C.P.M.; RIEGELII, I.C.; PEZZINI, S.H. Efeito da incorporação de talco nas características térmicas, mecânicas e dinâmico-mecânicas de poliuretanos termoplásticos. **Revista Matéria**, v. 16, n. 1, p. 597 – 605, 2011.

ARAUJO, G.L.B.; PITALUGA JR, A.; ANTONIO, S.G.; SANTOS, C.O.P.; MATOS, J.R. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, vol.33, n.1, p.27-36, 2012.

BARBETTA, C.M.; MAGINI, M.R. Espectros eletromagnéticos na região do infravermelho: utilização na caracterização de novos materiais. In: X Encontro Latino 156 Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, 2006. **Anais Universidade do Vale do Paraíba**, v. 13, 2006.

BRUNI, G.; AMICI, L.; BERBENNI, V.; MARINI, A.; ORLANDI, A. Drug-excipient compatibility studies search of interaction indicators. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 68, p.561-573, 2002.

COSTA, E. M. M. B. BARBOSA, A.S.; ARRUDA, T.A.; OLIVEIRA, P.T.; DAMETTO, F.R.; CARVALHO, R.A.; MELO, M.D. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2011.

COSTA, R.S.; NEGRÃO, C.A.B.; CAMELO, S.R. P.; COSTA, R. M. R.; BARBOSA, W.L. R.B.; COSTA, C. E. F.; SILVA-JÚNIOR, J. O. C. Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**, v. 111, p.1959–1964, 2013.

DHOOT, G.; AURAS, R.; RUBINO, M; DOLAN, K.; SOTO-VALDEZ, H. Determination of eugenol diffusion through LLDPE using FTIR-ATR flow cell and HPLC techniques. **Polymer**. v. 50, p. 1470–1482, 2009.

FADZILHA, A.N.; DAYANAA, K.; RUSOPA, M. Fabrication and characterization of camphor-based amorphous carbon thin films. **Procedia Engineering**. v.56, p.743 – 749, 2013.

FERNANDES, F. H. A.; SANTANA, C. P.; SANTOS, R. L.; CORREIA, L. P.; CONCEIÇÃO, M. M.; MACEDO, R. O.; MEDEIROS, A. C. D.; Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v.3, p. 2807-3, 2012.

MOYANO, M.A.; BROUSSALIS, A.M.; SEGALL, A.I. Thermal analysis of lipoic acid and evaluation of the compatibility with excipients. **Journal of Thermal Analysis Calorimetry**. v.99, p.631–637, 2010.

NUNES, K. M.; BARBOSA, W. L. R.; OZELA, E. F.; SILVA JUNIOR, J. O. C. Padronização da tintura de *Calendula officinalis* L. para seu emprego em formulações semi-sólidas fitoterápicas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 344- 350, 2009.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, 2011.

RAMOS, I. F. A. S.; BIZ, M.T.; PAULINO, N.; SCREMIN, A.; DELLA BONA.; BARLETTA.; FIGUEIREDO. Histopathological analysis of corticosteroid-antibiotic preparation and propolis paste formulation as intracanal medication after pulpectomy: an in vivo study. **Journal of Applied Oral Science.**, v. 20, n. 1, 2012.

SALES, A.LC; RAMOS, L.A.; NUNES, R.S.; NETO, S.C.; CAVALHEIRO, E. T.G. C.Síntese, caracterização e análise térmica de sais de lítio, sódio e potássio do ácido palmítico e do seu éster etílico. **Revista Química Nova**, v. 31, n. 7, 1722-1726, 2008.

SANSONE F, MENCHERINI T, PICERNO P. D'AMORE M, AQUINO R, LAURO MR. Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. **Journal of Food Engineering**. v.105, p.468–76, 2011.

SCALIA, S.; TURSILLI, R.; IANNUCELLI, V. Complexation of the sunscreen agent, 4-methylbenzylidene camphor with cyclodextrins: Effect on photostability and human stratum corneum penetration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.44; p. 29–34, 2007.

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

SILVEIRA, C. F. M., CUNHA, R. S.; BUENO, C. E. Assessment of the antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine paste and other intracanal medications against bacterial pathogens. **European Journal of Dentistry**, v. 5, p. 2-7, 2011.

TITA, B.; FULIAS, A.; BANDUR, G.; MARIAN, E.; TITA, D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 221-227, 2011.

Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização desse trabalho percebeu-se que a *X.americana* é fonte de fitocomplexos com atividade antibacteriana, principalmente contra bactérias gram-positivas como o *E. faecalis*. Esse vegetal possui uma toxicidade e citotoxicidade relativamente baixa além de ser constituído de boas concentrações de metabólitos secundários. Estes, atuam na formação de fitocomplexos responsáveis pela atividade farmacológica desta planta. Um dos seus constituintes que pode atuar como marcador químico é o ácido gálico que teve seu doseamento validado de acordo com as especificações dos compêndios oficiais. Podendo esse extrato ser indicado para obtenção de ingrediente ativo com atividade antimicrobiana utilizada em diversas formas farmacêuticas.

Para que um ingrediente ativo seja eficaz quanto a sua natureza antimicrobiana contra determinado microrganismo, é necessário que sua potência esteja dentro dos limites estabelecidos, de modo que forneça eficácia, segurança e qualidade. Sendo assim, na realização do doseamento de potência antimicrobiana do extrato seco da *X. americana* L os resultados obtidos indicaram que o ensaio microbiológico do método difusão em ágar cilindro oferecem boa precisão, exatidão, bem como uma curva de calibração apropriada no intervalo de concentração de 10 a 160 mg/mL, sendo efetivo para doseamento microbiológico do extrato nebulizado. Além disso, com a aplicação do método observou-se que o ácido gálico presente possui uma potência em relação ao padrão frente a *E. faecalis* dentro das especificações.

Os estudos de compatibilidade extrato nebulizado/excipientes, por análise técnica mostraram que os excipientes AF1, AF2, AD4, AE1 e AE2 utilizados em formulações de uso endodôntico, apresentam indícios de incompatibilidade com o extrato, por análise térmica. Todavia, nas análises na espectroscopia na região do infravermelho foi observado que essas incompatibilidades não apresentaram muita intensidade, no que diz respeito a supressão de grupos funcionais dos excipientes e do extrato seco e nem da formação de novos grupos funcionais resultantes da interação extrato/excipientes.

Assim estudos que mostrem o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico, bem como a caracterização e padronização do seu extrato são importantes, devido falta de metodologia oficial que comprove a qualidade, segurança e eficácia de destes produtos.