



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

FELIPE HUGO ALENCAR FERNANDES

**DESENVOLVIMENTO DE FORMA SÓLIDA OBTIDA A PARTIR DE
EXTRATO SECO DE *Schinopsis brasiliensis* ENGLER.**

CAMPINA GRANDE – PARAÍBA

FEVEREIRO DE 2014

FELIPE HUGO ALENCAR FERNANDES

**DESENVOLVIMENTO DE FORMA SÓLIDA OBTIDA A PARTIR DE
EXTRATO SECO DE *Schinopsis brasiliensis* ENGLER.**

**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.**

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

COORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Santos de Souza (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.

F363d Fernandes, Felipe Hugo Alencar.

Desenvolvimento de forma farmacêutica sólida obtida a partir de extrato seco de *Schinopsis brasiliensis* ENGLER. [manuscrito] / Felipe Hugo Alencar Fernandes. - 2014.
118 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".

"Co-Orientação: Prof. Dr. Fábio Santos de Souza, Departamento de Farmácia".

1. Fitoterapia. 2. Marcador químico. 3. Quimiometria. 4. Análise térmica. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

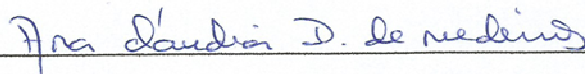
FELIPE HUGO ALENCAR FERNANDES

**DESENVOLVIMENTO DE FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA OBTIDA A
PARTIR DE EXTRATO SECO DE *Schinopsis brasiliensis* ENGLER.**

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



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

Orientadora



Prof. Dr. Fábio Santos de Souza – UFPB

Co-orientador



Prof.^a Dr.^a Francinalva Dantas de Medeiros – UEPB

Membro Interno



Prof.^a Dr.^a Marta Maria da Conceição – UFPB

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

A Deus. Se tudo vem Dele e por Ele nada mas justo que dedicar a Ele;

Aos meus pais, Severino e Maria de Fátima e ao meu irmão Feliz Berto;

Aos meus “pais científicos”, Germano Vêras e Ana Cláudia;

*Ao Prof. Ivan Coelho Dantas (in memoriam), o grande defensor das plantas
medicinais;*

AGRADECIMENTOS

“Faz o que podes, e reza pelo que não podes, para que Deus permita que possa.” (Santo Agostinho) Obrigado Senhor por estar comigo durante toda essa caminhada e nas próximas que virão;

Aos meus pais, Severino e Maria de Fátima, meu irmão Feliz Berto e todos os membros da minha família que sempre torceram por mim e me incentivam todos os dias;

A minha amiga, orientadora, professora... Ana Cláudia por desde o começo acreditar em mim e jamais deixar abandonar os sonhos da pesquisa. “Não a nada melhor que um dia atrás do outro e uma noite no meio” (MEDEIROS et al.,);

Ao grande amigo, incentivador, professor... Germano Vêras, por sempre me instigar e incentivar a carreira científica;

Ao meu co-orientador Prof. Fábio, pela disponibilidade, paciência, incentivo e grande contribuição nesse trabalho e na minha formação acadêmica;

As professoras Marta Conceição, Francinalva Dantas, Ana Paula e Rosemary Cunha Lima, por gentilmente aceitarem participar da banca examinadora;

Aos amigos do LABDEM (Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos) obrigado pelos bons momentos, as alegrias e amizade. A Monik, Alinne, Fernanda, René, Jocimar, Ana Michele, Jéssica, Isabel, Jôffily, Amaro, Lucas, Davy, Emmanuel, Pedro; Aos anexos: Naiana, Paulo, Thaise, Nathalia, Renata e Eveline; Aos que já passaram: Cinthya, Suênia, Ravelly, Allan e Amaro; E, em especial, aos alunos “seminovos”, porém “revisados”: Deysiane, Cleildo, Laiane, Fernando e Elaine e Thiago;

Aos amigos do LQAQ (Laboratório de Química Analítica e Quimiometria) pela amizade e companheirismo. Em especial a Valber, David, Gean, Thomás, Jéssica, Martina e Ingredy;

Aos amigos do LUDEM/UFPB (Laboratórios unificados de desenvolvimento e ensaios em medicamentos) pela ajuda e amizade. Em especial a galera do HPLC guerreiro do LTF: Rayanne, Tainara, Anna Paula, Fabrício, Valmir, Valdilânio, Ana Flávia, Lidiane, Elisana, Márcia Islaine e Leonardo, o único;

Ao Prof. Rui Oliveira Macedo, por abrir as portas do seu laboratório e permitir o uso de diversos equipamentos, além de ser um grande incentivador da nova geração;

A minha turma de Mestrado em Ciências Farmacêuticas (2012) e do mestrado em Ciências Agrárias pelos bons momentos durante as disciplinas;

Ao Hospital de Olhos Santa Luzia (Recife – PE) e a Dr.^a Catarina Ventura que, no início do mestrado, realizaram o meu transplante de córnea;

Aos meus amigos de Uiraúna e Campina Grande por sempre me incentivarem. Em especial a Mayara e Lucimário, meus grandes amigos de infância.

Aos funcionários Dilma Guedes, Maria da Paz, Fabiana, Aloísio I e II e Seu Mauricio;

Aos professores: Monica Simões, Vanda Lúcia, Délcio Felismino e Edja Costa;

Ao Departamento e Coordenação de Farmácia da UEPB por permitir a realização do Estágio em docência;

Ao CertBio UEPB/UFCG pelas análises realizadas;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas;

A Universidade Estadual da Paraíba;

Ao CNPq, Propesq/UEPB, Fapesq e a Capes pelo financiamento;

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

O CADERNO

(Toquinho/ Mutinho)

*Sou eu que vou seguir você
Do primeiro rabisco
Até o be-a-bá.
Em todos os desenhos
Coloridos vou estar
A casa, a montanha
Duas nuvens no céu
E um sol a sorrir no papel...*

*Sou eu que vou ser seu colega
Seus problemas ajudar a resolver
Te acompanhar nas provas
Bimestrais, você vai ver
Serei, de você, confidente fiel
Se seu pranto molhar meu papel...*

*Sou eu que vou ser seu amigo
Vou lhe dar abrigo
Se você quiser
Quando surgirem
Seus primeiros raios de mulher
A vida se abrirá
Num feroz carrossel
E você vai rasgar meu papel...*

*O que está escrito em mim
Comigo ficará guardado
Se lhe dá prazer
A vida segue sempre em frente
O que se há de fazer...*

*Só peço, à você
Um favor, se puder
Não me esqueça
Num canto qualquer*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS.....	12
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS	16
RESUMO.....	18
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
3.1. Plantas medicinais como alternativa terapêutica	23
3.2. A legislação vigente para plantas medicinais e fitoterápicos.....	24
3.3. Ativos naturais com atividade antimicrobiana	28
3.4. <i>Schinopsis brasiliensis Engler</i>	29
3.5. Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos	30
3.5.1. Planta medicinal	31
3.5.2. Coleta e secagem.....	31
3.5.3. Extrato	32
3.5.4. Caracterização dos princípios ativos	34
3.5.5. Estudos de pré-formulação.....	36
3.5.6. Formas farmacêuticas sólidas	37
3.6. Análise térmica.....	38
3.6.1. Termogravimetria.....	38
3.6.2. Análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)	41
3.6.3. Estudo de compatibilidade.....	44
3.6.4. Estudo cinético por termogravimetria isotérmica	45
3.7. Ferramentas quimiométricas.....	46
3.8. Validação de métodos analíticos.....	47
REFERENCIAS	49
CAPÍTULO I	62

ESTUDO DE UMA FORMULAÇÃO CANDIDATA A BASE DE <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engler. UTILIZANDO TÉCNICAS TÉRMICAS ASSOCIADAS A FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS.....	63
RESUMO.....	63
1. INTRODUÇÃO	64
2. EXPERIMENTAL	67
2.1. Material vegetal e extrato seco	67
2.2. Misturas binárias	67
2.3. Microscopia óptica.....	67
2.4. Análise térmica.....	68
2.5. Análise quimiométrica	68
2.6. Difração de raios X.....	69
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4. CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS.....	83
CAPÍTULO II	87
ESTUDO CINÉTICO DE EXTRATO NEBULIZADO E DE UMA FORMULAÇÃO SÓLIDA A BASE DE <i>Schinopsis brasiliensis</i> ENGLER.....	88
RESUMO.....	88
1. INTRODUÇÃO	89
2. EXPERIMENTAL	90
2.1. Material vegetal e extrato seco	90
2.2. Formulação	90
2.3. Análise térmica.....	91
2.4. Teoria cinética pela equação de Arrhenius	91
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
4. CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS.....	98
CAPÍTULO III	101
DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE POLIFENOL EM <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engler. USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	102
RESUMO.....	102
1. INTRODUÇÃO	103
2. EXPERIMENTAL	104

2.1. Material vegetal.....	104
2.2. Determinação de polifenóis totais por espectrofotometria.....	104
2.3. Determinação de flavonoides totais por espectrofotometria.....	105
2.4. Determinação do marcador químico	105
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
4. CONCLUSÃO.....	109
REFERÊNCIAS.....	109
CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
ANEXOS	113

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

A – Fator de frequência;

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida;

API – Ingrediente ativo farmacêutico;

BRCA – Extrato nebulizado de *Schinopsis brasiliensis* Engler.;

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência;

CLAE-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com acoplado a detector de arranjo de diodos;

DRX – Difração de raios X;

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial;

DTA – Análise Térmica Diferencial;

DTG – Derivada da termogravimetria;

E_a – Energia de ativação;

HCA – Análise hierárquica de agrupamentos;

ICH – *International Conference of the Harmonization of the Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*;

k – Constante de velocidade de decomposição térmica;

K – Temperatura em Kelvin;

MEV – Microscopia eletrônica de varredura;

N₂ – Gás nitrogênio;

nm – nanômetros

OMS – Organização Mundial da Saúde;

PCA – Análise dos componentes principais;

PFT – Produto fitoterápico tradicional;

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares;

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada;

RENAME – Relação nacional de medicamentos essenciais;

SNV – Transformação padrão normal de variação;

SUS – Sistema Único de Saúde;

TG – Termogravimetria;

US\$ - dólar;

UV-Vis – Ultravioleta e visível ;

α – fração decomposta;

ΔH – Variação de calor;

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1 – <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engler. localizada na zona rural de Pocinhos – PB	30
Figura 2 – Esquema de funcionamento de uma termobalança moderna da TA Instruments®	39
Figura 3 – Esquema de funcionamento da DTA da Perkin Elmer do Brasil	42
Figura 4 – Esquema de funcionamento de um DSC por compensação de potência da Perkin Elmer do Brasil	42
Figura 5 - Esquema de funcionamento do DSC por fluxo de calor (A), com detalhe do disco e dos termopares (B) e da posição das panelinhas (C) da TA Instruments®	43

Capítulo I

Figura 1 – Microscopia óptica do extrato nebulizado BRCA (A) e de suas misturas binárias (B) amido, (C) celulose microcristalina 101, (D) celulose microcristalina 102, (E) lactose, (F) estearato de magnésio, (G) PVP K-30 e (H) talco	70
Figura 2 – Curvas de DSC do extrato nebulizado de BRCA (A) e de suas misturas binárias: (B) amido, (C) celulose microcristalina 101, (D) celulose microcristalina 102, (E) lactose, (F) estearato de magnésio, (G) PVP K-30 e (H) talco	71
Figura 3 – Análise hierárquica de dados (HCA) das misturas binárias; (A) amido, (B) celulose microcristalina 101, (C) celulose microcristalina 102, (D) lactose, (E) estearato de magnésio, (F) PVP K-30 e (G) talco	77

Figura 4 – Análise dos componentes principais (PCA) das misturas binárias; amido (A), celulose microcristalina 101 (B), celulose microcristalina 102 (C), lactose (D), estearato de magnésio (E), PVP K-30 (F) e talco (G) 78

Figura 5 – Gráfico de Leverage para as misturas binárias; (A) amido, (B) celulose microcristalina 101, (C) celulose microcristalina 102, (D) lactose, (E) estearato de magnésio, (F) PVP K-30 e (G) talco 80

Figura 6 – Difratoograma do extrato seco de BRCA (A) e das misturas binárias; Amido (B), lactose (C), estearato de magnésio (D) 81

Capítulo II

Figura 1 – Curvas termogravimétricas do extrato de BRCA e da formulação até 1200 °C em atmosfera de N₂ 94

Figura 2 – Isotermas do extrato de BRCA (A) em diferentes temperaturas (178, 183, 185, 193 e 195 °C) e da formulação (B) em diferentes temperaturas (115, 120, 125, 130, 135 °C) em atmosfera de N₂ 95

Figura 3 – Gráfico de Arrhenius (ln t X T⁻¹) para as cinco temperaturas da isotermica 98

Capítulo III

Figura 1 – Cromatograma do extrato de *S. brasiliensis* Engler. (A) e do padrão de ácido gálico (B) em 271 nm 107

Figura 2 – Curva de calibração do padrão de ácido gálico em 271 nm 108

LISTA DE TABELAS

Introdução

Tabela 1 – Plantas medicinais pertencentes a RENAME (relação Nacional de Medicamentos)	27
Tabela 2 – Exemplos de estudo termogravimétricos aplicado a fármacos	40
Tabela 3 – Exemplos de estudos termogravimétricos aplicado a plantas medicinais e fitoterápicos	41
Tabela 4 – Exemplos de estudos com DSC e DTA aplicado a fármacos	43
Tabela 5 – Exemplo de estudos com DSC e DTA aplicado a plantas medicinais e fitoterápicos	44

Capítulo I

Tabela 1 – Dados dos principais eventos térmicos nas curvas de DSC do extrato nebulizado (BRCA) e de suas misturas binárias	73
---	----

Capítulo II

Tabela 1 – Formulação proposta para uma forma farmacêutica de uso oral... ..	91
Tabela 2 – Tempo de prateleira (em anos) em função da temperatura de armazenamento para o extrato de BRCA, utilizando a equação da reta	96
Tabela 3 – Coeficiente de determinação para as ordens de reação para o extrato de BRCA e para formulação utilizando os modelos cinéticos	97
Tabela 4 – Tempo de prateleira (em anos), em função da temperatura de armazenamento para o extrato de BRCA e para formulação, utilizando o modelo matemático $t_{90\%}$	98

Capítulo III

Tabela 1 – Teor de polifenóis totais e flavonoides totais do extrato de *S. brasiliensis* obtidos por espectroscopia na região do visível 106

Tabela 2 – Precisão do padrão de ácido gálico e do extrato analisados em dois dias diferentes. DP – Desvio padrão; CV – Coeficiente de variação 108

Tabela 3 – 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 109

Desenvolvimento de forma sólida obtida a partir de extrato seco de *Schinopsis brasiliensis* Engler. FELIPE HUGO ALENCAR FERNANDES.

Orientador: Ana Cláudia Dantas de Medeiros; Coorientador: Fábio Santos de Souza. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UEPB, 2014.

RESUMO

Os extratos nebulizados de plantas medicinais, secos por aspensão é o ponto de partida para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. Eles apresentam boa estabilidade química, menor contaminação microbiológica e a possibilidade de aplicação em outras formas farmacêuticas. Para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, a partir de ingrediente ativo são necessários ensaios prévios visando prever possíveis incompatibilidades e que possam afetar o produto final. Dessa forma, os estudos de pré-formulação constituem uma importante etapa no desenvolvimento farmacotécnico, pois permite identificar, dentre outras características, problemas relacionados ao excipiente, bem como a estabilidade da formulação. Assim, o objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de uma forma farmacêutica sólida a partir do extrato seco de *Schinopsis brasiliensis* Engler. O extrato foi nebulizado por aspensão foi produzido a partir do extrato hidroalcoólico das cascas de *S. brasilienses* Engler. (BRCA). Foi realizado o estudo de compatibilidade, utilizando diferentes excipientes (amido, celulose microcristalina 101 e 102, lactose, estearato de magnésio, PVP K-30 e talco) a partir de diferentes técnicas analíticas associada a ferramentas quimiométricas. Também foram realizados estudos cinéticos utilizando termogravimetria isotérmica e a determinação e validação do método para o polifenol majoritário por cromatografia líquida de alta eficiência no UV-Vis (CLAE UV-Vis). Os resultados da microscopia óptica, Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e das análises quimiométrica indicam uma possível incompatibilidade com amido, lactose e estearato de magnésio, as quais foram confirmadas por difração de raios X (DRX). A formulação proposta apresentou estabilidade maior que o extrato nebulizado e um tempo de prateleira considerável. O extrato também apresentou uma elevada concentração de polifenol, e optou-se pelo ácido gálico, que apresenta diversas atividades farmacológicas, como marcador químico. O método desenvolvido apresentou boa precisão, exatidão, linearidade e limite de detecção e quantificação aceitáveis. Os resultados apontam que as técnicas analíticas utilizadas nos estudos de pré-formulação do extrato nebulizado e que o mesmo pode ser utilizado para o desenvolvimento de capsulas e comprimidos de *S. brasiliensis*.

PALAVRAS-CHAVE: Pré-formulação; Análise térmica; Fitoterápico; Marcador químico.

Development of solid form obtained from drying extract of *Schinopsis brasiliensis* Engler. FELIPE HUGO ALENCAR FERNANDES. Advisor: Ana Cláudia Dantas de Medeiros. Co-advisor: Fábio Santos de Souza. Master's thesis. Post-grad Program in Pharmaceutical Sciences. Center of Biological and Health science. UEPB, 2014.

ABSTRACT

The drying extract of medicinal plants, obtained by spray drying is the starting point of development of herbal medicines. They exhibit good chemical stability, lower microbiological contamination and de possibility of application in the order dosage forms. For development of a dosage form, the active ingredient from previous trial are needed aiming to foresee and possible incompatibility that may affect the final product. Thus, the pre-formulation studies is an important step in pharmaceutics development since it identifies, among other characteristics, related to the excipient problems as well as the stability of the formulation. Thus, the objective of this work was the development of a solid dosage for from the drying extract of *Schinopsis brasiliensis* Engler. The extract was dried by spray-drying was produced from de hydroalcoholic extract of bark of *S. brasiliensis* (BRCA). The compatibility study was performed using different excipients (starch, microcrystalline cellulose 101 and 102, lactose. magnesium stearate, PVP K-30 and talc) from different analytical techniques associated with chemometric tools. Kinetics studies were also performed using isothermal thermogravimetry and determination and validation method for major polyphenol by high performance liquid chromatography UV-Vis (HPLC UV-Vis). The results of optical microscopy, differential scanning calorimetric (DSC) and chemometric analyze indicate possible incompatibility with starch, lactose and magnesium stearate, which were confirmed by X-ray diffraction (DRX). The proposed formulation was more stable than the drying extract and good self time. The extract also showed a high concentration of polyphenol, and we opted for gallic acid, which has several pharmacological activities such as chemical marker. The development method showed good precision, accuracy linearity and limits of detection and quantification acceptable. The results indicate that the analytical techniques used in the preformulation studies of the drying extract and that it can be used for the development of capsules and tables if *S. brasiliensis*.

KEYWORDS: Preformulation, thermal analysis, herbal drugs, chemical marker.

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são considerados um grande desafio da terapêutica medicamentosa. Bactérias como *Staphylococcus aureus* detém uma grande capacidade de mutação e resistência, contribuindo para uma diminuição da eficácia dos antimicrobianos tradicionais. Além do mais, o uso irracional dessa classe de medicamentos favorece esse processo, fazendo-se necessário o uso de fármacos cada vez mais potentes, como a Vancomicina (GUIMARÃES et al., 2010).

A classe dos anti-infecciosos é a quinta classe terapêutica mais vendida no mercado mundial, estando no topo empresas multinacionais como a Pfizer®, Glaxo-Smith-Kline® e a Novartis®. A maioria dos antimicrobianos disponíveis no mercado é obtida por síntese ou semissíntese de moléculas bioativas como a penicilina G, as sulfas e a vancomicina (SOUZA, 2010). Contudo é cada vez menor o número de novas moléculas antimicrobianas que foram lançadas nos últimos anos. Recentemente, apenas duas moléculas novas dessa classe foram lançadas, pois a indústria farmacêutica alega que os gastos em pesquisa e desenvolvimento são bastante elevados e o retorno pode não ser compensável, além da possibilidade do desenvolvimento de resistência (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010).

Por outro lado, um determinado seguimento vem mostrando-se como uma excelente alternativa tanto terapêutica, para o paciente, como economicamente para as empresas que são os medicamentos fitoterápicos. Segundo Brasil (2006), os fitoterápicos são medicamentos obtidos exclusivamente de matéria prima de origem vegetal, reconhecidos, seja por seus estudos clínicos, seja por conhecimentos etnofarmacológicos.

A linha de produtos fitoterápicos contempla principalmente medicamentos anti-inflamatórios, para o sistema nervoso central, para problemas respiratórios e digestivos e avança para o tratamento de patologias mais complexas como vitiligo, psoríase e a AIDS. Eles movimentaram mundialmente em 2011, US\$ 26 bilhões, com uma grande desigualdade regional, sendo a Europa correspondente a 50% desse mercado (ALVES, 2013).

Até o desenvolvimento do produto final o ingrediente ativo percorre varias etapas, dentre elas o estudo de pré-formulação, considerado uma das etapas mais importantes, devido ao grande numero de informações sobre os ativos, excipientes e da formulação em estudo, objetivando eficácia, segurança e qualidade. Essas características podem ser analisadas a parti de diferentes técnicas analíticas como analise térmica, espectroscopia, difração de raios X, microscopia, dentre outras (MAXIMINIANO et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver uma formulação sólida do extrato nebulizado de *Schinopsis brasiliensis* Engler. com atividade antimicrobiana

2.2. Objetivos específicos

- Realizar o estudo de compatibilidade fármaco excipiente através de diferentes técnicas analíticas;
- Propor, a partir do estudo de compatibilidade, uma formulação sólida com o extrato nnebulizado;
- Analisar o comportamento cinético da formulação e do extrato, por termogravimetria isotérmica;
- Identificar e validar o marcador químico da espécie;.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Plantas medicinais como alternativa terapêutica

O uso de plantas medicinais pelo homem é datado muito antes do surgimento das primeiras civilizações. A observação da natureza foi à fonte do conhecimento etnofarmacológico que atravessou gerações e chegou até os dias atuais, embora muito de tenha perdido no decorrer dos anos. Durante a Idade Média, o cultivo de plantas medicinais ficou a cargo dos monges sendo estes responsáveis pelo seu cultivo e distribuição. Porém foram os alquimistas que, através dos métodos rústicos de pesquisa, começaram a conhecer os primeiros aspectos relacionados a química de produtos naturais. (DANTAS, 2007).

No Brasil, as primeiras descrições sobre as plantas medicinais da nossa flora datam de 1500, com a Carta de Pero Vaz de Caminha. Com o passar dos anos, vários naturalistas que vieram para o Brasil descreveram algumas plantas que eram utilizadas pelos índios como o maracujá (*Passiflora sp.*) e a copiaba (*Copaifera sp.*). Em 1847, Theodore Peckolt e sua família começaram a pesquisa com química e farmacologia de plantas medicinais. Em 1889, a pedido do Congresso Médico Brasileiro, Peckoit descreveu detalhadamente a aroeira (*Schinus terebinthifolius*) tanto em seus aspectos quanto seus aspectos químicos com base nos ensaios fitoquímicos para a época (SILVA, 2013).

Fernandes (2012), menciona que no começo do século XX, começa a substituição dos boticários pelas “pharmacia” e pequenas indústrias nacionais que estava focada na produção de produtos compostos a base de extratos vegetais e minerais. Contudo a partir de 1930 a indústria nacional sofreu profundas mudanças com o advento da síntese de fármacos em grande escala, frente as grandes áreas e o elevado tempo necessários para o plantio e extração de ativos naturais.

No início do século XX, surgem os bases da Química Medicinal, baseado nos conhecimentos mais avançados de bioquímica. A síntese da Aspirina[®] foi considerada um marco para o tratamento da dor e um avanço na síntese de

fármacos. Contudo sua estrutura química foi baseada na salicina, um ativo natural com atividade anti-inflamatória, encontrado na casca do salgueiro *Salix alba*, descrito pela primeira vez no Papiro de Ebers em 1500 a.C. (YUNES et al., 2001; FUSTER; SWEENEY, 2011).

Até o período da Segunda Guerra Mundial, a síntese de fármacos, era favorecido pela classe dos antibióticos, o fez com que a busca por produtos naturais torna-se quase que esquecida e a indústria nacional brasileira que produzia produtos provenientes da flora natural, atendendo as pressões do mercado internacional, passou a ser uma simples linha de produção (FERNANDES, 2012).

No final do século XX, uma onda naturalista focada nos aspectos de sustentabilidade atingiu a toda a sociedade. Em paralelo a isso, a população de baixo poder aquisitivo e que não tinham acesso aos medicamentos sintéticos, continuava a fazer uso de plantas medicinais para o tratamento de diversas patologias. O resultado disso foi o retorno do uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica, porém focada numa nova tendência: o desenvolvimento de medicamentos ditos fitoterápicos e no isolamento de compostos químicos com atividade farmacológica comprovada (SOUSA et al., 2008; FIRMO et al., 2011).

Começa-se então a busca por ativos naturais, baseado principalmente no conhecimento etnofarmacológico e na parceria com Universidades e Centros de Pesquisa, o que fez surgir vários frutos como os medicamentos Floratil[®], proveniente da parceria entre a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e o laboratório Hebron[®] e o Acheflan[®], parceria encabeçada pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e o laboratório Aché[®] (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010).

3.2. A legislação vigente para plantas medicinais e fitoterápicos

Em 1978 a OMS reconhece as plantas medicinais como uma boa alternativa para o tratamento de diversas enfermidades. No Brasil, denotam-se

de 1981 as primeiras políticas para o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, por meio da portaria n° 212 do Ministério da Saúde.

No ano de 2006 foi lançada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC). Voltada para o Sistema Único de Saúde (SUS), a política objetiva oferecer um tratamento mais humanizado, além de alternativas terapêuticas com base na Medicina Tradicional Chinesa—acupuntura, Homeopatia, Medicina Antropofísica, Termalismo-Crenoterapia e Fitoterapia. No que se refere as plantas medicinais e fitoterápicos, a política traz algumas diretrizes, que se destacam (BRASIL, 2006):

- elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos;
- provimento do acesso a Plantas Medicinais e Fitoterápicos aos usuários do SUS;
- formação aos profissionais de saúde;
- incentivo a pesquisa e desenvolvimento de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade nacional.

No mesmo ano, o Governo Federal cria a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, justificada pela grande biodiversidade brasileira, os aspectos étnico-culturais relacionadas ao uso de plantas medicinais e o grande potencial científico e tecnológico produzido no país. A política visa:

“Garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional.” (Brasil, 2006 p. 20)

Em Novembro de 2009 foi publicada pela Portaria n° 2.982. que aprova as normas de execução e financiamento da Assistência Farmacêutica na Atenção Básica e nela está contidos oito medicamentos fitoterápicos na Relação Nacional de Medicamentos (RENAME, 2014). Em 2012, a RENAME foi atualizada incluindo mais quatro fitoterápicos, totalizando 12 alternativas terapêuticas para as mais diversas patologias (tabela 1).

Com o passar dos anos, diversas legislações foram elaboradas tendo como tema principal a política de fitoterápicos. Dentre elas podemos temos:

- RDC nº 10 de Março de 2010, na qual se encontra uma lista com mais de 60 plantas medicinais que podem ser usadas sobre forma de infusão (chás);
- RDC nº 14 de Março de 2010 que normatiza o registro de medicamentos fitoterápicos;
- RDC nº 60 de Novembro de 2011, que cria o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira;
- RDC nº 13 de Março de 2013, que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos fitoterápicos tradicionais.

Esta ultima resolução apresenta o conceito de “Produto tradicional fitoterápico” (PFT), diferenciando de medicamento fitoterápico, conforme a RDC 14/2010. O principal objetivo dessa diferença esta no fim dos testes necessários para a verificação da eficácia farmacológica do produto fitoterápico tradicional, que será feita com base no conhecimento entofarmacológico e na literatura e serão isentos de prescrição médica. Embora parte dessa resolução ainda esteja sob consulta publica, essa mudança facilitará o registro de fitoterápicos que já se encontram no mercado há vários anos.

De uma forma geral, a legislação voltada para Plantas medicinais e Fitoterápicos trouxe grandes avanços, no que se refere a difusão do seu uso e no incentivo ao desenvolvimento tecnológico, porém pouco aproveitada se compara a países como a Alemanha, onde se concentra o maior mercado de fitoterápicos (BUFAINO, 2013)

Tabela 1 – Plantas medicinais pertencentes a RENAME (relação Nacional de Medicamentos)

Nome	Nome científico	Forma farmacêutica	Indicação
Alcachofra	<i>Cynara scolymus</i>	Cápsula, comprimido, drágea, solução oral, tintura	Colagogos e coleréticos em dispepsias associadas a disfunções hepatobiliares.
Aroeira	<i>Schinus terebenthifolius</i>	Gel, óvulo	Produtos ginecológicos antiinfeciosos tópicos simples
Cascara sagrada	<i>Rhamnus purshiana</i>	Cápsula, tintura	Constipação ocasional simples
Espinheira Santa	<i>Maytenus illicifolia</i>	Capsula, comprimido, solução, emulsão, tintura	Dispepsias, coadjuvante no tratamento de gastrite e úlcera duodenal
Garra do diabo	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Cápsula, comprimido	Antiinflamatório (oral) em dores lombares, osteoartrite
Guaco	<i>Mikania glomerata</i>	Cápsula, solução oral, tintura, xarope	Expectorante, broncodilatador
Isoflavona de soja	<i>Glycine max</i>	Cápsula, comprimido	Climatério (Coadjuvante no alívio dos sintomas)
Unha de gato	<i>Uncaria tomentosa</i>	Cápsula, comprimido, gel	Antiinflamatório (oral e tópico) nos casos de artrite reumatóide, osteoartrite e como imunoestimulante
Babosa	<i>Aloe vera</i>	Creme	Tratamento tópico de queimaduras de 1º e 2º graus e como coadjuvante nos casos de Psoríase vulgaris
Hortelã	<i>Mentha x piperita</i>	Cápsula	Tratamento da síndrome do cólon irritável. Apresenta ação antiflatulenta e antiespasmódica
Plantago	<i>Plantago ovata</i>	Pó para dispersão oral	Coadjuvante nos casos de obstipação intestinal habitual. Tratamento da síndrome do cólon irritável
Salgueiro	<i>Salix alba</i>	Comprimido	Tratamento de dor lombar baixa aguda. Apresenta ação antiinflamatória

Fonte: RENAME, 2012

3.3. Ativos naturais com atividade antimicrobiana

Os antibióticos são compostos de origem natural ou sintética capazes de inibir ou causar a morte de micro-organismo, como bactérias e fungos. Desde a descoberta do corante vermelho Protosil[®], várias outras moléculas surgiram para o tratamento desses patógenos o que levou a grandes avanços na terapêutica antimicrobiana. Contudo, o uso irracional dessa classe terapêutica possibilitou o surgimento de linhagens resistentes aos quimioterápicos disponíveis no mercado (GUIMARÃES et al., 2010).

Até o final da década de 90, a síntese de fármacos era a principal fonte de novos antimicrobianos, porém desde 2000, poucas moléculas foram lançadas no mercado. A indústria farmacêutica alega que os gastos em pesquisa e desenvolvimento são bastante elevados e o retorno pode não ser compensável, além da possibilidade do desenvolvimento de resistência (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010).

Seguindo caminho oposto, foi retomada a busca por novos ativos de origem natural, proveniente de extratos de plantas medicinais. No Brasil tem crescido demasiadamente o número de pesquisa envolvendo espécies da nossa flora, tendo em vista a grande biodiversidade do nosso país e a busca pela “sustentabilidade”, no âmbito da indústria farmacêutica (OSTRSOKY., et al., 2008; SILVA e OLIVEIRA, 2012).

Espécies como o *Anacardium occidentale* L (cajueiro), *Psidium guajava* L (goiabeira), *Punica granatum* L (romã) e *Caesalpinia ferrea* Martius (jucá), pertencentes à flora brasileira e com uso etnofarmacológico bastante difundido, apresentam atividade contra diversos patógenos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e são bons exemplos de possíveis fontes de ativos naturais (SILVA et al., 2007; DANTAS, 2007; BISWAS et al., 2013; MALTA JUNIOR et al., 2013). Todas estas espécies encontram-se na RDC N^o 10 (BRASIL, 2010) que dispõe seu uso na forma de infusão (chá) estando indicadas para o tratamento de inflamações, infecções, cicatrizante e antisséptico.

3.4. *Schinopsis brasiliensis* Engler

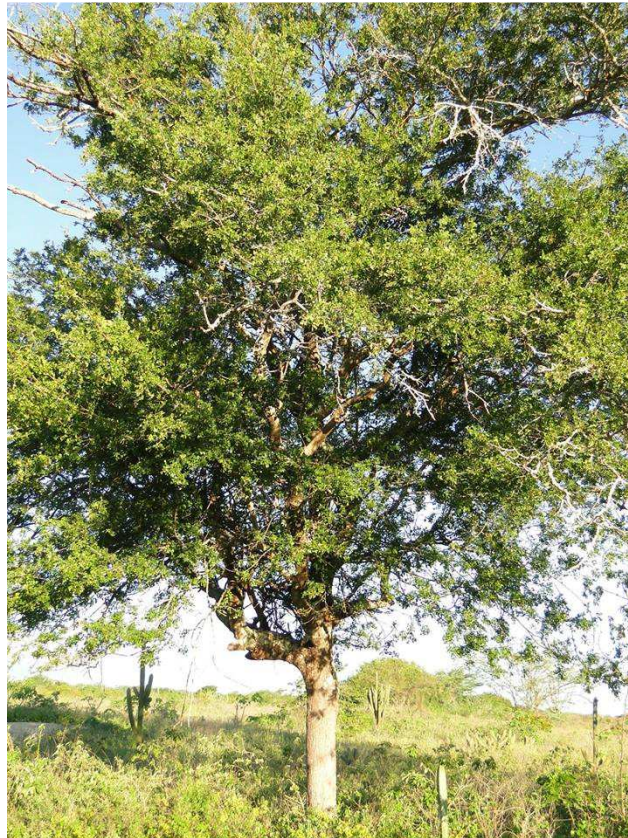
A *Schinopsis brasiliensis* Engler é uma árvore pertencente a família Anacardiaceae. Seu nome científico significa “*Schinopsis*” = parecido com “*Schinus*”, um gênero de plantas a qual pertence à aroeira (*Schinus terebinthifolius*). Popularmente é conhecido no Nordeste como braúna ou baraúna e em Minas Gerais como pau-preto. Sua ocorrência é, principalmente, na região Nordeste, no norte de Minas Gerais e de Mato Grosso do Sul. Também está presente em regiões da Bolívia (onde é conhecida como Soto) e no Paraguai (onde é conhecida como barauva). Seu nome popular está tem origem tupi *ibirá-uma* “madeira-preta” (DANTAS, 2007; CARVALHO, 2008).

A copa da árvore é quase globosa com ramos providos de espinhos. Sua casca é bastante escura e sua madeira bastante densa. Quando é macerada, libera um aroma de resina e quando deixada ao ar livre escurece rapidamente (SOUZA NETO, 2009).

Seu uso etnofarmacológico esta voltado para o tratamento da gripe, tosse, diarreia, fraturas e como antiinflamatório geral (SARAIVA et al, 2013). Extratos hidroetanólico das cascas e folhas apresenta atividade *in vitro* contra diversos micro-organismos de interesse médico como o *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus oralis*, possivelmente devido ao elevado teor de taninos e flavonoides presentes no extrato (CHAVES et al, 2011; SILVA et al., 2012).

Diversos compostos químicos já foram isolados de *S. brasiliensis*. Dentre eles destacam dois novos alquilfenóis (CARDOSO et al., 2005), galato de metila e ácido gálico (SARAIVA et al., 2011). Estes compostos apresentam varias aplicações tanto de indústria de alimentos, medicamentos e cosméticos como fonte natural de antioxidantes, estabilizantes de bebidas e matéria prima para a síntese de fármacos (BATTESTIN et al., 2004). Outro aspecto consiste na ação farmacológica desses compostos para o tratamento de doenças cardiovasculares e degenerativas, câncer, e como antidiabética, antihelmíntica, antiploriferativa, antimicrobiana e antifúngica (ARAPISTAS, 2012).

Figura 1 – *Schinopsis brasiliensis* Engler. localizada na zona rural de Pocinhos - PB



Fonte: SANTOS, 2013

3.5. Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos

A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) descreve que o consumo de plantas medicinais no SUS podem ser de quatro formas: Plantas medicinais in natura, plantas medicinais seca (droga vegetal), fitoterápico manipulado e fitoterápico industrializado (BRASIL, 2006).

Considerando os aspectos de eficácia e segurança exigidos pela legislação vigente, o fitoterápico industrializado talvez seja o que mais atenda a esses aspectos, tendo em vista as exigências para o registro de um fitoterápico ser bastante complexo, mesmo este sendo um produto fitoterápico tradicional (BRASIL, 2013).

Entretanto, no que se refere ao desenvolvimento de fitoterápicos o Brasil ainda encontram-se bem abaixo de países como EUA, Japão e Alemanha, que possuem uma biodiversidade bem menor e que investem maciçamente em Pesquisa e Desenvolvimento (KLEIN et al., 2009). Inicialmente, o

desenvolvimento de um medicamento fitoterápico consiste de uma forma geral, em algumas etapas:

3.5.1. Planta medicinal

Conforme Rodrigues e Otsuka (2011), a escolha da planta a ser trabalhada pode escolhida a partir de cinco abordagens:

- coletas randômicas – obtenção de amostras de todas as plantas encontradas em uma determinada região;
- quimiotaxonomia – escolha das espécies com base na presença de determinados grupos de metabólitos em determinadas famílias;
- ecologia química – baseia-se na observação das inter-relações (animais, plantas e micro-organismos) resultantes na produção de metabólitos secundários como estratégias de defesa química;
- zoofarmacognosia – consiste na observação de animais para com o uso de plantas com fins terapêuticos;
- entofarmacologia – baseia-se na busca através do saber popular de varias comunidades local, o uso de plantas medicinais;

Outra etapa importante consiste na correta identificação da espécie vegetal, com o deposito da exsicata no herbário. As amostras vegetais secas devem conter, pelo menos, itens de floração e frutificação e apresentarem-se em bom estado para identificação (RODRIGUES; OTSUKA, 2011).

3.5.2. Coleta e secagem

Outro aspecto importante esta relacionado a coleta do material vegetal. Diversos aspectos como a época e o horário da coleta, o tipo de solo, a forma de coleta dentre outros, podem afetar a droga vegetal bem como a concentração de compostos. Chaves et al. (2013) ao estudar a influência da variação sazonal na expressão de flavonoides e polifenóis totais bem como a atividade antimicrobiana, encontrou diferenças consideráveis entre o período chuvoso e seco nas espécies de *Guapira glacifora* e *Pseudobombax marginatum*.

O processo de secagem está diretamente ligado ao rendimento de ativos naturais nas plantas medicinais. As condições de secagem (temperatura, processo de secagem, parte do vegetal, dentre outros) podem produzir consideradas variações no teor de ativos. O principal objetivo da secagem é a redução do teor de água, sendo a temperatura mais utilizada é em torno de 40 °C (MELO et al., 2004).

3.5.3. Extrato

O extrato consiste numa preparação com consistência líquida, sólida ou intermediária proveniente de origem vegetal ou animal. Este material pode ser submetido a tratamento prévio como inativação de enzimas, moagem, desengorduramento, dentre outros (BRASIL, 2011). Os extratos podem ser obtidos utilizando diferentes solventes e técnicas de preparo, de acordo com a necessidade (ISAAC et al., 2008).

Dentre os principais solventes para a extração de ativos temos a água, o álcool etílico e metílico, hexano, acetato de etila, clorofórmio, éter de petróleo, dentre outros. Também é comum a mistura de solventes como a solução etanólica a 70% e mistura com clorofórmio e éter. A escolha dos solventes se dará de acordo com princípios ativos a ser extraída, adequação tecnológica ao método e inocuidade fisiológica (NEGRI; DUARTE-ALMEIDA, 2011). Outro aspecto diz respeito a técnica utilizada para obtenção do extrato. No caso dos extratos líquidos temos (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010):

- infusão: O material vegetal é posto em contato com água fervente em recipiente fechado por alguns minutos. Geralmente é aplicada as partes moles do vegetal ou rica em óleos essenciais e compostos voláteis.
- decocção: Consiste em submeter o material em contato com água em ebulição durante um curto período de tempo. É aplicado as partes duras do vegetal como cascas e raízes. Contudo esta sujeito a perda de compostos termossensíveis.
- maceração: A matéria prima vegetal fica em contato com o solvente durante um longo período, sem a renovação do liquido extrator. Quando é feita sob agitação ela é dita maceração dinâmica.

- percolação: Semelhante a maceração, porém com uma renovação constante do líquido extrator, objetivando o esgotamento da droga vegetal.
- turbólise ou turboextração: nessa técnica ocorre uma redução do tamanho da partícula da droga vegetal concomitantemente com a extração em altas rotações, o que faz com o processo de extração seja mais rápido. Entretanto esse método está sujeito a problemas relacionados à temperatura.
- extração por arraste de vapor: Utilizada principalmente na extração de óleos essenciais, consiste no arraste dos óleos pelo vapor de água, utilizando um aparelho denominado de Clevenger.
- extração por soxhlet: Utilizada para extração de sólidos utilizando solventes voláteis. Consiste num sistema rotativo, onde o solvente aquecido entra em contato várias vezes com o material vegetal, possibilitando uma extração utilizando pequenas quantidades de solvente.

Existem ainda outros tipos de extração: micro-ondas, ultrassom e fluido supercrítico, que utilizam outras técnicas e aparatos modernos.

A escolha do processo de extração pode ser feita, por exemplo, utilizando-se um planejamento experimental, visando obter a melhor condição de extração. Migliato et al. (2011) aplicaram um planejamento experimental completo (3^2), visando otimizar a extração dos frutos de *Syzygium cumini*. Os autores concluíram que a percolação (comparada a turbólise e maceração) e utilizando uma solução hidroalcoólica a 50% foi a que melhor resíduo seco e atividade antimicrobiana.

Entretanto os extratos líquidos apresentam sérios problemas relacionados a estabilidade, contaminação microbiológica e padronização, acarretados principalmente pela presença de solventes. Uma possível alternativa será a retirada parcial ou total desses solventes produzindo extratos secos (SOARES; SOUZA, 2011).

Entende-se por extrato seco as preparações provenientes da evaporação dos solventes em extratos líquidos, utilizando ou não adjuvantes de secagem.

Apresentam a vantagem de serem mais estáveis, tanto nos aspectos químicos quanto microbiológicos, melhor padronizações e maior aplicabilidade para outras formas farmacêuticas (SILVA et al., 2012). De uma forma os extratos secos podem ser obtidos pelos seguintes processos (SOARES; SOUZA, 2011; SILVA et al., 2012):

- secagem por evaporação rotativa: Utilizando um equipamento denominado de rotaevaporador, o extrato é concentrado pela retirada do solvente em forma de vapor pela agitação e aquecimento em banho-maria (geralmente a 30 - 40 °C).
- liofilização (*freezer drying*): Consiste na retirada da água do extrato, através do congelamento do mesmo e de sua retirada por sublimação sob pressão reduzida, de forma que ocorre uma proteção dos componentes do extrato pelo estado líquido da água. Embora seja o processo mais indicado para extratos termolábeis, é um processo de elevado custo para a produção de extratos e o seu produto final apresenta-se elevada higroscopicidade
- leito de jorro ou fluidizado: Processo de secagem onde ocorre um contato entre o fluido e partículas inertes relativamente grandes, através de uma circulação em um leito de sólidos. Sua utilização para secagem de fitoterápicos ainda é reduzida, porém é um processo mais barato que o *spray-drying*.
- *spray drying* (secagem por aspersão): A secagem por aspersão é a mais utilizada para produtos fitoterápicos sólidos. Consiste na atomização de finas gotículas frente a uma corrente de ar quente. É utilizado na secagem de soluções, suspensões, emulsões, dentre outras. Visando obter melhores características tecnológicas, é comum o uso de adjuvantes de secagem como o dióxido de silício coloidal, maltodextrina e amido pré-gelatinizado.

3.5.4. Caracterização dos princípios ativos

Após a obtenção dos extratos, a caracterização dos princípios ativos pode ser feita, basicamente, de duas formas: qualitativa e quantitativa. A

caracterização qualitativa (ou *screening* fitoquímico) é feita a partir de reações químicas (reações de caracterização) que produzem uma mudança de coloração e/ou precipitação, sugerindo a presença de determinados grupos de metabolitos. A reação com cloreto férrico a 2,0%, por exemplo, indica a presença de grupos com hidroxilas fenólicas, obtendo uma coloração violeta. Contudo este método pode apresentar interferência, como a elevada concentração de flavonoides. Métodos modernos de análises são utilizados para fins de caracterização quantitativa. Técnicas como espectroscopia, cromatografia, e ressonância magnética nuclear são utilizadas para a identificação e quantificação de compostos (NEGRI; DUARTE-ALMEIDA, 2011).

No estudo de *Spondias dulcis*, Islam et al. (2013) utilizaram reações para identificação de metabólitos secundários (antraquinonas, saponinas, alcaloides, glicosídeos cardíacos, esteroides, taninos, flavonoides, terpenoides e açúcares redutor) e da espectroscopia na região do UV-Vis para a determinação de polifenóis e flavonoides totais. Sousa et al., (2013) realizaram os estudos fitoquímicos dos galhos, talos e raízes de *Macroptilium lathyroides* L. utilizando técnicas de cromatografia em coluna, ponto de fusão, ressonância magnética nuclear (RNM) e espectroscopia no infravermelho, além da atividade antimicrobiana, foi possível identificar a ocorrência de metabólicos que nunca tinham sido registrados nesse gênero, como o (R)-lasiodiplodina..

Um aspecto importante relacionado a identificação de princípios ativos é ao marcador químico. Segundo Brasil (2010), o marcador químico de uma espécie vegetal consiste em um composto ou grupo de compostos químicos majoritários e que preferencialmente tenham relação com a sua atividade farmacológica e utilizada como padrão no controle da qualidade. Dentre as diferentes técnicas para sua identificação e quantificação, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando padrões de elevada pureza (ZOLLNER; SCHUWARZ, 2013).

De Souza et al., (2002) aplicaram a CLAE na quantificação e validação do método de compostos fenólicos em extratos de *Phyllanthus niruri*, destacando como principal componente o ácido gálico. A canferitina foi identificada como

marcador de *Bauhinia forticata* (MARQUES et al., 2013) e de *Uncaria guianensis* (VALENTE et al., 2009), onde em ambos os trabalhos, os autores utilizaram um sistema de cromatografia líquida em alta eficiência acoplado a uma detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

3.5.5. Estudos de pré-formulação

Visando acumular o maior número de informações sobre o comportamento físico e químico dos fármacos e excipientes, os estudos de pré-formulação compreende uma etapa importante no desenvolvimento de novos medicamentos seguros e eficazes. Esses estudos permitem determinar a forma farmacêutica mais viável, os excipientes mais apropriados e seus aspectos relacionados ao armazenamento e estabilidade (MAXIMIANO et al., 2010). Diversos aspectos são avaliados durante o período de pré-formulação, como descrição física, solubilidade, tamanho de partícula, polimorfismo, dissolução, estabilidade, dentre outros, os quais podem ser obtidos por diferentes técnicas (ALLEN JR et al., 2007).

A microscopia permite avaliar os aspectos morfológicos bem como o tamanho de partícula, distribuição granulométrica possíveis interações quando associado a outras técnicas. Dentre as técnicas de microscopia destacam-se a microscopia óptica, microscopia de chapa quente e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) (CHADHA; BHANDARI, 2014).

Estudos realizados com a cefuroxina em sistemas dispersos contendo povidona utilizou o MEV, comparando o fármaco, excipiente e a mistura. Juntamente com as demais técnicas utilizadas, foi possível visualizar o caráter amorfo da mistura (NICOLAI et al., 2014). Talvani et al., (2013) utilizaram a microscopia óptica na visualização de compatibilidade entre carvedilol com diversos excipientes após um stress térmico da amostra.

Oliveira e Petrovick (2010) apresentam o MEV como uma importante técnica para avaliação dos extratos secos por aspensão. Fernandes et al., (2013) utilizaram o MEV na caracterização de extratos secos de *Ximenia americana* e *Schinopsis brasiliensis* e observaram sua morfologia amorfa.

A difração de raios X (DRX) é outra técnica de grande aplicação nos estudos de compatibilidade. De uma forma geral, a técnica consiste na emissão de raios X sendo que, através da Lei de Bregg, é possível a determinação da estrutura cristalográfica de um sólido a partir dos raios refletidos expressos em picos (BARBOSA, et al., 2009). Em um sólido cristalino, as moléculas se organizam em células unitárias e produzem uma “impressão digital” com seus picos. Já, em um sólido amorfo como não ocorre esse arranjo, o difratograma apresenta-se com uma “aureola amorfa” (DONG; BOYD, 2011; NEWMAN; BYRN, 2003).

Sua aplicabilidade no estudo de pré-formulação esta voltada para a aviação do estado cristalino/amorfo e de polimorfismo (CHADHA; BHANDARI, 2014). Lima et al., (2009) utilizaram a difração de raios X para análise de taninos extraídos dos frutos de *Bixa orellana*, onde foi encontrado um sólido completamente amorfo, porem com uma possível fase cristalina. Honorato et al. (2014) aplicaram a difração de raios X na identificação de novos polimorfos de benzonidazol, fármaco para o tratamento da doença de chagas. No estudo de compatibilidade com o DRX é realizado utilizando a análise individual do fármaco e dos excipientes, com mistura binária fármaco/excipiente, Em caso de interação, são visualizados mudanças nos aspectos cristalino/amorfo e nas intensidades dos picos como foi observado nos trabalhos de Aigner et al., (2012).

3.5.6. Formas farmacêuticas sólidas

As formas farmacêuticas sólidas são as mais utilizadas pela sua grande praticidade e menor volume por dose, facilitando o transporte, manuseio e condições de armazenamento. Essas formas correspondem cerca de 40% a 70% das formulações existentes no mercado. Do ponto de vista tecnológico apresentam maior estabilidade que as formas líquidas (SOARES; SOUSA, 2011; ALLEN JR et al., 2007).

Dentre as principais formas farmacêuticas sólidas aplicadas a fitoterápicos destacam-se os pós, grânulos, cápsulas e comprimidos. Os pós apresentam sua aplicação maios no uso de drogas vegetais, acondicionados em *sachet*. Os

granulados são utilizados como produtos intermediários de extratos secos. Já os comprimidos e as cápsulas são as formas farmacêuticas mais utilizadas nos produtos fitoterápicos (BRESOLIN; CECHIENL FILHO, 2010).

Um dos principais pontos críticos no desenvolvimento dessas formas farmacêuticas consiste na escolha dos excipientes. Embora boa parte desses excipientes tenha sido considerado inerte, é sabido que alguns podem influenciar na absorção, biodisponibilidade e estabilidade do ativo, provocado principalmente, por interações de ordem química e/ou física (RUDNIC; SCHWARTZ, et al., 2004; NARANG et al., 2012).

3.6. Análise térmica

Os métodos termoanalíticos apresentam uma grande vantagem nos estudos de pré-formulação, tendo em vista que o mesmo é um método rápido, não necessita de tratamento prévio da amostra e utiliza uma pequena quantidade de amostra. Por outro lado, a sua única desvantagem é a degradação da amostra (COSTA, 2005). Sua principal aplicação é na visualização de interação fármaco-excipiente e no estudo de estabilidade térmica (LIMA et al., 2013; OLIVEIRA, et al., 2010).

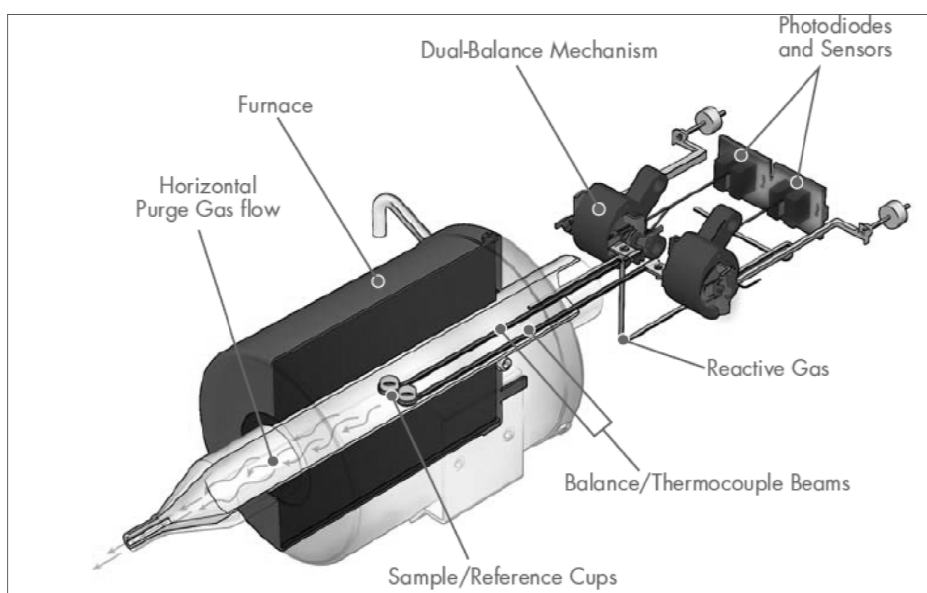
A análise térmica compreende um conjunto de técnicas, nas quais uma propriedade física de uma substância é avaliada em função da temperatura e/ou tempo, na medida em que esta mesma substância é submetida a um programa controlado de temperatura (ARAÚJO et al., 2003). Na área farmacêutica é aplicada, visando a caracterização de fármacos, pureza, compatibilidade, estabilidade, polimorfismo dentre outros. As técnicas mais utilizadas são a termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA) e a Calorimetria exploratória diferencial (DSC) (OLIVEIRA et al., 2011).

3.6.1. Termogravimetria

A termogravimetria é uma técnica na qual se verifica a variação da massa em função do tempo e/ou da temperatura. A primeira termobalança, instrumento utilizado para avaliar a massa sob uma temperatura controlada, é datado de 1915. Foi desenvolvida pelo Prof. Kotaro Honda (SAITO;

MORIKAWA, 2013). Basicamente, uma termobalança (Fig. 2) é formada, basicamente, por um forno com temperatura e atmosfera controlada, sensor de temperatura (termopar), uma balança com alta sensibilidade e um sistema controlador-registrador (CRAIG; READING, 2007).

Figura 2 – Esquema de funcionamento de uma termobalança moderna da TA Instruments®



De uma forma geral, existem três tipos de análises termogravimétricas (MATOS et al., 2009):

- TG dinâmica: a amostra é submetida a uma razão de aquecimento controlada;
- TG quase-isotérma: a amostra é aquecida até a ocorrência de perda de massa. Nesse momento ela inicia uma isoterma por um determinado tempo, e em seguida, retomando ao modo dinâmico até uma nova perda de massa;
- TG isoterma: a amostra é submetida a uma temperatura constante por um determinado tempo ou até a sua completa degradação;

Diversos fatores podem afetar uma análise termogravimétrica, dentre eles temos: a quantidade de massa da amostra e tamanho de partícula, razão de aquecimento, tipo e razão do gás de araste, tipo de forno (CRAIG; READING, 2007).

Uma ferramenta importante na análise termogravimétrica é a derivada de sua curva (DTG). Ela é obtida a partir da primeira derivada da variação da massa em relação ao tempo em função (dm/dt), do tempo ou da temperatura. Dessa forma, os “degraus” dos termogramas são substituídos por “picos”, facilitando a interpretação dos resultados (MATOS et al., 2009).

Diferentes estudos aplicam a termogravimetria as análises de fármacos e medicamentos. A tabela 2 apresenta alguns estudos recentes:

Tabela 2 – Exemplos de estudos termogravimétricos aplicado a fármacos.

Fármaco	Objetivo	Técnica empregada	Referência
Zidovudina	Cinética de degradação	Dinâmica e Isoterma (Arrhenius)	RODRIGUES et al, 2005
Captopril	Cinética de degradação do fármaco e dos comprimidos	Dinâmica e isoterma (Ozawa)	BAZZO; SILVA, 2005
Prednisona	Caracterização do fármaco e dos fabricantes e cinética de degradação	Dinâmica e isoterma (Arrhenius)	MEDEIROS et al., 2001
Fluconazol	Caracterização do fármaco e cinética de degradação	Dinâmica e isoterma (Arrhenius/Ozawa)	MOURA et al., 2010
Ácido lipóico	Pressão de vapor	Isoterma	PORTELA et al., 2012
Cetoprofeno	Caracterização do fármaco e compatibilidade	Dinâmica	TITA et al., 2011

Em relação a aplicação da termogravimetria a plantas medicinais e fitoterápicos, a quantidade de trabalhos relacionados é bem menor, porém com quase as mesmas finalidades dos estudos aplicados a medicamentos, conforme a tabela 3.

Tabela 3 – Exemplos de estudos termogravimétricos aplicado a plantas medicinais e fitoterápicos

Planta	Objetivo	Técnica empregada	Referência
<i>Albizia inopinata</i>	Cinética de degradação do extrato seco (<i>spray drying</i>)	Dinâmica e isoterma (Arrhenius)	MEDEIROS et al., 2002
<i>Cissampelos sympodialis</i>	Pressão de vapor da warfiteína e metilwarfiteína (marcadores)	Isoterma	GOMES et al., 2012
<i>Symphytum officinale</i>	Caracterização do extrato fluido e seco (<i>spray drying</i>)	Dinâmica	SILVA JUNIOR et al., 2006
<i>Capraria biflora</i>	Caracterização e cinética de degradação da biflorina (marcador)	Dinâmica e isoterma (Arrhenius)	ARAGÃO et al., 2002
<i>Heliotropium indicum</i>	Caracterização do extrato liofilizado	Dinâmica	DA COSTA et al., 2013
<i>Schinopsis brasiliensis</i> e <i>Ximenia americana</i>	Caracterização do extrato seco (<i>spray drier</i>)	Dinâmica	FERNANDES et al., 2013
<i>Sophora japônica</i>	Avaliação do processo de extração da rutina (marcador)	Dinâmica	ZHUNG et al., 2009

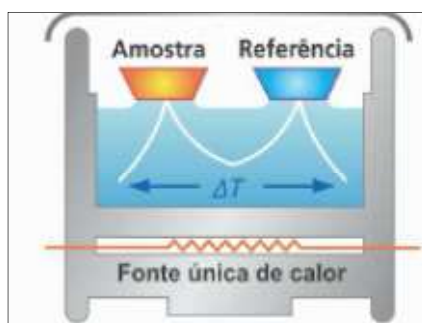
3.6.2. Análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Embora sejam duas técnicas distintas, a segunda surgiu visando aprimorar a primeira. A análise térmica diferencial (DTA – *Differential thermal analysis*) é uma técnica na qual se avalia a diferença de temperatura da amostra em relação ao material de referência sob uma programação controlada de temperatura. Já, a calorimetria exploratória diferencial (DSC – *Differential calorimetric scanning*) acompanha a variação de energia (fluxo de calor) entre a amostra e o material de referência (MATOS et al., 2009; CRAIG; READING, 2007).

A DTA (Fig. 3) surge com base nos estudos de Lê Chatelier, e mais tarde de outros autores, onde se analisava a variação de temperatura das substâncias (amostra e referência inerte), na medida em que as mesmas eram

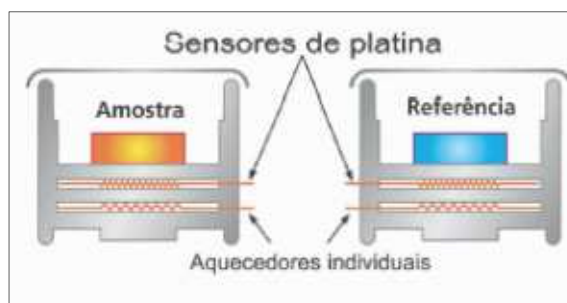
submetidas a uma temperatura controlada e medidos por termopares. Contudo, a curva do DTA (curva de aquecimento) não conseguia informar com precisão o calor envolvido durante a ocorrência dos eventos térmicos (BERNAL et al., 2002).

Figura 3 – Esquema de funcionamento da DTA da Perkin Elmer do Brasil.



Em 1963 a Perkin Elmer desenvolve o primeiro equipamento de DSC. Nele, a quantificação da energia envolvida no processo era feita tendo como base a separação da amostra e da referência em compartimentos diferentes e com sistemas de aquecimentos individuais. Dessa forma, o sistema registra a diferença de potência necessária para manterem ambos os compartimentos na mesma temperatura. Esse equipamento recebeu o nome de DSC por compensação de potência (Fig. 4) e sua patente pertence ao seu fabricante (BERNAL et al., 2002).

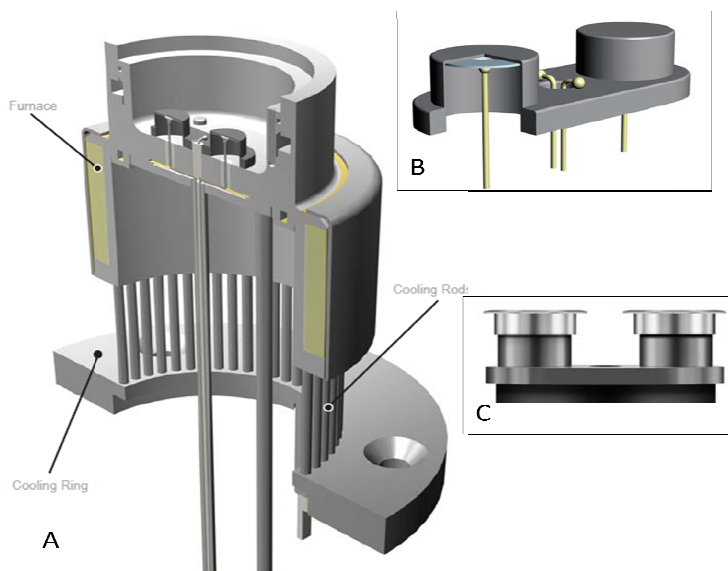
Figura 4 – Esquema de funcionamento de um DSC por compensação de potência da Perkin Elmer do Brasil.



Outro método foi então desenvolvido para contornar a patente. Baseado nas teorias de Boersma (1955), este método denominado de DSC por fluxo de calor se assemelha com a DTA. Em uma única célula (Fig. 5), a amostra e a

referência são colocadas em um disco termoeletrico e aquecidas por uma mesma fonte. Abaixo do disco encontram-se os termopares que medem a diferença de calor envolvido em função da temperatura (DANELUTI, 2011).

Figura 5 - Esquema de funcionamento do DSC por fluxo de calor (A), com detalhe do disco e dos termopares (B) e da posição das panelinhas (C) da TA Instruments®.



Na área de fármacos e medicamentos, a principal aplicação do DTA e do DSC consiste nos estudos de compatibilidade fármaco-excipiente e nos estudos de polimorfismo, conforme alguns exemplos da tabela 04.

Tabela 4 – Exemplos de estudos com DSC e DTA aplicado a fármacos.

Fármaco	Objetivo	Técnica empregada	Referência
Teofilina	Polimorfismo	DSC (fluxo de calor e compensação de potência)	SZTERNER et al., 2010
Rifampicina	Polimorfismo	DSC (fluxo de calor)	ALVES et al., 2010
Ácido acetilsalicílico	Estabilidade	DSC (fluxo de calor)	CESCHEL et al., 2003
Trissoralen	Compatibilidade	DTA e DSC (fluxo de calor)	LIMA et al., 2013
Esparfloxacino	Caracterização	DTA e DSC (fluxo de calor)	SALGADO et al., 2005
Itraconazol/benzonidazol	Compatibilidade	DSC (fluxo de calor)	ALVES-SILVA et al., 2014

No que se refere as plantas medicinais e fitoterápicos , tanto a DSC quanto a DTA é utilizada na caracterização de extratos e de produtos isolados de plantas (Tabela 5).

Tabela 5 – Exemplo de estudos com DSC e DTA aplicado a plantas medicinais e fitoterápicos.

Planta	Objetivo	Técnica empregada	Referência
<i>Moringa oleifera</i>	Caracterizar extrato etanólico proveniente de diversas partes do vegetal	DTA	NASCIMENTO et al., 2013
<i>Erythrina velutina</i>	Caracterizar a droga vegetal em diferentes tamanho de partícula	DTA	CORREIA et al., 2013
<i>Syzygium aromaticum</i>	Caracterização do óleo essencial (eugenol)	DSC (fluxo de calor)	SANTOS et al., 2009
<i>Cannabis sativa</i>	Pré-formulação com o Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	DSC (compensação de potencia)	THUMMA et al., 2009
<i>Cissampelos sympodialis</i>	Caracterização da warifteina (marcador químico)	DSC-photovisual* (fluxo de calor)	ARAGÃO et al., 2001
<i>Heliotropium indicum</i>	Caracterização do extrato liofilizado	DSC (fluxo de calor)	DA COSTA et al., 2013
<i>Schinopsis brasiliensis</i> e <i>Ximenia americana</i>	Caracterização do extrato seco (<i>spray drier</i>)	DSC (fluxo de calor)	FERNANDES et al., 2013

3.6.3. Estudo de compatibilidade

A interação entre ingredientes ativos farmacêuticos (API) e excipientes podem ocasionar sérios problemas relacionados a eficácia e segurança eficácia do ativo. Dentre as principais técnicas, a DSC e TG/DTG são as mais aplicadas tendo em vista a rapidez das análises (BERNARDI et al., 2009). A literatura menciona diversos casos de incompatibilidade, como os estudos de Macedo et al. (2002), que ao estudarem o propranolol, utilizando análise térmica, mostraram que a lactose é incompatível com o fármaco estudado. Essa incompatibilidade foi encontrada no estudo com o LPSF/FZ4 (COSTA et al., 2013); Araujo et al. (2003) através de análises de DSC e TG estudaram uma possível interação entre a zidovudina com lactose, amido, aerosil,

estearato de magnésio, hidroxipropilmetilcelulose e PEG 6000, sendo apenas este último que apresentou interação.

As técnicas de DSC e DTA são as primeiras técnicas a serem utilizadas para a avaliação da compatibilidade fármaco- excipiente, pela sua rapidez, avaliação de possíveis polimorfos, dentre outras. Geralmente, são realizadas misturas binárias na proporção de 1:1 (m/m). Dessa forma, a curva da mistura deverá se apresentar como um somatório das curvas dos componentes da mistura (MATOS et al., 2009). Supressão, deslocamento ou surgimento de novos eventos térmicos e alterações nos valores de entalpia podem sugerir a ocorrência de interações. Porém, é possível a ocorrência de pequenas alterações nos valores relacionados ao calor envolvido (ΔH) por ser tratar de mistura física (ALVES, 2007).

Na análise termogravimétrica, também são avaliados os componentes isoladamente e a mistura binária. A avaliação da compatibilidade é feita com base nas alterações nas perdas de massas, seja por antecipação ou retardo dessa variação, o que sugere uma menor alteração na estabilidade (DANELUTTI, 2009). Porém esta técnica necessita de DSC, para uma melhor visualização dos seus dados de interação (WESOLOWSKI et al., 2013).

3.6.4. Estudo cinético por termogravimetria isotérmica

Dentre as diversas aplicações da termogravimetria, o estudo cinético consiste na avaliação da perda de massa em função do tempo, em uma temperatura constante (RODRIGUES et al., 2005). Dessa forma, são produzidas no mínimo cinco curvas, com base na temperatura da primeira perda de massa e são plotados diferentes gráficos, de acordo com o método escolhido (CRAIG; READING, 2007). Estes estudos utilizam a equação de Arrhenius:

$$g(\alpha) = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) t$$

Onde A é o fator de frequência, E_a , é a energia de ativação, R a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e T a temperatura em K. O fator de frequência ou pré-exponencial, A, representa a frequência e colisões efetivas

entre as moléculas. Já a energia de ativação (E_a) é a energia necessária para a ocorrência de uma reação química (DANELUTTI, 2009).

O método de Matos et al., (2009) utiliza o gráfico $\ln t$ (min) em função $1/T$ (K), onde os dados são obtidos a partir das curvas de TG isotérmica, avaliando uma perda de massa de 5 a 10%. Murakami et al., (2009), Fandarruf et al., (2013), Alves-Silva et al. (2014) aplicaram esse método e obtiveram, com a equação da reta, a energia de ativação e o fator de frequência, além de uma predição do prazo de validade naquelas condições.

Outro método citado por Macedo et al. (1997) e Medeiros (2001) consiste em obter o gráfico $\ln k$ em função de $1/T$ (K), sendo o k uma constante para cada temperatura. Com base nesses dados, é possível a obtenção da energia de ativação, ordem de reação e o prazo de validade (BARRETO GOMES et al., 2003).

3.7. Ferramentas quimiométricas

A quimiometria é definida como uma disciplina da química que utiliza métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para o planejamento ou a seleção de maneira otimizada, visando extrair o maior número de informações possíveis a partir dos dados disponíveis. Dentre as diversas áreas da quimiometria destaca-se o planejamento de experimentos, o reconhecimento de padrões e a calibração multivariada (SOUZA; POPPI, 2012).

Com reconhecimento de padrões é possível, a partir de grande conjunto de dados sobre um determinado grupo de amostras, obter agrupamentos entre essas amostras, de forma a detectar similaridade ou tendências. Elas podem ser divididas em técnicas supervisionadas e não supervisionadas. Nas técnicas supervisionadas utilizam o conhecimento prévio do conjunto de amostra para a classificação. Já as técnicas não supervisionadas são verificadas a ocorrência de agrupamentos, sem o conhecimento prévio de características da amostra (FERNANDES, 2013). Dentre as técnicas são supervisionadas, Veras et al., (2012) mencionam a HCA (Análise hierárquica de agrupamentos - *Hierarchical Clusters Analysis*) e a PCA (Análise dos componentes principais - *Principal Components Analysis*).

A HCA está baseada na similaridade das amostras por meio das distâncias entre elas e estas expresso principalmente na forma de dendogramas. A PCA baseia-se na manipulação dos dados matemáticos, dos dados de origem, visando obter novas variáveis, que nada mais são que combinações lineares das variáveis originais (VERAS et al., 2012; CORREIA; FERREIRA, 2007).

Diferentes técnicas analíticas são aplicadas as técnicas de HCA e PCA. Rojek et al., (2013) aplicaram a espectroscopia no infravermelho para a visualização da compatibilidade do bacofleno com excipientes farmacêuticos, onde foi visualizado uma possível interação com lactose, beta-ciclodextrina e meglumina. Wesolowski et al., (2013) usaram a técnicas quimiométricas em dados de termogravimetria, visando avaliar a compatibilidade do atenolol com vários excipientes.

3.8. Validação de métodos analíticos

Compreendendo uma das partes mais importante no desenvolvimento de novos métodos, o processo de validação analítica é uma parte importante da garantia da qualidade e objetiva demonstrar que o método esta apropriado para determinada finalidade, assegurando a confiabilidade dos dados (CASEDEY, 2009; BRASIL, 2003). Visando o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, na validação dos métodos analíticos, os órgãos regulatórios exigem que os mesmos sejam validados, principalmente nos aspectos relacionados ao marcador químico (MARCUCCI, 2011).

Segundo Brasil (2003), a validação de métodos analíticos pode ser de quatro tipos:

- Categoria I – Testes quantitativos para a determinação de substância ativa;
- Categoria II – Testes quantitativos e ensaio limite para a determinação de impureza e produtos de degradação;
- Categoria III – Testes de performance;
- Categoria IV – Testes de identificação;

A ICH (*International Conference of the Harmonization of the Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) estabelece

os requisitos mínimos para avaliação de métodos analíticos (ICH, 2005). Essas figuras de mérito podem ser prontamente utilizadas na validação de metodologias aplicada aos fitoterápicos (MARCUCCI, 2011)

- Especificidade e seletividade: a especificidade é a capacidade do método distinguir o composto de interesse dos demais presentes na amostra. Já a seletividade é a capacidade do método de identificar o analito em questão na presença de possíveis interferentes;
- Linearidade: é a capacidade do método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais á concentração do analito. Esse parâmetro é verificado com base na construção da curva de calibração;
- Precisão: visa obter o grau de dispersão de amostra homogenia quando esta e analisada repetidas vezes, expressando a a concordância de valores de múltiplas medições. A precisão é avaliada em reprodutibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária;
- Exatidão: é a proximidade entre o valor aceito como verdadeiro e valor determinado pelo método. Geralmente analisa-se o analito em questão em três concentrações diferentes (baixa, média e alta) pelo teste de recuperação;
- Limite de detecção: é a menor concentração do analito presente na amostra que pode ser detectada com precisão e exatidão consideráveis;
- Limite de quantificação: é a menor concentração do analito presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão consideráveis;

Diferentes trabalhos na literatura descrevem a validação de métodos analíticos aplicados a fitoterápicos. Marques et al., (2013) validaram um método espectrofométrico UV-Vis e cromatográfico, para a quantificação do marcador de *Bauhinia forticata*. Lopes et al., (2009) aplicaram a cromatografia líquida na validação do método, para determinação de taninos em três espécies diferentes *Stryphnodendron*,

REFERENCIAS

- AIGNER, Z.; BERKESI, O.; FARKAS, G.; Szabó-Révész, O.; DSC, X-ray and FTIR studies of a gemfibrozil/dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex produced by co-grinding. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 57, n.01, p. 62-67, 2012.
- ALLEN Jr., L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistema de Liberação de Fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ALVES, L.F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, problemas e perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v.5, n.3, p.450-513, 2013.
- ALVES, R.; **Estudo termoanalítico e de compatibilidade fármaco-excipiente de rifampicina e alguns medicamentos utilizados na terapêutica da tuberculose**. 90f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamento) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2007.
- ALVES, R.; REIS, T.V.S.; SILVA, L.C.C.; STORPIRTIS, S. MERCURI, L.P.; MATOS, J.R.; Thermal behavior and decomposition kinetics of rifampicin polymorphs under isothermal and non-isothermal conditions. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science**. v.48, n. 02, p. 343-351, 2010.
- ALVES-SILVA, I.;SÁ-BARRETO, L.C.L; LIMA, E.L.;CUNHA-FILHO, M.S.S.; Preformulation studies of itraconazole associated with benzimidazole and pharmaceutical excipients. **Thermochimica Acta**. v. 575, n. 01, p. 29-33, 2014.
- ARAGÃO, C.F.S.; FILHO, J.M.B.; MACEDO, R.O.; Thermal characterization of warifteine by means of TG and a DSS Photovisual system. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 64, n. 01, p. 185-191, 2001.
- ARAPITSAS, P.; Hydrolyzable tannin analysis in food. **Food Chemistry**. v.135, n.3, p. 1708-1717, 2012.
- ARAUJO, A.A.S.; STORPIRTIS, S.; MERCURI, L.P.; CARVALHO, F.M.S.; SANTOS FILHO, M.; MATOS, J.R.; Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 260, n. 02, p. 303-314, 2003.
- BARBOSA, K.F.; **Determinação por Difração de Raios X da Estrutura Molecular do 1L-1,2,3,4,5-Ciclohexanopentol**. 81f. Dissertação de

- mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciências Moleculares) – Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2009.
- BARRETO GOMES, A.P.; SOUZA, F.S.; MACEDO, R.O.; Thermal and dissolution kinetics of Ampicillin drug and capsules. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 72, n. 02, p. 545-548, 2003.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L.K.; MACEDO, G.A.; Fonte e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**. v.15, n. 01, p. 63-72, 2004.
- BAZZO, G.C.; SILVA, M.A.S.; Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 03, p. 315-322, 2005.
- BERNADI, .L.S.; OLIVEIRA, P.R.; MURAKAMI, F.S.; SILVA, M.A.S.; BORGMANN, S.H.M.; CARDOSO, S.G.; Characterization of venlafaxine hydrochloride and compatibility studies with pharmaceutical excipients. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 97, n. 02, p. 729-733, 2009.
- BERNAL, C.; COUTO, A.B.; BREVIGLIERI, S.T.; CAVALHEIRO, E.T.G.; Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. **Química Nova**. v. 25, n. 02, p. 849-855, 2002.
- BISWAS, B.; ROGERS, K.; MCLAUGHLIN, F.; DANIELS, D.; YADAY, A.; Antimicrobial activities of leaf extracts of guava (*Psidium guajava* L.) on two Gram-Negative and Gram-Positive bacteria. **International Journal of Microbiology**. v. 2013, doi 10.1155/2013/746165. 2013.
- BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: ANVISA, 2011.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 899 de 29 de maio de 2003. Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, 2003.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Política Nacional de Práticas alternativas e complementares**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL, Resolução da Diretoria Colegiada da Agência nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 60 de 10 de Novembro de 2011**. Aprova o Formulário de

- Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, primeira edição e dá outras providências. 2011.
- BRASIL, Resolução da Diretoria Colegiada da Agência nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 13 de 14 de Março de 2013**. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos. 2013.
- BRASIL, Resolução da Diretoria Colegiada da Agência nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 10 DE 09 DE MARÇO DE 2010**. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências, 2010.
- BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEI FILHO, V. **Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2010.
- BUFAINO, E.M.; Phytotherapy in Brazil: recovering the concepts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 23, n.01, p. 22-27, 2013.
- CARDOSO, M.P.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; A new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis* Engl., **Natural Product Research**. v. 19, n. 05, p. 431-433, 2005.
- CARVALHO, P.E.R.; **Espécie arbóreas brasileira volume 3**. Brasília: Embrapa Florestas, 2008
- CASEDEY, E.C.L.; **Análise químico-farmacêutica de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica**. 179f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Ararquara, 2009.
- CESCHEL, C.G.; BADIELLO, C.; RONCHI, C.; MAFFEI, P.; Degradation of components in drug formulations: a comparison between HPLC and DSC methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.32, n. 01, p. 1067-1072, 2003.
- CHADHA, R.; NHANDARI, S.; Drug-exipient compatibility screening - Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 87, n. 01, p. 82-97, 2014.
- CHAVES, T.P.; DANTAS, I.C.; FELISMINO, D.C.; VIEIRA, K.V.M.; CLEMENTINO, E.L.C.; COSTA, L.S.; Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. **Biofar**. v. 05, n. 01, p 11-17, 2011.
- CHAVES, T.P.; SANTANA, C.P.; VÉRAS, G.; BRANDÃO, D.O.; FELISMINO, D.C.; MEDEIROS, A.C.D.; TROVÃO, D.M.B.M. Seasonal variation in the

- production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **African Journal of Biotechnology**, v.12, n.8, p.847-853, 2013.
- CORREIA, L.P.; PROCÓPIO, J.V.V.; SANTANA, C.P.; SANTOS, A.F.O.; CAVALCANTE, H.M.M.; MACEDO, R.O.; Characterization of herbal medicine with different particle sizes using pyrolysis GC/MS, SEM, and thermal techniques. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 111, n. 03, p. 1691-1698, 2013.
- CORREIA, P.R.M.; FERREIRA, M.M.C.; Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**. v. 30, n. 02, p. 481-487, 2007.
- COSTA, I.M.; **Estudo de pré-formulação com o composto polifenólico quercetina**. 192f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- COSTA, S.P.M.; DA SILVA, K.E.R.; DE MEDEIROS, G.C.R.; ROLIM, L.A.; OLIVEIRA, J.F.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; ROLIM NETO, P.J.; Thermal behavior and compatibility analysis of the new chemical entity LPSF/FZ4. **Thermochimica Acta**. v. 562, n. 01, p. 29-34, 2013.
- CRAIG, D.; READING, M.; **Thermal Analysis of Pharmaceuticals**. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.
- DA COSTA, R.S.; NEGRÃO, C.A.B.; CAMELO, S.R.P.; RIBEIRO COSTA, R.M.; BARBOSA, W.L.R.; 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, n. 03, p. 1959-1964, 2013.
- DANELUTI, A.L.M.; **Estudo termoanalítico envolvendo estabilidade e pré-formulação de ácido fítico livre/emulsão**. 112. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamento) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- DANTAS, I.C. **O raizeiro**. 1 ed. Campina Grande: EDUEP, 2007.
- DE SOUZA, T.P.; HOLZSCHUH, M.H.; LIONÇO, M.I.; GONZÁLES-ÓRTEGA, G.; PETROVICK, P.R.; Validation of a LC method for the analysis of phenolic

- compounds from aqueous extract of *Phyllanthus niruri* aerial parts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 30, n. 2, p. 351-356, 2002.
- DONG, Y.; BOYD, B.J.; Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International Journal of Pharmaceutics**. v.417, n. 01, p; 101-111, 2011.
- FANDARRUF, C.; ARAYA-SIBAJA, A.M.; PEREIRA, R.N.; HOFFMEISTER, C.R.D.; ROCHA, H.V.A.; SILVA, M.A.S.; Thermal behavior and decomposition kinetics of efavirenz under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. DOI 10.1007/s10973-013-3306-x, 2013.
- FERNANDES, D.D.S.; **Espectroscopia UV-Vis para avaliação de biodiesel e misturas de diesel/biodiesel**. 75f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias) – Universidade Estadual da Paraíba/ Embrapa Algodão, Campina Grande, 2013.
- FERNANDES, F.H.A., SANTANA, C.P.; SANTOS, R.L.; CORREIA, L.P.; CONCEIÇÃO, M.M.; MACÊDO, 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. 113, n.1, p. 443-447, 2013;
- FERNANDES, T.M.; Medicamentos no Brasil: Entre Naturais e Sintéticos (1920 a 2000). **Revista Fitos** v. 07, n. 02, p. 119-124, 2012.
- FERREIRA, M.S.; **Otimização de solução extrativa e desenvolvimento tecnológico de produto seco por aspersão de *Psidium guajava* L.** 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte., 2009.
- FIRMO, W.C.A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C.E.C.; DIAS, C.N.; ALVES, L.P.L.; DIAS, I.C.L.; SANTOS NETO, M.; OLEA, R.S.G.; Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Revista Cadernos de Pesquisa – UFMA**. v.18, p. 90-95, 2011.
- FUSTER, V.; SWEENEY, J.M.; Aspirin: A historical and contemporary therapeutic overview. **Circulation**. v. 123, n. 01, 768-778, 2011.
- GOMES, A.P.B.; FREIRE, F.D.; ARAGÃO, C.F.S.; Determination of vapor pressure curves of warifteine and methylwarifteine by using

- thermogravimetry. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 108, n. 01, p. 249-252, 2012.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M.T.; Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para descoberta de novos agentes. **Quím. Nova**, v. 33, n. 03, p. 667-679, 2010;
- HONORATO, S.B.; MENDONÇA, J.S.; BOECHET, N.; OLIVEIRA, A.C.; MENDES FILHO, J.; ELLENA, J.; AYALA, A.P.; Novel polymorphs of the anti-*Trypanosoma cruzi* drug benzimidazole. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 118, n. 01, p. 389-394, 2014.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH)**. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1), Genebra, 2005.
- ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORREIA, M.A.; Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 29, n. 01, p. 81-96, 2008.
- ISLAM, S.M.A.; AHMED, K.A.T.; MANIK, M.K.; WAHID, M.D.A.; KAMAL, C.S.I. A comparative study of the antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and thrombolytic potential of the fruits and leaves of *Spondias dulcis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.3, n.9, p.682-691, 2013.
- KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P.; Fitoterápico: Um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 30, n. 03, p. 241-248, 2009.
- LIMA, N.G.P.B.; LIMA, I.B.L.; BARROS, D.M.C.; OLIVEIRA, T.S.; RAFFIN, F.N.; LIMA E MOURA, T.F.A.; MEDEIROS, A.C.D.; GOMES, A.P.B.; ARAGÃO, C.F.S.; Compatibility studies of trioxsalen with excipients by DSC, DTA, and FTIR. **Journal of Thermal analysis and Calorimetric**. DOI 10.1007/s10973-013-3216-y, 2013.
- LIMA, R.J.C.; MORENO, A.F.D.; CASTRO, S.F.L.; GONÇALVES, J.R.S.; OLIVEIRA, A.B.; SASAKI, J.M.; FREIRE, P.T.C.; Taninos hidrolisáveis em *Bixa orellana* L. **Química Nova**, v. 29, n. 03, p. 507-509, 2009.
- LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; TOLEDO, C.E.M.; ISLER, A.C.; MELLO, J.C.P.; Determinação quantitativa de taninos em três espécies de

- Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science**. v. 45, n. 1, p. 135-143, 2009.
- MACEDO, R. O.; NASCIMENTO, T.G.; VERAS, J.W.E.; Compatibility and stability studies of propranolol hydrochloride binary mixtures and tablets for tg and dsc-photovisual. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 67, n. 01, p. 483-489, 2002.
- MACEDO, R.O.; SOUZA, A.G.; MACEDO, M.C.; Application of thermogravimetry in the quality control of mebendazole. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 49, n. 02, p. 937-941, 1997.
- MALTA JUNIOR, A.; MEDEIROS, A.C.D.; DINIZ, M.F.F.; ALMEIDA, R.N.; OLIVEIRA, R.A.G.; **Plantas Medicinais: Guia para uso racional**. Editora Prismas: Curitiba, 2013.
- MARCUCCI, M.C.; Validação de princípios ativos de plantas medicinais e fitoterápicos. In: SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N.P.; **Farmacognosia: Coletânea científica**. Ouro Preto: UFOP, 2011.
- 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*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 51-57, 2013.
- MATOS, J.R.; MERCURI, L.; BARROS, G.; Análise térmica aplicada a fármacos e medicamentos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- MAXIMIANO, F.P.; COSTA, G.H.Y.; SOUZA, J.; CUNHA-FILHO, M.S.S.; Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. **Química Nova**. v.33, n. 08, p. 1714, 1719, 2010.
- MEDEIROS, A.C.D.; **Aplicação da análise térmica no estudo de medicamentos anti-inflamatórios**. 195f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2001.
- MEDEIROS, A.C.D.; CERVANTES, N.A.B.; GOMES, A.P.B.; MACEDO, R.O.; Thermal stability of prednisone drug and tablets. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 64, n. 01, p. 745-750, 2001.

- MEDEIROS, A.C.D.; MEDEIROS, I.A.; MACÊDO, R.O.; Thermal studies of *Albizia inopinata* crude extract in the presence of cyclodextrin and Aerosil® by TG and DSC coupled to the photovisual system. **Thermochimica Acta**. v. 392-393, n. 01, p. 93-98, 2002.
- MELO, E.C.; RADUNZ, L.L.; ALVARENGA E MELO, R.S.; Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais – revisão. **Engenharia na Agricultura**. v. 12, n. 04, p. 307-315, 2004.
- MIGLIATO, K.F.; CORREIA, M.A.; SALGADO, H.R.N.; TOGNOLLI, J.O.; SACRAMENTO, L.V.S.; MELLO, J.C.L.; GIANNINI, M.J.S.M.; ALMEIDA, A.M.F.; PIZZOLITO, A.C.; Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) skeels. **Química Nova**. v.34, n. 04, p. 695-699, 2011.
- MOURA, E.A.; CORREIA, L.P.; PINTO, M.F.; PROCÓPIO, J.V.V.; SOUZA, F.S.; MACEDO, R.O.; Thermal characterization of the solid state and raw material fluconazole by thermal analysis and pyrolysis coupled to GC/MS. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 100, n. 01, p. 289-293, 2010.
- MURAKAMI, F.S.; BERNARDI, L.S.; PEREIRA, R.N.; VALENTE, B.R.; VASCONCELOS, E.C.; CARVALHO FILHO, M.A.S.; SILVA, M.A.S.; Comparative behavior studies of Cinnamic Acid using isothermal and nonisothermal kinetic methods. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. v. 43, n. 12, n. 01, p. 716-720, 2009.
- NASCIMENTO, J.A.; ARAÚJO, K.L.G.V; EPAMINONDAS, P.S.; SOUZA, A.S.; MAGNANI, M.; SOUZA, A.L.; SOLEDADE, L.E.B.; QUEIROZ, N.; SOUZA, A.G.; Ethanolic extracts of *Moringa oleifera* Lam. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 114, n. 02, p. 833-838, 2013.
- NARANG, A.S.; DESAI, D.; BADAWY, S. Impact of excipient interactions on solid dosage form stability. **Pharmaceutical Research**. v. 29, n. 10, p. 2660-2683, 2012.
- NEGRI, G.; DUARTE-ALEMEIDA, J.M.; Ensaio fitoquímicos em plantas medicinais: Propriedades, extração, caracterização e quantificação de princípios ativos. . In: CARLINI, E.A.; MENDES, F.R.; **Protocolos em psicofarmacologia comportamental: Um guia para a pesquisa de**

- drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais.** 1 ed. São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011.
- NEWMAN, A.W.; BYRN, S.R.; Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. **Drug Discovery Today.** v. 8, n. 19, p.898-905, 2003.
- NICOLAI, B.; PERRIN, M.A.; CÉOLIN, R.; RIETVIELD, I.B.; Differentiating amorphous mixtures of cefuroxime axetil and copovidone by X-ray diffraction and differential scanning calorimetry. **Annales Pharmaceutiques Françaises.** Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharma.2013.11.004>, 2014.
- OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L.; Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova.** v. 24, n. 07, p 1224-1230, 2011.
- OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L.; MUSSEL, W.N.; VIANNA-SOARES, C.D.; PIANETTI, G.A.; Análise térmica aplicada à caracterização da sinvastatina em formulações farmacêuticas. **Química Nova.** v. 33, n. 08, p. 1653-1657, 2010.
- OLIVEIRA, O.W.; PETROVICK, P.; Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 20, n.1, p. 641-650, 2010.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R.; Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 18, n. 02, p. 301-307, 2008.
- PORTELA, A.S.; ALMEIDA, M.G.; GOMES, A P.B.; SILVA, P.C.D.; MONTENEGRO NETO, A.N.; MEDEIROS, A.C.D.; SIMÕES, M.O.S.; Vapor pressure curve determination of α -lipoic acid raw material and capsules by dynamic thermogravimetric method. **Thermochimica Acta.** v.554, n. 01, p. 95-98, 2012.
- RENAME. Relação Nacional de Medicamentos. Disponível em www.saude.gov.br/renome. Acesso em 10 de Janeiro de 2014.
- RODRIGUES, E.; OTSUKA R.D.; Estratégia utilizadas para a seleção de plantas com potencial bioativo com ênfase nos métodos de etnobotânica etnofarmacologia. In: CARLINI, E.A.; MENDES, F.R.; **Protocolos em**

- psicofarmacologia comportamental: Um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais.** 1 ed. São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011.
- RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J.R.;
Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da Zidovudina (AZT). **Acta farmaceutica Bonaerense.** v.24, n. 03, 383-387, 2005.
- ROJEK, B.; WESOLOWSKI, M.; SUCHACZ, B.; Detection of compatibility between baclofen and excipients with aid of infrared spectroscopy and chemometry. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.** v. 116, n. 01, p. 532-538, 2013.
- RUDNIC, E.M.; SCHERTZ, J.D.; Formas Farmaceuticas sólidas por via oral. In: GENNARO, A.R.; **Remington: A ciência e a prática da Farmácia.** 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004
- SAITO, Y.; MORIKAWA, J.; Honda's thermobalance. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric.** v. 113, n. 03, p. 1157-1168, 2013.
- SALGADO, H.R.N.; RIBEIRO, Y.A.; RIBEIRO, C.A.; SCHAPOVAL, E.E.S.;
Análise térmica de Esparfoxacino. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.** v.26, n. 02, p. 119-123, 2005.
- SANTOS, A.L.; CHIERICE, G.O.; ALEXSANDER, K.S.; RIGA, A.; MATTEWS, E.; Characterization of the raw essential oil eugenol extracted from *Syzygium aromaticum* L. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric.** v. 96, n. 03, p. 821-825, 2009.
- SANTOS, R.L.; **Desenvolvimento de um dentifrício a partir de extrato nebulizado de *Schinopsis brasiliensis* Engler.** 147f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.
- SARAIVA, A.M.; CASTRO, R.H.A.; CORDEIRO, R.P.; PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; CASTRO, V.T.N.A.; AMORIM, E.L.C.; XAVIER, H.S.; PISCIOTTANO, M.N.C.; In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology.** v. 5, n. 14, p.1724-1731, 2011.

- SARAIVA, A.M.; SARAIVA, C.L.; CORDEIRO, R.P.; SOARES, R.R.; XAVIER, H.R.; CAETANO, N.; Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 15, n. 2, p. 199-207, 2013.
- 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, n. supl., p. 671-677, 2006.
- SILVA, F.G.; OLIVEIRA, G.L.; Conhecimento popular e atividade antimicrobiana de *Cydonia oblonga* Miller (Rosaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.15, n. 01, p. 98-103, 2012.
- SILVA, J.G.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA JUNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.P.; PEREIRA, M.S.V.; Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 04, p. 572-577, 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-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2012 doi:10.1155/2012/681207. 2012.
- SILVA, R.M.F., GOMES, T.C.B.L.; ALBUQUERQUE, M.M.; SILVA JUNIOR, J.O.C.; BARBOSA, W.L.R.; ROLIM NETO, P.J.; Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 14, n.1, p. 103-109, 2012.
- SOARES, L.A.L.; SOUZA, T.P.; Extrato seco vegetal e produtos derivados. In: SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N.P.; **Farmacognosia: Coletânea científica**. Ouro Preto: UFOP, 2011.
- SOUSA NETO, A.G.; **Avaliação da área foliar de cinco espécies florestais ocorrentes no semiárido brasileiro**. 37f. Trabalho de conclusão de curso

- (Graduação em Engenharia florestal) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2009.
- SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; CITÓ, M.C.O.; FELIX, F.H.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; BARBOSA FILHO, J.M.; VIANA, G.S.B.; Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 04, 642-654-2008.
- SOUSA, L.M.; GOIS, R.W.S.; LEMOS, T.L.G.; ARRIAGA, A.M.C.; ANDRADE-NETO, M.; SANTIAGO, G.M.P.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; Constituintes químicos e avaliação da atividade antibacteriana de *Macroptilium lathyroides* (L.) urb. (fabaceae). **Química Nova**, v.36, n. 09, p. 1370-1374, 2013.
- SOUZA, A.M.; POPPI, R.J.; Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: Um tutorial, parte I. **Química Nova**. v. 35, n. 01, p. 223-229, 2012.
- SOUZA, M. V. N.; **Estudo da Síntese Orgânica baseada em substâncias bioativas**. 1 ed. Campinas: Editora Átomo, 2010.
- SZTERNER, P.; LEGENDRE, B.; SGHAIGER, M.; Thermodynamic properties of polymorphic forms of theophylline part I: DSC, TG, X-ray study. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 99, n. 01, p. 325-335, 2010.
- TALVANI, A.; BAHIA, M.T.; SÁ-BARRETO, L.C.L.; LIMA, E.M.; CUNHA-FILHO, M.S.S.; Carvedilol: decomposition kinetics and compatibility with pharmaceutical excipients. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. DOI: 10.1007/s10973-013-3491-7. 2013.
- THUMMA, S.; MAJUMDAR, S.; ELSOHLY, M.A.; GUL, W.; REPKA, M.A.; Preformulation studies of a prodrug of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol. **AAPS PharmSciTech**. v. 09, n. 03, p. 982-990, 2009.
- TITA, B.; FULIAS, A.; BANDUR, G.; MARIAN, E.; TITA, D.; Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 56, n. 01, p. 221-227, 2011.

- VALENTE, L.M.M.; BIZARRI, C.H.B.; LIECHOCKI, S.; BARBOZA, R.S.; DA PAIXÃO, D.; ALMEIDA, M.B.S.; BENEVIDES, P.J.C.; MAGALHÃES, A.; SIANI, A.C.; Kaempferitrin from *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) and its Potential as a Chemical Marker for the Species. **Journal of Brazilian Chemistry Society**. v.20, n. 6, p. 1041-1045, 2009.
- VERAS, G.; BRITO, A.L.B.; SILVA, A.C.; SILVA, P.; COSTA, G.B.; FELIX, L.C.N.; FERNANDES, D.D.S.; FONTES, M.M.; Classificação do biodiesel na região do visível. **Química Nova**. v. 03, n.02, p. 315-318, 2012.
- WESOLOWSKI, M.; ROJEK, B.; Thermogravimetric detection of incompatibilities between atenolol and excipients using multivariate techniques. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 113, n. 01, p. 169-177, 2013.
- YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V.; Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**. v. 24, n. 01, 147-152, 2001.
- ZHUNG, L.M.; ZHAO, X.; JI, J.J.; DAI, Y.J.; TG-DTG as an effective method for the characterization of rutin extracted from the buds of *Sophora japonica* L. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 95, n. 03, p. 917-922, 2009.
- ZOLLNER, T.; SCHWARZ, M.; Herbal Reference Standards: applications, definitions and regulatory requirements. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23, n.1, p.1-21, 2013.

CAPÍTULO I

**ESTUDO DE UMA FORMULAÇÃO CANDIDATA A BASE DE *Schinopsis
brasilensis* Engler. UTILIZANDO TÉCNICAS TÉRMICAS ASSOCIADAS A
FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS**

ESTUDO DE UMA FORMULAÇÃO CANDIDATA A BASE DE *Schinopsis brasiliensis* Engler. UTILIZANDO TÉCNICAS TÉRMICAS ASSOCIADAS A FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

Felipe Hugo Alencar Fernandes¹; Valber Elias de Almeida²;
David Douglas da Silva Fernandes³; Fábio Santos de Souza⁴;
José Germano Veras Neto²; Ana Cláudia Dantas de Medeiros¹;

1 – Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB;

2 – Laboratório Química Analítica e Quimiometria (LQAQ) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB;

3 – Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica e Quimiometria (LAQA) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB;

4 – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB;

RESUMO

Os estudos de compatibilidade compreendem uma importante etapa da pré-formulação, pois permite a identificação dos excipientes mais compatíveis com o extrato nebulizado de plantas medicinais a partir de diferentes técnicas analíticas. Assim, o objetivo desse trabalho foi o estudo de compatibilidade do extrato nebulizado de *S. brasiliensis* Engler com excipientes farmacêuticos utilizando técnicas analíticas associadas a ferramentas quimiométricas. O extrato foi nebulizado por aspersão foi produzido a partir do extrato hidroalcolico das cascas de *S. brasilienses* Engler. (BRCA). As misturas binárias foram produzidas em diversas proporções com os excipientes farmacêuticos amido, celulose microcristalina 101 e 102, lactose, estearato de magnésio, PVP K-30 e talco. As amostras foram analisadas a microscopia óptica, calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios X (DRX). Com os dados obtidos das curvas de DSC foram montadas matrizes para análise hierárquica de agrupamentos (HCA) e análise dos componentes principais (PCA). Na microscopia foi visualizada a formação amorfa e/ou cristalina dos componentes. Nas curvas de DSC, bem como nas análises de PCA e HCA foram identificadas possíveis interações com o amido, lactose e

estearato de magnésio, as quais foram confirmadas por DRX, sendo que o amido apresentou maior interação. A análise dos resultados indicam que técnica de DSC associado a ferramentas quimiométricas colaborou para uma melhor interpretação dos estudos de compatibilidade e que a celulose microcristalina, o PVP K-30 e o talco foram os excipientes mais compatíveis com o extrato nebulizado.

PALAVRAS CHAVES: Pré-formulação, Calorimetria Exploratória Diferencial, Análise Hierárquica de Agrupamentos, Análise dos Componentes Principais.

1. INTRODUÇÃO

A *Schinopsis brasiliensis* Engler. é uma planta pertencente a família Anacardiaceae, encontrada na região do semiárido brasileiro, conhecida como braúna ou baraúna. Estudos mostram a atividade antimicrobiana de seus extratos frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (CHAVES et al., 2011; SARAIVA, et al., 2011; SILVA et al., 2012). Análises fitoquímicas das cascas de *S. brasiliensis* permitiram isolar um novo alquilfenol e indicaram a presença de compostos fenólicos como ácido gálico e galato de metila (CARDOSO et al., 2005; SARAIVA et al., 2013), Fernandes et al. (2013) caracterizaram o extrato de *S. brasiliensis* utilizando análise térmica, espectroscopia no infravermelho, difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura (MEV), e os resultados da pesquisa sugeriram que o extrato é estável, rico em metabolitos secundários e amorfo, sugestivo para o desenvolvimento de um produto fitoterápico.

Fitoterápicos são medicamentos obtidos exclusivamente de matéria prima de origem vegetal, reconhecidos, seja por seus estudos clínicos, seja por conhecimentos etnofarmacológicos e técnico-científicos. Esses produtos não incluem substâncias ativas isolados de origem vegetal nem associação de moléculas sintéticas a extratos vegetais (BRASIL, 2006). Eles movimentaram mundialmente em 2011, US\$ 26 bilhões, sendo a Europa correspondente a 50% desse mercado (ALVES, 2013).

A maioria dos produtos fitoterápicos utilizam os extratos secos obtidos por secagem em aspersão (*spray-drying*) como matéria prima principal devido a sua maior estabilidade química e microbiológica, melhor padronização, maior concentração de ativos além da aplicabilidade em diversas formas farmacêuticas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Esses produtos devem atender as exigências do mercado além de apresentar eficácia, segurança e qualidade. Neste sentido, estudos de pré-formulação, em especial os ensaios de compatibilidade, são o ponto de partida para o desenvolvimento de medicamentos estáveis e com eficácia terapêutica (GUPTA; SAINI, et al., 2002). As incompatibilidades podem alterar o princípio ativo e os excipientes em diversos aspectos como alterações nas características organolépticas, polimorfismo, aspecto de cristalinidade/amorfo, liberação do ativo, degradação, dentre outros (NARANG et al., 2012)

Diferentes técnicas são utilizadas para avaliar as possíveis interações fármaco-excipiente e podem ser aplicadas no estudo de compatibilidade de extratos secos de plantas medicinais com excipientes farmacêuticos. Análise térmica, microscopia óptica e difração de raios X (DRX) são exemplos de técnicas bastante utilizadas no estudo de compatibilidade de fármacos (MEDEIROS et al., 2001; MURA et al., 2005; TITA et al., 2011; ALVES-SILVA, et al, 2014) e que podem ser aplicada nos estudo de plantas medicinais e fitoterápicos.

A microscopia óptica, embora seja uma técnica simples, permite a visualização dos aspectos morfológicos dos ingredientes ativos. Detoisien et al. (2012) utilizaram, dentre outras técnicas, a microscopia óptica na visualização de cristais polimorfos. Alves-Silva et al., (2014), utilizaram da microscopia óptica acoplada a uma chapa quente (160 °C) para a visualização da compatibilidade de itraconazol/benzimidazol com diferentes excipientes.

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a termogravimetria (TG) são as técnicas termoanalíticas mais utilizadas para análise de extratos e ativos de plantas medicinais. Medeiros et al., (2002) avaliaram a presença de dióxido de silício coloidal e ciclodextrina na secagem de *Albizia inopinata*, utilizando TG e DSC fotovisual. O extrato com ciclodextrina foi o mais estável em ambas as

técnicas. Costa et al., (2013), utilizando DSC e TG, avaliaram a compatibilidade do extrato liofilizado de *Heliotropium indicum* com hidroxietilcelulose, metilparabeno e propilenoglicol, sendo que esses dois últimos interagiram com o extrato.

Entretanto os extratos de plantas medicinais na maioria das vezes apresentam uma composição complexa o que dificulta a visualização dessas possíveis interações, principalmente nos estudos por análise térmica (COSTA et al., 2013). Dessa forma, a aplicação de ferramentas que possibilitem uma melhor interpretação dos resultados, como a quimiometria, pode permitir uma interpretação suplementar das informações dos estudos de compatibilidade, os quais não podem ser confirmados com uma simples análise dos resultados isolados (WESOLOWSKI; ROJEK, 2013). Diferentes ferramentas como a Análise dos componentes principais (PCA – *Principal Components Analysis*) e Análise hierárquica de agrupamentos (HCA - *Hierarchical Clusters Analysis*) são técnicas quimiométricas simples e foram utilizadas em vários estudos associado a técnicas analíticas. Wesolowski et al., 2003 aplicaram a PCA em dados de termogravimetria e de análise química elementar obtidos de folhas e flores e classificaram 44 espécies vegetais distintas. Melo et al. (2013) aplicaram a PCA em espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) na classificação de amostras de comprimidos contendo dipirona, cafeína e citrato de orfenadrina.

A difração de raios X é uma técnica complementar no estudo de compatibilidade fármaco-excipiente. Sua aplicabilidade consiste no fato de que sólidos cristalinos apresenta um conjunto definido de picos enquanto os sólidos amorfos um conjunto de picos desordenado. Dessa forma, uma interação é visualizada como uma modificação ou supressão de picos ou alterações na condição amorfo/cristalino (CHADHA; BHANDARI, 2014). Visando obter o melhor extrato seco por aspensão de *Rhuminus pursiana*. Gallo et al. (2011), aplicaram, dentre outras técnicas, a difração de raios X para caracterizar o produto que revelou ser extrato completamente amorfo.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi estudar a compatibilidade entre o extrato nebulizado de *S. brasiliensis* (BRCA) com excipientes

farmacêuticos usados em formas sólidas, utilizando técnicas analíticas com ferramentas quimiométricas de reconhecimento de padrões.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Material vegetal e extrato seco

As cascas de *S. brasiliensis* Engler. foram coletadas na região de Campina Grande-PB (7° 13' 50" S, 35° 52'52" W) e a identificação foi feita no Herbário "Jaime Coelho de Moraes" na Universidade Federal da Paraíba - Campus de Areia sob o número EAN-14049. Em seguida o material foi seco em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C, até obter peso constante e pulverizado em moinho de facas com saída de 10 mesh.

O extrato hidroalcoólico foi obtido por maceração a frio da droga vegetal, utilizando como solvente água:etanol (30:70, v/v), por 3 dias. Em seguida o extrato foi submetido a secagem por aspersão em *spray dryer* da marca LabPlant® com temperatura de entrada à 140 °C e fluxo de 3 mL/minuto. O adjuvante de secagem foi o dióxido de silício coloidal (Aerosil 200®) em 20% em relação ao resíduo seco.

2.2. Misturas binárias

As misturas binárias foram preparadas a partir de misturas físicas do extrato nebulizado (BRCA) com excipientes farmacêuticos: amido (CS), celulose microcristalina 101 (MC 101) e 102 (MC 102), lactose (LA), talco (TALC), estearato de magnésio (MS) e polivilpirrolidona K-30 (PVP K-30). Os estudos foram realizados usando misturas nas proporções 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 e 1:10 para amido, celulose microcristalina e lactose e 1:1, 1:2 e 2:1 para talco, estearato de magnésio e PVP K-30, tendo como base seu percentual de uso em formulações sólidas (ROWE et al., 2009).

2.3. Microscopia óptica

A microscopia óptica foi realizada sem tratamento prévio das misturas, na proporção 1:1, utilizando um vídeo microscópio Hirox® modelo KH-7700 em aumento de 1400x.

2.4. Análise térmica

As curvas calorimétricas foram feitas utilizando a técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) usando um célula de DSC modelo Q20 da TA Instruments[®], em atmosfera de N₂ (50 mL/min), com amostras de 2 ± 0,5 mg em porta amostras de alumínio e razão de aquecimento de 10 °C/min. O equipamento foi calibrado utilizando como padrão amostra de índio e os dados foram analisados, utilizando o software TA Universal Analysis 2000[®].

2.5. Análise quimiométrica

Os dados de DSC do extrato, dos excipientes e das misturas binárias foram submetidos a duas técnicas quimiométricas não supervisionadas de reconhecimento de padrão: análise hierárquica de agrupamentos (HCA), utilizando o software Statistica 6.0 e análise por componentes principais (PCA), utilizando o software The Usrambler 9.8.

A análise hierárquica de agrupamentos (HCA) e a análise por componentes principais (PCA). Para uma melhor visualização das relações entre extrato com os excipientes os dados foram pré-processados por Transformação Padrão Normal de Variação (SNV), que é uma transformação que remove efeitos de espalhamento, centrando e escalonando cada curva individual.

A análise hierárquica de dados (HCA) esta baseada na similaridade entre as amostras com base nas distâncias expressas em dendogramas (VERAS et al., 2012). Para construção do dendograma, inicialmente calculou-se todas as distâncias entre pares de amostras, neste caso cada um dos excipientes, BRCA e as misturas extrato-excipiente. Existem diversos cálculos para a distância, mas o mais comum e utilizado neste artigo é a distância euclidiana em um espaço multidimensional, matematicamente expresso por:

$$d = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2 + \dots + (z_1 - z_2)^2}$$

em que x, y, z são os valores em cada dimensão para a amostra 1 e 2. Assim, calculou-se a raiz quadrada dos somatórios dos desvios quadrados em todas as dimensões.

Calculadas as distâncias entre pares de amostras, foi possível construir os agrupamentos utilizando diversos procedimentos, dentre eles a ligação completa (*complete linkage*). Neste procedimento usa-se a distância dos vizinhos mais distantes, distância máxima, entre dois grupamentos para fazer a ligação entre eles.

Em termos de PCA, os dados são projetados nas direções (ou eixos) perpendiculares do espaço multidimensional, os quais contêm a maior quantidade de informação possível (variância máxima), consistindo no tratamento dos dados visando obter novas variáveis, que nada mais são que combinações das variáveis originais apresentando ortogonalidade entre si (VERAS et al., 2012). Esta manipulação matemática de dados de uma matriz possui como objetivo representar a variação presente em muitas variáveis, usando um pequeno número de fatores ou componentes principais (PC's). Baseado na variância residual, foram selecionadas duas PC's para construção do modelo PCA para cada um dos excipientes com BRCA.

2.6. Difração de raios X

As análises de difração de raios X foram feitas nas misturas 1:1 que apresentaram interação, utilizando um difratômetro modelo XRD-600 da Shimadzu®. O ângulo de varredura (2θ) foi de 2° a 70° , com uma razão de $2^\circ/\text{min}$ e sistema de Cu ($K\alpha_1$). O equipamento foi operado em voltagem de 40,00 kV e corrente de 30 mA. Os dados foram analisados utilizando o software Origin® versão 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 encontram-se as imagens digitais do extrato nebulizado de BRCA e de suas misturas com os excipientes (1:1). Na Figura 1A são visualizadas as partículas com coloração castanho-escuro e não uniformes do extrato seco de BRCA. Na figura 2B tem-se a mistura binária com amido, sendo possível a identificação dos grãos de amido. Nas figuras 1C e 1D observou-se as misturas com celulose microcristalina 101 e 102 respectivamente, onde são visualizados os cristais de celulose. A figura 1E e 1F mostra a mistura da BRCA com a lactose e com o estearato de magnésio,

nas quais é perceptível a presença de regiões cristalinas, típicas desses excipientes. Com o PVP K-30 (Fig. 1G) foi perceptível, na mistura, algumas partículas esféricas, possivelmente do processo de produção da povidona. Já com o talco (Fig. 01H) é possível visualizar seu aspecto cristalino (ROWE et al., 2009).

Figura 1 – Microscopia óptica do extrato nebulizado BRCA (A) e de suas misturas binárias (B) amido, (C) celulose microcristalina 101, (D) celulose microcristalina 102, (E) lactose, (F) estearato de magnésio, (G) PVP K-30 e (H) talco.

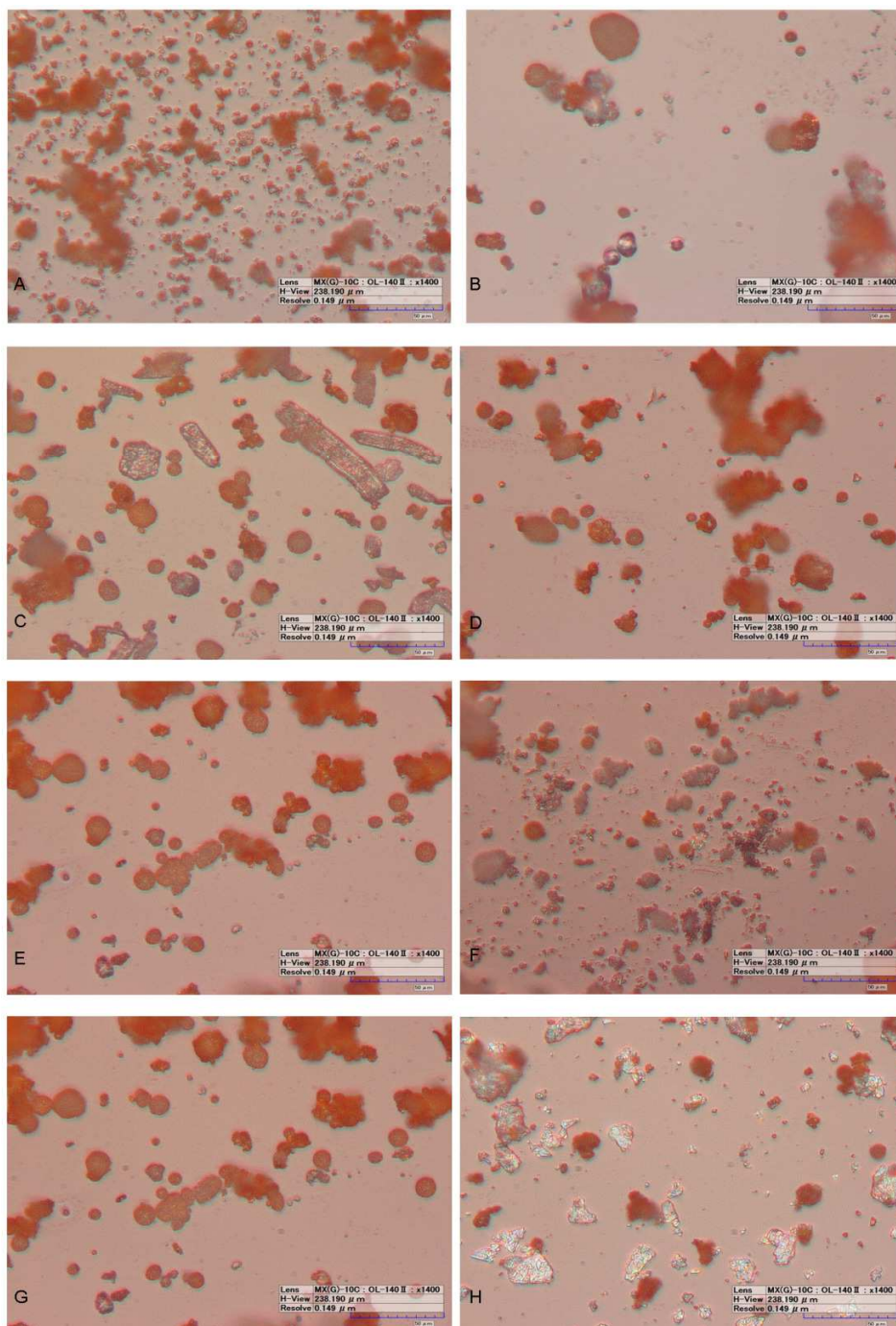
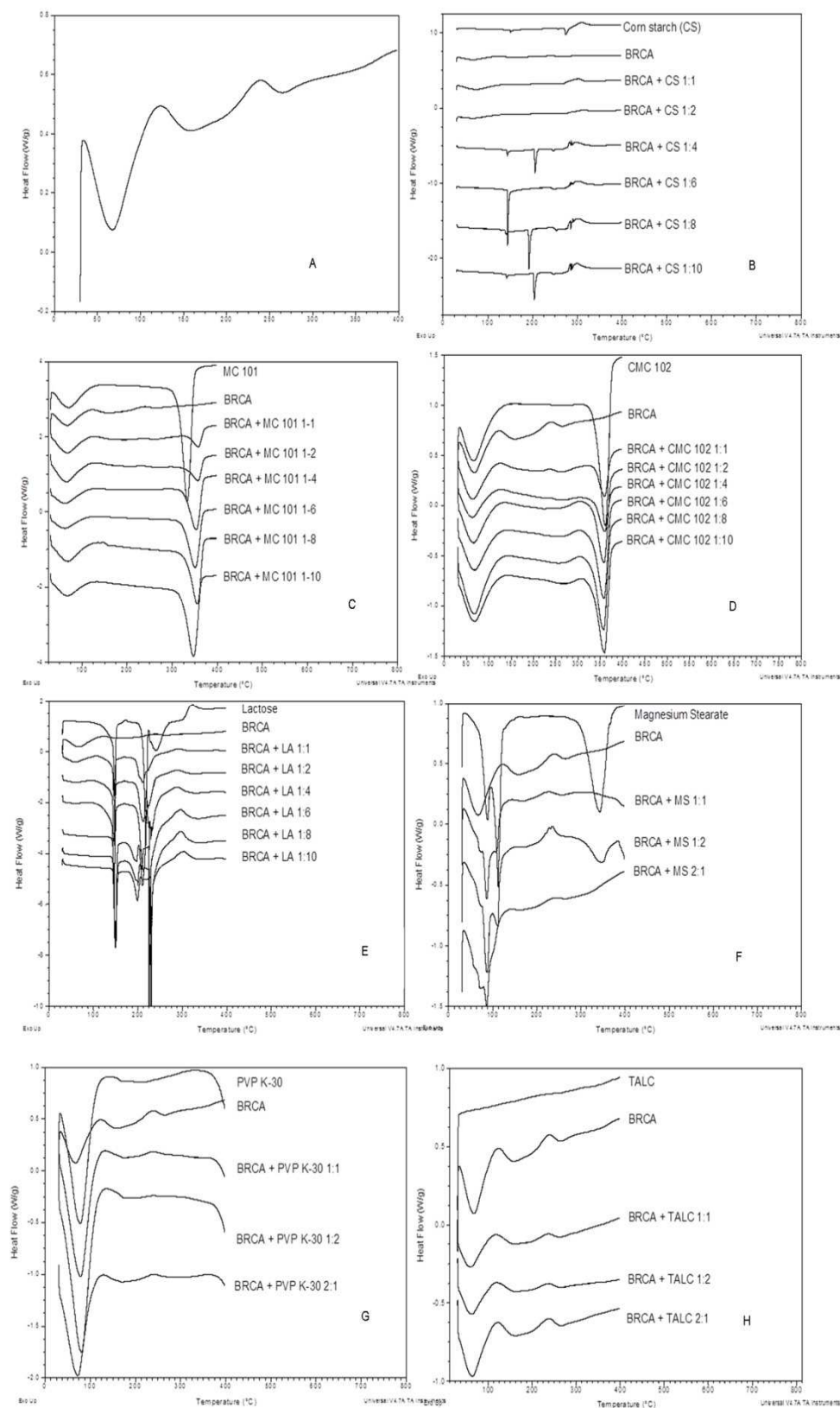


Figura 2 – Curvas de DSC do extrato nebulizado de BRCA (A) e de suas misturas binárias: (B) amido, (C) celulose microcristalina 101, (D) celulose microcristalina 102, (E) lactose, (F) estearato de magnésio, (G) PVP K-30 e (H) talco.



Na Figura 2 encontra-se a curva de DSC do extrato nebulizado e das misturas binárias e na Tabela 1, os valores dos eventos térmicos observados nas curvas de DSC.

A curva do extrato de BRCA (Fig. 2A) apresentou três picos endotérmicos, sendo o mais significativo em 69,06 °C ($\Delta H = 89,96$ J/g), possivelmente relacionado a perda de água, solvente (etanol) ou compostos voláteis. A curva termina com o início do processo de degradação da amostra que, possivelmente, se completa acima de 400 °C. Este comportamento foi completamente diferente ao encontrado por Fernandes et al.,(2013) nas curvas de *S. brasiliensis*, porém sem a presença de adjuvantes de secagem, o que pode sugerir que com a adição do adjuvante de secagem, há uma maior estabilidade do extrato seco.

Na mistura com o amido (Fig. 2B) ocorreu uma possível interação entre o extrato e o excipiente. Com o aumento da proporção de amido na mistura ocorreu uma alteração nos picos de calor desta mistura. Nas misturas 1:1 e 1:2 ocorreu uma supressão dos picos relacionados ao amido, sendo apenas visíveis as características do extrato. Também foi observado um processo entre 73 e 76 °C que provavelmente esta relacionado a gelatinização do amido de milho (ROWE et al., 2009) e a degradação acima de 300°C. Nas misturas seguintes, surgem os picos referentes ao amido, porém com intensidades completamente diferentes do amido puro.

Com as celulosas microcristalinas (101 e 102) não foi visualizada alteração nas curvas de DSC (Fig. 2C e 2D) comparando o extrato, o excipientes e as misturas, apenas pequenas variações no fluxo de calor do pico de desidratação. Basicamente, o que difere as celulosas entre si são os aspectos relacionados a suas características físicas como o tamanhos de partículas (ROWE et al., 2009).

Tabela 1 – Dados dos principais eventos térmicos nas curvas de DSC do extrato nebulizado (BRCA) e de suas misturas binárias.

Amostra	Mistura binária	Pico 1			Pico 2		
		Temperatura do pico. (°C)	ΔH (J/g)	T inicial/ final (°C)	Temperatura do pico. (°C)	ΔH (J/g)	T inicial/ final (°C)
BRCA	-	69.06	89.96	37.32 - 121.25	-	-	-
CS	-	150.79	7.84	150.15 - 167.60	83.28	274.67	261.49 - 310.51
	1:1	76.06	181.20	36.69 - 141.06	-	-	-
	1:2	73.61	84.36	37.56 - 133.48	-	-	-
	1:4	143.43	8.42	142.61 - 148.64	205.28	66.52	204.01 - 215.36
	1:6	144.05	92.57	143.79 - 153.07	-	-	-
	1:8	191.50	117.40	190.44 - 203.61	-	-	-
	1:10	203.62	80.97	202.36 - 214.60	-	-	-
MC 101	-	72.79	136.80	136.80 - 129.69	334.32	431.20	315.39 - 356.76
	1:1	68,19	119,5	32,95 - 127,79	359,53	53,33	338,94 - 394,29
	1:2	66,55	131,9	32,87 - 128,31	358,37	79,39	330,71 - 380,64
	1:4	65,38	79,23	32,85 - 119,83	354,51	202,7	326,92 - 386,71
	1:6	64,27	72,15	31,89 - 121,73	352,24	237,1	324,08 - 396,56
	1:8	69,99	127,1	34,80 - 134,24	356,72	244,5	330,22 - 377,23
	1:10	68,67	100,6	34,19 - 131,49	348,51	313,1	321,8 - 376,09
MC 102	-	68.77	120.30	36.69 - 139.55	214.20	361.93	336.83 - 397.57
	1:1	65.75	85.32	34.09 - 121.73	360.13	38.30	338.27 - 381.78
	1:2	63.63	67.37	32.91 - 121.35	360.45	57.31	336.35 - 387.09
	1:4	67.33	91.80	35.23 - 122.11	358.81	103.50	333.51 - 374.96
	1:6	69.72	94.96	36.08 - 125.55	358.70	123.90	331.75 - 375.71
	1:8	69.17	125.30	36.08 - 125.28	357.77	130.90	331.65 - 373.82
	1:10	69.65	109.80	35.93 - 130.83	359.76	135.90	332.96 - 376.47
LAC	-	147.84	154.80	144.69 - 155.47	217.47	177.90	211.71 - 224.08
	1:1	145.95	65.82	142.30 - 152.06	-	-	-
	1:2	145.84	104.20	101.25 - 152.06	211.31	107.0	198.73 - 218.30
	1:4	146.03	157.70	109.60 - 152.06	212.62	185.2	200.25 - 219.91
	1:6	150.13	139.50	139.92 - 156.98	224.79	115.10	224.47 - 323.42
	1:8	150.43	138.00	144.31 - 157.74	227.51	167.80	226.23 - 254.41
	1:10	149.21	105.20	145.65 - 156.98	229.15	74.62	228.90 - 235.45
MS	-	86.02	30.73	73.33 - 95.57	342.35	152.40	300.06 - 363.58
	1:1	87.08	21.22	70.06 - 100.50	256.72	3.89	233.79 - 287.39
	1:2	86.30	30.86	77.87 - 97.85	345.06	44.16	310.17 - 382.92
	2:1	87.02	21.93	81.16 - 118.70	200.13	9.66	144.77 - 236.97
TALC	-	-	-	-	-	-	-
	1:1	62.06	40.21	33.19 - 114.15	261.58	3.19	241.34 - 285.11
	1:2	63.62	46.33	33.71 - 119.09	261.40	3.15	242.82 - 293.45
	2:1	65.30	75.35	34.28 - 121.35	267.13	13.70	242.34 - 327.95
PVP	-	79.37	314.70	40.76 - 130.07	-	-	-
	1:1	79.52	302.37	37.33 - 131.58	-	-	-
	1:2	81.58	370.90	41.06 - 139.72	-	-	-
	2:1	73.68	216.80	35.98 - 126.66	-	-	-

Na curva de DSC, a lactose (Fig. 2E) apresentou dois eventos: o primeiro relacionado a desidratação (147,64 °C), o segundo um evento endotérmico, possivelmente de fusão da lactose (217,47 °C, $\Delta H = 117,90$ J/g), seguido da decomposição. Na mistura 1:1, ocorreu a supressão do pico de fusão da lactose e a amostra se degradou sem que ocorresse a fusão. Nas misturas 1:2

e 1:4 surgiu um pequeno evento endotérmico, que culminou com a degradação da amostra. Nas misturas 1:6, 1:8 e 1:10 surgiu um pico endotérmico, porém com temperaturas diferentes do pico original da lactose (224.79, 227.51 e 229.15 °C, respectivamente). Macedo et al. (2002) e Medeiros et al. (2001), ao estudarem a compatibilidade entre propanolol e prednisona, respectivamente, com lactose, observaram uma possível interação deste com os fármacos.

A curva típica de estearato de magnésio (Fig. 2F) apresentou perda de água em torno de 100 °C, um pico endotérmico possivelmente de fusão e uma degradação a partir de 350 °C. Nas três misturas ocorre uma supressão do pico de fusão e uma antecipação da degradação da amostra. A interação do estearato de magnésio foi descrita por Bazzo et al. (2005) nos estudos feitos com captopril e por Tita et al., (2013) nos estudos com o ácido acetilsalicílico. Nas misturas com o PVP K-30 (Fig. 2G) e com talco (fig. 2H) não foram visualizadas alterações significativas nas curvas quando comparadas com os dos excipientes isoladamente.

Em uma caracterização térmica da interação fármaco-excipiente, a curva da mistura será um resultante das curvas individuais dos componentes envolvidos. A supressão, surgimento ou deslocamento eventos térmicos em relação ao fármaco ou excipiente seria considerado possível uma interação (CHADHA; BHANDARI, 2014). Dessa forma, o uso de técnicas quimiométricas que permitam reduzir as informações em gráficos e tabelas de avaliação das interações de forma mais rápida e fácil faz-se necessário devido a grande quantidade de dados e a necessidade da comparação de gráficos de misturas em proporções distintas.

Com os dados provenientes das curvas de DSC, foram montadas matrizes visando a utilização de duas ferramentas quimiométricas de reconhecimento de padrões, HCA e PCA.

A HCA para o extrato de BRCA, excipientes e misturas estão na figura 3. No gráfico da mistura com o amido (Fig. 3A) foi observado a formação de dois grandes agrupamentos, sendo o primeiro do extrato com as misturas 1:1 e 1:2, em 45 % de distância de ligação percentual, e outro com o amido e as demais misturas, em 86 %. Apesar disto, foi possível observar que o extrato pouco

contribui nas análises de DSC em proporções elevadas de amido. Vale ressaltar a maior similaridade entre as proporções 1:1 e 1:2 em relação a BRCA em detrimento as demais misturas, que se assemelham muito mais ao excipiente. Assim sendo, é possível inferir interação extrato-excipiente pela disposição das misturas mais próximas do excipiente nos dendogramas, nomeadamente 1:4, 1:6, 1:8 e 1:10.

Na mistura com as celuloses houve uma diferença entre a 101 (Fig. 03B) e 102 (Fig. 03C). Enquanto que na celulose 101 ocorre a formação de dois grandes agrupamentos, na celulose 102 as misturas se assemelharam muito fortemente ao excipiente, isolando a BRCA. Na celulose microcristalina 101, o primeiro grupo, formado a 64 % de distância de ligação percentual, continha as misturas 1:1 e 1:2 e a BRCA, semelhante ao amido. O outro agrupamento é formado pelas demais misturas e pelo excipiente puro, também semelhante ao efeito provocado pelo amido, na proporção de 92 % de distância de ligação. A mesma consideração feita no amido sobre ocorrência de interação extrato-excipiente procede para a celulose 101.

Na celulose microcristalina 102 (Fig 3C), as misturas com o excipiente puro se ligam na distância de 36 % para 1:4, 1:6, 1:8 e 1:10 formando uma agrupamento, que se liga ao agrupamento das misturas 1:1 e 1:2 na proporção de ligação de 50 %. Assim, semelhante aos dendogramas anteriores, não ocorreu uma organização de disposição das proporções extrato-excipiente.

Na lactose (Fig. 3D), as misturas ficaram distribuídas em termos do excipiente. A distância de ligação percentual entre as misturas 1:1, 1:2 e 1:4 para o excipiente isoladamente se deu a 63 %, enquanto que para se ligar a a 1:6, 1:8 e 1:10 foi de 74 %.

Analisando as figuras referentes ao PVP K-30 (Fig. 3E) e estearato de magnésio (Fig. 3F) visualiza-se a diferença de organização dos dendogramas, quando ocorrem misturas proporcionais (1:1, 1:2 e 2:1). No caso do PVP, as misturas 1:1 e 1:2 estão mais próximas da BRCA, em 29 % de proporção de distância de ligação, e a 2:1, esta a 52 % do agrupamento que contém o excipiente. Já no estearato de magnésio, surgem dois grandes agrupamentos, mais uma vez isolando o excipiente. Organização semelhante do dendograma

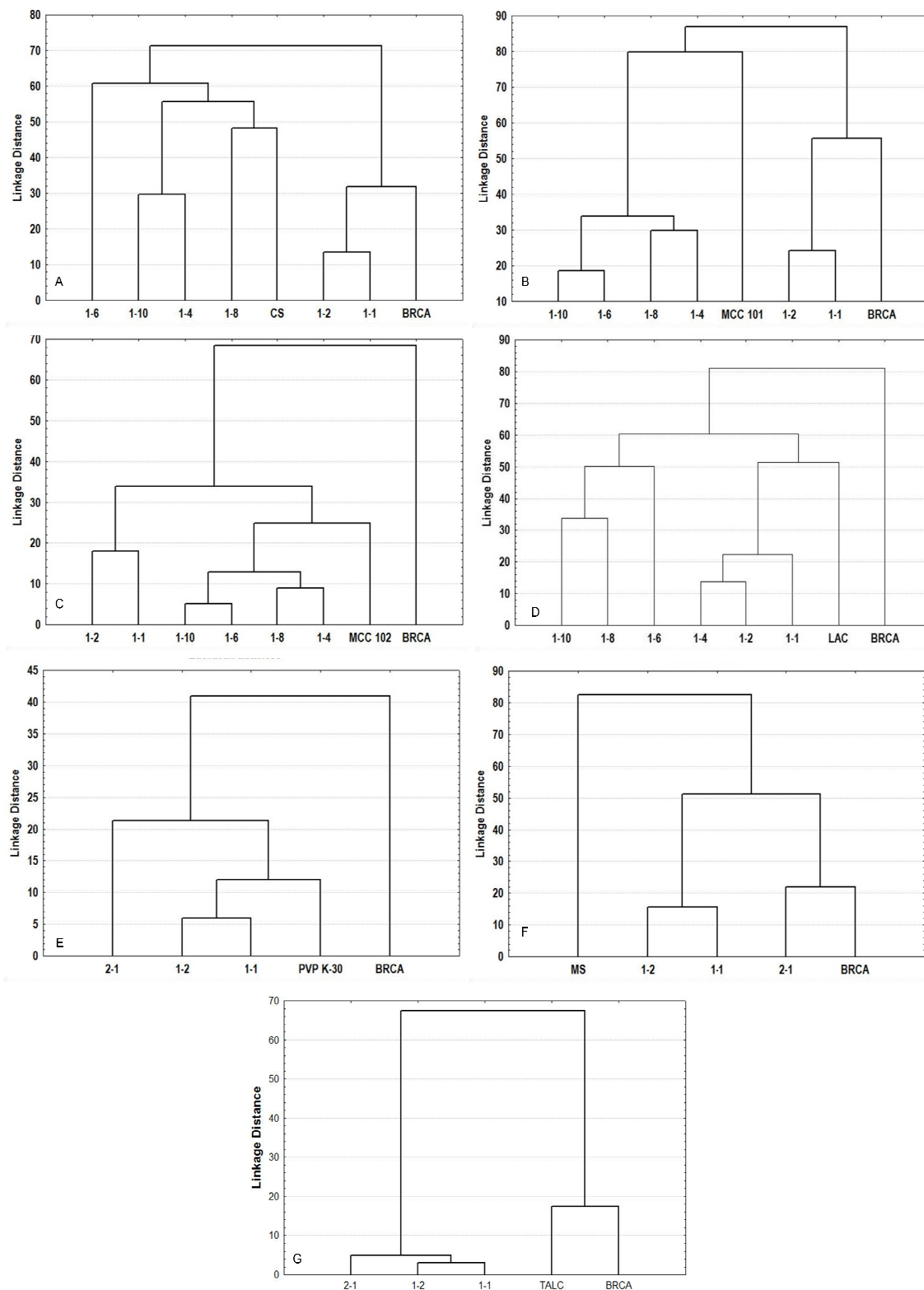
foi encontrada por Wesolowski e Rojek (2013) ao analisar por HCA, a interação ocorrida entre o atenolol e a beta-ciclodextrina. A distância de ligação entre BRCA e mistura 2:1, para o agrupamento 1:1 e 1:2 foi de 62 %.

Com o talco (Fig. 3G) há formação de dois agrupamentos, sendo um de BRCA e o outro das misturas e do excipiente. Inicialmente, as misturas 1:1 e 1:2 são as amostras mais próximas, em termos de distâncias, depois se liga o excipiente e, por fim, a mistura 2:1. Isto sugere que BRCA se aproxima mais da mistura 2:1 do que das demais, o que parece influência da interação extrato-excipiente.

Na análise de PCA com o amido (Fig. 4A), observou-se a formação de um agrupamento da BRCA e as misturas 1:1 e 1:2, outro com 1:4 e 1:10, um entre o amido e a 1:8 e a mistura 1:6 isolada, sugerindo uma interação pela organização espacial dos grupamentos (WESOLOWSKI et al., 2012). É possível perceber no gráfico de Leverage (Figura 5A) a ausência de amostras anômalas, sendo que as curvas DSC de BRCA, amido e mistura 1:8 são as que mais contribuem na disposição espacial das amostras. E as misturas 1:6 e 1:10 são as que possuem maior resíduo. Esta distribuição das misturas no espaço bidimensional de PC1xPC2, com 47 e 19 % de variância explicada respectivamente, aponta para uma interação extrato-excipiente em misturas com maior proporção de excipiente, corroborando com a análise HCA.

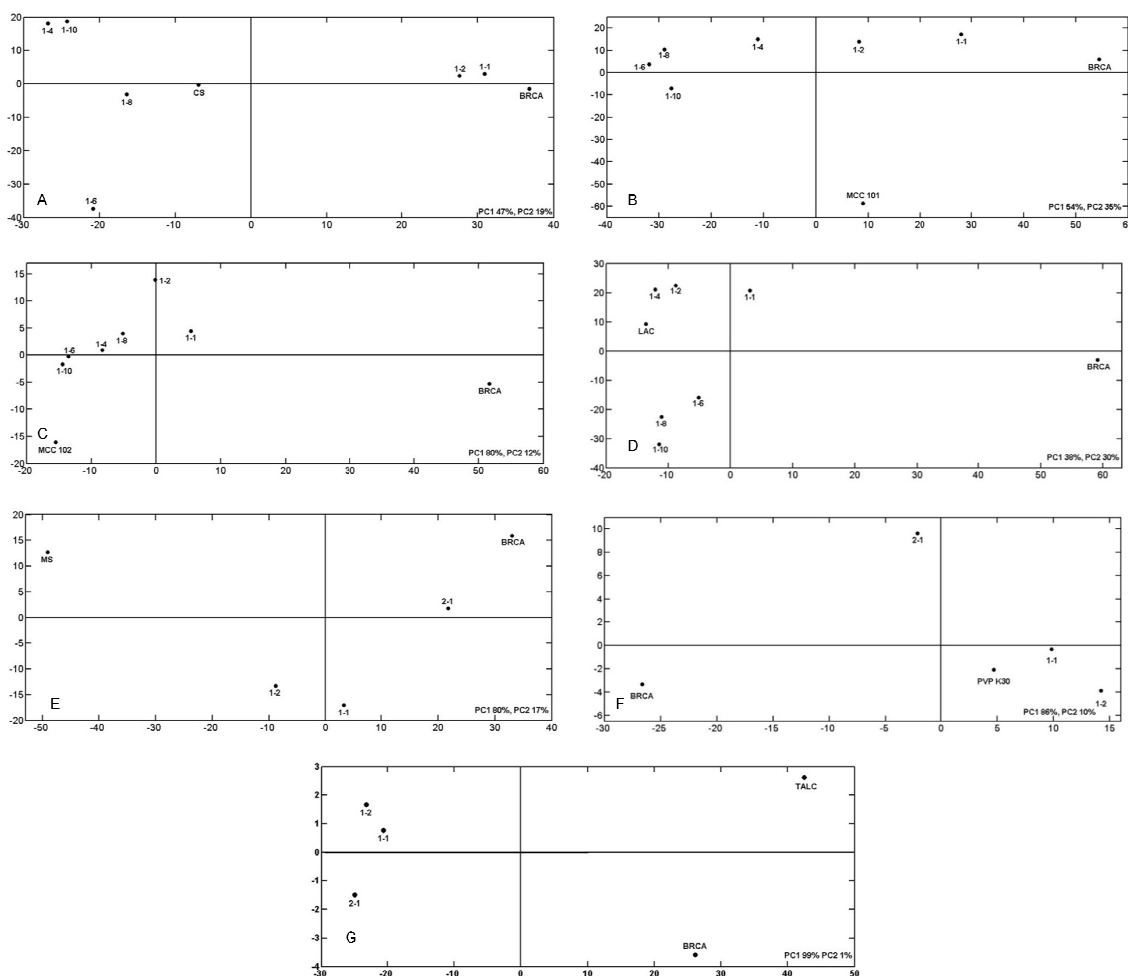
Com as celulosas 101 (Fig. 4B) e 102 (Fig. 4C) ocorrem um agrupamento entre as misturas, ficando o extrato e do excipiente. A variância explicada PC1xPC2, para cada um dos excipientes é: 54 e 35 % para celulose 101 e 80 e 12 % para celulose 102. Além disso, visualizando as distâncias em ambos os casos percebeu-se uma proximidade entre o extrato e a mistura 1:1 e entre o excipiente e a mistura 1:10. Wesolowski e Rajok (2013) encontraram organização da PCA semelhante na mistura com o atenolol e a quitosana, onde foi observado que não houve interação, divergindo da informação apresentada nos dendogramas correspondentes para cada um dos excipientes.

Figura 3 – Análise hierárquica de dados (HCA) das misturas binárias; (A) amido, (B) celulose microcristalina 101, (C) celulose microcristalina 102, (D) lactose, (E) estearato de magnésio, (F) PVP K-30 e (G) talco.



Esta divergência se dá, pois a técnica HCA permite-nos visualizar o grau de similaridade entre amostras apenas pelo cálculo de distâncias, utilizando todo o espaço multidimensional, enquanto a técnica PCA permite uma construção de novos eixos com respeito as informações mais relevantes para cada uma das variáveis neste espaço mutidimensional. Fato semelhante ocorreu com celulose 102, com uma maior distância do extrato em relação as misturas e proximidade com o excipiente.

Figura 4 – Análise dos componentes principais (PCA) das misturas binárias; amido (A), celulose microcristalina 101 (B), celulose microcristalina 102 (C), lactose (D), estearato de magnésio (E), PVP K-30 (F) e talco (G).



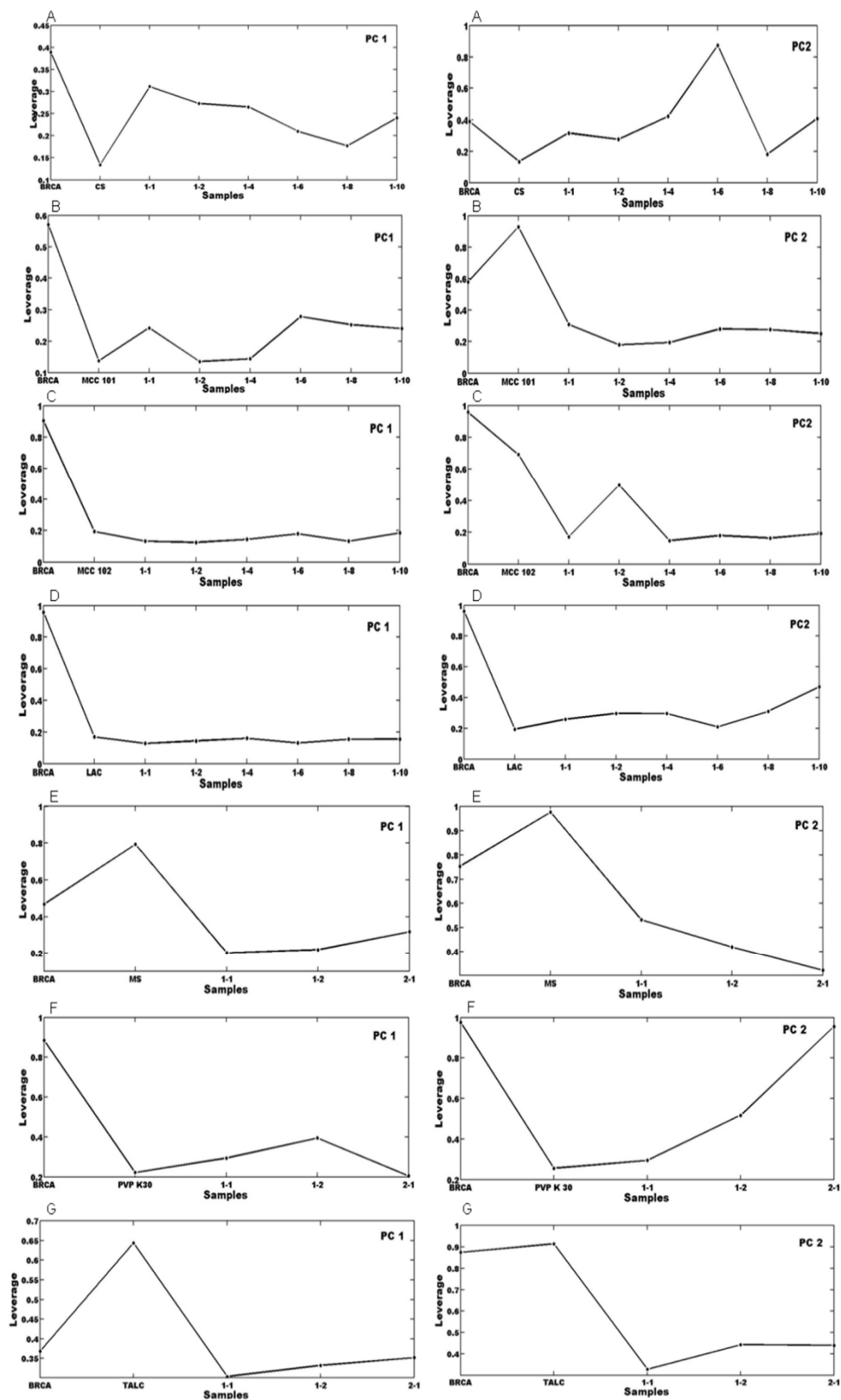
Em termos do gráfico de leverage para celulose 101 (Figura 5B), percebeu-se que as duas misturas que possuem maior resíduo depois de construído o modelo são 1:1 e 1:2 e que as demais misturas, excipiente e extrato possuem

influência alta sobre o modelo, excluindo a mistura 1:6, que possui baixa influência, mas também baixo resíduo. Para celulose 102 (Figura 5C), o gráfico de leverage apresenta alta influência das misturas 1:1, 1:2 e 1:8 além do excipiente e do extrato, e baixa influência e resíduo elevado para as demais misturas. Isto sugere, conforme apresentado em HCA, uma interação extrato-excipiente em proporções baixas de extrato em relação ao excipiente.

O gráfico de scores para lactose PC1xPC2 (Fig. 4D), com 38 e 30 % de variância explicada respectivamente, resultaram num agrupamento do excipiente com as misturas 1:1, 1:2 e 1:4, outro com as misturas 1:6, 1:8 e 1:10 e o isolamento da BRCA, sugerindo que as misturas não apresentaram semelhanças com o extrato. Na mistura com o estearato de magnésio (Fig. 4E), apenas a 2:1 apresentou certa proximidade com a BRCA. O que verificou-se que, em ambos os casos acima são sugestivos de interação. Em ambos os casos sugestivos de interação. O gráfico de leverage (Figura 5D) para a lactose, misturas 1:1, 1:2 e 1:4 apresentaram resíduo alto e baixa influência na construção do modelo e as demais misturas, mais o excipiente e o extrato possuem alta influência para o modelo. Para o estearato de magnésio, o gráfico de leverage (Figura 5E) apresentou uma distribuição homogênea da importância em todos os componentes.

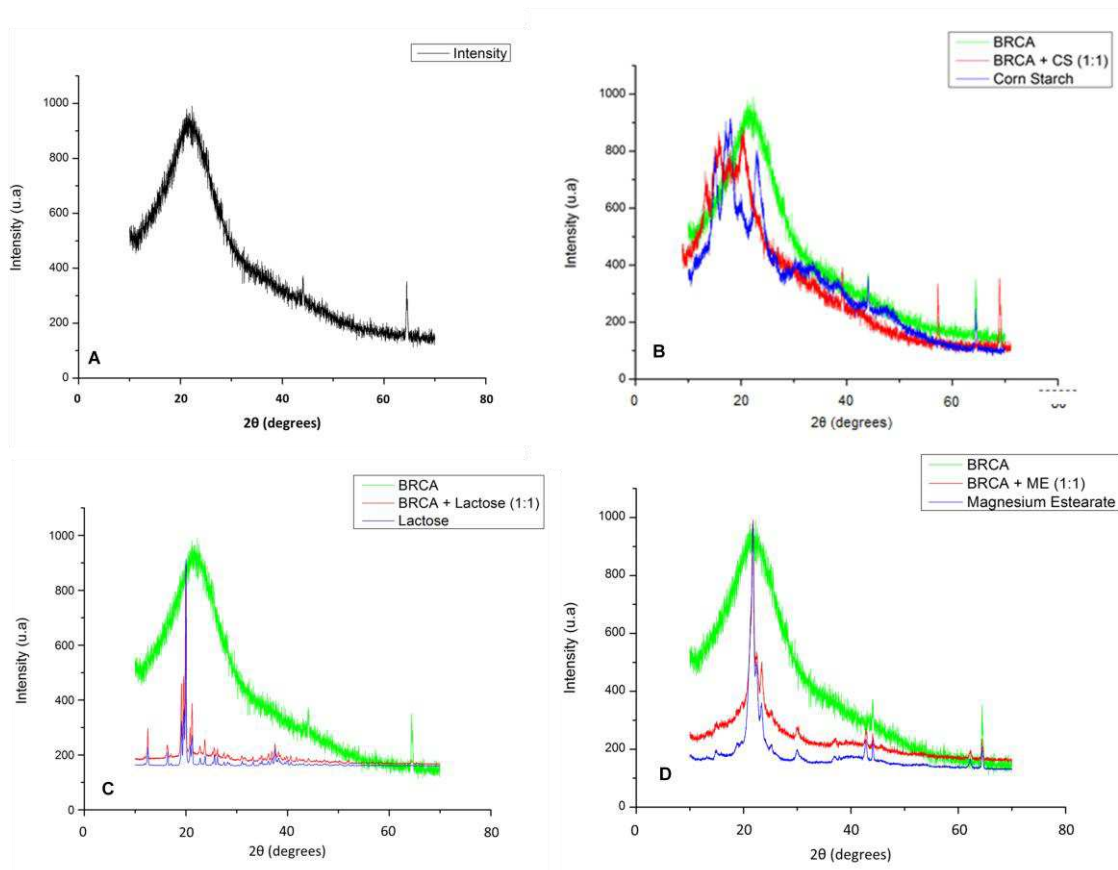
Com o PVP K-30 (Fig. 4F), em termos do gráfico de scores PC1xPC2, 86 e 10 % de variância explicada respectivamente, as misturas 1:1 e 1:2 ficaram próximo ao excipiente e a 2:1 isoladas. O talco (Fig. 04G), PC1(85 %) x PC2 (12 %) no gráfico de scores, apresentaram agrupamento das misturas e a separação dos extratos, semelhante ao ocorrido com a HCA. Embora mostrem esse agrupamento, os dados térmicos (Tabela 1) não apontam interação e o agrupamento tenha ocorrido devido a elevada semelhança entre as misturas. Em termos do gráfico de leverage, é possível visualizar situação semelhante a ocorrida com o estearato de magnésio, com distribuição uniforme das misturas, excipiente e extrato, em termos de suas influências e resíduo do modelo PCA.

Figura 5 – Gráfico de Leverage para as misturas binárias; (A) amido, (B) celulose microcristalina 101, (C) celulose microcristalina 102, (D) lactose, (E) estearato de magnésio, (F) PVP K-30 e (G) talco.



Assim, os excipientes que apresentaram maior interação (amido, lactose e estearato) foram submetidos à difração de raios X (XRD) em misturas binárias de 1:1.

Figura 6 – Difratoograma do extrato seco de BRCA (A) e das misturas binárias; Amido (B), lactose (C), estearato de magnésio (D).



Na Figura 6A mostra o difratograma do extrato de BRCA, no qual foi visualizado a amorficidade da amostra, comum em extratos vegetais secos por aspersão. Também é perceptível uma inclinação maior nos ângulos iniciais do difratograma, formando uma aureola amorfa (NEWMAN; BYRN, 2003), Isso possivelmente acontece devido a presença de açúcares que, durante o processo de secagem, não conseguiram retornar a sua forma cristalina e se organizam de forma amorfa. Esse fenômeno é bastante comum na secagem de poupas de frutas por aspersão (CANO-CHAUCA, et al., 2005). Fernandes et al. (2013) avaliaram a difração de raios X do extrato seco de *S. brasiliensis*, porém sem a presença do adjuvantes de secagem. Em ambos os extratos a conformação foi amorfa formada por um ruído intenso, o que sugere que a

presença do adjuvante não afeta o aspecto amorfo do extrato por *spray-drying*. Gallo et al. (2013) encontraram conformação semelhante no extrato de *Hamamelis virginiana*, o qual foi seco com dióxido de silício coloidal e carboximetilcelulose sódica.

Nas Figuras 6B, 6C e 6D observou-se que as misturas binárias produzidas com os excipientes amido, lactose e estearato de magnésio respectivamente. Em todas elas foram verificadas mudanças de intensidade nos picos, o que pode sugerir interação (TITA et al., 2013). Porém na mistura com o amido (Fig. 6D), além da mudança da intensidade foi verificada uma mudança na orientação dos ângulos iniciais e finais, embora o aspecto final continue sendo de uma mistura amorfa, sugerindo uma incompatibilidade com o excipiente (CHADHA; BHANDARI, 2014).

4. CONCLUSÕES

A microscopia óptica, embora seja uma técnica simples, permite a caracterização dos sólidos amorfos e cristalinos. Contudo é uma técnica suplementar no estudo de compatibilidade. Já a técnica de DSC associado as ferramentas quimiométricas apresenta-se bastante útil na identificação de incompatibilidade, principalmente em ingredientes ativos mais complexos como o extrato seco de plantas medicinais. Com base nesses dados foram identificado interações do extrato de BRCA com amido, lactose e estearato de magnésio, devido a alterações nos eventos térmicos e alterações nos gráficos de HCA e PCA. As incompatibilidades foram confirmadas pela difração de raios X, na qual o amido apresentou maior interação.

Nesse contexto, a celulose microcristalina 101 e 102, o talco e o PVP K-30 são os excipientes mais indicados para o desenvolvimento de futuras formulações sólidas de *S. brasiliensis*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, L.F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, problemas e perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v.5, n.3, p.450-513, 2013.
- ALVES-SILVA, L.; SÁ-BARRETO, L.C.L.; LIMA, E.M.; CUNHA-FILHO, M.S.S.; Preformulation studies of itraconazole associated with benzimidazole and pharmaceutical excipients. **Thermochemica Acta**. v. 575, n. 01, p. 29-33. 2014.
- BAZZO, G.C.; SILVA, M.A.S.; Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 03, p. 319-322, 2005.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P.C.; RAMOS, A.S.; CAL-VIDAL, J.; Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by *spray drying* and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v.6, n.1, 420-428, 2005.
- CARDOSO, M.P.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; A new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis* Engl., **Natural Product Research**. v. 19, n. 05, p. 431-433, 2005.
- CHADHA, R.; NHANDARI, S.; Drug-excipient compatibility screening - Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 87, n. 01, p. 82-97, 2014.
- CHAVES, T.P.; DANTAS, I.C.; FELISMINO, D.C.; VIEIRA, K.V.M.; CLEMENTINO, E.L.C.; COSTA, L.S.; Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. **Biofar**. v. 05, n. 01, p 11-17, 2011.
- COSTA, R.S.; NEGRÃO, C.A.B.; CAMELO, S.R.P.; RIBEIRO-COSTA, R.M.; BARBOSA, W.L.R.; COSTA, C.E.F.; SILVA JÚNIOR, J.O.S.; Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 111, n. 01, p. 1959-1964, 2013.
- DETOISIEN, T.; ARNOUX, M.; TAULELLE, P.; COLSON, D.; KLEIN, J.P.; VEESLER, S.; Thermal analysis: A further step in characterizing solid forms

- obtained by screening crystallization of an API. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 403, n. 1-2, p. 29-36, 2012.
- FERNANDES, F.H.A.; SANTANA, C.P.; SANTOS, R.L.; CORREIA, L.P.; CONCEIÇÃO, M.M.; MACÊDO, 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. 113, n. 01, p. 443-447, 2013.
- GALLO, L.; LLABOT, J.M.; ALLEMANDI, D.; BUCALÁ, V.; PIÑA, J.; Influence of *spray-drying* operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. **Powder Technology**. v. 208, n. 01, p. 205-214, 2011.
- GALLO, L.; PIÑA, J.; BUCALÁ, V.; ALLEMANDI, D.; RÁMIREZ-RIGO, M.V.; Development of a modified-release hydrophilic matrix system of a plant extract based on *co-spray-dried* powders. **Powder Technology**. v. 241, n. 1, p. 252-262, 2013.
- GUPTA, M.M.; SAINI, T.R.; Preformulation parameters characterization to design, development and formulation of vancomycin hydrochloride tablets for psudomembranous colitis. **International Journal of Pharma Research and Development**. n. 01, n. 09, p. 1-7, 2002.
- MACEDO, R.O.; DO NASCIMENTO, T.P.; VERAS, J.W.; Compatibility and stability studies of propranolol hydrochloride binary mixtures and tablets for TG and DSC-photovisual. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 67, n. 01, p. 483-489, 2002.
- MEDEIROS, A.C.D.; CERVANTES, N.A.B.; GOMES, A.P.B.; MACÊDO, R.O.; Thermal stability of prednisone drug and tablets. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 64, n. 01, p. 745-750, 2001.
- MEDEIROS, A.C.D.; MEDEIROS, I.A.; MACÊDO, R.O.; Thermal studies of *Albizia inopinata* crude extract in the presence of cyclodextrin and Aerosil® by TG and DSC coupled to the photovisual system. **Thermochemica Acta**. v. 392-393, n. 01, p. 93-98, 2002.
- MELO, C.A.D.; SILVA, P; GOMES, A.A.; FERNANDES, D.D.; VERAS, G.; MEDEIROS, A.C.D.; Classification of Tablets containing Dipyrone, Caffeine and Orphenadrine by Near Infrared Spectroscopy and Chemometric Tools.

- Journal of the Brazilian Chemistry Society**. v. 24, n. 06, p. 991-997, 2013.
- MURA, P.; FURLANETTO, S.; CIRRI, M.; MAESTRELLI, M.; MARRAS, A.M.; PINZAUTTI, S.; Optimization of glibenclamide tablet composition through the combined use of differential scanning calorimetry and d-optimal mixture experimental design. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 37, n. 01, p. 65-71, 2005.
- NARANG, A.S.; DESAI, D.; BADAWY, S. Impact of excipient interactions on solid dosage form stability. **Pharmaceutical Research**. v. 29, n. 10, p. 2660-2683, 2012.
- NEWMAN, A.W.; BYRN, S.R.; Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. **Drug Discovery Today**. v. 8, n. 19, p.898-905, 2003.
- OLIVEIRA, O.W.; PETROVICK, P.; Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n.1, p. 641-650, 2010.
- ROWE, R.C; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E.; **Handbook of Pharmaceutical excipients**. 6th ed. Chicago: AphA; 2009.
- SARAIVA, A.M.; CASTRO, R.H.A.; CORDEIRO, R.P.; PEIXOTO-SOBRINHO, T.J.S.; CASTRO, V.T.N.A.; AMORIM, E.L.C.; XAVIER, H.S.; PISCIOTTANO, M.N.C.; In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 05. n.01, p. 1724-1731, 2011.
- SARAIVA, A.M.; SARAIVA, C.L.; CORDEIRO, R.P.; SOARES, R.R.; XAVIER, H.S.; CAETANO, N.; Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.15, n. 02, 199-207, 2013.
- 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 Plants Extracts of Semiarid Northeast: Contribution to the Control of Oral Organism. **Evidence-based Complementary & Alternative Medicine**. doi:10.1155/2012/681207, 2012.

- 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, n.1, p. 221-227, 2011.
- TITA, B.; JURCA, T.; FULIAS, A; MARIAN, E; TITA, B.; Compatibility study of the acetylsalicylic acid with different solid dosage forms excipients. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 112, n. 01, p. 403-419, 2013.
- VERAS, G.; BRITO, A.L.B.; SILVA, A.C.; SILVA, P.; COSTA, G.B.; FELIX, L.C.N.; FERNANDES, D.D.S.; FONTES, M.M.; Classificação do biodiesel na região do visível. **Química Nova**. v. 03, n.02, p. 315-318, 2012.
- WESOLOWSKI, M.; ROJEK, B.; Thermogravimetric detection of incompatibilities between atenolol and excipients using multivariate techniques. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 113, n. 01, p. 169-177, 2013.
- WESOLOWSKI, M.; ROJEK, B.; PIOTROSKA, J.; Application of chemometrically Processed Thermogravimetric data for Identification of Baclofen–excipient Interactions. **Journal of AOAC International**. v.95, n. 03, p. 691-698, 2012.
- WESOLOWSKI, M.; KONIECZYNSKI, P.; Thermal decomposition and elemental composition of medicinal plant materials–leaves and flowers Principal component analysis of the results. **Thermochimica Acta**. v.397, n. 01, p. 171-180, 2003.

CAPÍTULO II

**ESTUDO CINÉTICO DE EXTRATO NEBULIZADO E DE UMA
FORMULAÇÃO SÓLIDA A BASE DE *Schinopsis brasiliensis* ENGLER.**

ESTUDO CINÉTICO DE EXTRATO NEBULIZADO E DE UMA FORMULAÇÃO SÓLIDA A BASE DE *Schinopsis brasiliensis* ENGLER.

Felipe Hugo Alencar Fernandes¹; Naiana Pereira Gondin Barros de Lima¹;
Cleildo Pereira de Santana¹; Paulo César Dantas da Silva²;
Fabio Santos de Souza³; Ana Cláudia Dantas de Medeiros¹;

1 – Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB;

2 – Laboratório de Desenvolvimento e Avaliação de Biomateriais do Nordeste (CertBio) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB;

2 – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB;

RESUMO

Os extratos nebulizados obtidos tecnologicamente são o ponto de partida para o desenvolvimento destes produtos, pois apresentam melhor estabilidade e padronização. Essas propriedades podem ser avaliadas por diferentes técnicas analíticas como a análise térmica, a qual pode ser aplicada tanto para matéria prima quanto formulação final. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar os parâmetros cinéticos em condições isotérmicas do extrato nebulizado e de uma formulação sólida proposta contendo *S. brasiliensis*. O extrato por aspensão foi produzido a partir do extrato hidroalcoólico das cascas de *S. brasilienses* Engler. (BRCA), enquanto a formulação farmacêutica sólida foi planejada conforme estudos de compatibilidade prévios. A análise termogravimétrica (TG/DTG) foi realizada em atmosfera de N₂, com razão de aquecimento de 10 °C/min, até 1200 °C. Para os cálculos cinéticos foi realizado curvas termogravimétricas em cinco diferentes temperaturas, utilizando dois modelos matemáticos. No primeiro modelo, a BRCA apresentou boa energia de ativação, e cinética de primeira ordem. Já a formulação apresentou cinética de ordem zero e elevada estabilidade. O tempo de prateleira foi determinado utilizando a equação da reta e pelo modelo matemático $t_{90\%}$, sendo este último apresentou melhores resultados, principalmente com a formulação. O estudo cinético mostrou ser um importante

parâmetro para avaliação da estabilidade e do comportamento térmico de extrato seco de plantas medicinais e de formulações farmacêuticas.

PALAVRAS CHAVES: Extrato nebulizado, termogravimetria, estudo de estabilidade.

1. INTRODUÇÃO

Schinopsis brasilienses Engler. é uma planta pertencente a família Anacardiaceae presente no semiárido nordestino conhecida como “braúna” ou “baraúna”. Seu uso etnofarmacológico é principalmente, como anti-inflamatório e analgésico (CHAVES et al., 2011). Alguns estudos também mencionam a atividade antimicrobiana contra diferentes micro-organismos, o que pode ser indicativo para o desenvolvimento de novo medicamento fitoterápico (SARAIVA et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Para tanto, uma das opções para o desenvolvimento de novos produtos é o uso dos extratos secos por aspersão apresentam melhores características tecnológicas, além de apresentarem melhor estabilidade e padronização e servirem de ponto de partida para outras formas farmacêuticas, quando comparados aos extratos líquidos e a as plantas *in natura* (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; SILVA et al., 2012).

As formas farmacêuticas de uso oral são as mais presentes no mercado, devido a sua grande aceitação pelo usuário, facilidade de administração e transporte, além de serem facilmente produzidas em grande escala. Apresentam também maior estabilidade, quando comparadas as outras formas farmacêuticas. Dentre elas se destacam as cápsulas e os comprimidos, revestidos ou não (ANGIOLUCCI et al., 2012).

Diferentes técnicas analíticas podem ser utilizadas para padronizar e acompanhar a estabilidade tanto do extrato seco, quanto da forma farmacêutica final. Dentre elas, destacam-se a cromatografia líquida, espectroscopia e a análise térmica (COUTO et al., 2013; FERNANDES et al., 2013).

Os estudos cinéticos obtidos por análise térmica são os mais utilizados e podem ser executados utilizando a técnica de termogravimetria isotérmica, onde a amostra é submetida a uma mesma temperatura durante o ensaio, ou pela técnica de termogravimetria dinâmica, no qual a amostra é submetida a diferentes razões de aquecimento. Embora, por meio de ambos os modelos seja possível à determinação da ordem de reação, energia de ativação (E_a) e da fração decomposta (α), apenas no método isotérmico é possível visualizar a perda de massa numa mesma temperatura (MEDEIROS et al., 2002; SHAMSIPUR et al., 2013; TITA et al., 2013).

Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar os parâmetros cinéticos utilizando condições isotérmicas do extrato nebulizado por aspersão de *Schinopsis brasilienses* Engler. e de uma formulação sólida.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Material vegetal e extrato seco

As cascas de *S. brasiliensis* Engler. foram coletadas na região de Campina Grande-PB (7° 13' 50" S, 35° 52' 52" W) e seco em estufa de circulação forçada de ar à 40 °C até obter peso constante. Em seguida o material seco foi pulverizado em moinho de facas com granulometria de 10 mesh. A identificação foi feita no Herbário "Jaime Coelho de Moraes" na Universidade Federal da Paraíba sob o número EAN-14049.

O extrato hidroalcoólico foi obtido por maceração a frio da droga vegetal utilizando como solvente água:etanol (30:70, v/v), por 3 dias e submetido a secagem por aspersão em *spray drying* da marca LabPlant® com temperatura de entrada à 140 °C e fluxo de 3 mL/minuto. O adjuvante de secagem foi o dióxido de silício coloidal (Aerosil 200®) na proporção de 20%, em relação ao resíduo seco.

2.2. Formulação

A formulação contendo o extrato nebulizado de *S. brasiliensis* Engler. foi desenvolvida com base em estudos prévios de compatibilidade entre o extrato

seco e diversos excipientes. Dessa forma, foi proposta uma formulação com os excipientes compatíveis, conforme a tabela 1:

Tabela 1 – Formulação proposta para uma forma farmacêutica de uso oral.

Componente	Função	%
Extrato nebulizado	Ingrediente ativo	67,5
Celulose microcristalina 101	Diluyente e desintegrante	25
PVP K-30	Aglutinante	2,5
Talco	Deslizante	4
Estearato de magnésio	Lubrificante	1
Total		100

2.3. Análise térmica

A análise termogravimétrica (TG/DTG) foi realizada em um analisador térmico simultâneo modelo SDT Q600 da TA Instruments® usando amostra de com razão de 10 °C/ min. até temperatura de 1200 °C. Numa atmosfera de nitrogênio, com fluxo constante de 50 mL/min. A análise não-isotérmicas foram realizadas, com a finalidade de se detectar as temperaturas que antecedem o processo de decomposição da amostra. As análises isotérmicas foram realizadas nas seguintes temperaturas: 178, 183, 188, 193 e 198 °C, para o extarto; 115, 120, 125, 130 e 135 °C para a formulação. Dois modelos matemáticos foram utilizados para a análise das curvas. Os dados foram analisados utilizando os softwares TA Universal analysis® 4.5A e Microsoft Excel® 2010.

2.4. Teoria cinética pela equação de Arrhenius

A cinética de decomposição térmica consiste na determinação da fração decomposta (α), em função do tempo da isotérmica (t), à temperatura constante. Dessa forma temos:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(T)f(\alpha)$$

Onde t é o tempo, T a temperatura e $f(\alpha)$ é o modelo de reação. A equação de Arrhenius é dada por:

$$k(T) = A \exp\left(\frac{-E}{RT}\right)$$

Onde A é o fator de frequência e E a energia de ativação. Combinando as equações acima, temos:

$$\frac{d\alpha}{dt} = A e\left(\frac{-E}{RT}\right) * f(\alpha)$$

Aplicando o logaritmo natural na equação anterior:

$$\ln g(\alpha) = \ln A - \frac{E}{RT} + \ln t$$

Rearranjando os termos:

$$\ln t = -\ln A + \ln g(\alpha) + \frac{E}{RT}$$

Dessa forma, no primeiro modelo matemático, foi obtido o tempo necessário para uma perda de massa de 5% ($\alpha = 5\%$) para cada temperatura. Com esses dados, foi traçado o gráfico do logaritmo natural do tempo em função do recíproco da temperatura absoluta, onde por regressão linear foi obtida a equação $y = ax + b$, sendo o produto de a pela constante real dos gases ($R = 8.314 \text{ (J/ mol}^{\circ}\text{K)}$) é a energia de ativação e b ao fator de frequência (TITA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2005).

Tomando mais uma vez a Equação e aplicando o logaritmo natural em ambos os termos da equação temos:

$$\ln k = \ln(A * e^{\frac{-E}{RT}})$$

Quando rearranjamos a equação temos,

$$\ln k = \ln A + \ln\left(e^{\frac{-E}{RT}}\right)$$

$$\ln k = \ln A + \left(\frac{-E}{RT}\right) \ln e$$

$$\ln k = \ln A + \frac{-E}{RT}$$

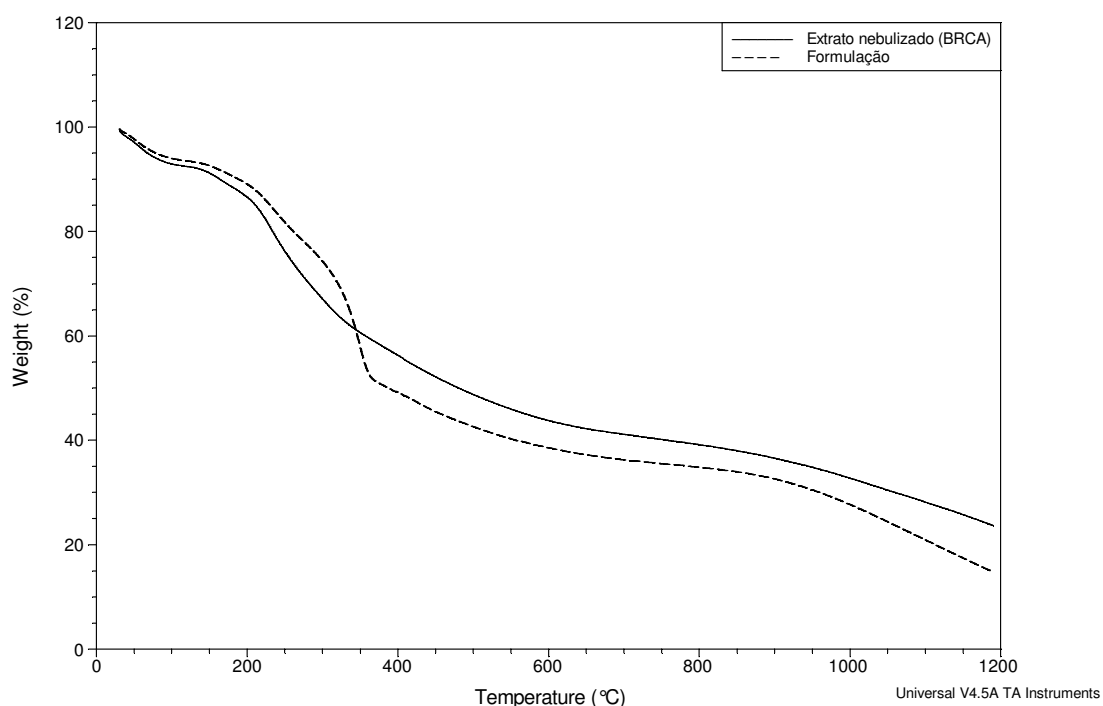
Em seguida, no segundo modelo matemático, foi feito o ajuste do modelo da cinética de degradação com base nas constantes de degradação k . São produzidos vários gráficos do logaritmo natural da constante k pelo recíproco da temperatura absoluta, utilizando modelos para as ordens zero (k_0), primeira ordem ($\ln k_1$) e segunda ordem ($1/k_2$). A partir daí, verifica-se qual modelo melhor se adapta, determinando a ordem de reação (MACEDO et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2013). Também foi utilizado a equação $t_{90\%}$, para a determinação do tempo de prateleira (BARRETO GOMES et al., 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na curva de TG do extrato seco de *S. brasiliensis* (figura 1) é possível visualizar uma perda de massa inicial, que pode ser devido à perda de compostos voláteis ou a resquícios de solventes como água ou álcool, visto que este fenômeno ocorreu em torno de 100 °C. Também foi visualizado que acima de 400 °C ocorreu a completa degradação do extrato, gerando uma perda de 29,93%. Quando estes dados foram comparados com o extrato produzido sem o adjuvante farmacotécnico, percebeu-se que os valores estão inferiores, o que pode sugerir uma menor perda de compostos voláteis e uma maior estabilidade do ingrediente ativo (FERNANDES et al., 2013). As curvas da formulação mostraram cinco etapas de decomposição: a primeira em 137,60 °C (6,36%), segunda em 242,02 °C (10,01%), terceira em 354,64 °C (30,01%), quarta em 682,42 °C (36,75%) e a quinta em 1200 °C com perda de massa de 21,50%.

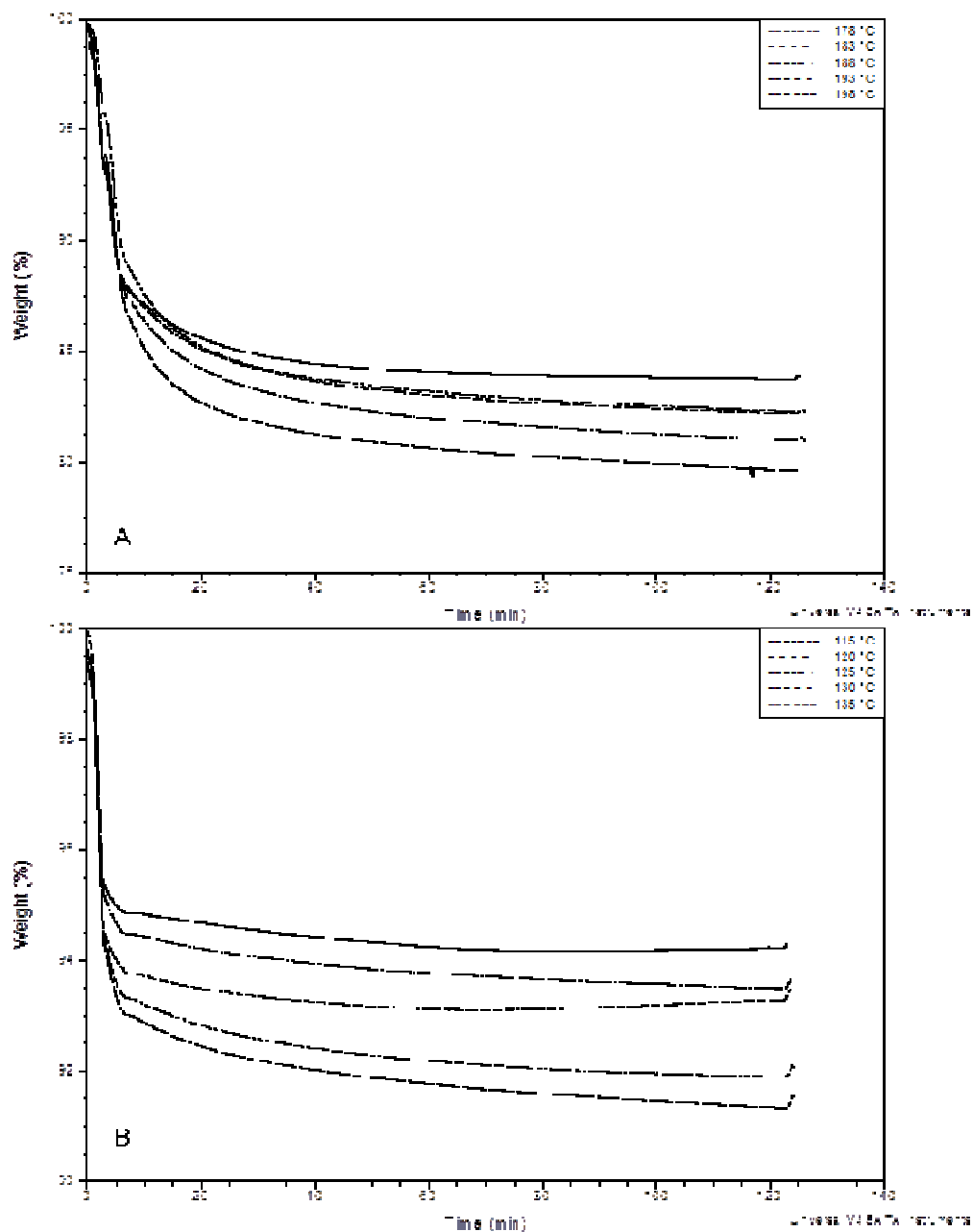
A partir da análise de TG/DTG determinaram-se as temperaturas de trabalho da isotérmica para o extrato e para a formulação. Na figura 2 temos os gráficos da isotérmica para a BRCA (A) e para a formulação (B).

Figura 1 – Curvas termogravimétricas do extrato de BRCA e da formulação até 1200 °C em atmosfera de N₂.



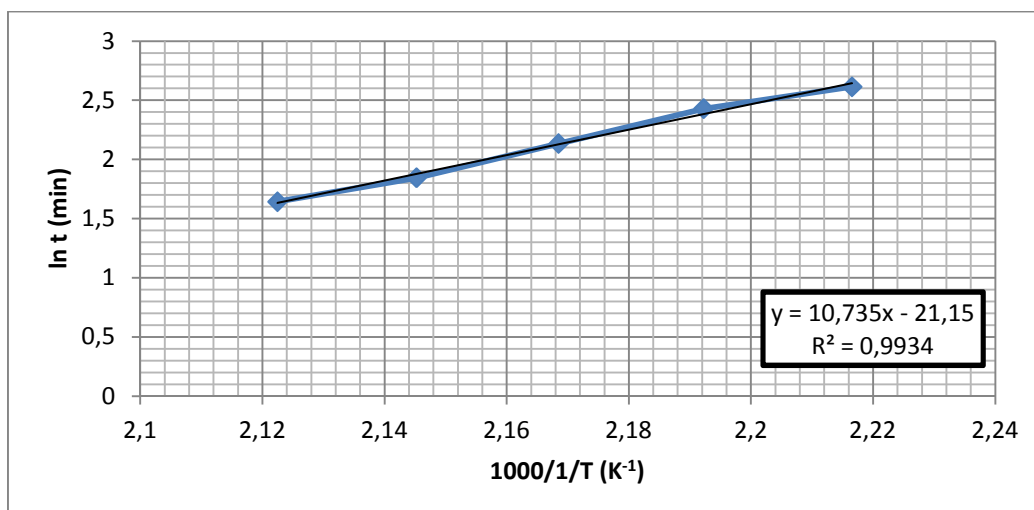
Os dados experimentais obtidos foram tratados por dois modelos matemáticos utilizando técnicas de regressão linear. Para o primeiro modelo matemático, foi traçado o gráfico de Arrhenius (figura 3). A partir dele foi obtida a energia de ativação ($E_a = 89,25$ kJ/mol) e foi calculado o tempo estimado de estabilidade ($\Delta m = 5\%$) para a BRCA entre 25 e 50 °C (tabela 2) onde é perceptível uma diminuição da estabilidade com o aumento da temperatura. Os resultados da energia de ativação encontra-se próximo a de alguns fármacos disponíveis no mercado. Como exemplo, pode-se citar os antirretrovirais, efavirenze e zidovudina (RODRIGUES et al., 2005; FANDARRUF et al., 2013), Como também da warifteina, um composto natural isolado de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (ARAGÃO et al., 2001). Segundo Talvani et. al. (2013) os valores da energia de ativação da maioria das drogas sintéticas estão entre 40 e 100 kJ/mol.

Figura 2 – Isotermas do extrato de BRCA (A) em diferentes temperaturas (178, 183, 185, 193 e 195 °C) e da formulação (B) em diferentes temperaturas (115, 120, 125, 130, 135 °C) em atmosfera de N₂.



Os dados contidos na tabela 2 sugerem que a temperatura afeta consideravelmente a estabilidade do extrato, tendo visto que um aumento de temperatura de 25 °C para 35 °C diminui em mais da metade o tempo de perda de 5% da amostra.

Figura 3 – Gráfico de Arrhenius ($\ln t \times T^{-1}$) para as cinco temperaturas da isotermica.



Contudo, utilizando esse modelo matemático, não foi possível à construção do gráfico de Arrhenius para a formulação, pois durante as isotermicas a maior perda de massa foi 2%.

Tabela 2 – Tempo de prateleira (em anos) em função da temperatura de armazenamento para o extrato de BRCA, utilizando a equação da reta.

T (°C)	25	30	35	40	45	50
Tempo (anos)	5,38	2,97	1,67	0,96	0,56	0,33

Com os mesmos dados, aplicou-se o segundo modelo matemático, que utiliza o gráfico $\ln K$ em função de $1/T$ (K). Dessa forma, analisou-se a possível ordem de reação da BRCA, bem como a energia de ativação do extrato seco e da formulação. A energia de ativação do extrato foi de 32,78 kJ/mol, enquanto da formulação foi de 61,03 kJ/mol.

Se comparados à energia de ativação obtida no outro modelo, o valor é quase 1/3. Contudo, no primeiro apenas 5% da perda de massa foi utilizada para o cálculo dessa energia, enquanto o segundo leva em questão toda a curva, o que em se tratando da complexidade de um extrato nebulizado, é possível a ocorrência dessa diminuição (FERNANDES, et al., 2013).

Para as possíveis ordens de reação (zero, primeira e segunda) foram traçados diferentes gráficos visando encontrar a equação que melhor se ajusta

ao modelo proposto com base no coeficiente de determinação (CRAING; READING, 2007; NASCIMENTO et al., 2013). Dessa forma (tabela 3), o extrato de BRCA apresentou cinética de primeira ordem, enquanto a formulação proposta apresentou ordem zero, o que pode sugerir uma possível interação dos componentes do extrato com os excipientes da formulação (MACEDO et al., 2002).

Tabela 3 – Coeficiente de determinação para as ordens de reação para o extrato de BRCA e para formulação utilizando os modelos cinéticos,

	Ordem zero	Primeira ordem	Segunda ordem
BRCA	0,8125	0,9002	0,8888
Formulação	0,9668	0,9382	0,8120

Com base nos dados obtidos das ordens de reação foi possível estimar o prazo de validade modelo matemático $t_{90\%}$ (BARRETO GOMES, et al., 2003), considerando o mecanismo de primeira ordem, para o extrato e ordem zero para a formulação. Na tabela 04 estão descritos a estimativa de validade de 25 a 50 °C. Nota-se que na formulação, o extrato de BRCA apresentou-se mais estável, fazendo com que o tempo de prateleira aumentasse consideravelmente. Shamsipur et al. (2013) menciona que a presença dos excipientes podem afetar o tempo de prateleira dos ingredientes ativos, principalmente aos termosensíveis, devido a ocorrência de incompatibilidades.

Comparando os dados obtidos com a tabela 2, há uma correlação dos dados, tendo em vista que no primeiro método a variação era de 5% e para o segundo método utiliza uma perda de massa de 10%. Em ambos os modelos o extrato de BRCA apresentou-se sensível à temperatura, de forma que, pequenas variações desta são suficientes para provocar uma diminuição de sua estabilidade no armazenamento.

Tabela 4 – Tempo de prateleira (em anos), em função da temperatura de armazenamento para o extrato de BRCA e para formulação, utilizando o modelo matemático $t_{90\%}$.

T (°C)	25	30	35	40	45	50
BRCA (anos)	1,71	1,36	1,09	0,89	0,73	0,60
Formulação (anos)	6,72	4,45	3,01	2,05	1,42	0,99

4. CONCLUSÕES

A análise térmica, em especial a termogravimetria (TG), pode ser aplicada para avaliação da estabilidade de extratos secos e de formulações farmacêuticas. O estudo da cinética de degradação pelo método isotérmico permite a determinação da energia de ativação, verificação do tempo de prateleira e a ordem de reação.

Utilizando o primeiro modelo, o extrato apresentou uma boa energia de ativação e um prazo de validade considerável, porém não foi possível a determinação das características da formulação. Já no segundo, o extrato apresentou reação de primeira ordem, uma boa estabilidade à temperatura ambiente, porém com valor de energia de ativação menor. A formulação apresentou ordem zero de reação e mais estável que o extrato. Utilizando o modelo matemático $t_{90\%}$, foi estipulado o prazo de validade em função das ordens de reação tanto da BRCA quanto da formulação, sendo que este último comum prazo bem maior em relação ao extrato.

REFERÊNCIAS

- ANGIOLUCCI, T.; OLIVEIRA JÚNIOR, J.B.; CHAUD, M.V.; ARANHA, N.; ANDRÉO FILHO, N.; Estudo de propriedades físico-químicas envolvidas no processo de compactação de uma formulação experimental contendo zidovudina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 33, n. 2, p. 233-243, 2012;
- ARAGÃO, C.F.S.; FILHO, J.M.B.; MACEDO, R.O.; Thermal characterization of warifteine by means of TG and a DSC photovisual system. **Journal Thermal analysis and calorimetric**. v. 64, n. 1, p. 185-191, 2001;

- BARRETO GOMES, A.P.; SOUZA, F.S.; MACEDO, R.O.; Thermal and dissolution kinetics of ampicillin drug and capsules. **Journal Thermal analysis and calorimetric**. v. 72, n. 1, p. 545-548, 2003;
- CHAVES, T.P.; DANTAS, I.C.; FELISMINO, D.C.; VIEIRA, K.V.M.; CLEMENTINO, E.L.C.; COSTA, L.S.; Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. **Biofar**. v. 05, n. 01, p 11-17, 2011.
- COUTO, A. G.; KASSUYA, C.A.L.; CALIXTO, J.B.; PETROVICK, P.R.; Anti-inflammatory, antiallodynic effects and quantitative analysis of gallic acid in *spray dried* powders from *Phyllanthus niruri* leaves stems, roots and whole plant. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 23, n.1, p. 124-131, 2013;
- CRAIG, D.Q.M., READING, M.; **Thermal analysis of Pharmaceutical**. 1 ed. CRC Press: New York, 2007;
- FANDARRUF, C.; ARAYA-SIBAJA, A.M.; PEREIRA, R.N.; HOFFMEISTER, C.R.D.; ROCHA, H.V.A.; SILVA, M.A.S.; Thermal behavior and decomposition kinetics of efavirenz under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. DOI 10.1007/s10973-013-3306-x, 2013.
- FERNANDES, F.H.A., SANTANA, C.P.; SANTOS, R.L.; CORREIA, L.P.; CONCEIÇÃO, M.M.; MACÊDO, 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. 113, n.1, p. 443-447, 2013;
- MACÊDO, R.O.; NASCIMENTO, T.G.; VERAS, J.W.E.; Compatibility and stability studies of Propranolol hydrochloride binary mixtures and tablets for TG and DSC-photovisual. **Journal Thermal analysis and calorimetric**. v.67, n.1, 483-489, 2002;
- MEDEIROS, A.C.D.; MEDEIROS, I.A.; MACEDO, R.O.; Thermal study of *Albizia inopinata* crude extract in the presence of cyclodextrine and Aerosil® by TG and DSC coupled to the photovisual system. **Thermochemica acta**. v. 392-393, n.1, p.93-98, 2002.
- NASCIMENTO, T.G.; OLIVEIRA, E.J.; BASÍLIO JÚNIOR, I.D.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; MACEDO, R.O.; Short-term stability studies of ampicillin and cephalexin in aqueous solution and human plasma: Application of least

- squares method in Arrhenius equation. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.73, p. 59-64, 2013;
- OLIVEIRA, O.W.; PETROVICK, P.R.; Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 4, p. 641-650, 2009;
- RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J.R.; Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização, Determinação da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farm. Bonaerense**. v.24, n. 3, p. 383-387, 2005;
- SHAMSIPUR, M., POURMORTAZAVI, S.M.; BEIGI, A.A.M.; HEYDERI, R.; KHAITIBI, M.; Thermal Stability and Decomposition Kinetic Studies of Acyclovir and Zidovudine Drug Compounds. **AAPS PharmSciTech**. v.14, n. 1, 287-293, 2013
- 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, doi:10.1155/2012/681207. 2012.
- SILVA, R.M.F., GOMES, T.C.B.L.; ALBUQUERQUE, M.M.; SILVA JUNIOR, J.O.C.; BARBOSA, W.L.R.; ROLIM NETO, P.J.; Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 14, n.1, p. 103-109, 2012.
- TALVANI, A.; BAHIA, M.T.; SÁ-BARRETO, L.C.L.; LIMA, E.M.; CUNHA-FILHO, M.S.S.; Carvedilol: decomposition kinetics and compatibility with pharmaceutical excipients. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. DOI: 10.1007/s10973-013-3491-7. 2013;
- TITA, D.; FULIAS, A.; TITA, B.; Thermal analysis of Ketoprofen. Part 2: Kinetic study of the active substance under isothermal conditions. **Journal Thermal analysis and Calorimetric**. v. 111, n.1, p. 1179-1185, 2013;

CAPÍTULO III

**DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE POLIFENOL EM *Schinopsis
brasiliensis* Engler. USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA (CLAE)**

**DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE POLIFENOL EM *Schinopsis
brasiliensis* Engler. USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA (CLAE)**

Felipe Hugo Alencar Fernandes¹, Cleildo Pereira Santana¹;
Thiago Pereira Chaves^{1,2}, Rayanne Sales de Araujo Batista³,
Fábio de Souza Santos³, Ana Cláudia Dantas de Medeiros¹;

1 – Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB;

2 – Departamento de Biologia, Campus Universitário Prof.^a Cinobelina Elvas – Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus – PI;

3 – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB;

RESUMO

O marcador químico de uma espécie vegetal consiste num grupo químico majoritário que pode ou não apresentar relação com a atividade farmacológica, sendo um importante parâmetro para a avaliação da qualidade de produtos fitoterápicos. Os compostos fenólicos são um grupo de metabolitos secundários presentes na maioria das plantas e com diversas atividades farmacológicas. Assim, o objetivo desse trabalho foi determinar polifenol no extrato de *Schinopsis brasiliensis* Engler. Inicialmente foi determinado o teor total de polifenóis e flavonoides totais por espectroscopia na região do visível. Em seguida foi desenvolvido e validado um método rápido por cromatografia líquida em alta eficiência (CLAE) com detector UV-Vis (271 nm) com fase móvel ácido ortofosfórico 0,05% e metanol em sistema gradiente e coluna C-18 de fase reversa. O extrato apresentou um elevado teor de polifenóis, o que sugeriu o ácido gálico, como marcador. O método por CLAE apresentou boa precisão, exatidão, linearidade e limite de detecção e quantificação aceitáveis.. Os resultados sugerem o ácido gálico como marcador químico do extrato seco de *S. brasiliensis* Engler e que o método validado é rápido, prático e dentro dos parâmetros estabelecido de validação.

PALAVRAS-CHAVES: Ácido gálico, marcador químico, marcador químico, validação.

1. INTRODUÇÃO

Schinopsis brasiliensis Engler. é uma planta pertencente a família Anacardiaceae, conhecida como baraúna ou braúna e distribuída na região do Semiárido brasileiro. Suas cascas apresentam uso etnofarmacológico para o tratamento de diarreia, tosse, antisséptico, analgésico (CHAVES, et al., 2011). Diversos estudos demonstraram sua atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, incluindo cepas multirresistentes (SILVA et al., 2012; SARAIVA et al., 2013). Em sua composição química é relatado à presença de taninos, fenóis e flavonoides, além de já terem sido isolados o galato de metila e o ácido gálico (SARAIVA et al., 2011).

A busca por novos produtos provenientes de extratos vegetais tem crescido consideravelmente nos últimos anos. Porém esses extratos são na sua maioria, líquidos, o que dificulta seu manuseio e padronização, quando comparados aos extratos secos, que além dessas características apresentam maior estabilidade, menor contaminação microbiológica além de ser mais tecnologicamente viável para a indústria, principalmente como Ingrediente farmacêutico ativo. Diferentes técnicas podem ser utilizadas para a produção desses extratos secos como o leito de jorro a liofilização, a evaporação rotativa e o *spray-drying*, sendo que este último apresenta um extrato com maior homogeneidade e características que favorecem sua aplicação em um produto acabado (SILVA et al., 2012; FERNANDES, et al., 2013).

Um aspecto importante para o controle da qualidade de produtos de origem vegetal está na determinação do seu marcador químico, que consiste em um constituinte (ou grupo de constituintes) quimicamente definido e presente no produto vegetal, podendo ou não estar relacionado com a sua atividade farmacológica (MARQUES et al., 2013). Diferentes técnicas analíticas podem ser utilizadas para a identificação e a quantificação dessas substâncias, porém a cromatografia líquida em alta eficiência (CLAE) é a mais utilizada pelos

diversos compêndios oficiais e agências reguladoras (ZOLLNER e SCHWARZ, 2013).

Os polifenóis são um grupo de metabólitos secundários, presentes em diversas plantas. De uma forma geral são classificados em quatro classes: ácidos fenólicos, flavonoides, lignanas e estelbenos. Esses compostos apresentam grande importância nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, principalmente pela sua ação antioxidante (GHARRAS, 2009).

Frente a essa discussão, o objetivo desse trabalho é determinar do marcador químico de *S. brasiliensis* Engler. .

2. EXPERIMENTAL

2.1. Material vegetal

As cascas de *S. brasiliensis* Engler. foram coletadas na região de Campina Grande-PB (7° 13' 50" S, 35° 52' 52" W) e seco em estufa de circulação forçada de ar à 40 °C até obter peso constante. Em seguida o material seco foi pulverizado em moinho de facas com granulometria de 10 mesh. A identificação foi feita no Herbário "Jaime Coelho de Moraes" na Universidade Federal da Paraíba sob o número EAN-14049.

O extrato hidroalcoólico foi obtido por maceração a frio da droga vegetal utilizando como solvente água:etanol (30:70, v/v), por 3 dias e submetido a secagem por aspersão em *spray drying* da marca LabPlant[®] com temperatura de entrada à 140 °C e fluxo de 3 mL/minuto. O adjuvante de secagem foi o dióxido de silício coloidal (Aerosil 200[®]) na proporção de 20%, em relação ao resíduo seco.

2.2. Determinação de polifenóis totais por espectrofotometria

O teor de polifenóis totais foi determinado utilizando ácido gálico como padrão, conforme Chaves et al., (2013). Inicialmente uma alíquota foi dissolvida em água, onde foram adicionadas 0,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu, deixando em repouso por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de carbonato de sódio a 20% (p/p), e foi deixado em repouso por 10 minutos. As amostras foram medidas utilizando um espectrofotômetro UV-Vis

Shimadzu, modelo UV-mini 1240, em comprimento de onda de 757 nm. Os resultados foram expressos em μg de ácido gálico/ mg de extrato.

2.3. Determinação de flavonoides totais por espectrofotometria.

O teor de flavonoides totais foi determinado utilizando uma solução de 2% de cloreto de alumínio (AlCl_3) em metanol. A quercetina foi utilizada como padrão, conforme Chaves et al., (2013). Inicialmente uma alíquota do extrato foi dissolvida em metanol. Em seguida, o extrato dissolvido foi misturado à solução de AlCl_3 na proporção de 1:1 e deixado em repouso por 10 minutos. As amostras foram medidas utilizando um espectrofotômetro UV-Vis, Shimadzu, modelo UV-mini 1240, em comprimento de onda de 415 nm. Os resultados foram expresso em μg de quercetina/ mg de extrato.

2.4. Determinação do marcador químico

A análise cromatográfica foi feita utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-10, equipado com uma bomba quaternária (LC-10 AD), controlador de gradiente (FCV-10 AL), degaseificador on-line (DGU-14A), com detector UV-Vis SPD 10A e sistema controlador SCL 10 A acoplado ao software Class VP. A coluna utilizada foi de fase reversa, 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 mm.

A fase móvel consistiu de ácido ortofosfórico à 0,05% (Fase A) e metanol (fase B) em sistema de gradiente: 90-10% B (0-10 minutos), 70-30% B (11-13 minutos), 40-60% B (14-19 minutos), 60-40% B (19-21 minutos), 80-20% B (22-24 minutos) e 90-10% B (24-30 minutos), totalizando 30 minutos de análise. A validação dos métodos analíticos foi feita levando em consideração os parâmetros de precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação (RIBANI et al., 2004; MARQUES et al., 2013;) :

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de polifenóis e flavonoides totais encontram-se na tabela 1. O teor de polifenóis totais é bastante elevado quando comparado ao de flavonoides totais. Embora seja um método quantitativo, ele não consegue prever a composição individual de cada composto, além de uma possível quantificação de compostos não fenólicos (ROBY et al., 2013).

Tabela 1 – Teor de polifenóis totais e flavonoides totais do extrato de *S. brasiliensis* obtidos por espectroscopia na região do visível.

	Polifenóis totais	Flavonoides totais
Concentração ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	24,52	14,43
Concentração (%)	15,08	1,44

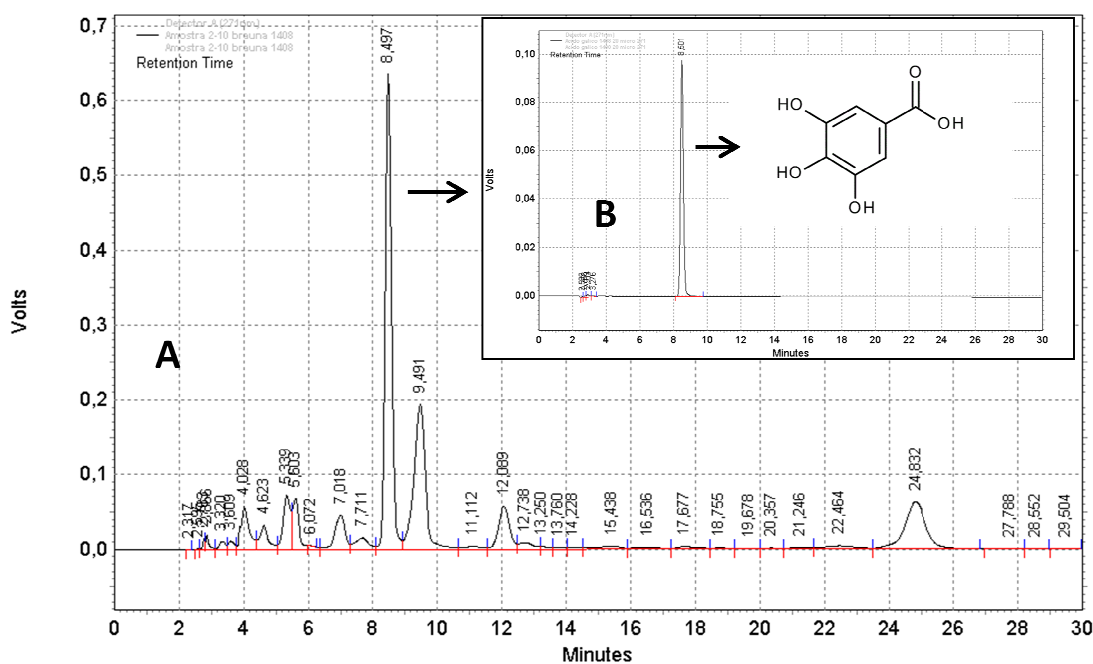
Como os polifenóis apresentaram-se em maior quantidade na planta foi analisado o extrato hidroalcoólico de *S. brasiliensis* Engler. utilizando o ácido gálico como padrão. O ácido gálico (ácido 3,4,5 trihidroxibenzoico) é um importante polifenol presente nas plantas e um composto de grande aplicação na síntese do fármaco trimetropin, como conservante de alimentos e como antioxidante em óleos e produtos ricos em lipídeos (BATTESTIN et al., 2004). Além do mais, extratos de plantas contendo ácido gálico possuem atividade farmacológica como antidiabético, antiangiogênico, antimicrobiano e redutor do risco de problemas cardíacos, dentre outras (MANSOURI et al., 2013),

Na análise preliminar foi detectada a presença deste composto em grandes quantidades. Com base neste resultado foi escolhido o ácido gálico como marcador e procedeu-se a sua quantificação e a validação do método. Para tal quantificação e validação do método, utilizou-se a cromatografia líquida em alta eficiência com detector de UV-Vis por ser o método mais indicado para tais tipos de compostos (ARAPTSAS, 2012).

Na figura 1 tem-se o cromatograma obtido do extrato de *S. brasiliensis*, onde se encontra o pico referente ao ácido gálico e padrão de ácido gálico, com tempo de retenção em torno de 8,5 minutos, além de outros picos presentes no fitocomplexo e o método ser uma injeção direta da amostra.

Diferentes estudos estão descritos na literatura analisando o ácido gálico diferenciando entre eles a constituição da fase móvel. Deshmukh et al. 2011, ao analisar ácido gálico em *Dendrophthoe falcate* Linn, encontrou tempo de retenção de aproximadamente 12 minutos, utilizando como fase móvel água acidificada com ácido ortofosfórico (0,1%) e acetonitrila na proporção de 4:6 e fluxo de 1 mL/minuto.

Figura 1 – Cromatograma do extrato de *S. brasiliensis* Engler. (A) e do padrão de ácido gálico (B) em 271 nm.

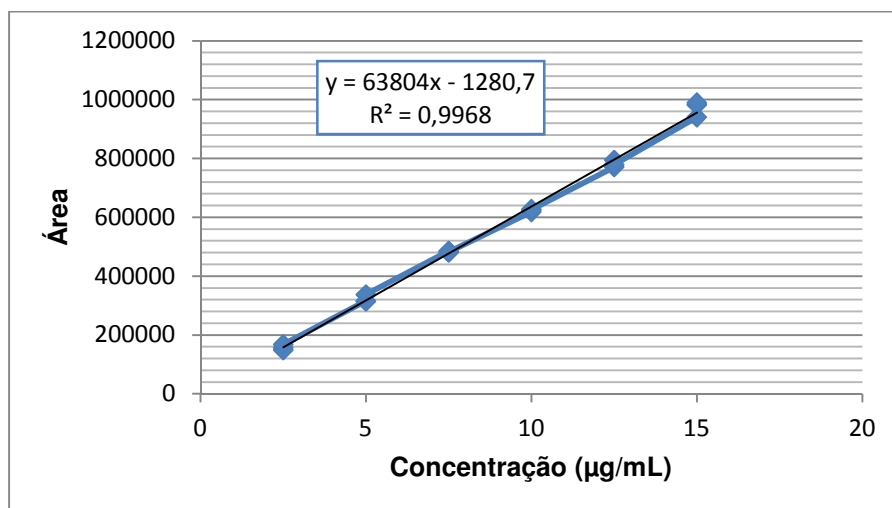


A escolha da fase móvel (ácido ortofosfórico 0,05% e metanol deu-se por experiências já descritas na literatura, o qual informa que a água acidificada impede a ionização do ácido gálico, fazendo com o mesmo tenha afinidade pela fase estacionária da coluna. Geralmente a mais utilizada é a coluna de fase reversa C-18. Embora ácido gálico absorva em vários comprimentos de onda (210, 254, 271, 275 e 280), optou-se por 271 nm, por apresentar maior absorção e melhor resolução dos picos nestas condições (DE SOUZA et al., 2002; LOPES et al., 2009; ARAPITSAS, 2012).

Definidas as condições de trabalho, partiu-se para a validação do método. A linearidade do método foi analisada a partir da curva de calibração obtido com as soluções do padrão de ácido gálico com concentrações entre 2,5 e 15 µg/mL, sendo obtida a equação de regressão linear $y = ax + b$. Segundo Ribani et al. (2004) a verificação de ajuste dos dados pode ser verificada pelo

coeficiente de correlação (R), sendo que a ANVISA recomenda um valor maior que 0,99. Como nosso estudo o valor encontrado foi $R = 0,9986$, a curva apresenta uma relação linear (Fig. 2).

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



Através dos parâmetros da curva de calibração foi possível a determinação com 95% de confiança, do limite de detecção ($LD = 1,22 \mu\text{g/mL}$) e do limite de quantificação ($LQ = 1,82 \mu\text{g/mL}$). A precisão do método foi avaliada a partir das análises intra-corrída (repetibilidade) e inter-corrída (precisão intermediária). Os dados estão contidos na tabela 2.

Tabela 2 – Precisão do padrão de ácido gálico e do extrato analisados em dois dias diferentes. DP – Desvio padrão; CV – Coeficiente de variação.

	Media (área)	DP	CV (%)
Ácido gálico (10 µg/mL)	623253	14409,03	2,31
Extrato (1º dia)	616653,8	17097,11	2,77
Extrato (2º dia)	627397	24066	3,83

A exatidão do método foi realizada através da análise de três fortificações pela adição do padrão de ácido gálico (tabela 3), na qual foi possível determinar que o método apresenta-se dentro dos limites aceitáveis entre 80 e 120% (LIMA et al., 2010). Segundo Marcucci (2010) o ensaio de exatidão através da recuperação é um ponto crucial para o desenvolvimento de metodologias para produtos fitoterápicos.

Tabela 3 – 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.

	1	2	3
CV (%)	1,65	0,72	0,65
Recuperação (%)	92,83	96,87	111,20

4. CONCLUSÃO

O extrato nebulizado de *S. brasiliensis* apresenta uma boa concentração de polifenóis totais, sugerindo que o seu marcador seja um composto desta espécie. Optou-se pelo ácido gálico por já sido isolado na espécie, fato que este que foi comprovado pela validação do método analítico para quantificação utilizando cromatografia líquida acoplado ao detector de UV-Vis.

O método desenvolvido por cromatografia líquida apresentou-se rápido e eficiente para a determinação do ácido gálico, além de apresentar boa linearidade, recuperação e reprodutibilidade, além de baixos limites de detecção e recuperação. Com isso, esse método pode tanto ser aplicado no controle da matéria prima, quanto do seu produto acabado.

REFERÊNCIAS

- ARAPITSAS, P.; Hydrolyzable tannin analysis in food. **Food Chemistry**. v.135, n.3, p. 1708-1717, 2012.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L.K.; MACEDO, G.A.; Fonte e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**. v.15, n. 01, p. 63-72, 2004.
- CHAVES, T.P.; SANTANA, C.P.; VÉRAS, G.; BRANDÃO, D.O.; FELISMINO, D.C.; MEDEIROS, A.C.D.; TROVÃO, D.M.B.M. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **African Journal of Biotechnology**, v.12, n.8, p.847-853, 2013.

- DE SOUZA, T.P.; HOLZSCHUH, M.H.; LIONÇO, M.I.; GONZÁLES-ÓRTEGA, G.; PETROVICK, P.R.; Validation of a LC method for the analysis of phenolic compounds from aqueous extract of *Phyllanthus niruri* aerial parts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 30, n. 2, p. 351-356, 2002
- DESHMUKH, H.; PRABHU, P.J.; Development of RP-HPLC method for Qualitative Analysis of Active Ingredient (Gallic acid) from Stem Bark of *Dendrophthoe falcate* Linn. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**. v. 3, n. 2, p. 146-149, 2011.
- FERNANDES, F.H.A., SANTANA, C.P.; SANTOS, R.L.; CORREIA, L.P.; CONCEIÇÃO, M.M.; MACÊDO, 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. 113, n.1, p. 443-447, 2013.
- GHURRAS, H.E.; Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. **International Journal of Food Science & Technology**. v.44, n. 01, p. 2512-2518.
- LIMA, L.L.A.; SCHULER, A.; GUERRA, N.; PEREIRA, G.E.; LIMA, T.C.A.; ROCHA, H.; Otimização e validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**. v. 33, n. 5, p.1186-1189, 2010.
- LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; TOLEDO, C.E.M.; ISLER, A.C.; MELLO, J.C.P.; Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science**. v. 45, n. 1, p. 135-143, 2009.
- MANSOURI, M.T. FARBOOD, Y., SAMERI, M.J.; SARKAKI, A.; NAGHIZADEH, B.; RAFEIRAD, M.; Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. **Food Chemistry**. v. 138, n. 01, p. 1028-1033, 2013.
- MARCUCCI, M.C.; Validação de princípios ativos de plantas medicinais. In: SOUZA, G. H. B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N. P.; **Farmacognosia: Coletânea científica**. Ouro Preto: UFOP, 2011.
- 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*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 51-57, 2013.
- RIBANI, M. BOTOLLI, C.B.G.; COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C.; **Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos**. *Quimica Nova*. v. 27, n. 2, p. 771-780, 2004.
- ROBY, M.H.H.; SARHAN, M.A.; SELIM, K.A.; KHALEL, K.I.; Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops and Products**. v. 43, n. 1, p. 827-831, 2013.
- SARAIVA, A.M.; CASTRO, R.H.A.; CORDEIRO, R.P.; PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; CASTRO, V.T.N.A.; AMORIM, E.L.C.; XAVIER, H.S.; PISCIOTTANO, M.N.C.; In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 5, n. 14, p.1724-1731, 2011.
- SARAIVA, A.M.; SARAIVA, C.L.; CORDEIRO, R.P.; SOARES, R.R.; XAVIER, H.R.; CAETANO, N.; Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 15, n. 2, p. 199-207, 2013.
- 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 doi:10.1155/2012/681207. 2012.
- SILVA, R.M.F., GOMES, T.C.B.L.; ALBUQUERQUE, M.M.; SILVA JUNIOR, J.O.C.; BARBOSA, W.L.R.; ROLIM NETO, P.J.; Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 14, n.1, p. 103-109, 2012.
- ZOLLNER, T.; SCHWARZ, M.; Herbal Reference Standards: applications, definitions and regulatory requirements. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23, n.1, p.1-21, 2013.