



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

JÉSSICA CABRAL DE ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA E BIOLÓGICA DA DROGA VEGETAL
PRODUZIDA A PARTIR DE CASCAS DE *Aspidosperma pyrifolium* Mart**

CAMPINA GRANDE

2019

JÉSSICA CABRAL DE ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA E BIOLÓGICA DA DROGA VEGETAL
PRODUZIDA A PARTIR DE CASCAS DE *Aspidosperma pyrifolium* Mart**

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

Orientadora: Prof^ª. Ana Cláudia Dantas de Medeiros.

Co-orientador: Prof. Felipe Hugo de Alencar Fernandes.

CAMPINA GRANDE

2019

É expressamente proibido 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 do trabalho.

A553c Andrade, Jéssica Cabral de.
Caracterização analítica e biológica da droga vegetal produzida a partir de cascas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart [manuscrito] / Jéssica Cabral de Andrade. - 2019.
119 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.
"Orientação : Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Coordenação de Curso de Biologia - CCBS."
1. Plantas medicinais. 2. Pereiro. 3. Citotoxicidade. 4. Droga vegetal. I. Título

21. ed. CDD 615.321

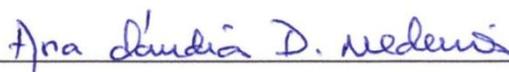
JÉSSICA CABRAL DE ANDRADE

**Caracterização analítica e biológica da droga vegetal produzida a partir de cascas
de *Aspidosperma pyrifolium* Mart**

Dissertação de Mestrado 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 26 de fevereiro de 2019

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Ana Cláudia Dantas de Medeiros

(Orientadora - UEPB)



Prof. Felipe Hugo de Alencar Fernandes

(Co-orientador - UNIFACISA)



Prof.^a Vanda Lúcia dos Santos

(Membro Interno - UEPB)



Prof. Cícero Flávio Soares Aragão

(Membro Externo - UFRN)

“Portanto, eu vos digo: pedi e recebereis; procurai e encontrareis; batei e vos será aberto. Pois quem pede, recebe; quem procura, encontra; e, para quem bate, se abrirá. Será que algum de vós que é pai, se o filho pedir um peixe, lhe dará uma cobra? Ou ainda, se pedir um ovo, lhe dará um escorpião? Ora, se vós que sois maus, sabeis dar coisas boas aos vossos filhos, quanto mais o Pai do Céu dará o Espírito Santo aos que o pedirem!

(Lucas 11, 9-13)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir iniciar e concluir mais uma etapa na minha vida acadêmica.

A minha orientadora, Ana Cláudia, por abrir as portas do LABDEM durante a graduação e por aceitar orientar-me durante o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por todos os ensinamentos pessoais e profissionais.

Agradeço ao meu co-orientador, Felipe, que chegou para somar conhecimentos ao trabalho. Obrigado por sempre me dar suporte na resolução de muitos entraves, que surgiram ao longo da pesquisa.

À banca examinadora, por dedicar o seu precioso tempo na correção deste trabalho e pelas suas contribuições.

À FAPESQ/CAPES, pela bolsa concedida.

Ao Certibio, por ceder seus laboratórios para a realização de experimentos.

Aos meus colegas de mestrado, Widson, Fernanda e Lucas, por tornarem os dias de “lutas” mais divertidos e menos cansativos. Agradeço por todo conhecimento que cada um me repassou, pelo companheirismo e pelas contribuições na realização de muitos trabalhos desenvolvidos no laboratório.

Aos alunos de Iniciação Científica do LABDEM, Angélica, Nathália, Naara, Milena, João Vítor, que disponibilizaram seu tempo para acompanhar e ajudar nas análises.

Aos meus pais (Jailma e Valmir) e minha irmã (Joicy), por serem os meus pilares de sustentação na caminhada em busca dos meus sonhos, e por compartilharem os momentos tristes e felizes da minha vida.

Aos demais familiares e amigos, que estiveram ao meu lado e que sempre tiveram uma palavra de apoio e motivação.

RESUMO

A utilização de plantas medicinais no tratamento de diversas desordens fisiológicas é uma prática muito antiga, sendo repassada ao longo dos anos. A eficácia de uma determinada planta deve ser comprovada, assim como também, a sua segurança, para que a utilização por parte da população seja baseada em evidências científicas. Neste âmbito, se torna necessário estudar espécies vegetais com importância farmacológica, com a finalidade de caracteriza-las quimicamente, fisicamente e biologicamente. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar e padronizar os diferentes tamanho de partículas da droga vegetal proveniente das cascas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart., com a finalidade de se avaliar ação biológica do chá produzido com a partícula de melhor rendimento. As amostras obtidas após separação dos tamanhos foram denominadas AP01 ($>355 \mu\text{m}$), AP02 ($\geq 180 \mu\text{m}$), AP03 ($\geq 155 \mu\text{m}$), AP04 ($\geq 75 \mu\text{m}$) e AP05 ($\geq 38 \mu\text{m}$). Os pós foram avaliados de acordo com testes estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira para drogas vegetais. Foram utilizadas na caracterização física e química, técnicas termoanalíticas, como a análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TG), microscópica (microscopia óptica), espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) e cromatográfica (CLAE-UV). Através da termogravimetria foi possível observar os seus processos de decomposição e utilizando o método de Flynn-Wall-Ozawa e Kissinger-Akira-Sunose foi possível determinar a energia de ativação de cada partícula. A citotoxicidade das partículas foi avaliada através do teste da hemólise de eritrócitos. Os pós obtidos com a tamisação encontram-se dentro dos limites aceitáveis de qualidade para os testes de umidade e cinzas. Os eventos térmicos ocorridos na DTA e na TG mostraram diferenças em suas temperaturas de acordo com a distribuição granulométrica de cada partícula, assim como na sua energia de ativação. A quantidade de metabólitos extraídos também foi influenciado pelo tamanho das partículas, bem como o percentual de hemólise. Através do emprego de diversas técnicas analíticas empregadas foi possível concluir que o tamanho das partículas pode influenciar em parâmetros físicos, químicos e biológicos, sendo de fundamental importância padroniza-los, garantindo, de forma eficiente, a sua qualidade e segurança.

Palavras-chave: Técnicas termoanalíticas. Citotoxicidade. Granulometria. Pereiro

ABSTRACT

The use of medicinal plants in the treatment of various physiological disorders is a very old practice, being passed on over the years. The efficiency of a particular plant must be proven, as well as its safety, so that the use by the population is based on scientific evidence. In this context, it is necessary to study plant species of pharmacological importance, with the purpose of characterizing them chemically, physically and biologically. The objective of this work was to characterize and standardize the different particle size of the vegetal drug from the barks of *Aspidosperma pyriforme* Mart., in order to evaluate the biological action of the tea produced with the best yielding particle. Samples obtained after size separation were AP01 ($> 355 \mu\text{m}$), AP02 ($\geq 180 \mu\text{m}$), AP03 ($\geq 155 \mu\text{m}$), AP04 ($\geq 75 \mu\text{m}$) and AP05 ($\geq 38 \mu\text{m}$). The powders were evaluated according to tests established by the Brazilian Pharmacopoeia for plant drugs. Differential thermal analysis (DTA) and thermogravimetry (TG), microscopy (optical microscopy), near-infrared spectroscopy (NIR) and chromatographic (HPLC-UV) were used in the physical and chemical characterization. Through thermogravimetry it was possible to observe its decomposition processes and using the Flynn-Wall-Ozawa and Kissinger-Akita-Sunose method it was possible to determine the activation energy of each particle. Particle cytotoxicity was assessed by the erythrocyte hemolysis test. The powders obtained with the sieving are within acceptable quality limits for the moisture and ash tests. The thermal events occurring in DTA and TG showed differences in their temperatures according to the particle size distribution of each particle, as well as its activation energy. The amount of metabolites extracted was also influenced by the size of the particles as well as the percentage of hemolysis. Through the use of several analytical techniques, it was possible to conclude that the size of the particles can influence physical, chemical and biological parameters, being of fundamental importance standardizing them, guaranteeing, in an efficient way, their quality and safety.

Keywords: Thermoanalytical techniques. Cytotoxicity. Granulometry. *Pereiro*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists International
AP01	Droga vegetal com diâmetro 355 µm
AP02	Droga vegetal com tamanho 180 µm
AP03	Droga vegetal com tamanho 150 µm
AP04	Droga vegetal com tamanho 75 µm
AP05	Droga vegetal com tamanho 38 µm
CP	Componente Principal
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coefficiente de variação
°C	Grau Celcius
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTA	Análise Térmica Diferencial
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DPR	Desvio padrão relativo
EMEA	European Medicines Agency
ECA g	Equivalente de catequina por grama
EQC g	Equivalente de quercetina por grama
EAG g	Equivalente de ácido gálico por grama
Ea	Energia de ativação
FDA	Food and Administration
FWO	Flynn-Wall-Ozawa
HPLC	High performance liquid chromatography
ICTAC	Confederation of Thermal Analysis and Calorimetry
IC₅₀	Concentração letal média
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
J/g	Joule por grama
KAS	Kissinger-Akira-Sunose
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
MS	Ministério da Saúde do Brasil

mL	Mililitro
MO	Microscopia Óptica
MIC	Concentração Inibitória Mínima
NIR	Infravermelho Próximo
nm	Nanometro
PCA	Análise de Componente Principal
PNCTIS	Política nacional de ciências, tecnologia e inovação em saúde
PNPIC	Política nacional de práticas integrativas e complementares
PNPNF	Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos
pH	Potencial Hidrogeniônico
RDC	Resolução da diretoria colegiada
Renisus	Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS
rpm	Rotação por Minuto
SUS	Sistema único de saúde
TA	Análise Térmica
TG	Termogravimetria
ΔH	Variação de entalpia
μm	Micrometro
β	Razões de aquecimento
UV	Ultravioleta visível
μg	Microgramas

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1 - Níveis das variáveis utilizadas para avaliar a robustez do método	65
Tabela 2 - Teste de robustez usando planejamento fatorial 2^3	65
Tabela 3 - Granulometria do pó obtido de cascas moídas de <i>Aspidosperma pyrifolium</i>	68
Tabela 4 - Valores obtidos para os testes exigidos pela farmacopéia brasileira.....	69
Tabela 5 - Quantificação dos metabólitos secundários da droga vegetal	71
Tabela 6 - Ensaio de citotoxicidade.....	73
Tabela 7 - Precisão do padrão ácido cafeico analisados em dois dias diferentes e por um analista diferente.....	80
Tabela 8 - Valores obtidos para o ensaio de recuperação pela metodologia de adição do padrão	80
Tabela 9 - Percentual de inibição da desnaturação da proteína do ovo	83
Tabela 10 – Percentual de inibição da desnaturação protéica do chá da droga vegetal.	83
Tabela 11 – Valores obtidos da avaliação da atividade antioxidante do padrão ácido cafeico e o chá da droga vegetal.....	86

ARTIGO II

Tabela 12 - Dados da análise térmica diferencial das partículas	101
Tabela 13 - Dados das temperaturas de decomposição das partículas	104
Tabela 14 - Valores da energia de ativação para as cinco partículas, utilizando razões de aquecimento diferentes	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Núcleo indólico.....	22
Figura 2 - <i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart., uma espécie endêmica do bioma caatinga.....	24
 ARTIGO I	
Figura 3 - Droga vegetal proveniente da <i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart.....	68
Figura 4 - Cromatograma obtido do chá da droga vegetal <i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart....	75
Figura 5 - Identificação do padrão ácido cafeico no chá da droga vegetal da <i>A. pyrifolium</i> Mart.	75
Figura 6 - Curva de calibração para o ácido cafeico	78
Figura 7 - Gráfico de resíduos	79
Figura 8 - Gráfico de pareto - (a) influência dos fatores na área, (b) influência dos fatores no tempo de retenção.....	82
Figura 9 - Ensaio do DPPH realizado em microplaca	85
 ARTIGO II	
Figura 10 - Curvas DTA das cinco partículas com granulometrias diferentes	99
Figura 11 - Curvas TG para as cinco partículas com granulometrias diferentes.....	102
Figura 12 - TG das partículas em diferentes razões de aquecimento: (a) AP01, (b) AP02, (c) AP03, (d) AP04 e (e) AP05	106
Figura 13 - Microscopia óptica dos pós em diferentes tamanhos de partículas: 355 μm (a), 180 μm (b), 150 μm (c), 75 μm (d) e 38 μm (e).....	110
Figura 14 - Variância explicada pelo modelo quimiométrico	112
Figura 15 - Gráfico de scores	113

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Geral	16
2.2	Específicos	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	Políticas públicas acerca dos medicamentos fitoterápicos no Brasil	17
3.2	Produtos tradicionais fitoterápicos (PTF)	19
3.3	Metabolismo secundário de plantas medicinais	20
3.4	Família Apocynaceae	21
3.4.1	<i>Aspydosperma sp</i>	22
3.4.2	<i>Aspidosperma pyrifolium Mart.</i>	23
3.5	Técnicas analíticas utilizadas na caracterização de plantas medicinais	25
3.5.1	<i>Técnicas termoanalíticas</i>	26
3.5.2	<i>Termogravimetria (TG)</i>	27
3.5.3	<i>Análise térmica diferencial (DTA)</i>	28
3.5.4	<i>Estudo cinético por termogravimetria</i>	28
3.6	Técnicas espectroscópicas	31
3.6.1	<i>Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)</i>	31
3.7	Ferramentas quimiométricas	32
3.7.1	<i>Análise de componente principal (PCA)</i>	34
3.8	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	35
3.9	Validação de métodos analíticos	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL DE <i>Aspidosperma pyrifolium</i> MART. EM DIFERENTES TAMANHOS DE PARTÍCULAS	55
	RESUMO	56
	INTRODUÇÃO	57
	MATERIAIS E MÉTODOS	58
	Obtenção dos pós.....	58

Caracterização dos pós obtidos da casca de <i>A. pyrifolium</i> Mart	59
Determinação da granulometria.....	59
Determinação de perda por dessecação	59
Determinação do teor de cinzas.....	60
Determinação de cinzas resistentes ao ácido	60
Determinação do pH.....	60
Caracterização fitoquímica do chá	61
Determinação do teor de polifenóis totais.	61
Determinação do teor de flavonoides	61
Determinação do teor de taninos condensados.....	62
Ensaio de citotoxicidade.....	62
Determinação do marcador fitoquímico	63
Preparo das soluções.....	63
Condições cromatográficas.....	63
Validação do método analítico	64
Linearidade	64
Precisão	64
Exatidão.....	64
Robustez	64
Avaliação in vitro da atividade anti-inflamatória	66
Preparo das soluções padrões	66
Inibição in vitro da desnaturação da albumina do ovo	66
Avaliação da atividade antioxidante do chá	66
RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
Caracterização da droga vegetal	67
Caracterização físico-químico da droga vegetal de <i>A. pyrifolium</i>	69
Prospecção fitoquímica.....	70
Citotoxicidade.....	72
Determinação do marcador fitoquímico	74
Validação do método para quantificação do ácido cafeico	77
Inibição in vitro da desnaturação da albumina do ovo	82
Avaliação da atividade antioxidante do chá	85
CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

3	CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DA DROGA VEGETAL DE <i>Aspidosperma</i>	
	<i>pyrifolium</i> MART.	93
	RESUMO	94
	INTRODUÇÃO	95
	MATERIAIS E MÉTODOS	96
	Obtenção dos pós.....	96
	Análise térmica diferencial (DTA)	97
	Termogravimetria (TG)	97
	Estudo cinético das partículas.....	97
	Microscopia óptica	98
	Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)	98
	Análise quimiométrica.....	98
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
	Análise térmica diferencial.....	99
	Termogravimetria (TG)	102
	Estudo do comportamento cinético das partículas	104
	Microscopia óptica	109
	Espectroscopia de infravermelho próximo	111
	CONCLUSÃO	114
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
	APÊNDICE I	118

1 INTRODUÇÃO

Após passar anos esquecida, devido a ascensão dos medicamentos de origem sintéticos, a utilização de plantas medicinais no combate a muitas enfermidades está sendo resgatada, principalmente devido ao alto índice de reações adversas causadas pelos medicamentos alopáticos. Estima-se que, aproximadamente 44% do atual arsenal terapêutico foi desenvolvido através de produtos naturais (SPRENGER, 2011).

A enorme biodiversidade do território brasileiro insere o país em uma posição estratégica para o desenvolvimento e exploração racional e sustentada de produtos naturais bioativos, uma vez que o Brasil tem a flora mais rica do mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas superiores, totalizando 19% da flora mundial. Porém, o potencial não explorado de plantas como fonte de substâncias bioativas ainda é enorme (PEREIRA, 2012).

Diante do conhecimento popular sobre as plantas medicinais, é de grande importância mostrar a população informações que indiquem o uso adequado e efeitos com comprovação científica destes produtos, visto que as plantas medicinais da flora nativa do Brasil são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. As análises preliminares ou avançadas se tornam importantes para caracterizar as substâncias presentes no controle de qualidade de um novo fitoterápico (OLIVEIRA, 2016).

Com o intuito de estimular o crescimento da medicina tradicional dentro do sistema de saúde pública, o Ministério da Saúde do Brasil (MS), estabeleceu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), aprovada por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. O objetivo desta política é garantir o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em todo o país, bem como utilizar de forma sustentável a biodiversidade brasileira ao passo que busca expandir o desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde (PIERRI, 2013).

A ANVISA publicou em 2010, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC), nº 10 de 9 de março, que dispõe sobre a produção, distribuição e uso de plantas medicinais, particularmente sob a forma de droga vegetal. Os produtos contidos nesta RDC destinam-se ao uso momentâneo (não prolongado), oral ou tópico, para o alívio sintomático das doenças relacionadas, devendo ser disponibilizados exclusivamente na forma de planta seca, rasurada ou triturada, para o preparo de infusões, decocções e macerações, sendo vendidas de forma livre, não sendo exigido prescrição médica (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

De acordo com a RDC nº 14 de março de 2014, a droga vegetal é obtida a partir da planta medicinal ou suas partes, que contem substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

A RDC 26/2014, estabelece o significado de “chá medicinal” como sendo a utilização da droga vegetal para fins medicinais, onde o mesmo é obtido através de infusões, decocção ou maceração em água pelo consumidor. Ou seja, esse termo será utilizado para o produto que antes era denominado, na RDC nº 10/2010, de “droga vegetal notificada” (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014).

A família Apocynaceae tem sido estudada extensivamente ao longo dos anos em relação à citotoxicidade de componentes químicos. A citotoxicidade proveniente de plantas medicinais está relacionada a presença de moléculas bioativas, denominados de metabólitos secundários, como por exemplo, os alcalóides. Estes compostos foram isolados de várias partes de espécies da família Apocynaceae, principalmente das sementes, cascas, folhas e caules (RODRÍGUEZ et al., 2008).

O gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae) possui um grande número de plantas que são utilizadas pela medicina tradicional. A presença, em sua constituição, de alcalóides (indólicos) permite a sua utilização no tratamento de diversas enfermidades. A *Aspidosperma pyrifolium* Mart., conhecida popularmente como Pereiro, é amplamente utilizada no Nordeste brasileiro devido a suas propriedades anti-inflamatórias, distúrbios metabólicos, como o diabetes, contra alguns tipos de câncer, como anticoncepcional, contra febre e reumatismo (PEREIRA et al., 2006).

Devido a sua complexidade, a quantificação das matrizes vegetais é feita de forma incompleta, pois na maioria dos casos, inexitem descrições em compêndios oficiais ou literaturas especializadas, para comparar com as matérias-primas, tornando o controle de qualidade destes produtos um enorme desafio. Outro problema enfrentado no desenvolvimento de um medicamento fitoterápico é distinguir qual composto bioativo presente na matriz é responsável pela atividade farmacológica, visto que, na maioria dos casos, a atividade é proveniente do sinergismo entre vários componentes (LEAL, 2010).

Diante deste contexto, atualmente, não existem metodologias específicas para realizar o controle de qualidade da planta *Aspidosperma pyrifolium* Mart., fazendo-se necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas que assegurem a qualidade e segurança, sendo

possível atestar algumas de suas atividades farmacológicas, empregando esta matéria-prima vegetal na produção de chás medicinais.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar a caracterização físico química e biológica da droga vegetal produzida, a partir das cascas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.

2.2 Específicos

Este trabalho pretende alcançar os seguintes objetivos específicos:

- a) obter a droga vegetal e caracterizar os diferentes tamanhos de partículas;
- b) avaliar a morfologia das diferentes partículas por microscopia óptica;
- c) quantificar os metabólitos secundários das partículas, assim como determinar o seu marcador quimiotaxonomico;
- d) analisar físico-quimicamente as partículas, utilizando técnicas termoanalíticas;
- e) determinar a cinética de degradação das partículas produzidas;
- f) avaliar a citotoxicidade das partículas com tamanhos diferentes;
- g) selecionar a droga vegetal, que apresentar menor citotoxicidade;
- h) realizar um *fingerprint* da droga vegetal escolhida que apresente menor citotoxicidade;
- i) avaliar a atividade anti-inflamatória (in vitro) e antioxidante da droga vegetal.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Políticas públicas acerca dos medicamentos fitoterápicos no Brasil

Em 2005, a fitoterapia foi incluída na Política Nacional de Ciências, Tecnologia e Inovação em Saúde (PNCTIS), na perspectiva de incentivar pesquisas para o desenvolvimento de novos produtos para o tratamento, prevenção e promoção à saúde. Contudo, apesar do crescente estímulo das políticas nacionais ao desenvolvimento e implementação ao SUS da fitoterapia, ainda existem fatores que comprometem a sua implementação (BIAVATTI; TORRES, 2011).

A ausência de comprovações científicas de eficácia dos compostos de origem naturais, aliadas às dificuldades do controle físico-químico, farmacológico e toxicológico, impulsionaram a substituição destes por moléculas sintéticas. Após a década de 1960, a indústria farmacêutica perdeu o interesse na pesquisa de novas substâncias de origem vegetal, por acreditarem que já teriam isolado todas as principais moléculas. Entretanto, em 1980, os avanços técnicos e o desenvolvimento de novos métodos, permitiram maior rapidez na identificação de matrizes complexas (ALVES, 2008).

Os produtos fitoterápicos, no Brasil, movimentam cerca de 5% do faturamento do mercado farmacêutico. São conceituados como produtos fitoterápicos, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 14/2010, todo medicamento obtido, exclusivamente, utilizando matéria-primas vegetais, onde a sua eficácia e segurança são comprovadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos de utilização ou evidências clínicas (LEAL, 2010; NUNES, 2014).

As normas sanitárias que regem o controle da qualidade dos produtos fitoterápicos no Brasil, passaram por várias adequações. Foram estudadas as principais legislações internacionais para o registro de fitoterápicos, como por exemplo, a legislação Européia, juntamente com normas pré-estabelecidas pela ANVISA. Com base nesses dados, elaborou-se uma proposta de republicação da norma brasileira para o registro de fitoterápicos, separando os produtos em duas classes: Medicamentos Fitoterápicos (MF), para aqueles que apresentem a comprovação de segurança e eficácia por meio de estudos clínicos e Produtos Tradicionais Fitoterápicos (PTF), para os que apresentem comprovação por meio do uso tradicional (CARVALHO; GUTIÉRREZ, 2013).

De acordo com a RDC n° 26/2014, os medicamentos fitoterápicos devem manter a sua constância de qualidade. Sendo concebidos para utilização sem a vigilância de um médico,

para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização. Tais produtos, não podem ser empregados no tratamento de doenças ou distúrbios considerados graves, não podendo conter matérias-primas em concentrações tóxicas nem serem administradas por via injetável e oftálmica (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014).

O Ministério da Saúde (MS), desde 1995 vem implementando uma série de medidas para melhorar os produtos fitoterápicos comercializados no país, principalmente nos centros urbanos. Para que um produto fitoterápico seja implementado, este deve atender a normas específicas de registro. Estas normas foram sendo aperfeiçoadas ao longo dos anos, seguindo a evolução científica e tecnológica do país (CARVALHO et al. 2012; MARTINS; BRANDÃO, 2006).

Devido ao crescente interesse nos produtos fitoterápicos, o Ministério da Saúde criou em 2008, a PNPMF, implementado no Sistema Único de Saúde (SUS) e mais recentemente divulgou uma Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (Renusus), que contém 71 plantas medicinais de interesse farmacológico (MARQUES, 2011).

Os programas de fitoterapia no Brasil buscam incentivar o conhecimento tradicional sobre as propriedades curativas de muitas plantas. Esses programas buscam a inserção de profissionais qualificados que irão ficar responsáveis desde o processo de cultivo e da produção do fitoterápico, até o diagnóstico da doença e prescrição destes produtos. (FRANCISCONI, 2014).

O objetivo da Política e do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) é garantir o acesso seguro da utilização de medicamentos fitoterápicos, ao mesmo tempo que promove a utilização sustentável da biodiversidade. Este programa visa ainda, aumentar as opções terapêuticas no Sistema Único de Saúde. Uma outra importante política que engloba a utilização de fitoterápicos é a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), que envolvem abordagens que buscam estimular os mecanismos naturais de prevenção de agravos e recuperação da saúde por meio de tecnologias eficazes e seguras (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014).

Visando o custo de desenvolvimento de produtos fitoterápicos, os países subdesenvolvidos, como o Brasil, oferecem terapias alternativas bastante promissora para a população, principalmente devido a vasta biodiversidade do país. Desde a década de 80, vários documentos vêm sendo elaborados a fim de enfatizar o uso de fitoterápicos na atenção básica no sistema de saúde pública (SANTOS et al, 2010).

3.2 Produtos tradicionais fitoterápicos (PTF)

Os produtos tradicionais fitoterápicos (PTF) são obtidos através do emprego, exclusivamente, de matérias-primas vegetais, onde a sua eficácia não foi comprovada através da realização de testes clínicos, e sim, somente, através de levantamentos de dados etnobotânicos. Os PTF possuirão alegações de uso permitidas apenas para doenças de baixa gravidade. Os “chás medicinais”, utilizados por determinadas populações para o tratamento de doenças, é considerado como um PTF (OLIVEIRA; ROPKE, 2016).

A utilização de chás, produzidos com partes de plantas medicinais, sempre foi empregada no combate e prevenção de certas doenças, que vão desde uma simples gripe até doenças crônicas, como o câncer e algumas cardiopatias. A utilização das plantas no tratamento de doenças é uma prática generalizada na medicina caseira, sendo resultado da agregação dos conhecimentos que surgiram ao longo dos anos, construídos nas antigas civilizações. Cerca de 80% da população brasileira utiliza produtos a base de ervas, para o tratamento de alguma desordem fisiológica. Esta prática apresenta influência da cultura africana, indígena e européia (CANTARELLI, 2012).

As terapias medicamentosas utilizadas convencionalmente, geralmente são acompanhadas de adjuvantes de origem natural. Erroneamente, a população que faz uso de plantas medicinais, na forma de chás, se deixam levar pela crença de que “o que vem da natureza não traz malefícios”, porém, a grande quantidade de compostos bioativos, podem ocasionar reações indesejáveis, colocando a saúde do consumidor em risco, sendo necessário cautela em seu uso, desde a escolha da planta e a parte utilizada, até o modo de preparo dos chás (SILVA; HAHN, 2011).

O modo de preparo, assim como também a quantidade de material utilizado na preparação, e o tempo de fervura, diferem de uma planta para outra. Dependendo da indicação do uso, a forma como a planta medicinal será administrada também mudará, tudo isso com o objetivo de alcançar esquemas terapêuticos benéficos ao consumidor (BRAGA, 2011).

Para algumas espécies que são classificadas como PTF, já foram padronizadas diversas informações, como as vias de administração permitidas, listas de doenças graves que não podem ser informadas para os mesmos, lista de espécies vegetais que não podem ser utilizadas por possuírem risco tóxico conhecido e uma lista de referências que podem ser utilizadas para comprovação de tradicionalidade de uso. Porém, para que novas substâncias sejam enquadradas como produto tradicional farmacêutico, está deve se adequar as exigências estabelecidas pela resolução nº 26/2014.

3.3 Metabolismo secundário de plantas medicinais

O metabolismo é definido como o conjunto total das transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre nas células vivas, suprindo o organismo de energia. Essas rotas metabólicas são utilizadas pelas plantas para aproveitar nutrientes e suprimir as exigências energéticas das células (PEREIRA; CARDODO, 2012).

As plantas possuem dois tipos de metabolismo; o metabolismo primário e o metabolismo secundário. O metabolismo primário é aquele que é dedicado a suprir necessidades básicas da planta, como síntese de celulose e açúcares, sendo primordiais a sobrevivência da mesma. Os metabólitos secundários são biomoléculas sintetizadas pelas plantas, que exercem a função de proteção contra predadores. Alguns conferem características fenotípicas, como cor, odor e sabor. Colaboram com a adaptação ao meio e a propagação da espécie vegetal (ASSUNÇÃO, 2017).

O estudo da influência do meio ambiente na produção dos metabólitos secundários é uma etapa preliminar importante que antecede a produção de um produto fitoterápico. Fatores sazonais, como temperatura e precipitação, condições do solo e do próprio vegetal possuem forte influência na atividade farmacológica final de uma determinada planta medicinal (SAMPAIO, 2010), devido a transformações em suas estruturas, causando diferentes efeitos, prejudiciais ou benéficos, dependendo do seu tipo, grupo funcional, propriedade química e concentração no meio que está atuando (SILVA, 2012).

O alto valor terapêutico observado devido a utilização de plantas medicinais tem chamado a atenção dos pesquisadores que buscam novos metabólitos secundários para o desenvolvimento de novos medicamentos. Os produtos de origem natural têm demonstrado seu enorme potencial como fontes de compostos bioativos com atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, antiespasmódica, antimicrobiana, cicatrizante, antitumoral, antidiabética e contra dislipidemias, dentre outras (MARQUES et al. 2011).

Alguns fatores externos irão influenciar no aumento ou diminuição dos metabólitos farmacologicamente ativos. É fundamental definir parâmetros para coleta, ou até mesmo qual a parte da planta que será utilizada, com a finalidade de se otimizar o processo extrativo e reduzir custos na produção do novo medicamento (CZELUSNIAK et al. 2012).

Cada espécie responde de forma diferente a estímulos externos, provenientes do meio ambiente, dentre estes a luminosidade. Além disto, a variabilidade genética assim como o tipo de fotossíntese realizado pela planta irá determinar a concentração de metabólitos ativos. Trabalhos realizados sob proteção do excesso de irradiação solar, tem sido desenvolvidos a

fim de aumentar a produtividade do composto de interesse comercial (MEIRA; MARTINS; MANGANOTTI, 2012).

O horário em que a coleta da planta vai ocorrer precisa ser adequado ao tipo de vegetal e a parte que irá se utilizar. Por exemplo, a extração de óleos essenciais das plantas devem ocorrer em horários de temperaturas baixas, no qual ocorra a menor evaporação possível do produto, sendo necessário um melhor conhecimento dos fatores que afetam a produção de óleos essenciais (SOUZA et al. 2011).

Dentre os biomas existentes no Brasil, a caatinga, bioma exclusivamente brasileiro, tem chamado atenção dos pesquisadores, que concentram suas pesquisas em torno dos metabólitos secundários produzidos por algumas espécies endêmicas dessa região. Esses compostos são altamente bioativos, e muitos medicamentos têm como origem moléculas orgânicas procedentes dessas substâncias (VIANA, 2015).

3.4 Família Apocynaceae

A família Apocynaceae compreende cerca de 1500 espécies, com cerca de 424 gêneros. Estão distribuídas nos trópicos e subtropicais, sendo menos frequentes nas regiões temperadas. Cerca de 32 gêneros dessa família, são encontrados na floresta amazônica (AQUINO, 2010). Apresentam grande variabilidade morfológica em seus órgãos florais, apresentando vasos lactíferos, onde os produtos do seu metabolismo são utilizados devido às suas propriedades farmacológicas (SANTOS, 2016).

Dentre os gêneros com maior número de espécies estão a *Aspidosperma* com 20 registros, seguidas de *Himatanthus* com nove e *Rauvolfia* com seis registros. De acordo com dados etnobotânicos, as plantas dessa família podem ser utilizadas com diversas finalidades, onde a parte mais utilizada desses vegetais são as cascas (SANTOS et al. 2013).

As árvores possuem porte regular, que podem atingir em média uma altura entre 7 e 8 metros. As folhas possuem um formato oval e suas flores são de cor clara, o fruto possui uma coloração castanho-clara, com pequenas verrugas de cor cinza, que comporta cerca de 5 sementes, sendo a dispersão feita através do vento. A madeira possui uma cor clara, moderadamente pesada e é considerada bastante resistente (VIANA, 2015).

Destaca-se a importância desta família como fonte de moléculas bioativas com utilidade na medicina moderna. Várias substâncias foram isoladas do gênero *Aspidosperma* abrangendo moléculas com atividade farmacológicas distintas. Os alcalóides estão presentes

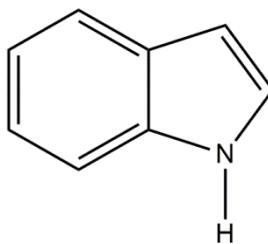
nesta família em grande quantidade, sendo a classe de metabólitos mais abrangente, onde muitos destes possuem grande aplicação na medicina atual. (AÑES, 2009).

3.4.1 *Aspydosperma* sp

Em 1951, o gênero sofreu uma revisão sistemática, haja vista que espécies distintas vinham sendo classificadas com o mesmo nome. Esta revisão agrupou 52 espécies, entretanto, ainda existiam controvérsias quanto ao número exato de espécies que constituíam este gênero. Em 1987 Bolzani propôs uma nova classificação das espécies deste gênero, compreendendo 48 espécies em oito séries: Rígida, Nitida, Quebrachines, Polyneura, Pyricolla, Nobile, Macrocarpa e Tomentosa, levando em consideração os aspectos quimiotaxonômicos (OLIVEIRA et al. 2009).

As espécies do gênero *Aspidosperma* são caracterizadas quimicamente pela ocorrência de alcalóides indólicos monoterpênicos. Esta classe de alcalóide é conhecida pela presença de derivados do triptofano, o qual possuem um núcleo indólico (figura 1), responsável por promover alterações fisiológicas relevantes e potentes casos de intoxicações, sendo considerada uma das espécies mais tóxicas da caatinga (GOMES, 2011; AQUINO; FALCÃO; ALMEIDA-CORTEZ, 2017).

Figura 1 - Núcleo indólico



Fonte: Próprio Autor, 2018.

É atribuído aos alcalóides indólicos presentes no gênero *Aspidosperma*, uma larga aplicação terapêutica, despertando nos pesquisadores, a necessidade de uma investigação mais apurada da correlação entre as atividades terapêuticas, com a sua presença neste gênero (OLIVEIRA et al. 2009).

A presença de compostos nitrogenados, como a aspidrofractina, 15-demetoxipirifolina e 15-formilaspidofractin, obtidos do extrato da casca do caule de *Aspidosperma pyrifolium* mostraram-se eficientes sobre a mortalidade de larvas de *Plutella xylostella* (SANTOS, 2017). Trindade *et al.* (2008a) relataram resultados significativos com o uso dos extratos etanólicos

da casca, do caule, do fruto e da raiz de *A. pyrifolium* sobre larvas de *Plutella xylostella* e ainda Torres (2006) demonstrou o potencial larvicida do extrato aquoso da casca do caule de *A. pyrifolium* sobre esse mesmo inseto. Trindade *et al.* (2016) relataram o eficiente efeito ovicida sobre *Diatraea saccharalis* tratadas com extrato etanólico da casca do caule de *A. pyrifolium*, e ação repelente sobre o parasitoide *Trichogramma galloi* tratadas com este mesmo extrato.

O gênero *Aspidosperma subincanum*, conhecido popularmente como guatambú, utilizado na região de Goiás-GO por diversos raizeiros devido as suas atividades antidiabéticas e no tratamento da hipercolesterolemia. Estudos conseguiram elucidar a estrutura de alguns alcalóides indólicos, tais como, Matidina, Elipticina, Olivacina, N-Metilolivacina, 3,4-Diidrolivacina, 1,2-Diidropiridocarbazol, 1,2-Diidrolipticina, Subincanina, (+)-Uleína, 3-epi-Uleína, Dês-N-Metiluleína (BERNARDES, 2012).

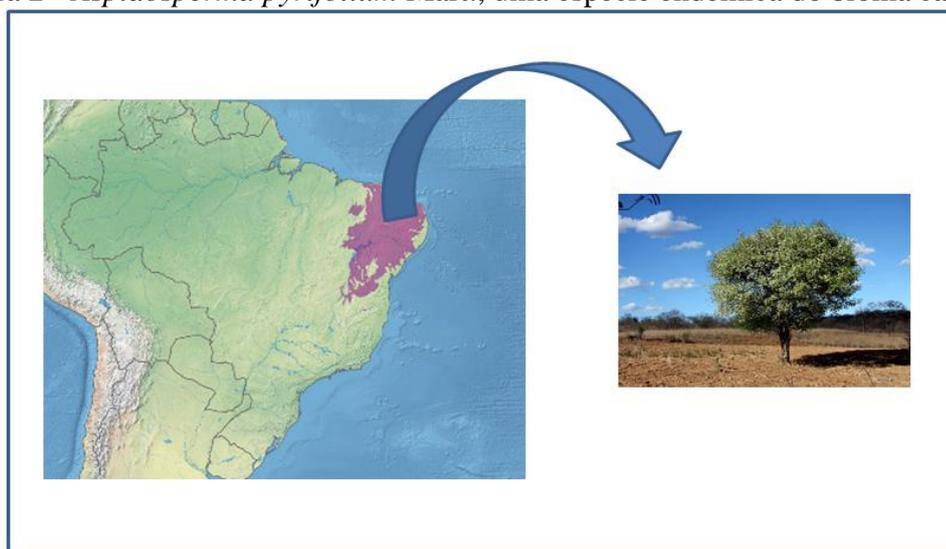
Na *Aspidosperma vargasii*, foram isoladas substâncias do grupo das olivacinas e elipticinas, estas por sua vez, apresentam uma promissora atividade citotóxica frente a diferentes linhagens de células tumorais, com efeitos colaterais reduzidos e ausência de efeitos hematológicos (MONTAIA, 2013).

A *Aspidosperma marcgravianum* Woodson (Apocynaceae) é conhecida popularmente como carapanaúba. Na região do amazônas, o infuso de suas cascas é utilizado para tratar malária, diabetes, disfunções intestinais, inflamações do útero e do ovário, contra câncer, e como contraceptivo. Dentre os seus constituintes, encontram-se alcalóides do tipo indólico (VILHENA, 2012).

3.4.2 *Aspidosperma pyrifolium* Mart.

O gênero *Aspidosperma pyrifolium* Mart. é encontrado entre a Argentina e o México. No Brasil, é conhecida popularmente por Pereiro, sendo encontrada principalmente no semiárido nordestino (figura 2). Toda a planta é marcada por um sabor amargo intenso. Essa característica organoléptica facilita o seu reconhecimento em períodos secos, totalmente desfolhadas e sem frutos (LINS, 2016).

Figura 2 - *Aspidosperma pyrifolium* Mart., uma espécie endêmica do bioma caatinga



Fonte: Adaptação de (www.mundoeducacao.bol.uol.com.br/geografia/caatinga.htm)

O pereiro possui várias utilizações, além da utilização de sua madeira para serviços de carpintaria, é utilizada para fazer carvão, cercas e lenha. Pode servir como planta ornamental, por ser uma árvore de pequeno porte, e pela beleza da sua copa, sendo empregada também, no paisagismo de diversos lugares. É bastante utilizada na recuperação de áreas degradadas, inclusive em matas ciliares. Devido sua importância ecológica e adaptação às mais severas condições de seca e solos rasos ou pedregosos, é uma das poucas espécies indicadas para a recuperação de áreas em processo de desertificação (COSTA, 2015).

É utilizada na medicina popular, devido as suas propriedades anti-inflamatórias, principalmente no trato genito-urinário, algumas dermatites, dor de estômago, cólicas, coceiras e diarréias. Possui ainda, propriedades sedativas, uma vez que, os alcaloides indólicos agem, provavelmente, sobre os receptores opiáceos, GABAérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos (VIANA 2015; LINS, 2016). Na medicina popular, infusões das cascas do gênero *Aspidosperma pyrifolium*, são comumente utilizadas no tratamento de várias enfermidades, como leishshmaniose, febre, tratamento do câncer e reumatismo (MONTIOIA, 2013).

Vários alcalóides foram isolados da espécie *Aspidosperma pyrifolium*, encontradas nas regiões da Bolívia. Dentre eles estão: (-)-vincadiformina, O-demetilpalosina, haplocina, formilaspidospermina, acuamicina e tubotaivina. Destacando-se a aspidospermina, uma substância com atividade antagonista dos receptores adrenérgicos, sobre os tecidos urogenitais, sendo utilizada no tratamento de hiperplasia prostática benigna (HPB) e disfunção erétil (LIMA, 2015).

3.5 Técnicas analíticas utilizadas na caracterização de plantas medicinais

O controle de qualidade de produtos naturais difere para cada matéria-prima. No caso da droga vegetal, são exigidos testes específicos, como por exemplo, identidade botânica, aspectos organolépticos, umidade, cinzas, presença de material estranho como, micro e macros contaminantes, incluindo fungos, bactérias, micotoxinas e metais pesados. Deve ser ainda informado o local de coleta, análises qualitativas e quantitativas dos biomarcadores (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015).

Uma das etapas de desenvolvimento de um fitoterápico consiste no emprego de metodologias analíticas para quantificação e controle dos marcadores químicos e farmacológicos, presentes tanto na matéria-prima vegetal quanto no produto intermediário e final. Esses métodos compreendem requisitos indispensáveis ao registro desses produtos no Brasil, tendo em vista que permitem a avaliação de sua qualidade, eficácia terapêutica e segurança (MARQUES et al., 2012).

A existência de inúmeros constituintes químicos dificulta o controle de qualidade dos fitoterápicos, havendo variações entre os lotes de um mesmo medicamento. Além da dificuldade na caracterização de todas as substâncias presentes, um outro problema é a impossibilidade de distinguir qual substância está sendo responsável pela atividade farmacológica (LEAL, 2010).

A indústria de medicamentos fitoterápicos, busca padronizar a quantidade e a forma certa que estes produtos devem ser usados, ausência de contaminações por microorganismos, agrotóxicos e substâncias estranhas, além de garantir a sua qualidade e os seus efeitos terapêuticos. A incorporação de matérias-primas fraudulentas pode ocorrer através de ingredientes sem nenhuma atividade terapêutica (NUNES, 2014).

A *Association of Official Analytical Chemists* define como materiais estranhos, quaisquer material estranho no produto associados a condições ou práticas inadequadas na produção, armazenamento ou distribuição, podendo ser citados como exemplos, areia, solo, vidro, ferrugem, ou outras substâncias. Podendo haver, também, a adição de substâncias com o intuito de mascarar sabores, como a adição do açúcar. A RDC nº 175 de 8 de julho de 2003, define dois tipos de contaminantes, os materiais macroscópicos, sendo aqueles que podem ser detectados por observação direta (olho nu) sem auxílio de instrumentos ópticos e os materiais microscópicos, sendo aqueles que são detectados com auxílio de instrumentos ópticos (SANTOS, 2012).

Alguns métodos de controle de qualidade de algumas plantas medicinais, já validados, estão presentes em compêndios oficiais, como por exemplo, na Farmacopéia dos Estados Unidos, e Farmacopéia Brasileira, que por sua vez, inclui 44 monografias de plantas medicinais na sua maioria não nativas do Brasil. Em 2004, a Resolução nº 48, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e, entre outros pontos, abrange as etapas de controle de qualidade da droga vegetal, do produto acabado e da importação de produtos fitoterápicos, foi aprovada (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

As técnicas analíticas que estão disponíveis atualmente permitem avaliar a qualidade dos constituintes químicos, de forma a garantir a sua identificação, constância e segurança na sua utilização. A avaliação quantitativa e qualitativa envolve a utilização de diversas técnicas, que sofreram alterações ao longo dos anos, principalmente devido aos avanços tecnológicos ocorridos no mundo (ASSUNÇÃO, 2018).

3.5.1 *Técnicas termoanalíticas*

A análise térmica abrange um conjunto de técnicas nas quais uma propriedade física é medida enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de temperatura. Recentemente, a *Confederation of Thermal Analysis and Calorimetry* (ICTAC), estabeleceu um novo conceito, no qual afirma que “Análise Térmica (TA) é o estudo das relações entre uma propriedade da amostra e sua temperatura, enquanto a amostra é aquecida ou resfriada de maneira controlada” (NETO, 2013).

As várias aplicações torna a análise térmica aplicável em vários domínios científicos e tecnológicos, principalmente nas áreas de Ciências Naturais, como: Química, Geociências, e Ciências Biológicas (BANNACH et al. 2011).

Tais técnicas permitem obter informações a respeito da variação de massa, estabilidade térmica, grau de hidratação, pureza, temperaturas de sublimação, temperatura de fusão e ebulição, calor específico, diagramas de fase, cinética de reação, investigações catalíticas, transição vítrea, etc. As mais utilizadas são: termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) (RDRIGUES, 2015).

De acordo com Paula et al. (2014), as técnicas termoanalíticas podem ser utilizadas na síntese de novas substâncias, uma vez que, durante o aquecimento das amostras, pode haver a formação de produtos intermediários. Para uma técnica ser considerada termoanalítica, ela deve obedecer a alguns critérios:

- ✓ Uma propriedade física deve ser medida.

- ✓ Essa medida deve ser expressa, direta ou indiretamente, em função da temperatura ou do tempo.
- ✓ Deve ser utilizado, na análise, um programa de temperatura controlado.

3.5.2 Termogravimetria (TG)

A termogravimetria é uma técnica em que a perda ou ganho de massa de uma amostra é medida como função da temperatura ou do tempo enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. A termobalança permite a realização da análise termogravimétrica sob as mais variadas condições experimentais (MORAIS, 2011).

A TG é utilizada para medir a variação de massa em função da temperatura em uma atmosfera controlada sob um programa de aquecimento. Para fins farmacêuticos, seu uso é descrito na caracterização, determinação de pureza e de umidade, identificação de pseudopolimorfismo, na avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos e em estudos de cinética de degradação (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

As análises termogravimétricas podem ser conduzidas de duas formas, isotérmicas e não-isotérmicas. As análises isotérmicas no qual o material é aquecido até uma determinada temperatura, permanecendo por um determinado tempo, sendo possível obter medidas de tempo e perdas de massas. Já as análises não-isotérmicas ou dinâmicas, as amostras são submetidas a um programa controlado de temperatura constante, para obtenção de dados de perda de massa, tempo e temperatura (CHEN et al., 2012).

Os modelos dinâmicos tem atraído muita atenção, uma vez que possui a capacidade de investigar uma gama de temperaturas de forma eficiente. Para esta metodologia, são empregadas termobalanças modernas, garantindo que nenhuma das temperaturas sejam omitidas. Uma das desvantagens é a grande sensibilidade á ruídos, diminuindo a confiabilidade dos parâmetros cinéticos empregados (WHITE et al. 2011).

A primeira termobalança foi construída em 1915, pelo professor Kotaro Honda. As termobalanças atuais, são constituídas por um forno, com temperatura controlada, um sensor de temperatura, denominado termopar, uma balança de alta precisão, capaz de detectar pequenas quantidades de massas, e um sistema controlador, que registre todo o processo (FERNANDES, 2014).

Fatores relacionados tanto a amostra quanto ao instrumento utilizado na análise, podem influenciar nas curvas TG. Os fatores instrumentais que afetam significativamente as análises termogravimétricas são: razão de aquecimento do forno, atmosfera do forno,

geometria do suporte de amostras e do forno. Já os fatores relacionados as características da amostra pode-se citar: tamanho de partículas, quantidade de amostra, solubilidade dos gases liberados, calor de reação, natureza da amostra e condutividade térmica da amostra. Por estas razões, o analista precisa se deter a todos os detalhes, com a finalidade de se obter curvas robustas (MENDONÇA et al., 2014).

3.5.3 *Análise térmica diferencial (DTA)*

A DTA é uma técnica na qual é medida a diferença de temperatura entre a amostra e uma substância de referência (inerte), quando ambas são submetidas a um programa controlado de temperatura. Mudanças da temperatura da amostra são ocasionadas pelas transições ou reações entálpicas (endotérmica ou exotérmica) devido a mudanças de fase, fusão, vaporização, reações de desidratação, oxidação, reações de redução entre outras. Durante as variações físico-químicas, as mudanças de temperaturas são detectadas utilizando o método diferencial (MOTHÉ; LEITE; MOTHÉ, 2008).

Uma curva típica de DTA mostra diferentes tipos de transições. Reações de transição de segunda ordem, detectada pela mudança horizontal na linha de base, pico endotérmico (causado pela fusão ou transição da fusão) e picos exotérmicos (devido à reações de decomposição). Como a área do pico é proporcional à mudança de calor envolvido, a técnica pode também ser útil para determinar o valor do calor de reação (MOTHÉ, 2009).

As técnicas TG e DTA podem ser realizadas no mesmo equipamento, sendo possível obter curvas simultâneas das duas técnicas. Uma técnica é dita simultânea, quando duas técnicas são aplicadas ao mesmo tempo sob uma mesma amostra (PEREIRA, 2013).

3.5.4 *Estudo cinético por termogravimetria*

As técnicas termogravimétricas estão sendo largamente utilizadas na obtenção de estudos cinéticos, principalmente na área farmacêutica. O conhecimento da cinética e do provável mecanismo de decomposição térmica de sólidos, bem como sua energia de ativação, constitui-se uma ferramenta importante na determinação de parâmetros cinéticos (PAULA, 2014).

As substâncias quando são submetidas a algum tratamento térmico sofrem transformações químicas ou físicas (fusão, recristalização, decomposição). Na maioria das vezes, estas transformações podem ocorrer abaixo do ponto de fusão. Alguns materiais

apresentam estabilidade térmica, quando submetidos a um determinado estresse térmico. A estabilidade térmica necessita ser considerada em termos do ambiente imposto ao material e das funções que ele deve executar (ZANATTA, 2012).

Arrhenius sugeriu que para uma determinada reação ocorra, as moléculas reagentes precisam ser ativadas. Assim a energia de ativação representa a energia que as moléculas têm que adquirir para ser capaz de desenvolver a reação, sendo que o aumento na temperatura eleva a ativação das moléculas. O principal objetivo da modelagem da cinética é obter os parâmetros cinéticos: energia de ativação (Ea), fator pré-exponencial (A) ou fator de frequência e o mecanismo de reação, $f(\alpha)$, os quais podem incluir outros parâmetros, como a ordem de reação (n), representados na equação 1 (NAVARRO, 2015):

$$k T = A \exp \frac{-Ea}{RT} \quad (1)$$

Onde: $k(T)$ é a constante de velocidade da reação.

A definição da constituição do mecanismo de reações da decomposição térmica dos elementos sólidos se faz necessário, pois estes necessitam de tais informações para que sejam usados apropriadamente na indústria, nos materiais da construção civil, nos óxidos catalisadores e em metais de alto grau de pureza. Assim, é necessário classificar os processos para adequar os meios e os mecanismos que podem ser utilizados durante o processo de transformação. As transformações que ocorrem em materiais no estado sólido são realizados por meio da solução de equações (MANOZZO, 2016).

A técnica da termogravimetria pode ser realizada de três formas: isotérmica, parcialmente isotérmica e não-isotérmica. A análise não-isotérmica apresenta vantagem sobre as outras metodologias, pois as análises isotérmicas apresentam uma rampa de aquecimento no início do experimento, além disso no caso de processos que envolvem reações exotérmicas é difícil manter a temperatura constante (LOPES, 2016).

Os modelos isoconversionais utilizam uma abordagem integral ou diferencial na determinação dos parâmetros cinéticos. Na utilização de modelos integrais, os erros são mais frequentes, principalmente os que estão relacionados a aproximações sucessivas, sendo necessária a utilização de valores integrais de temperatura. Os métodos diferenciais não utilizam valores integrais de temperatura, onde os parâmetros cinéticos são calculados diretamente. A desvantagem do método diferencial é a sua susceptibilidade a ruídos (WHITE et al., 2011; CARVALHO, 2016).

Os métodos de modelos livres não-isotérmicos (“*model free*”), também são empregados no cálculo de parâmetros cinéticos das reações. Podemos citar o método de Flynn-Wall-Osawa e o de Kissinger-Akira-Sunose, que exigem um conjunto de testes experimentais como diferentes taxas de aquecimento, permitindo determinar os parâmetros cinéticos sem conhecer os mecanismos de reação (FERREIRA, 2012).

O método de Flynn-Wall-Ozawa (FWO) é um método de isoconversão, baseado no modelo livre (“*model free*”), relativamente simples e permite determinar a energia de ativação a partir dos dados termogravimétricos não-isotérmicos obtidos em diferentes razões de aquecimento, sem um conhecimento prévio da fração de conversão de massa e do fator de frequência (FERREIRA, 2012; NUNES, 2013).

Kissinger em 1957 adotou como técnica, integrar uma sucessão de partes o que gera uma equação que representa a temperatura máxima que indica a taxa de perda de massa. Desta forma, pode-se determinar a energia de ativação quando atinge o ponto máximo e a sua taxa de reação conforme decorre das diferentes temperaturas. Esse método possui como vantagens não apresentar limites no número de etapas (MANOZZO, 2016).

A decomposição térmica de uma determinada substância dependerá de sua constituição e estrutura, assim como também das condições do ambiente o qual estará inserida, como: temperatura, taxa de aquecimento, pressão, tamanho da partícula, atmosfera gasosa e presença de cinzas e minerais. A atmosfera gasosa empregada no sistema pode ter impacto significativo no comportamento da decomposição térmica. Normalmente, as atmosferas gasosas mais empregadas na termogravimetria são as inertes e as oxidantes. Os gases mais utilizados para atmosfera inerte são: nitrogênio (N₂) e hélio (He), e para os meios oxidantes são: oxigênio (O₂) e vapor d’água (WHITE *et al.*, 2011; BARONI, 2015).

Para que ocorra uma melhor transferência de calor e massa é preciso garantir que estes não influenciem na cinética da decomposição, sendo indicadas na literatura taxas de aquecimento menores que 20 °C min⁻¹ e empregadas no mínimo três taxas de aquecimento (VYAZOVKIN *et al.*, 2014).

O tamanho da partícula apresenta grande influência nos processos de transferência de calor, sendo, portanto, um importante parâmetro a ser controlado. Para obter aquecimentos rápidos e evitar gradientes de temperaturas entre a superfície e o centro da partícula é apropriado trabalhar com partículas pequenas (VAN DE VELDEN *et al.*, 2010).

3.6 Técnicas espectroscópicas

3.6.1 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)

Em 1800, o astrônomo alemão Frederick William Herschel, ao estudar a relação entre as cores do espectro e o calor produzido, utilizando um termômetro, descobriu os primeiros sinais de absorção na região do infravermelho. Herschel postulou uma banda visível de luz pertencente ao vermelho, ao qual denominou de infravermelho, sendo posteriormente denominada de infravermelho próximo (Near Infrared – NIR) (BREITKREITZ, 2013).

A espectroscopia na região do infravermelho, representa uma ferramenta de inestimável valor para a implementação de rotinas de análise, em função de características como baixo custo, tanto instrumental quanto operacional, rapidez e não necessidade de operações de abertura e solubilização de amostras. Por estes motivos, métodos fundamentados em espectroscopia no infravermelho tornam-se populares na indústria e na pesquisa, crescendo substancialmente como técnica de controle de qualidade na indústria farmacêutica (MALUF et al., 2010). Para as regiões que compreendem o NIR, pode-se utilizar amostras nos mais diversos estados (gases, sólidos, líquidos, sistemas binários e terciários, amostras semi-sólidas, etc) para se analisar, não sendo gerados sub-produtos tóxicos durante todo o procedimento (NETO, 2012).

A radiação na região do infravermelho próximo, está compreendida entre 12.800 a 4.000 cm^{-1} , possuindo as mesmas propriedades da luz visível, porém não pode ser percebida pela visão humana. A espectroscopia consiste num método analítico, no qual se podem estudar as interações de radiações eletromagnéticas com as moléculas. A interação entre dois átomos nas moléculas, correspondem a diferentes tipos de energias. Para que tenha absorção no infravermelho, as moléculas necessitam ser diatômicas, heteronucleadas ou poliatômicas para poderem ser excitadas vibracionalmente e para que se verifique alteração do seu momento dipolar (LEITÃO, 2012).

Nos últimos anos, o emprego da análise no infravermelho próximo ganhou ampla aceitação na indústria farmacêutica. Para garantir a identidade de cada recipiente, é possível utilizar-se das vantagens da técnica espectroscópica de infravermelho próximo, como rapidez e identificação não destrutiva, sem a necessidade de amostragem, podendo identificar a matéria-prima diretamente na sua embalagem de origem, através da utilização da sonda de fibra óptica (AMORIM; KLIER; ANGELIS, 2013).

Os espectros originados na espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) são complexos e apresentam sobreposições e bandas de combinações, não sendo possível uma interpretação direta dos mesmos, a fim de ser possível determinar uma propriedade da amostra. Para isto, é necessário medir a intensidade do sinal em vários comprimentos de onda para construir uma calibração. Os dados são interpretados utilizando modelos matemáticos e estatísticos a fim de se construir uma calibração multivariada dos dados (LEITÃO, 2012).

A espectroscopia na região do NIR destaca-se atualmente como uma das técnicas mais importantes na análise de *fingerprintings* de misturas complexas. Tal técnica produz uma grande quantidade de informação, muitas vezes complexas e variadas, tornando a quimiometria indispensável para a análise de dados químicos de natureza multivariada (HATANAKA, 2015).

Os espectros no NIR são obtidos utilizando, basicamente, cinco componentes: uma fonte de radiação contínua, um seletor de comprimento de onda (monocromador), um local adequado para colocar a amostra (porta amostras), um conversor de energia luminosa em energia elétrica e um detector para captar a resposta (detector) (NETO, 2012).

3.7 Ferramentas quimiométricas

As análises de substâncias, nos mais variados ramos da ciência, geram um grande número de informações, na maioria das vezes, em um curto espaço de tempo. A partir destas informações, são construídas matrizes de modelos de calibração multivariadas, que serão tratadas por ferramentas quimiométricas, para extrair o máximo de informações possíveis (SANTANA, 2015).

As análises quantitativas realizadas por metodologias convencionais, como: titulação, precipitação e reações específicas, desprendem um tempo maior na sua realização assim como também um elevado consumo de reagentes, sendo na maioria das vezes pouco precisas e exatas, sendo gradativamente substituídas por técnicas instrumentais modernas, tais como: ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia vibracional (infravermelho próximo, médio), espectrometria de massas, cromatografia, etc. Tais técnicas geram um grande número de sinais, podendo ser interpretados através de relações matemáticas (TERRA, 2013).

Quando nos deparamos com um grande volume de dados, uma análise estatística faz-se necessária para reduzir a quantidade de variáveis, agrupando e comprimindo os dados, restando a informação química, facilitando assim a interpretação pelo analista. Essa é uma das tarefas da análise multivariada dos dados. Quando os dados são relacionados com

características químicas de uma determinada amostra, está também pode ser denominada de quimiometria (KAZMIRCZAK, 2016).

Os estudos em quimiometria desenvolvidos no Brasil podem ser utilizados com finalidades distintas, como por exemplo: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória e classificação) e calibração multivariada (CAUDURO et al., 2017).

A análise multivariada consiste na avaliação de dados analíticos de duas ou mais variáveis, simultaneamente. Essa área da quimiometria desenvolve ferramentas computacionais que permitem explorar os resultados obtidos por meio de análises químicas, a fim de verificar a existência de similaridades entre as amostras que, por sua vez, correspondem às semelhanças na composição (RIVERO, 2009).

Oliveira (2018) empregou a análise multivariada de dados para a quantificação de alcaloides minoritários em amostras de cocaína (base livre e cloridrato) utilizando derivatização e cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-DIC). A utilização da quimiometria possibilitou analisar diversas variáveis simultaneamente, permitindo a extração de uma quantidade maior de informações de agrupamento das amostras reais.

Schneider (2017) com a finalidade de realizar o controle de qualidade da erva-mate, utilizada devido a suas propriedades tônica, diurética, estimulante do sistema nervoso central, analgésica, dentre outras, fez uso de ferramentas quimiométricas, avaliando a presença de um dos principais adulterantes desta matéria-prima, que é a sacarose.

Com o auxílio da espectroscopia no NIR, as ferramentas quimiométricas são empregadas no tratamento dos dados, podendo ser utilizadas as técnicas de reconhecimento de padrões, sendo possível identificar as semelhanças e as diferenças das amostras, de acordo com o grau de similaridade entre suas propriedades químicas e físicas (MELO, 2013).

Os dados são representados por uma matriz, na qual as linhas representam as amostras e as colunas as variáveis. Podem-se empregar métodos de compressão da dimensionalidade como a análise por componentes principais (PCA), ou simplesmente calcular a distância n-dimensional entre cada linha da matriz (amostra), empregando-se o conceito de similaridade (HERBST JR.; MORTARI; MÜLLER, 2006).

3.7.1 Análise de componente principal (PCA)

A análise de componente principal (*Principal Component Analysis* - PCA) foi introduzida na química por Malinowski no final dos anos 1960, com o nome de Análise de Fatores, e a partir da década seguinte uma série de aplicações foi desenvolvida, o que a tornou muito conhecida e explorada. A análise de modelos multivariados, como a PCA, tem sido utilizado com frequência em diversos trabalhos reportados na literatura como ferramenta quimiométrica útil para extrair um maior número de informações (CARVALHO et al., 2015).

Quando aplicamos um algoritmo de PCA num conjunto de variáveis, como por exemplo, espectros no infravermelho, o conjunto original destas variáveis é substituído por um novo conjunto de variáveis denominado de Componentes Principais (CPs). A principal característica deste novo conjunto é a ortogonalidade, não havendo correlação entre as variáveis (ROBOTTI; MARENGO, 2016).

Através desta ferramenta quimiométrica, é possível avaliar quais variáveis são importantes no espaço das componentes principais (CPs), descartando as informações redundantes e agrupando as variáveis que estão mais correlacionadas, melhorando a visualização estatística dos resultados. Este método se baseia na análise de dados visando à sua redução, por meio de escolhas mais representativas a partir de combinações lineares das variáveis originais (INÁCIO, 2010; CARNEIRO, 2013).

Ao aplicar a técnica de reconhecimento de padrão não supervisionado (PCA), a matriz original (X) é decomposta em três matrizes, sendo estas: a matriz de *scores* (T), matriz transposta de *loadings* (P^t), e matriz de resíduos não explicados pelo modelo (E). O gráfico de *scores* apresenta as coordenadas das amostras dadas pelas PCs, permitindo reconhecer padrões através do agrupamento de amostras próximas ou distantes entre si. No gráfico de *loadings* se observa os pesos das variáveis originais na separação entre os grupos de amostras representadas pelo gráfico de scores (LOURENÇO, 2017).

A medida que uma componente é modelada, certa quantidade de informação permanece sem ser explicada, ou seja, uma quantidade de variância continua não descrita. A esta quantidade de variância não descrita chamamos de *resíduos* e podem ser organizados na forma da matriz dos resíduos (E). Normalmente, as últimas PCs modelam ruído inerente aos dados, sendo assim, a eliminação dessas CPs frequentemente aumentam a relação sinal/ruído. Um procedimento básico para melhorar a análise de modo a reduzir a dimensão dos dados é a escolha do número de componentes principais a serem utilizadas na descrição do sistema.

Para a determinação do número correto de CP o método mais utilizado consiste no método de Validação Cruzada (*Cross Validation*) (ARAÚJO, 2007).

3.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise de matrizes complexas, como as matérias-primas provenientes de plantas, pode ser demorada, devido ao grande número de compostos. Na tentativa de contornar estes problemas, a utilização de técnicas cromatográficas na separação de constituintes de matrizes vegetais, vem sendo empregadas. A cromatografia líquida de alta eficiência, vem se tornando tendência mundial, devido a sua eficiência na separação de analitos (FREITAS, 2014).

A CLAE é comumente empregada na análise dos constituintes químicos de plantas medicinais, permitindo a obtenção de cromatogramas e *fingerprints*. Um *fingerprint* é caracterizado por toda a constituição química do vegetal (impressão digital), sendo obtido por várias técnicas analíticas de separação (CABRAL, 2010). Estas análises são reconhecidas mundialmente por instituições como a *Food and Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA), onde inúmeros estudos realizados, já comprovaram a utilidade desta técnica (MARTINS; PEREIRA-FILHO; CASS, 2008).

Juntamente com as análises qualitativas, se torna necessário a investigação dos marcadores quimiotaxonômicas presentes nas espécies vegetais. Estes marcadores são constituídos de pequenas moléculas que apresentam a rota metabólica inerente a uma determinada espécie, interferindo diretamente na quantidade de metabólitos secundários, sendo estes, os principais responsáveis pela atividade biológica (ALVARENGA et al. 2009).

3.9 Validação de métodos analíticos

O desenvolvimento de um novo método analítico ou a adaptação ou aplicação de um método conhecido envolve um processo de avaliação que garanta a sua eficiência no uso de rotinas laboratoriais. O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) define validação como a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico foram atendidos (ARAGÃO et al., 2009).

A Resolução de nº 166, de junho de 2017 da Diretoria Colegiada (RDC), estabelece que:

Art. 5º A utilização de método analítico não descrito em compêndio oficial reconhecido pela Anvisa requer a realização de uma validação analítica, conforme parâmetros estabelecidos nesta resolução, levando-se em consideração as condições técnico-operacionais (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

No Brasil e em diversos países, para que um medicamento seja registrado, a validação documentada da metodologia analítica é exigida pelos órgãos regulatórios das indústrias farmacêuticas. Existem legislações e guias estabelecidos por estes órgãos regulatórios que servem para direcionar procedimentos e métodos adotados no processo de validação (CAMPOS, 2017).

O processo de validação pode ser realizado de três maneiras: através da validação prospectiva, retrospectiva e concorrente. A validação prospectiva é executada visando à produção de um processo ou produto novo, a partir de uma escala piloto. A validação prospectiva caracteriza-se pela análise estatística dos dados analíticos provenientes de lotes de um determinado produto já estabelecido, avaliando se o mesmo encontra-se dentro dos limites de qualidade. A validação concorrente avalia aspectos dos dois processos citados anteriormente. A revalidação é realizada sempre que se desconfia da qualidade de um determinado produto (HILGERT, 2009).

Durante o processo de validação, devem ser estabelecidos quais os parâmetros serão analisados para avaliar a adequabilidade do método escolhido. De acordo com a RDC nº 166, de junho de 2017, dentre os parâmetros utilizados na validação, podem-se citar: a seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

- ✓ Seletividade - capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas.
- ✓ Linearidade - capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra.
- ✓ Precisão - proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade.
- ✓ Exatidão - A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro.

- ✓ Limite de detecção - deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.
- ✓ Limite de quantificação - é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.
- ✓ Robustez - é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução ANVISA n. 10, de 9 de março de 2010**. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 11 de março de 2010.

ALVARENGA, F. Q.; MOTA, B. C. F.; LEITE, M. N.; FONSECA, J. M. S.; OLIVEIRA, D. A.; ROYO, V. A.; SILVA, M. L. A.; ESPERANDIM, V.; BORGES, A.; LAURENTIZ, R. S. In vivo analgesic activity, toxicity and phytochemical screening of the hydroalcoholic extract from the leaves of *Psidium cattleianum* Sabine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 280–284, 2013.

ALVES, M. S. M. **Caracterização farmacognósticas, química, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação da Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verlt**. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pará. Belém. 2008.

ALVES, G. S. P.; POVH, J. A. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de Santa Rita, Ituiutaba – MG. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 231-242, 2013.

ALMEIDA, G. S.; BARBOSA, A. S.; SANTANA, M. Conhecimento e uso de plantas medicinais da cultura Afro-brasileira pelos moradores da comunidade da fazenda velha no município de Jequié-BA. **Veredas da História**, p. 27 - 39, 2012.

ALMEIDA, J. R. G. S.; GUIMARÃES, A. G.; SIQUEIRA, J. S.; SANTOS, M. R. V.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. *Amburana cearensis* – uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, v. 6, n. 11, 2010.

AMARANTE, C. B.; SILVA, J. C. F.; MÜLLER, R. C. S.; MÜLLER, A. H. Avaliação da composição mineral do chá da folha senescente de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae) por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 419-423, 2011.

AMOR, E.C.; QUANICO, J. P.; PEREZ, G.G. Analgesic activity of extracts of *Kyllinga monocephala*. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 7, p. 624 – 627, 2009.

AMORIM, S. R.; KLIER, A. H.; ANGELIS, L. H. Controle de qualidade na indústria farmacêutica: identificação de substâncias por espectroscopia no infravermelho. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 3, p. 234-242, 2013.

AÑEZ, R. B. S. **Análise morfoanatômica das folhas e casca de *Aspidosperma nitidum* Benth. e *Aspidosperma marcgravianum* Woodson (Apocynaceae) com abordagem farmacognóstica e etnofarmacológica.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Formulário Nacional da **Farmacopeia Brasileira**. 1º ed. Brasília, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 14, de 14 de março de 2013. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos de Origem Vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 7 mar 2013. Disponível em:<
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0014_14_03_2013.html>. Acesso em: 09 nov 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 4, de 18 de junho de 2014. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 jun 2014. Disponível em:<
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2501251/Guia%2Bfinal%2Bdicol%2B180614+%282%29.pdf/f400c535-e803-4911-9ef8-100c0c2bb3c6>. Acesso em: 09 nov 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 out 2006. Disponível em:<
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html>. Acesso em: 02 out 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 mai 2014. Disponível em:<

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf>. Acesso em: 02 out 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 166, de junho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 jul. 2017. Disponível em:< http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 02 out 2018.

AKERRETA, S.; CAVERO, R. Y.; LÓPEZ, V.; CALVO, M. I. Analyzing factors that influence the folk use and phytonomy of 18 medicinal plants in Navarra. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, London, v. 3, n. 16, 2007.

AQUINO, R. E.; FALCÃO, H. M.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S. Variação nas concentrações de compostos fenólicos e nas taxas de herbivoria em *Aspidosperma pyriforme* Mart. em áreas antropizadas de Caatinga. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 2, n. 1, p. 61-71, 2017.

AQUINO, A. B. **Avaliação do perfil antiinflamatório e antinociceptivo da casca do caule de *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (clae) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.

ARAUJO, T. P. **Emprego de espectroscopia no infravermelho e métodos quimiométricos para a análise direta de tetraciclinas em leite bovino**. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

ARRUDA, J. T.; APPROBATO, F. C.; MAIA, M. C. S.; SILVA, T. M.; APPROBATO, M. S. Efeito do extrato aquoso de camomila (*Chamomilla recutita* L.) na prenhez de ratas e no desenvolvimento dos filhotes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n.1, p. 66 - 71, 2013.

ASSUNÇÃO, I. L. M. **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de uma formulação semissólida com atividade antimicrobiana a partir do extrato seco de *schinopsis brasiliensis* Engler.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Estadual da Paraíba, 2017.

ASSUNÇÃO, G. V. **Caracterização química e avaliação da atividade lavircida frente ao *Aedes aegypti* do óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck (Laranja Doce).** Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

BANDEIRA, J. M.; BARBOSA, F. F.; BARBOSA, L. M. P.; RODRIGUES, I. C. S.; BACARIN, M. A.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 13, n. 2, p.157-164, 2011.

BANNACH, G.; PERPÉTUO, G. L.; CAVALHEIRO, E. T. G.; CAVALHEIRO, C. C. S.; ROCHA, R. R. Efeitos da história térmica nas propriedades do polímero pet: um experimento para ensino de análise térmica. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1825-1829, 2011.

BARONI, E. G. **Estudo cinético da pirólise do endocarpo de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G. Meyer) para obtenção de biocombustíveis.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

BERNARDES, M. J. C. **Efeito hipotensor de *Aspidosperma subincanum* Mart. em ratos e o seu mecanismo de vasodilatação em artérias isoladas.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012).

BORELLA, J. C.; MARINCEK, A.; RODRIGUES, M. S. Comparative evaluation of chemical composition of plant Extracts and drugs of *calendula officinalis* L. (Asteraceae) cultivated with variation of fertilization and mulching. **Visão Acadêmica**. v. 15, n. 1, 2014.

BRAGA, C. M. **Histórico da utilização de plantas medicinais.** Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Biologia à Distância). Universidade de Brasília e Universidade estadual de Goiás, Brasília, 2011.

BRANDÃO, D. O. **Desenvolvimento de uma formulação de uso intracanal com atividade antimicrobiana obtida a partir de uma planta do semiárido brasileiro.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

BREITKREITZ, M. C. **Desenvolvimento e caracterização de formulações de fármacos pouco solúveis em água empregando espectroscopia de imagem e quimiometria.** Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

CABRAL, E. C. **Utilização de técnica de fingerprinting por espectrometria de massas para a análise de extratos de produtos naturais.** 2010. 144 f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2010.

CAUDURO, V. H.; FORNASIER, F.; TEICHMANN, A.; COSTA, A. B.; Determinação do teor de etanol anidro em gasolina por calibração multivariada utilizando espectroscopia no infravermelho médio. **TECNO-LÓGICA**, v. 21, n. 2, p. 125-130, 2017.

CAMPOS, I. A. **Avalidação de método analítico de dissolução de microgrânulos gastrorresistentes de lansoprazol.** Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2017.

CANTARELLI, A. P. **Estudo da utilização de plantas medicinais pelos usuários do SUS e das práticas dos profissionais de saúde de doutor Maurício Cardoso em relação a fitoterapia.** Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Gestão em Saúde). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Três Passos, 2012.

CARVALHO, W. S. **Pirólise rápida do bagaço de sorgo sacarino: influência da temperatura, de aditivos e de catalisadores.** Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

CARVALHO, A. C. B.; BRANCO, P. F.; FERNANDES, L. A.; MARQUES, R. F. O.; CUNHA, S. C.; PERFEITO, J. P. S. Regulamentação brasileira em plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 7, n. 1, 2012.

CARVALHO, A.; C.; B.; GUTIÉRREZ, I.; E.; M. Uma nova classe de fitoterápicos na legislação brasileira: os produtos tradicionais. **Ifarma**, v. 25, n. 2, 2013.

CARVALHO, F. L. M.; LEMOS, V. P.; FILHO, D.; DANTAS, K. G. F. Avaliação da Qualidade das Águas Subterrâneas de Belém a partir de Parâmetros Físico-Químicos e Níveis de Elementos Traço Usando Análise Multivariada. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2221-2241, 2015.

CASTRO, R.J.A.; LEAL, P.C.; SAKATA, R.K. Pain Management in Burn Patients. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.63, n.1, p.149-158, 2013.

CHEN, D. Y.; ZHENG, Y.; ZHU, X. Determination of effective moisture diffusivity and drying kinetics for poplar sawdust by thermogravimetric analysis under isothermal condition. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 451-455, 2012.

COSTA, E. L. **Análise toxicológica, citotóxica e mutagênica de extratos aquosos de *Aspidosperma pyrifolium* (APOCYNACEAE)**. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Universidade Rural do Semiárido, Mossoró, 2015.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 14, n. 2, p. 400 - 409, 2012.

DAVID, M.; PASA, M. C. As plantas medicinais e a etnobotânica em Várzea Grande, MT, **Brasil. Interações**. v. 16, n. 1, p. 97-108, 2015.

FERNANDES, F. H. A. **Estudo químico-farmacológico e desenvolvimento galênico De *spondias dulcis* forst.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2017.

FERREIRA, R. A. R. **Contribuição ao estudo cinético e balanço energético da pirólise autotérmica da palha de cana-de-açúcar através de análises termogravimétricas e calorimetria.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, 2012.

FILHO, A. L. N. F. **Estudo comparativo da eficácia *in vitro* de pastas intracanal comercializadas e formuladas a partir de plantas medicinais do semiárido brasileiro.**

Dissertação. Programa de Pós-graduação em Odontologia. Clínica Odontológica. Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande. 2012.

FRANICISCONI, L. S. **Determinação dos constituintes inorgânicos em plantas medicinais e seus extratos.** Dissertação (Mestrado em Ciências na área de tecnologia nuclear). Ipen. Autarquia Associada a Universidade de São Paulo, 2014.

FREITAS, D. R. **Desenvolvimento e validação de métodos rápidos para análises de resíduos de fármacos e pesticidas em matrizes biológicas e vegetais por LC-MS/MS.** Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia. Departamento de Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

GENTIL, L. B.; ROBLES, A. C. C.; GROSSEMAN, S. Uso de terapias complementares por mães em seus filhos: estudo em um hospital universitário. **Ciência e Saúde Coletiva**. v. 15, p. 1293-1299, 2010.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, n. 2, 395 - 406. 2010.

GOMES, L. F. S. **Abordagem fitoquímica, determinação da atividade antiplasmódica in vitro e avaliação preliminar da toxicidade do extrato hidroetanólico das cascas de *Aspidosperma excelsum* Benth (APOCYNACEAE).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará. Belém, 2011.

HAEFFNER, R.; HECK, R. M.; CEOLIN, T.; JARDIM, V. M. R.; BARBIERI, R. L. Plantas medicinais utilizadas para o alívio da dor pelos agricultores ecológicos do Sul do Brasil. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 14, n. 3, 2012.

HATANAKA, R. R. **Desenvolvimento, validação, avaliação da incerteza de medição e análise de custos de método baseado em espectroscopia no infravermelho e análise multivariada para previsão de parâmetros de qualidade de amostras de E85.** Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

HERBST JR., C. G.; MORTARI, S. R.; MÜLLER, E. I. Análise exploratória aplicada no estudo de medicamentos contendo maleato de enalapril. **Disciplinarum Scientia**, v. 7, n. 1, p. 23-28, 2006.

HILGERT, R. N. **Qualificação do desempenho e validação do processo de obtenção de comprimidos por compressão direta em escala piloto.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

INÁCIO, M. R. V. **Ferramentas quimiométricas aplicadas a classificação de amostras de leite em pó e quantificação de proteínas.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2010.

KANDARI, L. S.; NEGI, T.; THAKUR, A. K.; YILMA, E. Ethnobotanical and indigenous knowledge of important plants in east hararghe, eastern Ethiopia. **Journal of Mountain Science**, v. 12, n. 6, p. 1521-1533, 2015.

KAZMIRCZAK, P. C. **Aplicação da espectroscopia no infravermelho e ferramentas de análise multivariada na avaliação de formulações farmacêuticas comerciais de captopril.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial). Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

LEITÃO, T. M. D. **Aplicações da espectroscopia de infravermelho próximo em Ciências Farmacêuticas.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

LEAL, A. F. V B. **Ensaio de dissolução de fitoterápicos contendo *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reiss (Celastraceae): validação de métodos para quantificação de catequina e epicatequina.** Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2010.

LIMA, M. C. J. S. **Análise fitoquímica e avaliação das atividades anti-inflamatória, antipeçonhenta e citotóxica de extratos aquosos de *Aspidosperma pyrifolium* e *Ipomoea asarifolia*.** 2015. 150f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica. Centro de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

LINS, F. S. V. **Constituintes químicos e avaliação toxicofarmacológica de *Aspidosperma pyrifolium* Mart (APOCYNACEAE).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

LOMBARDO, M. Potencial adverso de medicamentos fitoterápicos: um estudo com foco em medicamentos de registro simplificado. **Revista de Ciências e Saúde**, v. 3, n. 1, 2018.

LOPES, F. C. R. **Análise cinética da decomposição térmica do resíduo da semente do guaraná (*Paullinia cupana*) em atmosfera oxidante**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

LOURENÇO, A. V. F. **Discriminação de espécies de *Baccharis* l. da seção *Caulopterae* por espectroscopia de infravermelho aliada à quimiometria**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

MALUF, D. F. PONTAROLO, R.; CORDEIRO, G. A.; NAGATA, N.; PERALTA-ZAMORA, P. Determinação de sibutramina em formas farmacêuticas através de espectroscopia no infravermelho com refletância difusa e métodos de calibração multivariada. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 649-652, 2010.

MANOZZO, V. **Estudo cinético da pirólise das macrófitas: *Pistia stratiotes* e *Eichhornia crassipes***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Centro de Engenharia e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2016.

MARQUES, T. S.; PEREIRA, D. T. M.; ABREU, A. S.; SOUZA, M. A. S. Determinação do perfil fitoquímico e avaliação das atividades biológicas de extrato da espécie *Scleronema micranthum* da família Bombacaceae. **Revista Fitos**, v. 10, n. 1, p. 375-547, 2016.

MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; ROLIM-NETO, P. J.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de bauhinia forficata link. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MARQUES, G. S. **Desenvolvimento e avaliação de metodologias analíticas para quantificação de flavonóides totais e canferitrina em folhas de *Bauhinia forficata* LINK**. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2011.

MARTINS, E. L. P.; BRANDÃO, M. G. L. Qualidade de amostras comerciais preparadas com *Aesculus hippocastanum* L. (castanha-da-Índia). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 224-229, 2006.

MARTINS, L. R. R.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CASS, Q. B. **Perfil cromatográfico e análise multivariada para o controle de qualidade de amostras comerciais do gênero *Phyllanthus* (quebra-pedra)**. 2008. 154 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, 2008.

MATSUURA, E. N. **Espectroscopia no infravermelho como ferramenta para diferenciação de chá verde de agricultura orgânica e convencional**. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2017.

MEIRA, M. R.; MARTINS, E. R.; MANGANOTTI, S. A. Crescimento, produção de fitomassa e teor de óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 14, n. 2, p. 352 -357, 2012.

MELO, C. A. D. **Classificação simultânea de fármacos contidos em comprimidos de analgésico por espectroscopia NIR e ferramentas quimiométricas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Departamento de Farmácia. Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2013.

MENDONÇA, C. M. S.; LIMA, I. P. B.; ARAGÃO, C. F. S.; GOMES, A. P. B. Thermal compatibility between hydroquinone and retinoic acid in pharmaceutical formulation. **Jornal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 115, n. 3, p. 2277–2285, 2014.

MONTOIA, A. **Semi-síntese de derivados da elipticina e atividade antimalárica de isolados e infusões de *Aspidosperma vargasii***. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Ciências Exatas. Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2013.

MORAIS, F. E. **Estudo termoanalítico de medicamentos de referência, genérico e similar**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

MOTHÉ, M. G. **Estudo do comportamento de ligantes asfáticos por reologia e análise térmica**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2009.

MOTHÉ, M. G.; LEITE, L. M.; MOTHÉ, C. G, “Thermal characterization of asphalt mixtures by TG/DTG, DTA and FTIR”, **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 93, p. 105-109, 2008.

NAVARRO, L. K. T. **Determinação da cinética de pirólise do ouriço da castanha de sapucaia (*Lecythis pisonis*) por termogravimetria**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

NETO, F. F. **Determinação do teor de diclofenaco sódico em comprimidos por espectroscopia no infravermelho próximo – NIR – com calibração multivariada – PLS**. Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Ciências Exatas e da Terra. Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

NETO, J. S.; BEZERRA, C. R. M.; FERNANDES, N. P.; MEDEIROS, R. M.; VILA NOVA, A. R. M.; PINTO, D. S. A fitoterapia como terapêutica complementar no tratamento do alzheimer. **Revista de Ciências e Saúde Nova Esperança**, v. 12, n. 2, 2014.

NETO, M. A. H. **Aplicação da termogravimetria e análise térmica diferencial de uma droga vegetal**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2013.

NUNES, L. M. **Cinética de degradação do sistema resina epóxi/fibra de carbono**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Materiais). Faculdade de Engenharia. Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2013.

NUNES, A. S. **Análise dos produtos de origem vegetal disponíveis em uma farmácia no município de nova veneza - SC**. Monografia apresentada para a obtenção do título de Especialista em Farmacologia Latu – Sensu. Pós-graduação da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma. 2014.

OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.1, p. 92-99, 2009.

OLIVEIRA, A.; C.; D.; ROPKE, C.; D. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v, 10, n. 2, p. 95-219, Abr-Jun 2016.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, S. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

OLIVEIRA, F.; H. **Consolidação de análise cromatográfica e aplicação de ferramentas quimiométricas à análise de alcalóides minoritários em amostras reais de cocaína.** Dissertação (Programa de Pós-graduação em Tecnologia Química e Biológica). Instituto de Química. Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

OSUKOYA, O. A.; ADEGBENRO, D.; ONIKANNI, S. A.; OJO, O. A.; ONASANYA, A. Antinociceptive and Antioxidant Activities of the Methanolic Extract of *Telfairia occidentalis* Seeds. **Acient Science of Live**. v. 36, n. 2, p. 98 – 103, 2016.

PAGANINI-COSTA, P.; CARVALHODA-SILVA, D. Uma Xícara (chá) de Química. **Revista Virtual Química**, v.3, n.1, p.27-36, 2011.

PAULA, J. A. M.; REIS, J. B.; FERREIRA, L. H. M.; MENEZES, A. C. S.; PAULA, J. R. Gênero *Pimenta*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.3, p. 363 - 379, 2010.

PAULA, S. F. A. **Determinação da energia de ativação e pureza de medicamentos de referência, genérico e similar utilizando técnicas termoanalíticas.** Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Ciências Exatas e da Terra. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, 2012.

PEREIRA, T. M. M. **Caracterização térmica (TG/DTG, DTA, DSC, DSC-fotovisual) de hormônios bioidenticos (estriol e estradiol)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências da Saúde. Universidade federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

PEREIRA, J. R.; Cardoso, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PEREIRA, M. M.; SOUZA JÚNIOR, S. N.; ALCÂNTARA, A. F. C.; PILÓ-VELOSO, D.; ALVES, R. B.; MACHADO, P. O.; AZEVEDO, A. O.; MOREIRA, F. H.; CASTRO, M. S. A.; RASLAN, D. S. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p.1-8, 2006.

PEREIRA, A. B. D. **Contribuição para a padronização química de *Hancornia speciosa* Gomes: desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação de marcadores químicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

PIERRI, E. G. **Avaliação das atividades cicatrizante e antiinflamatória de *casearia sylvestris swartz* em animais e identificação dos marcadores químicos**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia. Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2013.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Farmacologia. 6.ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2007. 848p.

RIVERO, E. G. **Avaliação de medicamentos industrializados contendo aciclovir através de espectroscopia por reflexão no infravermelho e análise multivariada**. Dissertação (Mestrado em Sistemas e Processos Industriais). Universidade de Santa Cruz do Sul. Santa Cruz do Sul, 2009.

ROBOTTI, E.; MARENCO, E. Chemometric multivariate tools for candidate biomarker identification: LDA, PLS-DA, SIMCA, Ranking-PCA. In: 2-D PAGE Map Analysis. **Humana Press**, p. 237-267, 2016.

ROCHA, E.; FRID, M.; CORBO, W. A corte, o chá e o voto: o consumo como arena política. **Intexto**, n. 34, p. 322-341, 2015.

RODRIGUES, J. V. M. **Desenvolvimento de uma solução oral com atividade farmacológica a partir de extrato de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.** 2015. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.

SAMPAIO, B. L. **Influência dos fatores ambientais sobre a concentração de compostos fenólicos nas folhas e nas cascas do caule de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil (LYTHRACEAE).** 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Goiás, 2010.

SANTANA, F. B. **Uso de espectroscopia no infravermelho médio e análise discriminante por quadrados mínimos parciais na determinação de adulterações em óleos de *Andiroba*, *Prímula* e *Rosa Mosqueta*.** Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química. Laboratório de Quimiometria do Triângulo. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

SANTOS, S. P. D. **Alcalóides indólicos de *Aspidosperma pyrifolium*: Estudo químico e dados espectroscópicos.** Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

SANTOS, A. C. B.; SILVA, M. A. P.; SANTOS, M. A. F.; LEITE, T. R. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de *Apocynaceae* Juss. ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 442-458, 2013.

SANTOS, D. R. **Atividade inseticida de extratos e óleos essenciais de espécies do gênero *Lippia* contra *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) e *Nasutitermes corniger* (Motschulsky, 1855).** Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2017.

SANTOS, A. P.; ZATTA, D. T.; MORAES, W. F.; BARA, M. T. F.; FERRI, P. H.; SILVA, M. R. R.; PAULA, J. R. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, 2010.

SANTOS, R. L.; GUIMARAES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 13, n. 4, p. 486 - 491, 2011.

SILVA, M. A. B.; MELO, L. V. L.; RIBEIRO, R. V.; SOUZA, J. P. M.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SILVA, R. M. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 549-562, 2010.

SILVA, B. Q.; HAHN, S. R. Uso de plantas medicinais por indivíduos com hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus ou dislipidemias. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar**, v. 2, n. 3, p. 36-40, 2011.

SILVA, RME. **O chá em português: história e hábitos de consumo. Dissertação (Pós-graduação em Estudos Interculturais Português/Chinês: Tradução, Formação e Comunicação Empresarial)**. Instituto de Letras e Ciências Humanas. Universidade do Minho. Braga. 2014.

SILVA, R. L. C. **Desenvolvimento de Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasiticida**. Tese. Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas com Especialidade em Tecnologia Farmacêutica. Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto. Porto. 2014.

SILVA, P. S. S. Atuação dos aleloquímicos no organismo vegetal e formas de utilização da alelopatia na agronomia. **Revista Biotemas**. v. 25, n. 3, p. 65 – 74, 2012.

SCHNEIDER, M. **Determinação da adulteração da erva-mate por adição de sacarose empregando espectroscopia no infravermelho (atr-ftir) em conjunto com ferramentas quimiométricas**. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Química). Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

SOUZA, M. F.; MANGANOTTI, S. A.; SOUZA, P. N. S.; MEIRA, M. R.; MATOS, C. C.; MARTINS, E. R. Influência do horário de coleta, orientação geográfica e dossel na produção de óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. **Revista Biotemas**. v. 24, n. 1, p. 9 – 14, 2011.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. R. L. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SOUZA, C. M. P; BRANDÃO, D. O.; SILVA, M. S. P.; PALMEIRA, A. C.; SIMÕES, M. O. S.; MEDEIROS, A. C. D. Utilização de Plantas Medicinais com Atividade Antimicrobiana por Usuários do Serviço Público de Saúde em Campina Grande – Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 188-193,

2013.

SORIA, E. A.; GOLENIOWSKI, M. E.; CANTERO, J. J.; BONGIOVANNI, G. A. Antioxidant activity of different extracts of Argentinian medicinal plants against arsenic-induced toxicity in renal cells. **Human & Experimental Toxicology**, v. 27, p. 341–346, 2008.

SPRENDER, R. F. **Caracterização de quatro espécies de quebra-pedra utilizando cromatografia de alta eficiência hifenada a espectrometria de massas em múltiplos estágios**. Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia. Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

STANDAGE, T. História do Mundo em 6 copos, edição brasileira, Nova York: **Walker & Company**, p.403-405, 2005.

TERRA, L. A. **Avaliação de transformação polimórfica em comprimidos do fármaco carbamazepina por espectroscopia de imagem no infravermelho próximo e ferramentas quimiométricas**. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

TRINDADE, R. C. S.; KIKUCHI, T. Y. S.; SILVA, R. J. F.; VALE, V. V.; OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; COELHO-FERREIRA, M. R. Estudo farmacobotânico das folhas de *Aspidosperma excelsum* Benth. (Apocynaceae). **Revista Fitos**, v. 10, n. 3, p. 220-372, 2016.

TRINDADE, R. C. P.; SILVA, P. P.; Araújo-Júnior, J. X.; Lima, I. S.; PAULA, J. E.; SANT'ANA, A. E. G. Mortalidade de larvas de *Plutella xylostella* tratadas com extratos etanólicos de *Aspidosperma pyriformium*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.12, p.1813-1816, dez. 2008a.

TRINDADE, R. C. P.; SANT'ANA, A. E. G.; MICHELETTI, S. M. F. B.; BORN, F. S.; ARAÚJO, M. J. C. Plantas inseticidas ou insetistáticas: Uma alternativa no controle de pragas. **Ciência Agrícola**. v. 9, n. 1, p. 83-89, 2007/2008b.

TORRES, A. L.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; MEDEIROS, C. A. M.; BARROS, R. Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyriformium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. **Bragantia**, Campinas, v.65, n.3, p.447-457, 2006.

VAN DE VELDEN, M.; BAEYENS, J.; BREMS, A.; JANSSENS, B. DEWIL, R. Fundamentals, kinetics and endothermicity of the biomass pyrolysis reaction. **Renewable Energy**, v. 35, p. 232-242, 2010.

VILHENA, M. C. P. **Estudo Farmacológico de Extratos secos padronizados das cascas do caule de *Aspidosperma marcgravianum* Woodson coletadas na Amazônia Ocidental.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual do Amazonas, Manaus, 2012.

VIANA, F. F. O. **Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos da parte aérea de *Aspidosperma pyrifolium* sobre *Aedes aegypti*.** Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga. Bahia. 2015.

VYAZOVKIN, S. Advanced isoconversional method. **Journal of Thermal Analysis**, v. 49, p. 1493-1499, 1997.

VYAZOVKIN, S.; CHRISSAFIS, K.; LORENZO, M. L.; KOGA, N.; PIJOLAT, M.; RODUIT, B.; SBIRRAZZUOLI, N.; SUÑOL, J. J. ICTAC Kinetics Committee recommendations for collecting experimental thermal analysis data for kinetic computations. **Thermochimica Acta**, v. 590, p. 1 – 23, 2014.

WHITE, J. E.; CATALLO, W. J.; LEGENDRE, B. L. Biomass pyrolysis kinetics: A comparative critical review with relevant agricultural residue case studies. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. v. 91, n. 1, p. 1-33, 2011.

ZANATTA, E. R. **Estudo cinético da pirolise das biomassas: bagaço de mandioca, casca de soja e bagaço de cana.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Centro de Engenharia e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2012.

ZHU, J. **O Café e O Chá nas Culturas da China e de Portugal.** Dissertação (Pós-graduação em Línguas, Literaturas e Culturas). Departamento de Línguas e Culturas. Universidade de Aveiro. Aveiro. 2016.

Capítulo I – Artigo I

2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL DE *Aspidosperma pyrifolium* MART. EM DIFERENTES TAMANHOS DE PARTÍCULAS

Caracterização físico-química da droga vegetal de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. em diferentes tamanhos de partículas

Jéssica Cabral de Andrade, Felipe Hugo Alencar Fernandes, Ana Cláudia Dantas de Medeiros
Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos. Universidade Estadual da Paraíba, Rua Baraúnas, 351, Cidade Universitária, 58429-500, Campina Grande-PB, Brasil.

RESUMO

A espécie *Aspidosperma pyrifolium* Mart é conhecida popularmente como Pereiro, e amplamente utilizada na região do nordeste Brasileiro, devido às suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias. A presença de alguns metabólitos secundários, como alcalóides indólicos, pode ser responsável por causar alterações no sistema nervoso central, o que gera a necessidade de investigar suas propriedades farmacológicas, e padronizar as matérias-primas provenientes desta planta medicinal. Assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar e padronizar os diferentes tamanho de partículas da droga vegetal proveniente das cascas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart., com a finalidade de se avaliar ação biológica do chá produzido com a partícula de melhor rendimento e de se determinar o seu marcador químico. O controle de qualidade da droga vegetal seguiu os critérios da Farmacopéia Brasileira (5^o edição). A quantificação de alguns metabólitos secundários foi feita utilizando técnicas espectrofotométricas. Com a finalidade de determinar a composição qualitativa da preparação de uso medicinal (chá) de *A. pyrifolium* foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE-UV. A citotoxicidade foi avaliada através do teste de hemólise de eritrócitos. A droga vegetal foi classificada como sendo um pó grosso. O teor de flavonóides, taninos e polifenóis foi inversamente proporcional ao tamanho de partícula, uma vez que, quanto maior o tamanho da partícula, menor foi a extração de metabólitos. O método desenvolvido se mostrou linear, preciso, exato e robusto para a identificação de ácido cafeico, um ácido fenólico com diversas propriedades farmacológicas. Somente o chá da partícula AP05 foi capaz de causar a hemólise em 50% dos eritrócitos. Através das metodologias *in vitro* utilizadas para avaliar a atividade anti-inflamatória e antioxidante do chá, verificou-se indícios de que o chá da droga vegetal possui atividade anti-inflamatória e antioxidante, sendo necessário uma investigação mais aprofundada. Diante disto, pode-se observar a influência do tamanho de partícula na extração de compostos bioativos, de relevância na medicina tradicional, assim como na toxicidade de drogas vegetais, podendo trazer prejuízos à população que fazem uso indiscriminado de plantas medicinais.

Palavras-chave: Droga vegetal. Pereiro. Atividade anti-inflamatória. Marcadores Químicos. CLAE.

INTRODUÇÃO

Aspidosperma pyrifolium Mart., é uma espécie arbórea, que ocorre com grande frequência no bioma caatinga. É conhecida popularmente por Pereiro, Pau-Pereiro, Trevo, entre outros. Possui uma ampla utilização, desde a produção de móveis, devido a rigidez de sua madeira, até ornamentação de espaços (MESSIADES, 2014). A partir do conhecimento popular e etnobotânico foi possível descobrir as suas atividades farmacológicas benéficas, dentre elas podem ser citadas: atividade anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana (RODRIGUES, 2015).

Em um estudo fitoquímico da *A. Pyrifolium*, detectou-se a presença de alcaloides indólicos monoterpênicos como aspidofractinina, 15-demetoxipirifolina e N-formilaspidospermidina (LIMA, 2015; PEREIRA, 2015). Foi possível identificar a presença de alcaloides indólicos, que são responsáveis pela atividade terapêutica (hipotensora, antimicrobiana, citotóxica, tripanosomicida e inibitória sobre monoamino oxidase) (NUÑEZ, 2014).

As drogas vegetais devem ser estudadas também, com a finalidade de avaliar os constituintes tóxicos e o quanto estas substâncias são letais ao organismo. Porém, muitas vezes estas plantas são comercializadas em feiras livres, onde não há nenhuma fiscalização, tornando-se um sério problema de saúde pública (LIMA, 2015).

A segurança, eficácia e a qualidade dos produtos fitoterápicos, devem ser asseguradas e comprovadas após a sua fabricação. No processo de moagem das drogas vegetais, pode haver surgimento de produtos intermediários, devido à diminuição do tamanho da partícula. Esses produtos intermediários podem influenciar na sua atividade farmacológica (CORREIA et al., 2016). Os métodos analíticos buscam padronizar essas partículas e aumentar a segurança e a utilização de plantas medicinais por parte da população (CORREIA et al., 2015). Enquanto que, as farmacopéias buscam estabelecer padrões de qualidade a que os medicamentos devem obrigatoriamente obedecer, e suas monografias visam agrupar, padronizar e sistematizar o conhecimento das características e propriedades das plantas

medicinais, tanto para auxiliar os prescritores, como para orientar a população (FELTRIN; CHORILLI, 2010).

Dentre as técnicas mais utilizadas para a padronização, pode-se destacar a cromatografia. Esta técnica compreende um processo físico de separação, onde o analito se distribui em duas fases, denominadas fase móvel (podendo ser um gás um líquido ou um fluido supercrítico), e fase estacionária (sólida ou líquida, disposta em um suporte sólido com uma área superficial grande). A fase móvel passa pela fase estacionária, arrastando consigo os componentes presentes nas misturas. Esta técnica se baseia no princípio da adsorção seletiva (MARINHO, 2011).

Um método deve ser validado sempre que uma nova metodologia de análise for desenvolvida, ou quando alterações devam ser feitas a um método já existente, com a finalidade de adequá-lo ao estudo de um novo composto químico. No Brasil, a RDC de nº 166, de 24 de julho de 2017, trata dos parâmetros de validação e seus respectivos critérios de aceitação, existindo compêndios, a nível internacional, que servem como guias para a validação de métodos analíticos, como por exemplo, o FDA (*Food and Drug Administration*) (BRANDÃO, 2014).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi obter partículas com granulometrias diferentes, a partir da droga vegetal proveniente da planta *Aspidosperma pyrifolium* Mart., e padronizá-las de acordo com as exigências da Farmacopéia Brasileira, determinando a constituição e o marcador químico presente na espécie em estudo, bem como a sua citotoxicidade, levando em consideração a influência do tamanho de partícula.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos pós

As cascas de *Aspidosperma pyrifolium* foram coletadas na região semiárida da Paraíba, (7°13'50"S, 52°52'W). O material botânico foi identificado pelo professor Leonardo Pessoa Félix e a exsicata depositada no herbário Jayme Coelho de Moraes, na Universidade Federal da Paraíba – UFPB, sob número 20104. A dissertação foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), com Número do cadastro A00DF7D. O material vegetal coletado foi submetido à secagem em estufa de circulação forçada de ar, a 40 °C e pulverizado em moinho de facas com granulometria de 10 mesh.

Caracterização dos pós obtidos da casca de *A. pyrifolium* Mart

Os pós obtidos da casca da *A. pyrifolium* foram caracterizados, de acordo com a Farmacopéia Brasileira (5ª edição, volume 1), quanto a determinação da granulometria, perda por dessecação, teor de cinzas totais, determinação de cinzas resistentes ao ácido e pH.

Determinação da granulometria

Pesou-se 25 mg do pó no qual foi transferido para um conjunto de peneiras para análise granulométrica por 15 minutos. Os pós obtidos foram designados AP01 ($>355 \mu\text{m}$), AP02 ($\geq 180 \mu\text{m}$), AP03 ($\geq 155 \mu\text{m}$), AP04 ($\geq 75 \mu\text{m}$) e AP05 ($\geq 38 \mu\text{m}$). Em seguida, foi calculado o tamanho médio das partículas em função da distribuição das massas nas peneiras, utilizando a seguinte fórmula:

$$\% = \frac{P1}{P2 \times 100} \quad (2)$$

Onde:

P1: peso da amostra retida em cada tamis (g).

P2: soma dos pesos retidos em cada tamis (g).

Determinação de perda por dessecação

Exatamente 3g do pó da planta foram transferidos para um pesa-filtro (n=3), onde foram submetidas ao aquecimento em estufa a 105°C durante duas horas, seguida de resfriamento em dessecador e pesagem. A operação foi repetida até obtenção do peso constante. Os resultados foram avaliados em termos de porcentagem ponderal sobre a quantidade da amostra, utilizando a equação:

$$\% \text{ perda} = \frac{P_u - P_s \times 100}{P_a} \quad (3)$$

Onde:

P_a: peso da amostra (g).

P_u: peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação (g).

Ps: peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação (g).

Determinação do teor de cinzas

Exatamente 3 g dos pós foram pesados e transferidos para cadinhos previamente calcinados, resfriados e tarados. As amostras dos pós foram submetidas a carbonização em mufla a 450°C por duas horas. Após resfriamento em dessecador, as mesmas foram pesadas em balança analítica, repetindo-se o procedimento até estabilização do peso. A percentagem de cinzas foi calculada em relação a droga seca.

Determinação de cinzas resistentes ao ácido

O resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi fervido durante 5 minutos com 25 mL de ácido clorídrico a 7% (p/v) em cadinho coberto com vidro de relógio. A solução foi filtrada com papel de filtro, isento de cinzas, e o resíduo retido foi submetido a secagem sobre chapa quente e incinerado a cerca de 500 °C até peso constante. O cálculo levou em consideração a porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca.

Determinação do pH

Para a determinação do pH, foi preparado o chá da droga vegetal na concentração de 1%. Após o resfriamento, a solução foi analisada utilizando um potenciômetro previamente calibrado.

Produção do chá das cascas da *A. pyrifolium*

Foi realizada a decocção das cinco partículas, onde se pesou 1 g de droga vegetal, sendo adicionados 100 mL de água destilada. A solução foi colocada sob uma tela de amianto e aquecida com o auxílio de um bico de bunsen, até atingir seu ponto de ebulição. Em seguida, a solução foi resfriada a temperatura ambiente e posteriormente filtrada. Ao final do processo, se obteve o chá na concentração de 1% (m/v).

Caracterização fitoquímica do chá

Foram realizadas as quantificações dos metabólitos secundários: polifenóis totais, flavonoides e taninos condensados, utilizando espectrofotometria na região do UV-visível. Para os ensaios foi utilizado o espectrofotômetro Shimadzu UV mini-1240.

Determinação do teor de polifenóis totais.

Para a determinação do teor de polifenóis totais, utilizou-se o método descrito por Chandra e Mejía (2004). Adicionou-se 1 mL do chá a 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N. Esta mistura permaneceu em repouso por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20% (p/v), e deixou-se em repouso por mais 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em 757 nm em espectrofotômetro, contra um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução a 20% de Na_2CO_3 . Para a obtenção da curva analítica, uma solução padrão de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido gálico foi preparada pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de água destilada. A partir dessa solução foram feitas diluições em triplicata, de forma a obter soluções de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, e $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata.

Determinação do teor de flavonoides

A determinação do conteúdo de flavonoides totais seguiu o método de Meda et al. (2005). Onde 5 mL da solução do chá foi adicionado ao mesmo volume de uma solução (em metanol) de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 2% (p/v). A mistura permaneceu em repouso por 10 minutos antes da leitura da absorbância em 415 nm, contra um branco composto pela solução de AlCl_3 . A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada pela dissolução de 10 mg de quercetina em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram feitas diluições em triplicata, obtendo-se soluções de quercetina nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração de flavonoides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina. As análises foram realizadas em triplicata.

Determinação do teor de taninos condensados

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de Makkar e Becker (1993), no qual 5 mL do chá da droga vegetal foram adicionado a 3 mL de uma solução de vanilina (4% p/v em metanol); em seguida, adicionou-se 1,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado (37%). A leitura foi feita a 500 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, HCl e uma solução de etanol 50% (v/v) em água. A curva de calibração para este ensaio foi obtida a partir de uma solução padrão de catequina obtida pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram realizadas diluições em triplicata, de forma a obter soluções de catequina nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina. As análises foram realizadas em triplicata.

Ensaio de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade seguiu a metodologia descrita por Cruz-Silva et al (2000), com algumas modificações. O sangue utilizado foi doado pelo Laboratório de Análises Clínicas (LAC), sendo do tipo A⁺, B⁻, AB⁺ e O⁻, acondicionados em tubo com heparina. O plasma foi retirado do tubo após centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos. Posteriormente a suspensão de hemácias foi lavada, três vezes, com solução salina 1%. As hemácias foram ressuspendidas novamente com a mesma solução e o volume ajustado para 5%. Então, colocou-se 1,5 mL da suspensão de hemácias a 5% juntamente com 1,5 mL das soluções testes (chá) nas concentrações de 1, 2,5 e 5% em tubos de ensaio, os quais foram deixados em repouso durante 1 hora a temperatura ambiente para que acontecesse a hemólise. Após esse período, cada tubo foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos, sendo retirado o sobrenadante para leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540 nm.

Como controle positivo, foi utilizado o líquido de Turk a 2% uma vez que, essa substância causa 100% de hemólise e como controle negativo foi utilizada solução salina a 1%, que não causa hemólise alguma. A análise foi feita em triplicata. O percentual hemolisante foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Ph} = \frac{\text{Ae} - \text{Ab} \times 100}{\text{At}} \quad (4)$$

Onde:

Ph: potencial hemolisante (em porcentagem).

Ae: absorvância da amostra teste.

Ab: absorvância do branco da amostra.

At: absorvância do controle positivo.

Um percentual de hemólise considerado baixo deve estar entre 0 e 40%, moderado entre 40% e 80% e um alto percentual de hemólise compreende valores entre 80 e 100% (ASSUNÇÃO, 2017).

Determinação do marcador fitoquímico

Preparo das soluções

Para investigação do marcador químico presente no chá da droga vegetal proveniente da planta *A. pyrifolium* Mart., foram utilizados os padrões cromatográficos: cafeína, ácido cafeico, quercetina, catequina, ácido gálico e cumarina, todos na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A droga vegetal (tamanho selecionado) foi submetida a uma decocção para obtenção do chá (1% m/v), onde 9 mL do chá foi adicionado a um balão volumétrico de 10 mL, contendo 1mL de água (9:1), que foi posteriormente filtrado em membranas de seringas com orifícios de 0,45 μm . Todas as soluções e fases móveis usadas neste ensaio foram preparadas com água ultrapura obtida de um Milli-Q Plus. O metanol utilizado como fase móvel foi grau HPLC, os demais reagentes foram de grau analítico. Antes da injeção, as fases móveis foram degaseificadas.

Condições cromatográficas

Foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu, com um detector UV-Vis simples, acoplado ao software LC Solution da Shimadzu, sendo pré-estabelecido o comprimento de onda de 254 nm. A fase móvel consistia em água acidificada (ácido ortofosfórico 1%), pH ajustado para 3,5 (fase A) e metanol (fase B) (70:30 v/v). A coluna cromatográfica utilizada foi uma Gemini C18 (Phenomenex) (250 x 4,60 mm x 5 μm) mantida em uma temperatura de 30 °C durante toda a análise. A separação cromatográfica ocorreu sob condições isocráticas, em uma corrida de 30 minutos, com um volume de injeção de 20 μL e um fluxo de fase móvel de 1 mL min^{-1} .

Validação do método analítico

A validação do método foi realizada segundo a resolução de nº 166, de 24 de julho de 2017. Os parâmetros avaliados foram: linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez. Os parâmetros determinados foram minuciosamente observados neste trabalho e serão detalhados a seguir.

Linearidade

Para verificação da linearidade do método foram construídas, em triplicata, curvas de calibração do marcador. Preparou-se uma solução-mãe contendo o marcador na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ diluído em água (m/v) e a partir desta foram realizadas diluições sucessivas no intervalo de 60 a $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ (60, 80, 100, 120, 140, 160 e $180 \mu\text{g mL}^{-1}$). A partir dos resultados obtidos determinou-se a equação da reta e coeficiente de correlação das curvas analíticas, utilizando o software Microsoft Excel 2010 (Windows®).

Precisão

A precisão do método foi verificada por meio da determinação da repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia) e reprodutibilidade (inter-analista). As variações intradia e interdia foram determinadas pela injeção em sextuplicata do extrato aquoso a $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ no mesmo dia e no dia seguinte, respectivamente. Os valores de repetibilidade e precisão intermediária foram expressos pelo desvio padrão relativo entre as injeções (DPR%).

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada comparando-se as concentrações do marcador químico determinadas em concentrações do extrato em três concentrações (60, 80 e 100 mg mL^{-1}), com os seus valores de concentração real.

Robustez

A robustez do método foi verificada a partir de variações pequenas na temperatura do forno, concentração de metanol da fase móvel e comprimento de onda (fatores). Para

avaliação da robustez determinou-se, em triplicata, a influência dessas variações no tempo de retenção, e área dos picos (Tabela 1):

Tabela 1 - Níveis das variáveis utilizadas para avaliar a robustez do método

Condições analíticas	Níveis		
	Baixo (-1)	Central (0)	Alto (+1)
Temperatura (°C)	29,5	30	31
Concentração de metanol da fase móvel	29,5	30	31
Comprimento de onda (λ)	253,0	254	256

Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

As respostas foram obtidas de acordo com o planejamento fatorial 2^3 , onde três fatores foram avaliados, utilizando dois níveis, totalizando dezesseis experimentos, incluindo as repetições no ponto central. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA 8.0 (Tabela 2).

Tabela 2- Teste de robustez usando planejamento fatorial 2^3

Parâmetros analíticos	Combinação dos Fatores															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	0	-1	+1	0	0	0	0	0
B	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	0	0	0	-1	+1	0	0	0
C	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	0	0	0	0	0	-1	+1	0

A: temperatura; B: concentração de metanol e C: comprimento de onda.

Fonte: Dados da pesquisa, 2018

Avaliação *in vitro* da atividade anti-inflamatória

Preparo das soluções padrões

Os padrões utilizados foram os fármacos, ácido acetil salicílico, nimesulida, dexametasona e ácido cafeico. Foram preparadas soluções nas concentrações de 100, 80, 60, 40 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Com a droga vegetal em estudo foi preparado o chá em três concentrações: 1; 2,5 e 5%.

Inibição *in vitro* da desnaturação da albumina do ovo

A determinação da atividade anti-inflamatória seguiu a metodologia descrita por Chandra et al., 2012, com algumas alterações. Em um becker foi adicionado 2,0 mL da solução do chá, 2,8 mL de tampão fosfato (pH 6,4) e 0,2 mL da clara de ovos (10% v/v), obtendo um volume final de 5 mL. A solução foi colocada posteriormente na estufa em uma temperatura de 35 °C, durante 15 minutos. Em seguida, foi submetida a aquecimento em banho-maria, por 15 minutos, em uma temperatura de 70 °C. Após resfriamento, a mesma foi lida em espectrofotometro no comprimento de onda de 660 nm. O mesmo sucedeu para os padrões estudados. O branco utilizado para esta análise era composto por água destilada, a clara do ovo e o tampão fosfato. O percentual de inibição foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 \times \frac{V_t}{V_c} - 1 \quad (5)$$

Onde V_t = absorvância do teste e V_c = absorvância do controle.

A determinação da IC_{50} do chá da droga vegetal e dos padrões se deu através da plotagem dos valores do percentual de inibição em relação a concentração.

Avaliação da atividade antioxidante do chá

Para avaliar a atividade antioxidante utilizou-se a metodologia descrita por Chaves et al. (2016), com algumas adaptações. Foi utilizada a técnica do DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, P.M. = 394,32 g mol⁻¹, Sigma Aldrich), preparando-se uma solução a 0,200 mM em etanol. Como padrão foi utilizado o ácido cafeico, preparado a uma concentração de 5 µg mL⁻¹. A droga vegetal foi utilizada na mesma concentração do ácido cafeico (5 µg mL⁻¹). O branco da reação era constituído de etanol. Em seguida, 100 µL da solução de DPPH foram adicionados aos poços de uma microplaca. Após 30 minutos, a leitura foi realizada no comprimento de onda de 517 nm e o resultado expresso em capacidade sequestrante do DPPH livre:

$$\text{DPPH livre (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}})}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100 \quad (6)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização da droga vegetal

Após a secagem da droga vegetal em estufa de circulação de ar, para estabilização da umidade, obteve-se um pó de cor marrom-claro, com tamanhos e formatos de partículas variados, de sabor amargo e odor característico (Figura 3).

Figura 3 - Droga vegetal proveniente da *Aspidosperma pyrifolium* Mart.



Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

O pó obtido foi submetido a análise granulométrica em um tamisador, para posterior classificação de acordo com os seus diâmetros médios, retidos em cada tamis. A Tabela 3 apresenta a classificação granulométrica dos pós.

Tabela 3- Granulometria do pó obtido de cascas moídas de *Aspidosperma pyrifolium*.

Amostras	Média (g)	Rendimento do pó (%)
AP01	32,93	36,50
AP02	36,92	40,92
AP03	3,65	4,00
AP04	12,78	13,30
AP05	3,87	5,46

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010), o pó da planta foi classificado como sendo um pó grosso, uma vez que 40% do pó conseguiu passar pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 μm . A distribuição granulométrica de drogas vegetais, determina a superfície de contato que estará disponível para interagir com o solvente utilizado na

preparação de extratos, influenciando diretamente na eficiência extrativa do método escolhido (SILVA et al. 2013).

Caracterização físico-químico da droga vegetal de *A. pyrifolium*

Os parâmetros físico-químicos foram avaliados com a finalidade de estabelecer um controle de qualidade mais rigoroso da droga vegetal. A Farmacopéia Brasileira estabelece alguns parâmetros que devem ser seguidos para matéria-prima de origem vegetal. Porém, para alguns dos testes exigidos por este compêndio, não se tem valores pré-estabelecidos. Na Tabela 4, encontram-se os valores de cada tamanho de partícula, obtidos em cada ensaio.

Tabela 4- Valores obtidos para os testes exigidos pela Farmacopéia Brasileira

Testes	Amostras \pm Desvio Padrão				
	AP01	AP02	AP03	AP04	AP05
Perda por dessecação (%)	9,5 \pm 0,3	9,5 \pm 0,4	9,6 \pm 0,2	7,3 \pm 0,4	7,3 \pm 0,5
Cinzas Totais (%)	10,2 \pm 0,5	10,7 \pm 0,2	10,3 \pm 0,3	10,4 \pm 0,9	10,2 \pm 0,5
Cinzas totais resistentes a ácido (%)	0,8 \pm 0,5	0,8 \pm 0,5	0,8 \pm 0,4	0,9 \pm 0,1	0,8 \pm 0,8
pH	5,4 \pm 0,3	5,9 \pm 0,3	4,9 \pm 1,3	4,7 \pm 0,1	3,5 \pm 0,1

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

O teor de umidade em matérias-primas vegetais nos fornecerá informações a respeito da efetividade da etapa de secagem. Um alto teor de umidade irá favorecer a proliferação de microrganismos e também facilitar a ocorrência de reações químicas que culminam em deterioração da amostra e perda de sua estabilidade. Em contrapartida, um processo de secagem intensa, pode ocorrer perda de compostos sensíveis ao calor (ARAUJO et al., 2010). A Farmacopéia Brasileira (2010), estabelece um limite entre 6 e 15% de umidade total para drogas vegetais.

Para avaliar a quantidade de compostos voláteis disponíveis na droga vegetal foi utilizado o método gravimétrico, no qual para a substância em estudo o teor de compostos voláteis, no caso, a água, encontra-se dentro do que a literatura preconiza, apresentando um teor médio em torno de 8,64% para todas as amostras.

O teste utilizado para avaliar o teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido em drogas vegetais visa estabelecer e quantificar a quantidade de material inorgânico, que

consegue se manter inalterado após longos ciclos de calor excessivo. Neste teste, pode-se ter uma idéia do nível de impurezas das matérias-primas vegetais, uma vez que, um grande número de substâncias inorgânicas, como a terra, podem ser utilizadas para aumentar o rendimento dos pós. Para o teste de cinzas totais, o limite especificado é de 3 a 15%, o qual podemos observar que para os pós de *A. pyrifolium*, os valores obtidos se encontram em conformidade.

O pH obtido para a solução do chá das partículas a 1% de droga vegetal (p/v) mostrou uma diminuição, a medida que o tamanho da partícula ia diminuindo. Isto pode estar relacionado com o aumento da superfície de contato das partículas, que facilitou a extração de metabólitos secundários solúveis em água, como por exemplos os taninos e os polifenóis.

Prospecção fitoquímica

Atráves de reações colorimétricas entre reagentes específicos e os metabólitos que existem em uma determinada planta, é possível identificar de forma quantitativa a composição do mesmo (FERNANDES, 2017). Através do grau de partição das partículas, pode-se observar que, a medida que o tamanho da partícula diminuiu, o número de metabólitos extraídos aumentou. Isso pode ser explicado devido a um aumento na superfície de contato da partícula, facilitando uma maior capacidade do líquido extrator de envolvê-la, solubiliza-la e arrastar consigo o extrativo. A Tabela 5 mostra os metabólitos encontrados na droga vegetal de *A. pyrifolium* e a quantidade extraída de cada partícula.

Tabela 5- Quantificação dos metabólitos secundários da droga vegetal

Amostras	Taninos (mg ECA g⁻¹)	Flavonóides (mg EQC g⁻¹)	Polifenóis (mg EAGg⁻¹)
AP01	28,9 ± 1,37	69,8 ± 1,99	135,0 ± 1,38
AP02	36,0 ± 1,68	73,3 ± 2,43	150,3 ± 1,07
AP03	73,0 ± 0,96	75,9 ± 1,67	188,6 ± 1,60
AP04	73,5 ± 1,14	77,9 ± 1,81	237,8 ± 1,24
AP05	73,8 ± 1,19	81,5 ± 1,40	239,2 ± 0,83

ECA (equivalente de catequina) EQC (equivalente de quercetina) EAG (equivalente de ácido gálico).

Fonte: Dados da Pesquisa, 2017

Através do teste estatístico não-paramétrico de Friedman, realizado no software Bioestat 5.0, foi possível observar que não existem diferenças significativas entre as partículas na extração dos metabólitos em estudo. A única diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada entre as partículas AP01 e AP05, havendo uma extração de metabólitos mais significativa nas partículas de menor tamanho.

Os metabólitos secundários além de proteger a planta contra estímulos do meio ambiente, também são vistos como grandes moléculas promissoras à síntese de novos fármacos, tendo-se destacado no âmbito farmacêutico nos últimos anos (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

A família Apocynaceae é rica em glicosídeos e alcaloides do tipo indólico. Este último atua como protetor químico dos vegetais, e é responsável por diversos efeitos fisiológicos em animais podendo ter ação antimicrobiana. Alguns alcaloides são inseticidas e agem como repelentes em herbívoros, podendo ser extraídos de diversas partes da planta, como sementes, cascas, caules e folhas (OLIVEIRA; ALMEIDA, 2016). Podem ser encontrados outros tipos de metabólitos na família Apocynaceae, como os glicosídeos cardioativos, glicosídeos cianogénicos, leucoantocianinas, saponinas, taninos, cumarinas, ácidos fenólicos, ciclitois e triterpenos (TRINDADE et al., 2016).

Através das análises fitoquímicas semiquantitativa observou-se uma maior quantidade de polifenóis e flavonóides na droga vegetal, seguido de um número menor de taninos, resultado este que também foi observado por Messiades (2014), porém neste mesmo trabalho o autor não conseguiu quantificar taninos utilizando esta metodologia, provavelmente porque o mesmo trabalhou com extratos e não com droga vegetal.

Os flavonoides possuem várias propriedades terapêuticas tais como ação citotóxica, anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiparasitária, antiviral, vasolizador, dentre

outras. Estes metabólitos atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres, em ambos os compartimentos celulares lipofílicos e hidrofílicos. Os flavonoides mais investigados são: quercetina, a mirecitina, a rutina e a naringenina (OLIVEIRA et al., 2011; MARQUES, 2016).

Os compostos fenólicos atuam, na área farmacológica, como antimicrobianos e antivirais. Estes compostos também são incluídos como inibidores de radicais livres, atuando na clínica como antioxidantes (OLIVEIRA; ALMEIDA, 2016). O método quantitativo utilizado para a determinação desses compostos, não pode prever a composição de cada polifenol, uma vez que possa haver quantificação de compostos não fenólicos, com estruturas semelhantes ao padrão utilizado nessa análise, neste caso, o ácido gálico (BARBOSA, 2017).

Aos taninos são atribuídas atividade antimicrobiana, sendo capazes de inativar fatores de virulências de cepas microbianas. Possuem adstringência característica, o que lhes confere a propriedade de precipitar proteínas, agindo por esse mecanismo de ação contra o crescimento microbiano. A baixa quantidade de taninos pode ser explicada devido a fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, índice pluviométrico, radiação UV, temperatura, ou até mesmo idade da planta (VALE, 2014).

Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade é um teste *in vitro* que avalia a biocompatibilidade de compostos com atividade desconhecida. O teste é realizado em um meio controlado, sem a interferência dos demais compartimentos do organismo, sendo um método de fácil execução, rápido, reprodutível e de baixo custo. A citotoxicidade pode ser definida como a propriedade nociva de uma substância em relação às células do organismo (MARTINS et al., 2010).

Um dos parâmetros avaliados no ensaio de citotoxicidade é a concentração letal média (IC_{50}), que podem ser obtidos através de ensaios que envolvem hemólise em eritrócitos animais ou humanos. As concentrações estudadas, dos chás, provenientes da droga vegetal em tamanhos de partículas diferentes (Tabela 6), apresentaram uma citotoxicidade equivalente a 25%, não sendo considerado tóxico, visto que a IC_{50} (onde 50% dos eritrócitos são hemolisados) não foi atingida. Porém, para a partícula AP05 (38 μ m), a citotoxicidade foi de 50%, atingindo a IC_{50} . Isso pode ser explicado devido ao aumento da solubilidade do pó com o aumento da sua superfície de contato, causando uma maior extração de metabólitos, levando a intensificação do efeito tóxico.

Tabela 6- Ensaio de citotoxicidade

Amostras	Concentração do chá (%)	Tipo Sanguíneo			
		A ⁺	B ⁺	AB ⁺	O ⁻
AP01	1,0	+	+	+	+
	2,5	+	+	+	+
	5,0	+	+	+	+
AP02	1,0	+	+	+	+
	2,5	+	+	+	+
	5,0	+	+	+	+
AP03	1,0	+	+	+	+
	2,5	+	+	+	+
	5,0	+	+	+	+
AP04	1,0	+	+	+	+
	2,5	+	+	+	+
	5,0	+	+	+	+
AP05	1,0	++	++	++	++
	2,5	++	++	++	++
	5,0	++	++	++	++

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Atualmente, as leis a respeito da utilização de animais em testes toxicológicos, visam à diminuição do número de animais usados em experimentos, estabelecendo a implementação de testes preliminares que permitam identificar inferências, possibilitando a redução do uso de animais e uma discussão ampla dos resultados *in vitro* e *in vivo* (BEDNARCZUK et al., 2010).

A visualização da hemólise foi determinada através da leitura no espectrofotometro, e classificada como: - (0% de hemólise), + (25% de hemólise), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise). O líquido de Turk, utilizado como controle positivo no ensaio, apresentou hemólise equivalente a 100%. Foram utilizados os grupos sanguíneos A⁺, B⁺, AB⁺ e O⁻, com o objetivo de observar se a hemólise ocorreria de forma mais intensa em grupos sanguíneos diferentes, o que não foi observado no estudo em questão, uma vez que a hemólise foi igual para ambos os grupos sanguíneos.

Os chás e infusões são utilizados pela população a muitos anos, não tendo comprovação científica a respeito das suas propriedades tóxicas, pois para essas preparações a quantidade utilizada não são estabelecidas, podendo ser utilizadas quantidades que causem intoxicações e danos a alguns órgãos, como por exemplo o fígado.

A presença de alcalóides no gênero *Aspidosperma pyrifolium*, relatada na literatura, reforça a importância da realização de testes que comprovem a sua toxicidade, uma vez que, a presença desses compostos podem causar estomatites, gastroenterites, bradicardia, alterações na pressão sanguínea, paralisia e espasmos musculares (DESOTI et al., 2011).

A partir dos dados a respeito da citotoxicidade obtida para as amostras em estudo, a partícula AP02, foi utilizada para a produção do chá a 1%, para a determinação do marcador químico, uma vez que, a mesma teve um maior rendimento, boa extração de metabólitos secundários e uma baixa toxicidade.

Determinação do marcador fitoquímico

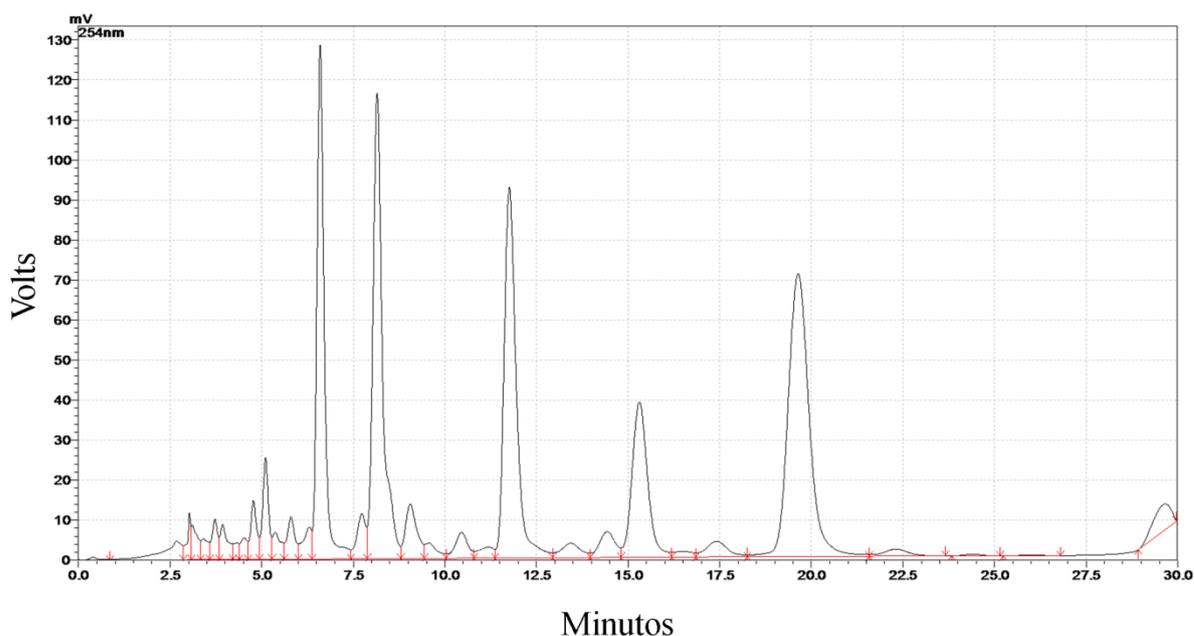
O método analítico foi desenvolvido com a finalidade de separar os compostos presentes no chá da droga vegetal de *A. pyrifolium*, assim como, identificar a presença dos padrões cromatográficos utilizados nos ensaios. A proporção entre as fases foi ajustada até que houvesse uma boa resolução dos picos, tanto do chá como dos padrões.

A escolha da fase inorgânica, composta por água acidificada (ácido ortofosfórico 1%), levou em consideração o interesse em diminuir a ionização das substâncias no momento da eluição, para que não houvesse retenção acentuada dos compostos, nem a formação de caudas nos picos. A eluição isocrática foi preferível para esta análise, sendo escolhida a proporção de fase B (metanol) de 10%, possibilitando um fator de retenção (k) adequado, sendo este a razão entre o número de moléculas do soluto distribuídos tanto na fase estacionária como na fase móvel (CASS; DEGANI, 2013).

Muitos laboratórios de instituições disponibilizam sistemas CLAE equipados apenas com bomba simples, de menor custo, e empregando eluição isocrática, mantendo constante o fluxo da fase móvel na coluna, por ser um sistema de fácil operação e com boa reprodução entre diferentes marcas de equipamentos (DUTRA; HOFFMANN-RIBAN; RIBANI, 2010).

O chá foi produzido a partir da partícula AP02 (180 μm), levando-se em consideração o rendimento do pó com esta granulometria e devido à observação dos demais testes realizados (prospecção fitoquímica e citotoxicidade). Após a injeção do chá, nas condições descritas anteriormente, obteve-se o cromatograma apresentado na Figura 4. O método foi considerado adequado, uma vez que possuiu um tempo curto de análise e separação entre os componentes da amostra. As mesmas condições foram aplicadas aos padrões, onde o método se mostrou eficiente, pois os picos dos mesmos apareceram num tempo curto de retenção e com boa resolução.

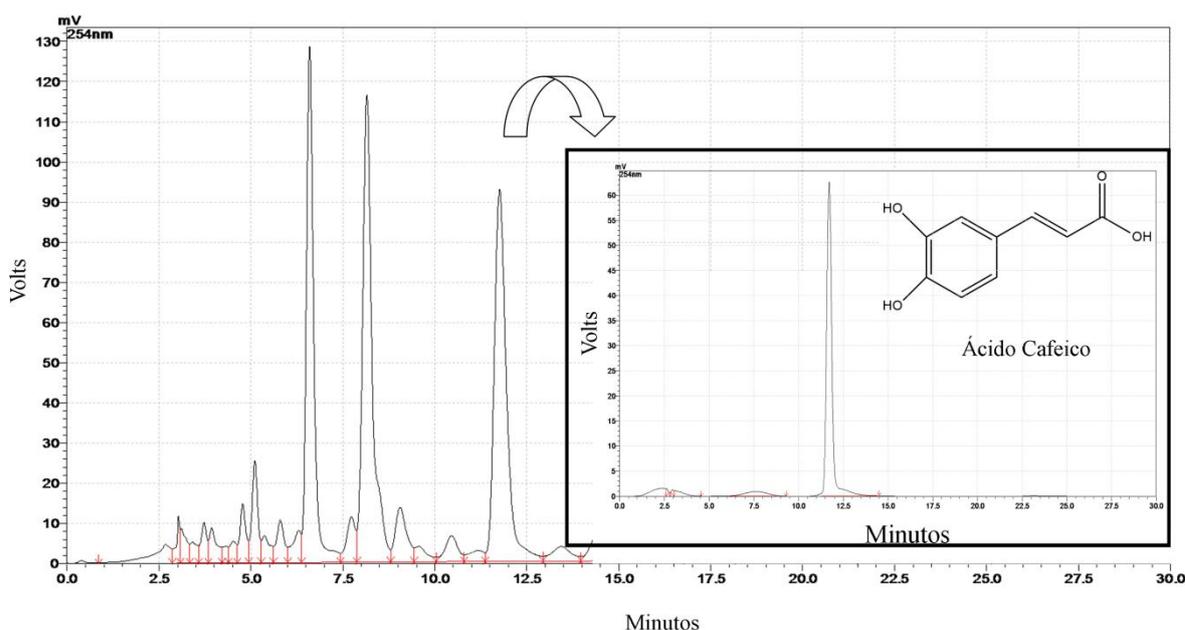
Figura 4 - Cromatograma obtido do chá da droga vegetal *Aspidosperma pyrifolium* Mart.



Fonte: Próprio autor, 2018

Com o método analítico estabelecido, realizou-se a injeção dos padrões analíticos selecionados para identificação da presença dos mesmos no chá, levando em consideração o tempo de retenção, a intensidade do pico e sua área. A Figura 5 mostra a identificação do padrão ácido cafeico no chá. O tempo de retenção (T_r) referente ao ácido cafeico, no chá, foi de 11,5 minutos de análise. O cromatograma da injeção do padrão, isolado, exibiu o pico no $T_r = 11,7$.

Figura 5 - Identificação do padrão ácido cafeico no chá da droga vegetal da *A. pyrifolium* Mart.



Fonte: Próprio autor, 2018.

O ácido cafeico é classificado como um composto fenólico que apresenta pronunciada atividade antioxidante, que age neutralizando radicais livres que possam causar danos oxidativos nas membranas celulares e no DNA (ALIYAZICIOGLU, 2013). O ácido cafeico é freqüentemente encontrado em inúmeras plantas na forma livre e em várias formas esterificadas, sendo um intermediário chave na biossíntese da lignana. O ácido cafeico demonstrou possuir um amplo espectro de propriedades biológicas poderosas, incluindo antiviral, antiestresse, além de efeitos quimiopreventivos contra o câncer. Estudos recentes demonstraram que alguns produtos esterificados, derivados deste ácido, também exibem atividade antimutagênica, anticarcinogênica, anti-inflamatória e imunomoduladora (BAE; KIM, 2012).

A atividade antiviral do ácido cafeico foi comprovada através da inibição de enzimas do tipo neuramidases do vírus da gripe, sendo estas enzimas um alvo importante para o desenho de fármacos anti-influenza. Os fragmentos das moléculas que possuíam o ácido cafeico exibiram boa atividade antiviral nestas células (XIE et al.; 2013).

A utilização do ácido cafeico e de outros compostos fenolicos foram capazes de inibir a formação de biofilme produzido pelo fungo *Candida albicans*, sendo mais efetivos que o medicamento de referência utilizado no tratamento de candidiases, o fluconazol. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) foram significantes tanto nos estágios iniciais de

formação do biofilme, como em estágios mais avançados, atribuindo uma boa atividade antimicrobiana ao ácido cafeico (VITA et al., 2014).

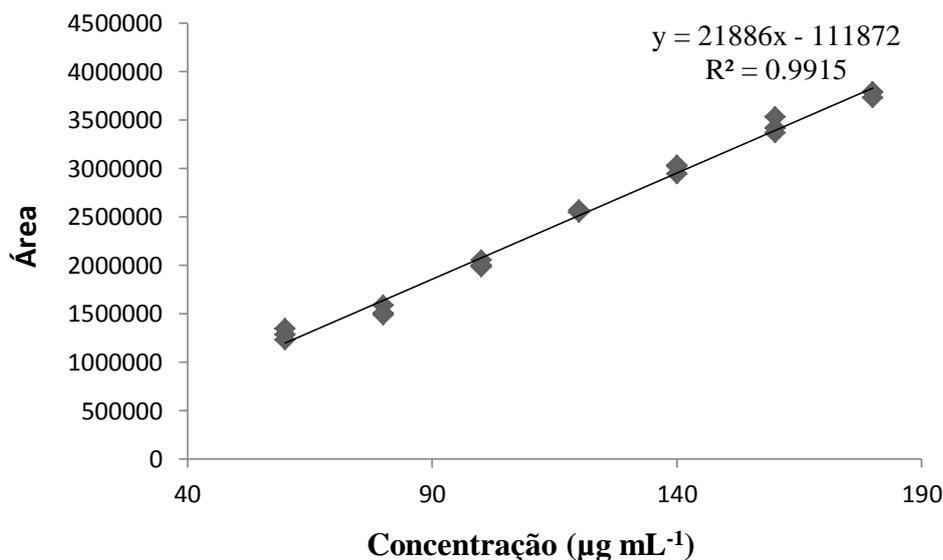
A atividade anti-inflamatória atribuída à planta medicinal *A. pyrifolium* pode estar relacionada com a atividade anti-inflamatória de compostos fenólicos, como o ácido cafeico, uma vez que a sua presença foi confirmada no chá. A inibição de enzimas envolvidas na produção de mediadores da inflamação atribui características analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas a muitas moléculas que estão atualmente disponíveis no mercado.

Desta forma, o ácido cafeico pode ser considerado o marcador químico dessa planta, possuindo propriedades bioativas responsáveis pela atividade anti-inflamatória da planta *A. pyrifolium.*, no qual a sua presença na matriz vegetal, confere benefícios devido a suas diversas propriedades terapêuticas comprovadas.

Validação do método para quantificação do ácido cafeico

Segundo a legislação brasileira a linearidade é a habilidade de um método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito em um dado intervalo de variação. A linearidade do padrão ácido cafeico foi avaliada através da injeção em triplicata das concentrações pré-estabelecidas (60, 80, 100, 120, 140, 160 e 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Após a construção da curva de calibração, obteve-se a equação da reta de regressão linear, através do método dos mínimos quadrados, avaliando a adequação do modelo proposto. Além disso, foi calculado o coeficiente de determinação (R^2). A Figura 6 mostra a curva de calibração obtida para o ácido cafeico.

Figura 6 - Curva de calibração para o ácido cafeico

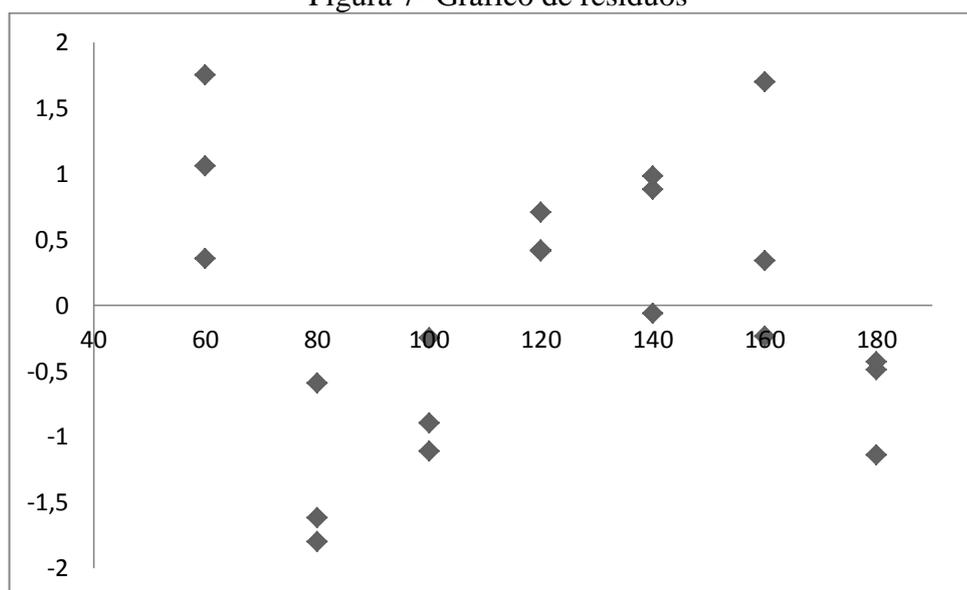


Fonte: Dados da pesquisa, 2018

A curva de calibração do ácido cafeico é representada pela equação $y = 21886 - 111872$ com coeficiente de correlação $R^2 = 0,9915$, dentro de uma faixa linear de 60 a 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Segundo a resolução de n° 166/2017, o valor para o coeficiente linear deve ser igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2017). O valor encontrado pelo método proposto mostrou-se dentro do valor estipulado, dando indícios de uma possível correlação linear entre os valores. A análise de variância demonstrou a significância do modelo linear.

O gráfico de resíduos (Figura 7), utilizado para confirmar a linearidade, mostrou uma distribuição homocedástica dos resíduos, num intervalo de confiança de 95%, garantindo dessa forma uma maior confiabilidade dos dados obtidos (FERNANDES, 2017).

Figura 7- Gráfico de resíduos



Fonte: Dados da pesquisa, 2018

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados através da curva de calibração, utilizando 95% de confiança. O LD foi de $2,24 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o LQ foi igual a $6,78 \mu\text{g mL}^{-1}$. O Limite de detecção é definido como sendo a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis (FRAQUETI, 2016).

Os limites de detecção e quantificação foram considerados satisfatórios, visto que os valores obtidos encontram-se muito abaixo do valor observado no modelo linear de calibração, mostrando que possíveis ruídos na linha de base do equipamento não interferem na determinação de soluções com concentrações dentro dos limites lineares da curva de calibração (SANTANA, 2016). A validação do método cromatográfico tornou possível a quantificação do teor de ácido cafeico contido no chá, que foi de $11,3 \mu\text{g mg}^{-1}$.

A determinação da precisão costuma ser subdividida em repetibilidade (intra-dia), que refere-se à precisão do método durante um curto intervalo de tempo, sob as mesmas condições de análise, precisão intermediária (inter-dia), que é a habilidade do método de fornecer os mesmos resultados, sob as mesmas condições analíticas, porém em dias diferentes e reprodutibilidade, que é utilizada para demonstrar a precisão do método em laboratórios diferentes (SPÍNOLA; LLORENT-MARTÍNEZ; CASTILHO, 2014).

A análise de precisão do método foi determinada a partir de seis determinações de soluções independentes do padrão, preparadas em um único dia e em dias diferentes pelo mesmo analista e incluem, respectivamente, a determinação da repetibilidade e precisão intermediária do método analítico. Foram considerados os valores de desvio padrão e coeficiente de variação (CV) como parâmetros para esta análise, onde os valores de CV não devem ultrapassar 5%. Os valores expostos na Tabela 7 mostram uma boa precisão do método desenvolvido.

Tabela 7- Precisão do padrão ácido cafeico analisados em dois dias diferentes e por um analista diferente

	Média (área)	DP	CV (%)
Intradia	2557009	11461	0,54
Interdia	2457250	28737	1,16
Inter-analista	2347097	38102	1,61

DP – Desvio padrão, CV – Coeficiente de variação.

Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

Neste estudo a exatidão do método foi determinada a partir do ensaio de adição de padrão, uma vez que se trata de uma matriz complexa, que consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de referência na matriz da amostra, neste caso o chá. A exatidão foi expressa como o percentual de recuperação do composto referência (determinadas a partir do intervalo de linearidade da análise) adicionada a matriz (Tabela 8), sendo utilizada três concentrações: uma baixa ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$), uma média ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e uma alta ($120 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabela 8- Valores obtidos para o ensaio de recuperação pela metodologia de adição do padrão

Nível	DP	CV	% de recuperação
Baixo	2,65	4,14	106,6
Médio	2,42	3,23	93,7
Alto	1,66	1,71	97,0

DP – Desvio padrão, CV – Coeficiente de variação.

Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

A orientação da FDA para drogas estabelece a porcentagem de recuperação seja de 80, 100 e 120% do valor esperado, e que o valor experimental seja realizado em triplicata. Para

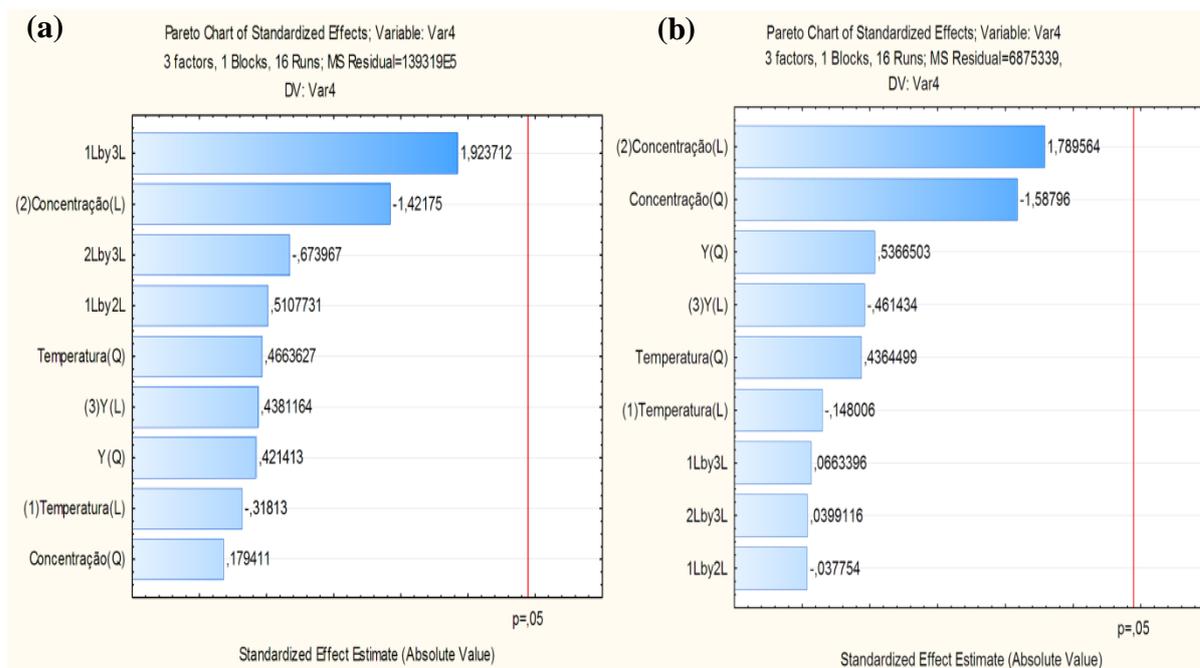
materiais botânicos e suplementos dietéticos, onde o analito pode estar presente em um grande intervalo de concentração, a recuperação deve ser determinada ao longo de todo o intervalo analítico de interesse para o método (BETZ; BROWN; ROMAN, 2010).

Os limites de recuperação estabelecidos pela ANVISA, possuem intervalos de acordo com a concentração do analito. Os valores de recuperação próximos a 100% são os mais adequados, contudo, estes limites podem sofrer alterações de acordo com o tipo de análise (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017). Segundo a *Association of Official Analytical Chemists International* AOAC (2002) o intervalo de recuperação recomendado para amostras de origem vegetal é de 75 – 120 %, para concentrações na faixa de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Dessa forma, a recuperação para o padrão ácido cafeico encontra-se dentro do especificado para matrizes vegetais, com uma variação inferior a 15%, possuindo também, valores de CV inferiores a 5%, um outro critério estabelecido por regulamentações.

A robustez do método analítico define a interferência de pequenas variações no funcionamento do equipamento nos resultados da análise. Tais variações das condições analíticas nos permite conhecer quais fatores devem ser estritamente controlados durante as análises de rotina.

Através da análise de variância (ANOVA), foi possível observar que as variações nos parâmetros escolhidos, não causaram interferência na área do pico nem no tempo de retenção do ácido cafeico ($p > 0,05$), como detalhado no gráfico de pareto (Figura 8):

Figura 8 - Gráfico de Pareto - (a) influência dos fatores na área, (b) influência dos fatores no tempo de retenção.



Fonte: Dados da pesquisa, 2018

Avaliando o coeficiente de variação da análise dos valores das áreas dos picos obtidos, assim como os valores do tempo de retenção, concluímos que o limite estabelecido (5%) foi mantido, mostrando que o método pode ser considerado robusto, uma vez que resistiu a variações realizadas na metodologia.

Inibição in vitro da desnaturação da albumina do ovo

Na Tabela 9, é possível observar os valores do percentual de inibição, dos padrões utilizados, sobre a desnaturação da proteína do ovo. Este teste foi realizado com a finalidade de investigar a atividade anti-inflamatória do chá da droga vegetal. Através dos resultados, observa-se que, à medida que a concentração das substâncias diminui, ocorre uma diminuição do percentual de inibição. Vários fármacos anti-inflamatórios como a indometacina, diclofenaco de sódio, ácido salicílico e ácido flufenâmico possuem a capacidade de inibir a desnaturação de proteínas (CORRÊA, 2014).

Tabela 9 - Percentual de inibição da desnaturação da proteína do ovo

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Percentual de Inibição (%)			
	Ácido acetil salicílico	Padrões		
		Nimesulida	Dexametasona	Ácido cafeico
100	197,6 \pm 0,1	268,5 \pm 1,0	268,5 \pm 5,2	244,7 \pm 3,7
80	143,3 \pm 0,1	210 \pm 0,7	210 \pm 1,0	210,5 \pm 1,7
60	93,9 \pm 0,8	140 \pm 0,03	140 \pm 0,6	158,1 \pm 1,9
40	48,6 \pm 0,1	84,5 \pm 0,01	84,5 \pm 0,9	124 \pm 1,3
20	16,5 \pm 0,1	22,2 \pm 0,07	22,2 \pm 0,05	64,3 \pm 0,8

\pm : Desvio Padrão

Fonte: dados da pesquisa, 2019.

Os padrões utilizados possuem atividade anti-inflamatória, sendo o ácido acetil salicílico e a nimesulida um anti-inflamatório não esteroidal (AINEs), agindo através da inibição das cicloxigenases, envolvidas no desencadeamento de processos inflamatórios. A dexametasona é um anti-inflamatório pertencente à classe dos corticóides. Sua atividade anti-inflamatória provém da inibição da síntese de proteínas pró-inflamatórias.

O ácido cafeico, possui, dentre as suas atividades farmacológicas, atividade anti-inflamatória. Por ser um composto fenólico, compartilha da capacidade de inibir a ciclo-oxigenase (COX), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), lipoxigenase, mono-oxigenase microsomal, glutatona S-transferase, succinoxidase mitocondrial e NADPH-oxidase (LEITE et al., 2015).

Na Tabela 10 estão expostos os valores do percentual de inibição da desnaturação proteica, provenientes do chá da droga vegetal em três concentrações testadas. A medida que a concentração aumenta, o percentual de inibição também aumenta, podendo se concluir que existe uma resposta dose-dependente.

Tabela 10 – Percentual de inibição da desnaturação protéica do chá da droga vegetal.

Percentual de Inibição da Amostra	
Concentração (%)	Percentual de Inibição (%)
1,0	102,3 \pm 0,03
2,5	148,9 \pm 0,07
5,0	257,6 \pm 0,18

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

A desnaturação de biomoléculas endógenas tem sido bastante documentada em processos inflamatórios, principalmente aqueles que estão relacionados a doenças artríticas. A

produção de auto-antígenos em pacientes com artrite reumatóide pode levar ao desencadeamento da desnaturação de proteínas *in vivo*, ocasionando a perda da sua função biológica. O descobrimento de moléculas, que possuem a propriedade de inibir a desnaturação de proteínas, em meio a processos inflamatórios, podem ser empregadas em estudos mais aprofundados, para avaliar a sua atividade anti-inflamatória (GWATIDZO et al., 2018).

Estudos *in vivo* realizados recentemente, demonstraram o potencial anti-inflamatório de extratos obtidos da planta *A. pyrifolium*, sendo capaz de inibir o edema de pata induzido pelos agentes flogísticos carragenina e veneno de cobra, bem como inibir a migração de leucócitos na peritonite induzida por carragenina (MESSIADES, 2014; DIAS, 2016).

A *Aspidosperma pyrifolium* também se mostrou eficiente na diminuição de contorções abdominais induzidas por ácido acético e na redução de lambeduras na pata após o teste da formalina nas suas duas fases, a fase neurogênica (curta duração com ativação de nociceptores) e a fase inflamatória (liberação de mediadores endógenos ocasionando resposta inflamatória local) (MESSIADES, 2014; RODRIGUES, 2015).

A realização de metodologias *in vitro* para avaliação da atividade farmacológica de algumas substâncias vem se destacando nos últimos anos, uma vez que, a realização de testes *in vivo* exibem certos problemas, principalmente problemas relacionados à aprovação de projetos no comitê de ética animal, no qual orienta que havendo-se a possibilidade de substituir um teste *in vitro* por um *in vivo*, deve-se aplicá-lo (CHANDRA et al., 2012).

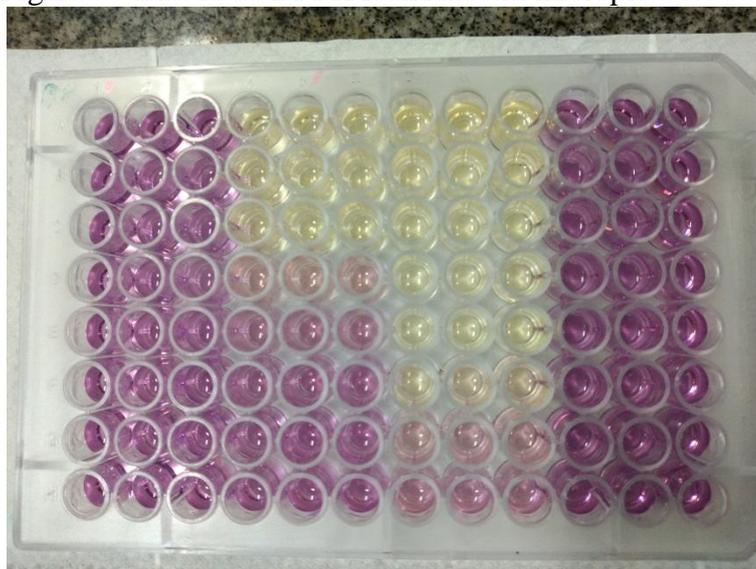
Através da equação da reta, obtida da plotagem dos dados das concentrações das soluções estudadas (padrões farmacológicos e chá da droga vegetal) com os seus respectivos valores do percentual de inibição, foi possível calcular os valores de IC_{50} . Para o padrão AAS, foi obtido um valor de $IC_{50} = 95,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, para o nimesulida um valor de $73,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, para a dexametasona $103,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e para o ácido cafeico um valor de $IC_{50} = 34 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para o chá da droga vegetal o valor de IC_{50} foi de 6,4%. O padrão ácido cafeico se mostrou mais potente dentre os demais padrões utilizados, confirmando o seu potencial anti-inflamatório já descrito na literatura. O valor da IC_{50} do chá da droga vegetal demonstra que, a concentração que inibe 50% da desnaturação da proteína se mostra efetiva mesmo que em baixas concentrações.

Avaliação da atividade antioxidante do chá

Os radicais livres produzidos pelo organismo são controlados por substâncias com atividade antioxidante. O controle da produção destes radicais previnem o aparecimento de muitas doenças, como por exemplo, o câncer. Tal controle pode se dar pela utilização de compostos antioxidantes, provenientes da alimentação, de origem animal e vegetais. Desta forma, uma substância possui atividade antioxidante quando, em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato (SOUSA et al., 2007).

O ensaio de DPPH foi realizado em uma microplaca de 96 poços (Figura 9), sendo possível utilizar uma quantidade reduzida de reagentes e substâncias, obtendo resultados de forma rápida e de fácil execução, gerando uma quantidade reduzida de resíduos considerados agressivos para o meio ambiente (FERNANDES, 2016).

Figura 9 - Ensaio do DPPH realizado em microplaca



Fonte: Dados da pesquisa, 2019

Na Tabela 11 é possível observar um percentual de inibição do ácido cafeico sob o substrato oxidável de 87,1%, demonstrando um bom potencial antioxidante. Outras atividades antioxidantes relatados na literatura para o ácido cafeico, mostrou um percentual de inibição menor do que encontrado neste estudo (49,76 %) (OSORIO-ESQUIVEL et al., 2013).

O valor da concentração efetiva necessária para se obter 50% do efeito antioxidante máximo estimado em 100% (IC_{50}) foi calculado através de uma regressão linear para cada

padrão e para o chá, onde a abscissa representava as concentrações da amostra, e a ordenada à porcentagem de Atividade Antioxidante (AA%). O valor da IC₅₀ do chá foi maior do que o valor do padrão ácido cafeico, uma vez que o mesmo é constituído por uma matriz complexa, não estando com o mesmo grau de pureza do padrão.

Os valores de IC₅₀ expostos na tabela visam demonstrar a capacidade que determinados compostos possuem em inibir 50% da oxidação da concentração inicial do radical DPPH. O ácido cafeico exibiu uma IC₅₀ de 3,44 µg mL⁻¹. Quanto menor o valor obtido, maior será a capacidade antioxidante. Resultados próximos, ao obtido na análise, de IC₅₀ para o ácido cafeico foi encontrado por Magnani (2014).

A potente atividade antioxidante dos núcleos fenólicos vem sendo demonstrado, ao longo dos anos, por diversos autores (MIHARA et al., 2005; MEDA et al., 2005; WU et al., 2005). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres (OSORIO-ESQUIVEL et al., 2013).

Tabela 11 – Valores obtidos da avaliação da atividade antioxidante do padrão ácido cafeico e o chá da droga vegetal

Concentração (µg mL ⁻¹)	Padrão Ácido Cafeico	
	DPPH livre (%)	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
5	87,1	3,44
Concentração (µg mL ⁻¹)	Chá da Droga Vegetal	
	DPPH livre (%)	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
5	52,0	18,6

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Muitos processos inflamatórios induzem o estresse oxidativo, produzindo radicais livres no organismo humano, sendo interessante administrar uma substância que possua atividade anti-inflamatória e antioxidante ao mesmo tempo, para inibir e prevenir essa produção. O ácido cafeico reúne essas duas propriedades, podendo ser demonstrada em estudo por Wang (2013), sendo um agente anti-inflamatório e potente antioxidante.

O chá da droga vegetal, preparado na mesma concentração do padrão, demonstrou uma boa capacidade antioxidante, com um valor de IC_{50} baixo ($18,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). A atividade antioxidante de plantas medicinais pertencentes ao gênero *Aspidosperma*, sempre foi bastante documentado na literatura científica, sendo comprovada em diversos estudos (BARBOSA, 2008; BRITO et al., 2015; PESSINI, 2015).

CONCLUSÃO

A diminuição do tamanho de partícula influenciou na quantidade de metabólitos extraídos, podendo ser observado através da análise fitoquímica. Porém, a partícula de menor tamanho apresentou maior toxicidade, quando comparada às demais partículas, tendo em vista que partícula AP05 apresentou capacidade de hemolisar 50% dos eritrócitos para todos os grupos sanguíneos analisados. Neste trabalho a caracterização química por CLAE-UV do chá de *A. pyrifolium* permitiu a identificação o composto ativo ácido cafeico, sendo o método de quantificação desenvolvido, linear, sensível e robusto, obedecendo a todas as especificações estabelecidas pelas normas vigentes. Através de metodologias *in vitro* foi possível observar que o chá da droga vegetal possui indícios de atividade anti-inflamatória e antioxidante, sendo imprescindível uma investigação mais aprofundada de tais atividades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 jul 2017. Disponível em: <http://portal.imprensanacional.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412>. Acesso em: 02 out 2018.

ALIYAZICIOGLU, R.; SAHIN, H.; ERTURK, O.; ULUSOY, E.; KOLAYLI, S. Properties of phenolic composition and biological activity of propolis from turkey. **International Journal of Food Properties**, v. 16, p. 277–287, 2013.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists International. **Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals**, 2002.

ASSUNÇÃO, I. L. M. **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de uma formulação semissólida com atividade antimicrobiana a partir do extrato seco de *schinopsis brasiliensis engler***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Estadual da Paraíba, 2017.

BAE, J. S.; KIM, T. H. Enzymatic transformation of caffeic acid with enhanced cyclooxygenase-2 inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, 793–796, 2012.

BARBOSA, A. L. Desenvolvimento de um creme para o tratamento de candidíase vulvovaginal a partir do extrato de *schinopsis brasiliensis engler*. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas). 2017.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão acadêmica**, v. 11, n. 2, 2010.

BETZ, J. M.; BROWN, P. N.; ROMAN, M. C. Accuracy, precision, and reliability of chemical measurements in natural products research. **Fitoterapia**, v. 82, 44–52, 2011.

BRANDÃO, D. O. **Desenvolvimento de uma formulação de uso intracanal com atividade antimicrobiana obtida a partir de uma planta do semiárido brasileiro**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos analíticos por HPLC**. Fundamentos, Estratégias e Validação. São Carlos: Edufscar, 2013. 77p.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguayensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 11, p. 3583 - 3589, 2004.

CORREIA, L. P.; PROCÓPIO, J. V. V.; SANTANA, C. P.; PINTO, M. F.; MOURA, E. A.; SANTOS, A. F. O.; MACÊDO, R. O. Herbal medicine physical quality evaluation by thermal analysis using adapted Ozawa method. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, v. 122, n. 1, p. 207–214, 2015.

CORREIA, L. P.; SANTANA, C. P.; SILVA, K. M. A.; RAMOS-JÚNIOR, F. J. L. R.; LIMA, R. S. C.; SOUZA, F. S.; MEDEIROS, A. C. D. Physical and chemical characteristics of *Maytenus rigida* in different particle sizes using SEM/EDS, TG/DTA and pyrolysis GC–MS. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, p. 1-10, 2016. doi: 10.1007/s10973-016-5999-0.

CRUZ-SILVA, M. M.; MADEIRA, V. M. C.; ALMEIDA, L. M.; CUSTÓDIO, J. B. A. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1464, n. 1, p. 49-61, 2000.

DESOTI, V. C.; MALDANER, C. L.; CARLETTO, M. S.; HEINZ, A. A.; COELHO, M. S.; PIATI, D.; TIUMAN, T. S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do paraná. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 15, n. 1, p. 3 - 13, 2011.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, Campinas, n. 7, out. 2006.

DUTRA, F. L. G.; HOFFMANN-RIBAN, R.; RIBANI, M. Determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência isocrática durante estacionamento da erva-mate. **Química Nova**, v.33, n. 1, p. 119-123, 2010.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz. Volume 1, 5ª Ed. Brasília, 2010.

FAQUETI, L. G. **Quantificação por cromatografia líquida de ultra eficiência de marcadores presentes no extrato aquoso de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae).** Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2016.

FELTRIN, E. P.; CHORILLI, M. Extratos Secos Padronizados: Tendência Atual em Fitoterapia. *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*. v. 7, n. 1, p. 109-115, 2010.

FERNANDES, F. H. A. **Estudo químico-farmacológico e desenvolvimento galênico De *spondias dulcis* forst.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2017.

LIMA, M. C. J. S. **Análise fitoquímica e avaliação das atividades anti-inflamatória, antipeçonhenta e citotóxica de extratos aquosos de *Aspidosperma pyrifolium* e *Ipomoea asarifolia*.** 2015. 150f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica. Centro de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

MARINHO, A. F. **Caracterização dos marcadores, desenvolvimento e validação de método analítico aplicado ao estudo de sazonalidade e identificação de noos alcalóides de *Cissampelos sympodialis*.** Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

MARQUES, G. S. **Desenvolvimento e avaliação de metodologias analíticas para quantificação de flavonóides totais e canferitrina em folhas de *Bauhinia forficata* LINK.** Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2011.

MARTINS, M. B. G. CARAVANTE, A.L.C; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B; SOARES, M.K.M; MOREIRA, R.R.D; SANTOS, L.E. Caracterização anatômica e fitoquímica de

folhas e rizomas de *Hedychium coronarium* J. König (Zingiberaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.2, p.179-187, 2010.

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

MEDA, A., LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in burkin fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005.

MESSIADES, D. M. S. **Estudo das propriedades biológicas, fitoquímicas e toxicológicas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.** 2014. 137f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

OLIVEIRA, N. T.; ALMEIDA, S. S. M. S. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida* Aublet (Apocynaceae). **Biota Amazônia**, v. 6, n. 1, p. 20-25, 2016.

PEREIRA, J. C. S. **Estudo alelopático, fitoquímico e genotóxico de extratos aquosos de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. e *Combretum leprosum* Mart. em *Allium cepa*.** 2015. 67f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2015.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

RODRIGUES, J. V. M. **Desenvolvimento de uma solução oral com atividade farmacológica a partir de extrato de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.** 2015. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.

SANTANA, C. P. **Desenvolvimento de comprimidos com atividade antimicrobiana a partir de extrato de *Ximenia americana* L.** Dissertação. Programa de Pós-graduação em

Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande. 2016.

SOUSA, S. A. **Desenvolvimento e validação de método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio de dissolução para avaliação da qualidade de fitoterápicos contendo *Paullinia cupana* Kunth**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2009.

SPÍNOLA, V.; LLORENT-MARTÍNEZ, E.J.; CASTILHO, P.C. Determination of vitamin C in foods: current state of method validation. **Journal. Chromatography. A**, v. 1369, n., p. 2-17, 2014.

TRINDADE, R. C. S.; KIKUCHI, T. Y. S.; SILVA, R, J. F.; VALE, V. V.; OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; COELHO-FERREIRA, M. R. Estudo farmacobotânico das folhas de *Aspidosperma excelsum* Benth. (Apocynaceae). **Revista Fitos**, v. 10, n. 3, p. 220-372, 2016.

VALE, V. V. **Estudo fitoquímico e atividade antiplasmódica em *Plasmodium falciparum* (W2) de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (Apocynaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Estadual do Pará, Belém, 2014.

VITA, D.; FRIGGERI, L.; D'AURIA, F. D.; PANDOLFI, F.; PICCOLI, F.; PANELLA, S.; PALAMARA, A. T.; SIMONETTI, G.; SCIPIONE, L.; SANTO, R.; COSTI, R.; TORTORELLA, S. Activity of caffeic acid derivatives against *Candida albicans* biofilm. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 1502–1505, 2014.

XIE, Y. HUANG, B.; YU, K.; XU, W. Further discovery of caffeic acid derivatives as novel influenza neuraminidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, 7715–7723, 2013.

Capítulo II – Artigo II

3 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DA DROGA VEGETAL DE *Aspidosperma pyrifolium* MART.

Artigo aceito para publicação on line no Journal of Thermal Analysis and Calorimetry (ANEXO I)

Caracterização térmica da droga vegetal de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.

Jéssica Cabral de Andrade¹, Widson Michael dos Santos¹, Fernanda Pontes Nóbrega¹, Lucas Ferreira de Almeida¹, Felipe Hugo Alencar Fernandes^{1,2}, Cleildo Pereira de Santana³, Germano Veras⁴, Ana Cláudia Dantas Medeiros^{1,3*}

¹Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, R. Baraúnas, 351, Cidade Universitária, 58429-500, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

²Unifacisa, Centro Universitário, Av. Sen. Argemiro de Figueiredo, 1901, Itararé, Campina Grande, Paraíba, 58411-020, Brasil

³Centro de Tecnologia em Desenvolvimento de Medicamentos (CT-Tecnologia Farmacêutica), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

⁴Laboratório de Química Analítica e Quimiometria, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual da Paraíba, R. Baraúnas, 351, Cidade Universitária, Campina Grande, Paraíba, 58429-500, Brasil.

RESUMO

Aspidosperma pyrifolium Mart é uma planta endêmica do nordeste brasileiro, amplamente utilizada na medicina popular devido às suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas. É popularmente conhecida como Pereiro, e usado para tratar várias doenças, como febre, hipertensão, icterícia, dismenorréia, distúrbios gastrointestinais e malária. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar, por técnicas analíticas, a droga vegetal da planta *A. pyrifolium* em diferentes tamanhos de partículas para uso na produção de chá. Para caracterização, foram utilizadas técnicas de análise térmica, microscopia óptica (MO) e espectroscopia no infravermelho próximo (NIR). Após tamisação, foram obtidas cinco amostras, denominadas AP01 (>355 µm), AP02 (≥180 µm), AP03 (≥155 µm), AP04 (≥75 µm) and AP05 (≥38 µm). As curvas termogravimétricas mostraram três etapas de decomposição, com diferentes porcentagens de perda de massa. O segundo evento de decomposição apresentou a maior perda de massa para as cinco partículas. As curvas DTA das cinco amostras mostraram um primeiro pico endotérmico em 91,70, 96,22, 96,29, 91,09 e 86,32 °C para AP01, AP02, AP03, AP04 e AP05, respectivamente. A decomposição de todas as partículas ocorreu a partir de

200 °C. A energia de ativação obtida através de modelos cinéticos mostrou diferenças significativas entre as duas metodologias empregadas. Os espectros NIR foram tratados usando ferramentas quimiométricas, incluindo análise de componentes principais (PCA) onde duas PCs foram necessárias para separar as amostras adequadamente. As técnicas analíticas utilizadas neste estudo permitiram caracterizar adequadamente os pós podendo ser utilizados na produção de chá.

Palavras-chave: Controle de Qualidade, Técnicas Analíticas, Quimiometria, Chá.

INTRODUÇÃO

A Farmacopéia Brasileira e os códigos oficiais estabelecem parâmetros para avaliar a qualidade dos insumos farmacêuticos, entretanto, para ingredientes farmacêuticos ativos vegetais, esses parâmetros são escassos para várias espécies de plantas. A obtenção de um fitoterápico requer a garantia da qualidade química da planta, para que sua atividade biológica e segurança não sejam afetadas. Durante o processo de produção, o controle da granulometria é um passo importante, uma vez que os diferentes tamanhos das partículas influenciam diretamente nas características do produto final. Os métodos analíticos atualmente utilizados são úteis para caracterizar fármacos vegetais, garantindo a eficácia de seu uso, além de serem utilizadas pelas empresas durante as etapas de produção e controle de qualidade de chás (BRANDÃO et al., 2016; SANTANA et al., 2018).

A Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria (ICTAC) estabelece que os parâmetros para estudos cinéticos não isotérmicos devem ser determinados através de modelos livres, como nos modelos isoconvercionais, que são divididos em duas categorias: diferencial e integral. Muitos modelos matemáticos de isoconversão têm sido utilizados para caracterizar ingredientes farmacêuticos ativos, tais como Flynn-Wall-Ozawa, Kissinger-Akira-Sunose, Friedman, Li-Tang, Coats-Modified Redfern e Vyazovkin (VYAZOVKIN et al., 2014). Utilizando metodologias obtidas a partir de estudos térmicos, é possível obter informações mais precisas sobre qual matéria-prima é mais ou menos estável termicamente (BARBADILLO et al., 2007).

Em comparação com outras técnicas analíticas, a microscopia óptica, embora simples, é uma ferramenta útil que fornece imagens da morfologia das partículas. Esta técnica, por exemplo, foi utilizada em um estudo de pré-formulação utilizando *Schinopsis brasiliensis*

Engler e excipientes farmacêuticos para identificar incompatibilidades (FERNANDES et al., 2016).

O infravermelho próximo (NIR) é uma técnica de espectroscopia vibracional que permite analisar rapidamente, sem reações químicas, amostras de bebidas, cigarros, alimentos, combustíveis e fármacos (MELO et al., 2013). Mas, essas técnicas analíticas apresentam sinais espectrais muito complexos, sendo necessário o uso de análise multivariada, empregando técnicas quimiométricas. Neste sentido é possível determinar a concentração de analitos, propriedades químicas e físicas. Mas também é possível utilizar técnicas de reconhecimento de padrões, agrupando as amostras. A técnica mais utilizada para agrupar amostras é a Análise de Componentes Principais (PCA), que pode ser aplicada em análise de tamanho de partícula (SANTOS; PEREIRA; KORNDÖRFER, 2010).

A família Apocynaceae apresenta uma grande variedade morfológica (CONCEIÇÃO; LIMA; SOTO-BLANCO, 2010), caracterizada pela presença de vasos láctiferos e uma diversidade de substâncias resultantes do seu metabolismo secundário, os quais estão envolvidas em atividades farmacológicas. Entre os metabólitos secundários podem ser encontrados glicosídeos cardíacos e alcalóides do tipo indólicos. O gênero *Aspidosperma* apresenta grande relevância fitoquímica e é encontrado principalmente na América do Sul, em biomas como o Cerrado, a Caatinga e em algumas florestas. *A. pyrifolium* é uma espécie relevante na medicina popular, sendo utilizada devido às suas propriedades antiinflamatórias e analgésicas, principalmente no trato urinário, em algumas dermatites, dores estomacais, câimbras, pruridos e diarreia. (CONCEIÇÃO; LIMA; SOTO-BLANCO, 2010; KITAJIMA et al., 2013).

A obtenção de partículas é um passo crítico, pois qualquer alteração na sua granulometria pode resultar em partículas com tamanhos heterogêneos e não uniformes (CORREIA et al., 2016; CORREIA et al., 2018). Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar, através de técnicas analíticas, a *Aspidosperma pyrifolium* Mart. em diferentes tamanhos de partículas para uso na produção de chá.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos pós

As cascas da *Aspidosperma pyrifolium* foram coletadas na região semiárida da Paraíba, (7°13'50"S, 52°52'W). O material botânico foi identificado pelo professor Leonardo

Pessoa Félix e a exsicata depositada no herbário Jayme Coelho de Moraes, na Universidade Federal da Paraíba – UFPB, sob número 20104. O material vegetal coletado foi submetido à secagem em estufa de circulação de ar, a 40 °C e pulverizado em moinho de facas, o qual possuía um tamis de 10 mesh acoplado. Os pós obtidos, com diferentes granulometrias, foram denominados de AP01 (>355 µm), AP02 (≥180 µm), AP03 (≥155 µm), AP04 (≥75 µm) e AP05 (≥38 µm), acondicionados separadamente em frascos de polietileno branco, fosco e devidamente fechados, para proteção da luz e da umidade e armazenados a temperatura ambiente de 25°C.

Análise térmica diferencial (DTA)

As curvas de análise térmica diferencial dos pós (AP01, AP02, AP03, AP04, AP05) foram obtidas em um analisador térmico da Shimatzu, utilizando cadinhos de alumínio com cerca de $2 \pm 0,1$ mg de amostra sob atmosfera de nitrogênio, no fluxo de 50 mL min^{-1} . Os experimentos foram realizados no intervalo de temperatura de 25 a 450°C, com razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas dinâmicas dos pós (AP01, AP02, AP03, AP04, AP05), foram obtidas em um analisador térmico da Shimatzu, utilizando cadinhos de alumina, com cerca de $8 \pm 0,1$ mg, sob uma atmosfera de nitrogênio a 50 mL min^{-1} . Os experimentos foram realizados no intervalo de temperatura de 25 a 900°C, com razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

Estudo cinético das partículas

As análises termogravimétricas foram realizadas em um analisador térmico simultâneo (Shimadzu DTG-60). As amostras (8 mg) foram analisadas em porta amostras de alumina, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1} , em razões de aquecimento de 10, 20 e $40 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ e uma faixa de temperatura de 25 a 900 °C. Os métodos de FWO, KAS, foram utilizados para determinar os parâmetros da cinética de análise térmica.

O método FWO é explicado pela equação:

$$\ln \beta = \ln \frac{0.0048AE}{RG \alpha} - 1.0516 \frac{E}{RT} \quad (7)$$

Já o método KAS é explicado pela equação:

$$\ln \frac{\beta}{T^2} = \ln \frac{AR}{EG(\alpha)} - \frac{E}{RT} \quad (8)$$

Onde onde β é a taxa de aquecimento linear ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$); E é a energia de ativação (J mol^{-1}); A é o fator pré-exponencial; R é a constante molar dos gases; $G(\alpha)$ é a função integral do mecanismo (ZHOU; SHENG, 2012).

Microscopia óptica

Foram avaliados parâmetros físicos, como circunferência, raio, diâmetro e área das partículas do pó, pela técnica de vídeo microscopia, utilizando um microscópio óptico digital de marca Hirox[®], modelo KH - 770. Esses parâmetros foram determinados pela média de vinte medidas.

Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho próximo foram obtidos com um espectrofotômetro Perkin Elmer[®] Lambda 750 na região de 750 a 2500 nm, com resolução de 2 nm, usando o acessório Praying Mantis[®], no modo de refletância. Os pós da droga vegetal foram analisados em quintuplicata ($n = 5$) e a curva espectral construída a partir da média das cinco curvas obtidas. Os espectros NIR foram usados para caracterizar os pós e verificar diferenças de tamanho entre as amostras, agrupando-as.

Análise quimiométrica

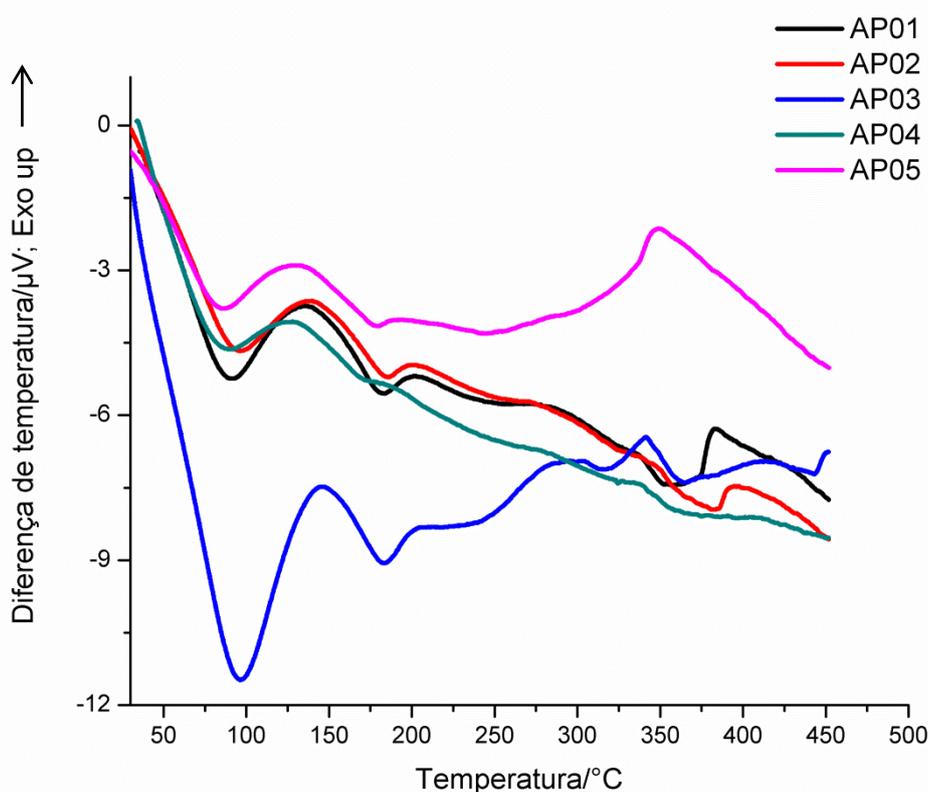
Dados espectroscópicos, obtidos a partir dos pós com diferentes tamanhos de partículas, foram submetidos a técnica de reconhecimento de padrões não supervisionados por Análise de Componentes Principais, utilizando o software The Unscrambler 9.8. Para melhor visualização dos dados, eles foram pré-processados, aplicando uma correção da linha de base dos espectros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise térmica diferencial

As curvas de DTA dos pós nas diferentes granulometrias 355, 180, 150, 75 e 38 μm (Figura 10), mostram eventos decorrentes de transições de fases em função da temperatura, em que são evidenciados eventos térmicos característicos da decomposição da droga vegetal.

Figura 10 - Curvas DTA das cinco partículas com granulometrias diferentes



Fonte: Dados da pesquisa, 2017

A Análise Térmica é baseada na interpretação dos picos endotérmicos e exotérmicos, que aparecem ao longo das curvas. Esses eventos nos permitem obter informações qualitativas e quantitativas, através do formato e posição de tais picos, por exemplo (FERNANDES et al., 2018; SANTANA et al., 2018).

Os primeiros picos endotérmicos presentes nas curvas das cinco amostras apresentaram temperaturas de pico entre 91,70 e 86,32 °C para AP01, AP02, AP03, AP04 e AP05, respectivamente, com temperatura inicial entre 35,78 - 111,15 °C. Uma das

características de drogas vegetais é apresentar morfologia amorfa e, assim, eventos endotérmicos podem ser atribuídos à evaporação da água da umidade ambiente, pois as matrizes amorfas são muito higroscópicas (CORREIA et al 2013). Estes processos ocorrem devido à decomposição térmica de alguns metabólitos secundários, como alcalóides, flavonóides e taninos, uma vez que, alguns destes metabólitos foram encontrados na espécie em estudo. Os processos de degradação das partículas foram iniciados em 350 °C.

O segundo evento endotérmico, para todas as partículas, ocorreu na faixa de 137,99 a 200,80 °C, com temperatura de pico entre 183,35 e 185,84 °C. Os valores de perda de calor, quando submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) com posterior teste de Turkey, mostraram diferenças significativas entre as partículas ($p=0,0006$), considerando ($p<0,05$), sendo possível diferenciá-las de acordo com a energia liberada. Estudos recentes revelam que drogas vegetais com diferentes tamanhos de partículas podem ter comportamentos térmicos diferentes (CORRÉIA, 2011).

O terceiro evento endotérmico ocorreu na faixa de temperatura entre 322,36 - 382,68 °C, com temperatura de pico entre 383,00 e 349,11 °C, respectivamente, para AP01, AP02, AP03, AP04 e AP05 (Tabela 12), seguido de um evento exotérmico, referente a decomposição das partículas. Variações de T_{onset} , T_{endset} e entalpia dos três eventos térmicos observados nas curvas de DTA, são sugestivas de diferenças no comportamento térmico das partículas.

Os materiais vegetais são compostos de matrizes complexas, o que prejudica a qualidade dos picos em DTA, onde a má qualidade dos mesmos pode ser atribuída a alguns fatores, como: imperfeições das partículas que constituem o fitoterápico, perda de produtos gasosos no aquecimento da amostra e presença de impurezas. Esses fatores contribuem para picos endotérmicos com larguras defeituosas.

Tabela 12 - Dados da análise térmica diferencial das partículas

Amostras	Pico 1			Pico 2			Pico 3		
	T _{pico} /°C	$\Delta H/J$ g ⁻¹	T _{inicial e final} /°C	T _{pico} /°C	$\Delta H/J$ g ⁻¹	T _{inicial e final} /°C	T _{pico} /°C	$\Delta H/J$ g ⁻¹	T _{inicial e final} /°C
AP01	91,70	322,19	63,07 – 117,43	183,53	94,25	161,91 – 200,80	383,00	35,31	373,90 – 437,53
AP02	96,22	260,42	66,12 – 124,46	185,84	56,08	159,15 – 198,45	382,68	106,95	335,76 – 382,68
AP03	96,29	501,02	35,78 – 130,53	183,35	96,92	157,85 – 196,58	341,43	154,40	324,22 – 360,63
AP04	91,09	360,75	50,54 – 115,80	136,54	47,35	148,57 – 189,53	327,37	35,31	323,87 – 353,36
AP05	86,32	242,93	51,59 – 112,38	179,83	28,96	137,99 – 189,13	349,11	1,07	322,36 – 433,11

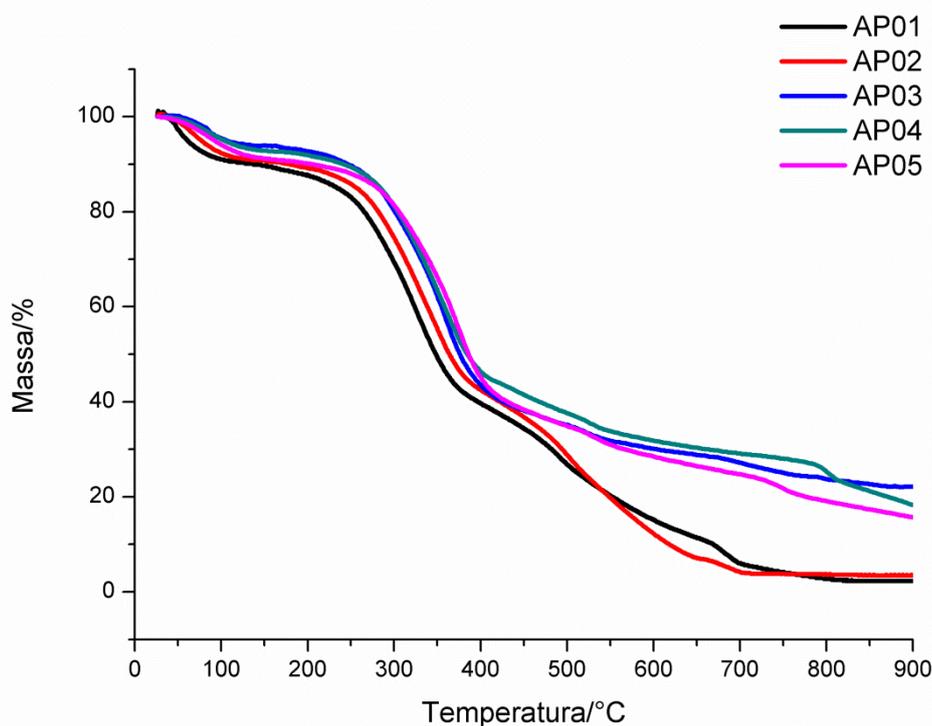
Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Termogravimetria (TG)

Estudos recentes utilizando termogravimetria mostraram uma diferença no perfil térmico de partículas com diferentes tamanhos de drogas vegetais. Diferenças observadas em seus sinais analíticos sugerem uma diferença química e física induzida pela diferença na granulometria (MELO et al., 2013).

As curvas termogravimétricas do pó fitoterápico apresentaram três etapas de decomposição. O primeiro estágio (Figura 11) ocorre em uma faixa de temperatura de 19,77 a 78,50 °C, o que pode ser atribuído à perda de compostos voláteis, como por exemplo a água, estando presentes em amostras vegetais. Para esta etapa, as perdas de massa foram de 9,98, 7,76, 8,35, 7,70 e 5,96% para AP01, AP02, AP03, AP04, AP05, respectivamente.

Figura 11 - Curvas TG para as cinco partículas com granulometrias diferentes



Fonte: Dados da pesquisa, 2017

A Farmacopéia Brasileira, para realizar o controle de qualidade de insumos farmacêuticos ativos, estabelece um limite máximo de 14% de umidade. Os resultados da TG possibilitam determinar o teor de umidade de fitoterápico e, com esses resultados, estabelecer formas de controle dos parâmetros de secagem, evitando o crescimento de microrganismos,

reações químicas e posterior degradação das amostras (MEDEIROS; MEDEIROS; MACÊDO, 2001).

Moléculas maiores são degradadas nas etapas seguintes, como pode ser atribuído ao segundo evento, que ocorreu na faixa de 259,06 a 363,68 °C, com uma perda de massa de 54,64% para AP01, 56,57% para AP02, 55,20% para AP03, 53,95% para AP04 e 53,23% para AP05, representando o estágio em que houve maior degradação das amostras. Este passo de degradação ocorreu perto do intervalo de temperatura do segundo evento térmico das curvas de DTA.

Na terceira etapa, com temperatura inicial de 431,11 °C e término a 904,80 °C, houve perda de massa de 23,94, 10,15, 12,78, 13,55 e 15,68% para AP01, AP02, AP03, AP04, AP05, respectivamente, correspondentes às cinzas das amostras. Nesta etapa, os constituintes da amostra que foram carbonizados constituem a matéria inorgânica e os resíduos que não podem se degradar nessa atmosfera.

As matrizes vegetais são compostas por vários componentes, sendo uma mistura de compostos orgânicos e inorgânicos. A decomposição térmica dessas substâncias é resultado de fenômenos físico-químicos, que ocorrem após o aquecimento. A Tabela 13 apresenta os valores associados aos passos de decomposição termogravimétrica das cinco amostras de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.

Tabela 13 - Dados das temperaturas de decomposição das partículas

Amostras	T_{onset}/°C	T_{endset}/°C	Perda de massa/%
AP01	63,76	76,70	9,98
	280,00	349,29	54,64
AP02	498,56	606,20	23,94
	55,58	78,50	7,76
	279,82	363,68	56,57
AP03	508,34	610,65	10,15
	52,01	67,36	8,35
	269,33	362,74	55,20
AP04	675,94	904,80	12,78
	51,47	71,49	7,70
	259,06	353,13	53,95
AP05	431,11	562,43	13,55
	19,77	65,01	5,96
	259,85	345,31	53,23
	696,26	792,76	15,68

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Através dos dados da TG expostos na tabela 13, podemos observar que a medida que o diâmetro da partícula ia diminuindo, a temperatura inicial de decomposição também diminuía, evidenciando a pouca estabilidade térmica das partículas com uma maior área superficial.

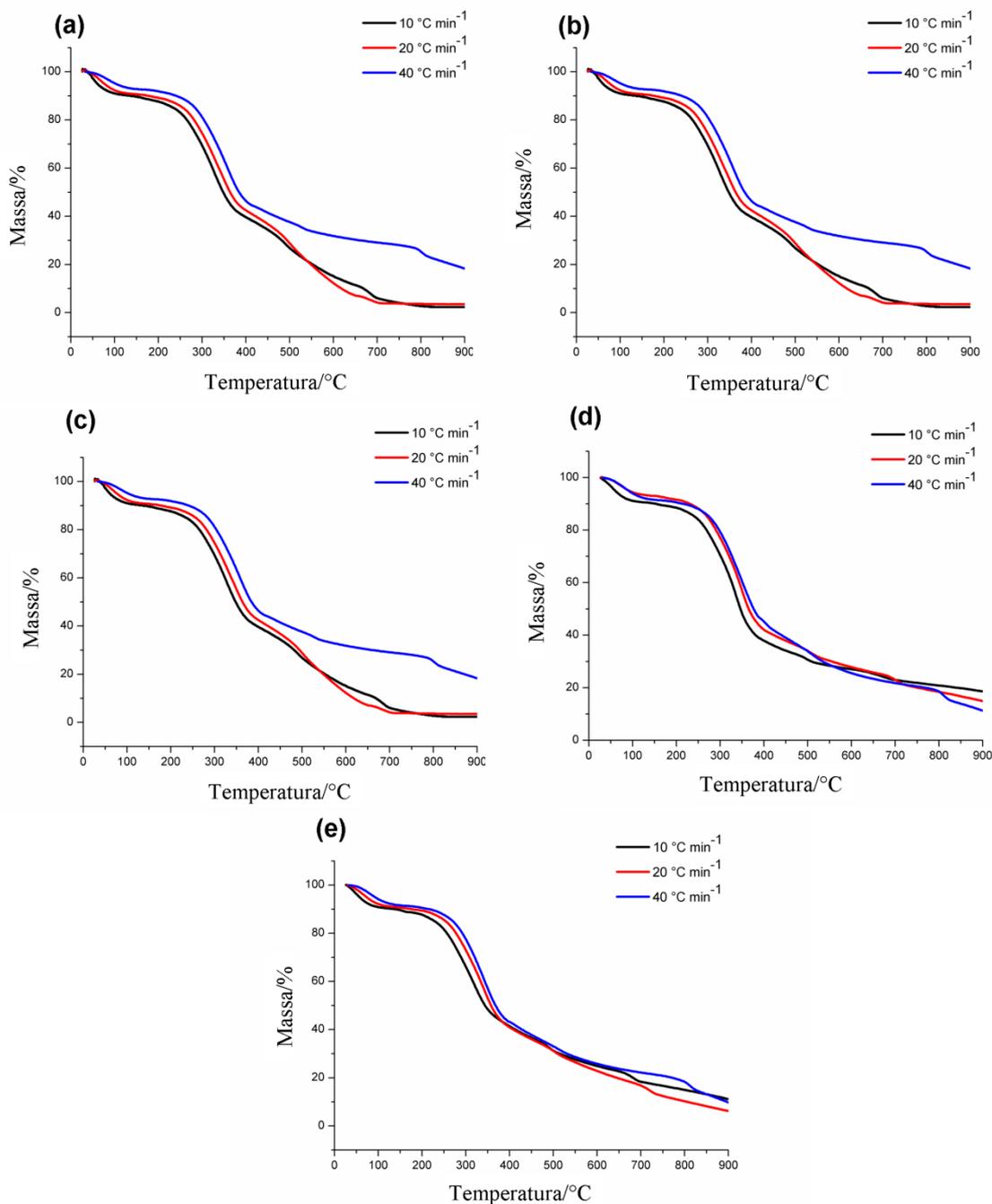
Estudo do comportamento cinético das partículas

As curvas TG das partículas obtidas nas razões de aquecimento (β) de 10, 20 e 40 °C min⁻¹ (Figura 12) mostraram o mesmo perfil térmico, com apenas um deslocamento de curvas devido a diferentes razões de aquecimento. As razões de aquecimento podem deslocar eventos termogravimétricos para temperaturas maiores ou menores, bem como influenciar o número de etapas de decomposição, causando variações nos valores de perda de massa, induzindo erros. Neste contexto, é fundamental utilizar razões de aquecimento diferentes na análise termogravimétrica (CORREIA et al., 2015; VENKATESH; RAVI; TEWARI, 2011).

A energia de ativação representa uma barreira pela qual toda reação química precisa ser transposta para começar. É um dos parâmetros cinéticos mais importantes a serem

determinados. Os modelos cinéticos utilizados no estudo foram: Flynn-Wall-Ozawa e Kissinger-Akira-Sunose. As faixas de temperatura e a perda de massa (Tabela 14), obtidas em três razões de aquecimento, da segunda etapa de decomposição das partículas foram selecionadas, logo após a etapa de decomposição das substâncias voláteis.

Figura 12 - TG das partículas em diferentes razões de aquecimento: (a) AP01, (b) AP02, (c) AP03, (d) AP04 e (e) AP05



Os modelos cinéticos de Flynn-Wall-Ozawa (FWO) e Kissinger-Akira-Sunose foram aplicados em nove frações de decomposição ($0,1 < \alpha < 0,9$). A energia de ativação (E_a) foi calculada pelo coeficiente angular das retas obtidas pelo logaritmo de β versus $1000/T$ para o modelo FWO.

A energia de ativação (kJ mol^{-1}) para as cinco partículas foi calculada multiplicando-se o coeficiente angular da linha pela constante dos gases ($R = 8,31 \text{ kJ mol}^{-1}$). Foi possível

observar que no modelo cinético de FWO (Tabela 14), que a energia média de ativação das partículas tendeu a aumentar até a partícula AP03, com diminuição para as partículas AP04 ($105,65 \text{ kJ mol}^{-1}$) e AP05 ($100,92 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Para o estudo cinético do KAS (Tabela 14), a energia média de ativação das cinco partículas aumentou conforme o diâmetro das partículas ia diminuindo, mas no AP05 ($38 \mu\text{m}$) a energia média de ativação diminuiu para $100,04 \text{ kJ mol}^{-1}$, sendo o mesmo valor obtido a partir do estudo cinético de Ozawa. Essas diferenças observadas em nosso estudo podem estar relacionadas à ocorrência de múltiplos eventos que podem estar ocorrendo na faixa de trabalho escolhida, uma vez que utilizou-se uma energia de ativação superior a $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ (TITA; FULIAS; TITA, 2011).

A análise de variância e posterior teste de Turkey indicaram que o modelo FWO foi mais sensível que o KAS para a diferenciação do tamanho das partículas em relação à sua energia de ativação. Isso pode ser explicado porque o modelo KAS leva em consideração o pico de temperatura das frações (α) na construção do modelo matemático cinético.

A influência do tamanho das partículas na energia de ativação média avaliada pelos dois métodos, KWO e KAS, mostra que as partículas com menor área superficial apresentam maior resistência na transferência de calor, sendo este efeito mais acentuado para as partículas AP01, AP02 e AP03, onde este parâmetro pode ser levado em consideração na escolha da partícula que será utilizada como matéria-prima na fabricação de um futuro fitoterápico.

Tabela 14 - Valores da energia de ativação para as cinco partículas, utilizando razões de aquecimento diferentes

Amostras	Faixas de temperatura ($T_{\text{onset and onset}}/^{\circ}\text{C}$)			Energia de ativação/ kJ mol^{-1}	
	(β) $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$	(β) $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$	(β) $40^{\circ}\text{C min}^{-1}$	FWO	KAS
AP01	265,74 – 300,80	243,43 - 280,09	222,22 - 255,23	$100,92 \pm 10,76$	$100,40 \pm 11,86$
AP02	224,72 - 251,04	243,03 - 271,56	250,03 - 272,56	$117,76 \pm 5,91$	$114,8 \pm 5,17$
AP03	225,35 - 321,57	259,54 - 277,32	252,65 - 273,25	$118,85 \pm 8,73$	$114,8 \pm 14,74$
AP04	224,16 - 274,33	247,65 - 257,43	245,35 - 270,73	$105,65 \pm 15,29$	$115,98 \pm 7,72$
AP05	221,65 - 251,85	229,08 - 242,07	251,43 - 284,56	$100,92 \pm 10,70$	$100,4 \pm 11,76$

Fonte: Dados do autor, 2018,

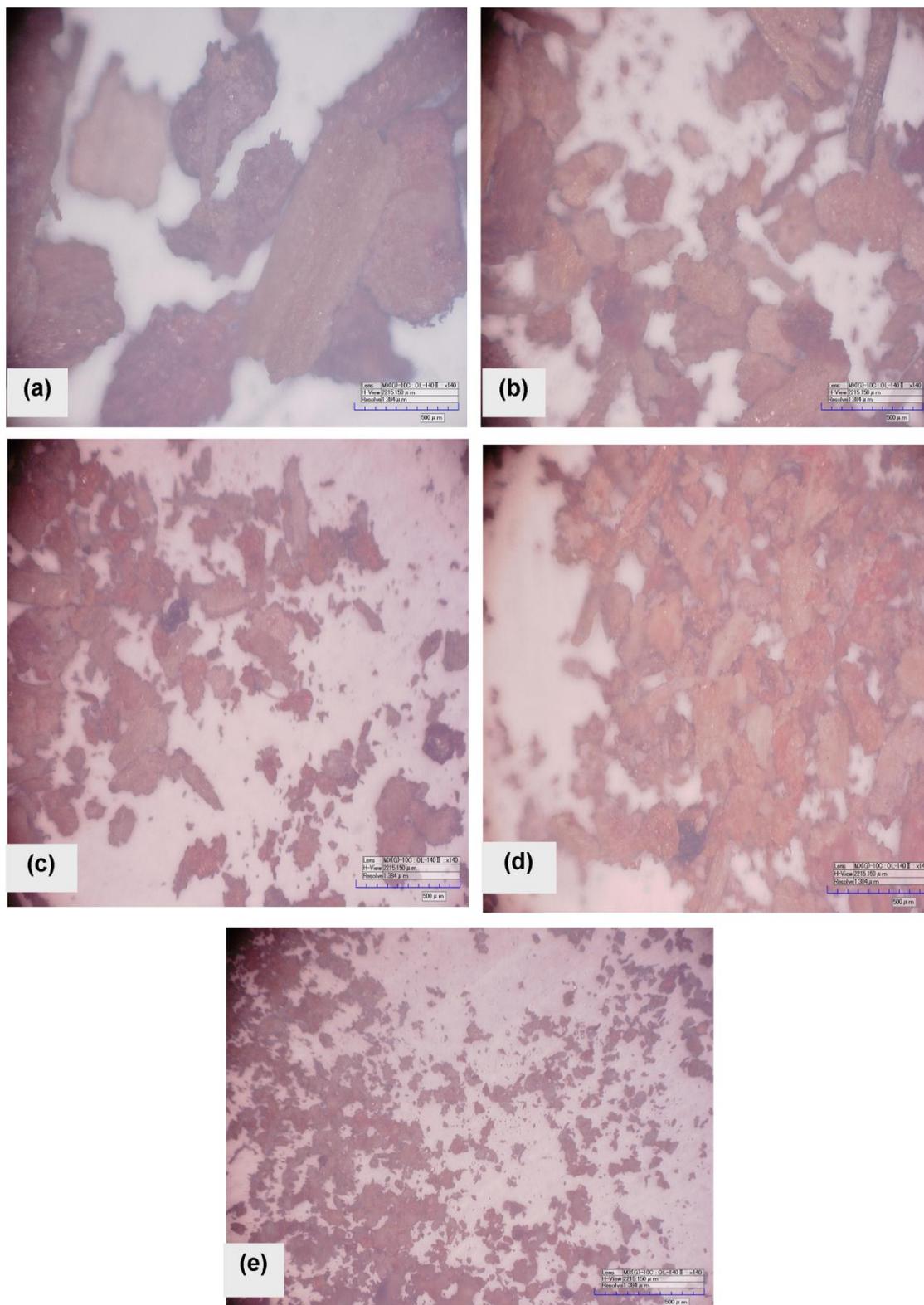
Microscopia óptica

A caracterização de fitoterápicos é um passo que permite um melhor controle no desenvolvimento de um fitoterápico de qualidade. A padronização da granulometria de espécies vegetais deve ser considerada, objetivando um rigoroso controle de qualidade (CORREIA et al., 2015). Partículas esféricas têm comportamento diferente daquelas que possui um formato que não se encaixa em nenhuma das formas geométricas, exigindo uma padronização efetiva, uma vez que a forma da partícula serve como um indicador da reprodutibilidade de um processo (KECK; MÜLLER, 2008).

A microscopia óptica é uma ferramenta útil para verificar tamanhos de partículas e sua distribuição (Figura 13). Usando esta técnica, foi possível observar a não uniformidade morfológica dos pós AP01 (Fig 13a), AP02 (Fig, 13b), AP03 (Fig, 13c), AP04 (Fig, 13d) e AP05 (Fig, 13e), o que pode ser explicado pela pouca eficiência do processo de pulverização empregado.

Os valores médios dos diâmetros obtidos pela análise microscópica foram de 258,0, 180,6, 173,2, 83,2 e 37,4 μm para AP01, AP02, AP03, AP04 e AP05, respectivamente. As amostras AP03 e AP04 apresentaram partículas com diâmetros superiores aos especificados nas peneiras (150 e 75 μm , respectivamente) utilizadas no processo de separação.

Figura 13 - Microscopia óptica dos pós em diferentes tamanhos de partículas: 355 μm (a), 180 μm (b), 150 μm (c), 75 μm (d) e 38 μm (e)



Alguns fatores podem favorecer negativamente a passagem ou a retenção do pó na malha errada, como por exemplo, furos na malha do tamis facilitam a passagem de partículas

maiores, assim como a absorção de umidade pelos pós pode causar a formação de grânulos, impedindo a passagem de partículas menores, ou mesmo a adesão delas a locais específicos das peneiras. A agitação irregular, a velocidades não especificadas em compêndios oficiais para matérias-primas vegetais, também influenciará negativamente no processo de separação.

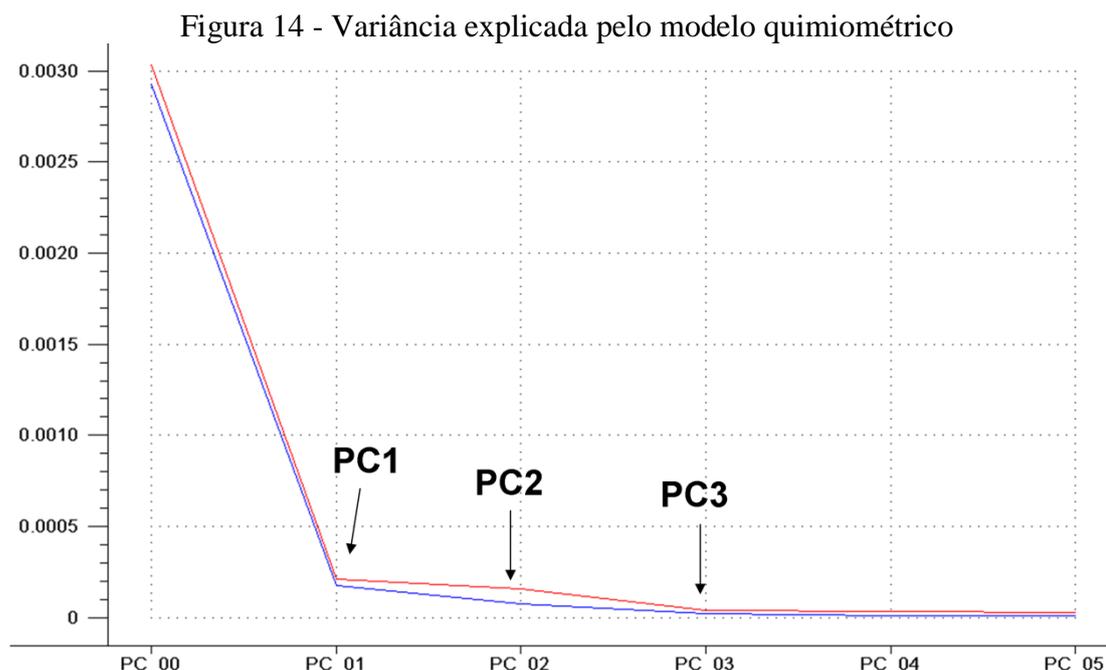
As partículas podem atravessar a malha de várias maneiras, por não possuírem formatos característicos, a mesma partícula pode passar pela peneira na direção longitudinal, não sendo classificada corretamente de acordo com seu diâmetro. Além disso, esta mesma partícula na direção transversal pode ser retida na peneira que não corresponde ao seu diâmetro real (CORREIA et al., 2015).

Espectroscopia de infravermelho próximo

Para realizar as análises quimiométricas, os dados foram organizados em matrizes nas quais as linhas (n) se referem aos espectros das amostras e (i) as variáveis analisadas no estudo, que no caso dos dados espectrais NIR, são os sinais de reflectância, transformada em absorbância.

A matriz de dados obtida após análise foi constituída de 60 linhas (amostras) e 1404 colunas (variáveis). Os espectros dos dados obtidos foram pré-processados, de modo a destacar as diferenças entre as amostras. A técnica de pré-processamento mais adequada, com a qual foi obtida uma melhor visualização da separação das partículas, foi a correção da linha de base. Essa técnica transforma uma linha de base inclinada em uma linha de base horizontal. Ao realizar o pré-processamento das amostras, as informações menos importantes são eliminadas, tornando a matriz de dados mais objetiva, permitindo uma posterior análise exploratória dos dados (SOUZA et al., 2013; MELO et al., 2013).

Na análise de componentes principais foram selecionados 3 PCs, dentre as quais a primeira foi capaz de explicar 94% dos dados, e a segundo e a terceira PCs corresponderam a 3% do restante dos dados. Após a terceira PC, a variância explicada pelo modelo, mostra uma ligeira diminuição (Figura 14).

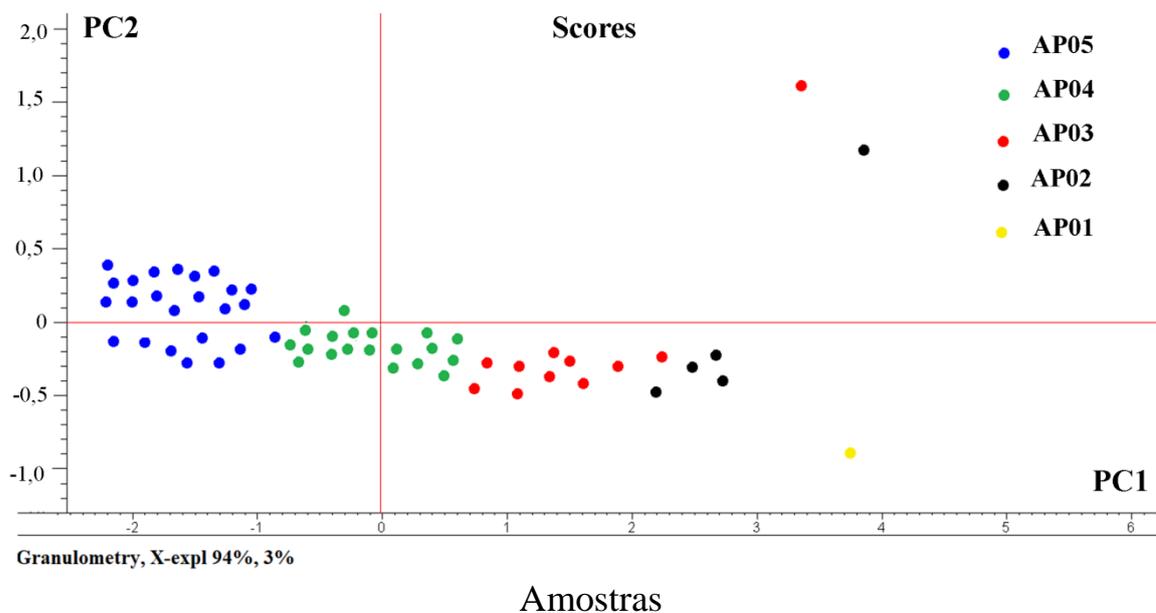


Fonte: Dados da pesquisa, 2017

As amostras são visualizadas no gráfico de *scores* (Figura 15), onde são projetadas em um novo eixo (PC's). De acordo com a granulometria dos pós, foi possível visualizar uma tendência à formação de grupos, embora houvesse algumas semelhanças entre alguns tamanhos que foram obtidos no processo de separação.

O modelo quimiométrico foi capaz de discriminar as partículas de acordo com sua granulometria, dividindo-as em cinco grupos diferentes. As partículas com o menor diâmetro (AP05) apresentaram menor absorvância (0,128-0,210). Algumas amostras foram definidas como amostras anômalas, uma vez que não atribuíram importância ao modelo, podendo ser posteriormente retiradas da matriz.

Figura 15 - Gráfico de scores



Fonte: Dados da pesquisa, 2017

Analisando o gráfico de *score*, pode-se concluir que, embora o pó da droga vegetal tenha sido submetido ao processo de peneiramento, a separação do tamanho das partículas pelo método convencional não foi eficiente.

O controle da granulometria na indústria farmacêutica é um passo crítico no desenvolvimento de fitoterápicos. O estado de partição do fármaco vegetal influenciará no teor de metabólitos secundários extraídos, além de poder potencializar os efeitos farmacológicos e toxicológicos (KECK; MÜLLER, 2008). Desta forma, existe a necessidade de implementação de uma metodologia que permita identificar mais rapidamente e eficientemente o grau de partição das matérias-primas vegetais.

Técnicas que usam dados químicos de algumas substâncias podem otimizar a eficiência das análises de controle de granulometria na indústria farmacêutica. A implementação da espectroscopia de infravermelho é uma técnica difundida, que permite resultados rápidos com baixo consumo de amostras. Técnicas quimiométricas aplicadas a dados espectrais do NIR podem ser usadas para melhorar o controle de qualidade de ingredientes farmacêuticos ativos de plantas, onde haveria uma padronização mais eficiente do tamanho das partículas (TITA, FULIAS; TITA, 2011).

CONCLUSÃO

As técnicas termoanalíticas forneceram temperaturas iniciais e finais dos eventos térmicos do DTA, assim como a energia envolvida no processo, que mostrou diferenças significativas para as cinco partículas. O modelo cinético do FWO foi mais sensível para detectar diferenças na energia de ativação entre as partículas. Usando microscopia óptica, concluiu-se que as técnicas utilizadas no processamento do material vegetal para a obtenção de partículas, com tamanhos diferentes, foi ineficientes, evidenciando a necessidade de se utilizar técnicas acessíveis, rápidas e eficientes, como por exemplo, o emprego de dados espectroscópicos obtidos no NIR, processados através de ferramentas quimiométricas,

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBADILLO, F.; FUENTES, A.; NAYA, S.; CAO, R.; MIER, J, R.; ARTIAGA, R, Evaluating the logistic mixture model on real and simulated TG curves, *Journal of Thermal Analyses and Calorimetry*, v, 87, p, 223 – 27, 2007,

BRANDÃO, D, O.; GUIMARAES, G, P.; SANTOS, R, L.; JÚNIOR, F, J, L, R.; SILVA, K, M, A.; SOUZA, F, S.; MACEDO, R, O, Model analytical development for physical, chemical, and biological characterization of *Momordica charantia* vegetable drug, **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, 2016; doi:10.1155/2016/7528297,

CONCEIÇÃO, M.; LIMA, J, S.; SOTO-BLANCO, B, Poisoning in goats by *Aspidosperma pyrifolium* Mart.; Biological and cytotoxic effects, *Toxicon*, v, 55, p, 320-324, 2010,

CORREIA, L, P.; SANTANA, C, P.; MEDEIROS, A, C, D.; MACÊDO, R, O, *Sideroxylon obtusifolium* herbal medicine characterization using pyrolysis GC/MS, SEM and different thermoanalytical techniques, **Journal of Thermal Analyses and Calorimetry**, v, 123, p, 993–01, 2016,

CORREIA, L, P.; SANTANA, C, P.; SILVA, K, M, A.; RAMOS, J, F, J, L.; LIMA, R, S, C.; MEDEIROS, A, C, D.; MACÊDO, R, O, Physical and chemical characteristics of *Maytenus rigida* in different particle sizes using SEM/EDS, TG/DTA and pyrolysis GC–MS, **Journal of Thermal Analyses and Calorimetry**, v, 131, p, 743–752, 2018,

CORREIA, L, P.; PROCOPIO, J, V, V.; SANTANA, C, P.; SANTOS, A, F, O.; CAVALCANTE, H, M, M.; MECÊDO, R, O, Characterization of herbal medicine with different particle sizes using Pyrolysis GC/MS, SEM and thermal techniques, **Journal of Thermal Analyses and Calorimetry**, v, 111, p, 1691–98, 2013,

CORREIA, L, P.; PROCÓPIO, J, V, V.; SANTANA, C, P.; PINTO, M, F.; MOURA, E, A.; SANTOS, A, F, O.; MACÊDO, R, O, Herbal medicine physical quality evaluation by thermal analysis using adapted Ozawa method, **Journal of Thermal Analyses and Calorimetry**, v, 122, p, 207-14, 2015,

VYAZOVKIN, S.; CHRISSAFIS, K.; LORENZO M, L.; KOGA, N.; PIJOLAT, M.; RODUIT, B.; SBIRRAZZUOLI, N.; SUÑOL, J, J, ICTAC Kinetics Committee recommendations for collecting experimental thermal analysis data for kinetic computations, **Thermochimica Acta**, v, 590, p, 1-23, 2014,

FERNANDES, F, H, A.; ALMEIDA, V, E.; MEDEIROS, F, D.; SILVA, P, C, D.; SIMÕES, M, O, S., VERAS, G.; MEDEIROS, A, C, D, Evaluation of compatibility between *Schinopsis brasiliensis* Engler extract and pharmaceutical excipients using analytical techniques associated with chemometric tools, **Journal of Thermal Analyses and Calorimetry**, v, 123, p, 2531–42, 2016,

FERNANDES, F, H, A.; SANTANA, C, P.; SILVA, C, D.; SIMÕES, M, O, S.; KANEKO, T, M.; MEDEIROS, A, C, D, Development of a sunscreen by thermal compatibility study using *Schinopsis brasiliensis* Engler extract as preservative, **Journal of Thermal Analyses and Calorimetry**, v, 131, p, 753–3, 2018,

SANTOS, G, A.; PEREIRA, A, B.; KORNDÖRFER, G, H, Use of analysis system by near infrared (NIR) for the analysis of organic matter and clay fraction in soils and leaf levels of silicon and nitrogen in sugar cane, *Bioscience Journal*, v, 26, p, 100-08, 2010,

KITAJIMA, M.; IWAI, M.; KOGURE, N.; KIKURA-HANAJIRI, R.; GODA, Y.; TAKAYAMA, H, *Aspidosperma e aspidosperma*-type bisindole alkaloids from *Voacanga africana*, **Tetrahedron**, v, 69, p, 796-1, 2013,

KECK, C, M.; MÜLLER, R, H, Size analysis of submicron particles by laser diffractometry - 90% of published measurements are false, **International Journal of Pharmaceutics**, v, 355, p, 150-3, 2008,

MEDEIRO, S 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, p, 93–8, 2002,

MELO, M, S.; SANTANA, R, F.; BATISTA, C, M, PINHEIRO, M, S, ALBUQUERQUE, R, L,S,J.; PADILHA, F, F, LIMA, A, S.; NUNES, P, S.; COSTA, A, A, S.; CARDOSO, J, C, Thermal characterization of mangaba-based films, **Journal of Thermal Analyses and Calorimetry**, v, 111, p, 2097–102, 2013,

MELO, C, A.; SILVA, P.; GOMES, A, A.; FERNANDES, D, D, S.; VÉRAS, G.; MEDEIROS, A, C, Classification of Tablets containing Dipyron, Caffeine and Orphenadrine by Near Infrared Spectroscopy and Chemometric Tools, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, p, 24, 991 - 997, 2013,

SANTANA, C, P.; FERNANDES, F, H, A.; BRANDÃO, D, O.; SILVA, P, C, D.; CORREIA, L, P.; NÓBREGA, F, P.; MEDEIROS, F, D.; DINIZ, P, H, G, D.; VÉRAS G, MEDEIROS, A, C, Compatibility study of dry extract of *Ximenia americana* L, and pharmaceutical excipients used in solid state, **Journal of Thermal Analyses and Calorimetry**, v, 133, p, 603–617, 2018,

SOUZA, A, M.; BREITKREITZ, M, C.; FILGUEIRAS, P, R.; ROHWEDDER, J, J, R.; POPPI, R, J, Chemometrics didactic experiment for multivariate calibration in the determination of paracetamol in commercial tablets using near infrared spectroscopy: a tutorial, part II, **Quimica, Nova**, v, 36, p, 1057-65, 2013,

TITA, D.; FULIAS, A.; TITA, B, Thermal stability of ketoprofen – active substance and tablet, **Journal of Thermal Analyses and Calorimetry**, v, 105, p, 501-8, 2011,

VENKATESH, M.; RAVI, P.; TEWARI, S, P, Isoconversional kinetic analysis of decomposition of nitroimidazoles: Fridman method vs Flynn-Wall-Ozawa method, **The Journal of Physical Chemistry A**, v, 117, p, 10162-69, 2013,

ZHOU, Q.; SHENG, G, **Pyrolytic and Kinetic Characteristics of the Thermal Decomposition of Perilla frutescens Polysaccharide**, PlosOne, 2012;7: e52597; doi:10.1371/journal.pone.0052597,

ANEXO I



Thermal characterization of *Aspidosperma pyriformium* Mart. plant drugs

Jéssica Cabral Andrade¹ · Widson Michael Santos¹ · Fernanda Pontes Nóbrega¹ · Lucas Ferreira Almeida¹ · Felipe Hugo Alencar Fernandes^{1,2} · Cleildo Pereira Santana³ · Germano Vêras⁴ · Ana Cláudia Dantas Medeiros¹

Received: 31 August 2018 / Accepted: 2 February 2019
 © Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2019

Abstract

Aspidosperma pyriformium Mart. is an endemic plant from Brazilian northeastern, which is widely used in folk medicine to treat dermatitis, gastritis, and malaria due to its anti-inflammatory activity. Thus, the aim of this work was to characterize by analytical techniques *A. pyriformium* in different particle sizes to use in the production of tea. For characterization, thermal analysis, optical microscopy, and near-infrared spectroscopy (NIR) techniques were used. After sieving, five samples, named AP01 (> 355 μm), AP02 ($\geq 180 \mu\text{m}$), AP03 ($\geq 155 \mu\text{m}$), AP04 ($\geq 75 \mu\text{m}$), and AP05 ($\geq 38 \mu\text{m}$), were obtained. Thermogravimetry curves showed three steps of decomposition, with different percentages of mass loss. The second step of decomposition showed the highest mass loss for the five samples. DTA curves of five samples showed a first endothermic peak at 91.70, 96.22, 96.29, 91.09, and 86.32 °C for AP01, AP02, AP03, AP04, and AP05, respectively. Decomposition of all particles occurred from 200 °C. The activation energy obtained through kinetic models showed significant differences between the two methodologies employed. NIR spectra were treated using chemometric tools, including principal component analysis and two PC were necessary to properly separate the samples. The analytical techniques used in this study allowed us to properly characterize the powders and could be used in the production of tea.

Keywords Quality control · Analytical techniques · Chemometrics · Pereira · Tea

Introduction

The Brazilian Pharmacopoeia and its official codes establish parameters to evaluate the quality of pharmaceutical ingredients. However, for active vegetal pharmaceutical ingredients, these parameters are scarce for several plant species. Obtaining a herbal medicine requires safeguarding the pharmacological and chemical qualities of the plant to ensure that the biological activity and safety of the medication are not affected. During the production process, the control of the granulometry is an important step, since the different sizes of the particles directly influence the characteristics of the final product. Consequently, analytical methods used are useful to characterize plant drugs, ensuring the efficacy and efficiency of its usage by companies during the production and quality control stages [1, 2].

The International Confederation of Thermal Analysis and Calorimetry (ICTAC) establishes that parameters for non-isothermal kinetics studies should be determined through free models, i.e., isoconversional models, which

✉ Ana Cláudia Dantas Medeiros
 anaclaudia@uepb.edu.br

¹ Laboratório de Desenvolvimento e Ensaios de Medicamentos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, R. Baraúnas, 351, Cidade Universitária, Campina Grande, Paraíba 58429-500, Brazil

² Unifacisa, Centro Universitário, Av. Sen. Argemiro de Figueiredo, 1901, Itararé, Campina Grande, Paraíba 58411-020, Brazil

³ Centro de Tecnologia em Desenvolvimento de Medicamentos (CT-Tecnologia Farmacêutica), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

⁴ Laboratório de Química Analítica e Quimiometria, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual da Paraíba, R. Baraúnas, 351, Cidade Universitária, Campina Grande, Paraíba 58429-500, Brazil