

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FRANCISCO NOÉ DA FONSECA

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE FITOPRODUTO A PARTIR DE *Justicia pectoralis* – CHAMBÁ: OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO (CLAE – DAD) E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

FORTALEZA

2009

FRANCISCO NOÉ DA FONSECA

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE FITOPRODUTO A PARTIR DE *Justicia pectoralis* – CHAMBÁ: OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO (CLAE – DAD) E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Farmácia Experimental e Tecnológica.

Orientador: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.

FORTALEZA

2009

F744d Fonseca, Francisco Noé da

Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis* – chambá : obtenção do extrato seco padronizado (CLAE – DAD) e avaliação farmacológica / Francisco Noé da Fonseca. – Fortaleza, 2009.

130 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, Ce.

1. Tecnologia Farmacêutica 2. Fitoterapia 3. Cumarínicos I. Leal, Luzia Kalyne Almeida Moreira (orient.) II. Título.

CDD: 615.19

FRANCISCO NOÉ DA FONSECA

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE FITOPRODOTO A PARTIR DE *Justicia pectoralis* – CHAMBÁ: OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO (CLAE – DAD) E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia Experimental e Tecnológica.

Aprovada em \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profa. Dra. Juvenia Bezerra Fontenele  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profa. Dra. Flávia Almeida Santos  
Universidade Federal do Ceará – UFC

Aos meus pais, Noé e Osanide...

E a todos aqueles que acreditam que sonhos  
podem se tornar realidade...

## AGRADECIMENTOS

Finalmente esse trabalho está terminado, mas isso não poderia ter acontecido sem a ajuda de muitas pessoas, sejam elas amigas pessoais, parceiros de laboratórios, conhecidos de parada de ônibus, entre outros, os quais contribuíram diretamente ou indiretamente de certa forma. Contudo, algumas pessoas merecem certo destaque por terem sido agentes ativos nessa empreitada...

Primeiramente, gostaria de agradecer à força superior que rege o universo e que nos faz acordar pela manhã com o peito cheio de vida e acreditar que viver ainda vale à pena, mesmo quando tudo nos leva a pensar o oposto...

Agradeço meus pais, Noé e Osanide, aqueles que me deram a vida e sempre lutaram, e ainda lutam, para mantê-la, dando-me exemplos de como seguir adiante com dignidade mesmo nas adversidades da vida, além de me apoiarem e me orientarem em todas as minhas decisões...

Agradeço aos meus irmãos, Patrício e Perla, sempre presentes na medida do possível com amizade e companheirismo...

Agradeço à Profa. Kalyne a confiança em mim para execução desse trabalho, mesmo com todas as dificuldades; sou enormemente grato por todos esses anos de trabalho, aprendizado e confiança mútuos...

Agradeço à Profa. Meire Anne, chefe do NUFITO, e demais profissionais de lá (em especial às farmacêuticas Alexsandra e Angélica, aos agrônomos Carlos e Giovane e ao técnico Reginaldo), os quais me receberam de braços abertos para o fornecimento do material vegetal empregado nesse trabalho...

Agradeço à direção e a todos os funcionários da Farmácia Escola da UFC, principalmente aos membros do controle físico-químico (farmacêuticas Janete, Teresinha e Rafaela e técnicos Beto e Eliane), o acolhimento a ajuda na realização dos meus experimentos e os momentos de descontração; também ao Elton e ao Jurandir a ajuda na execução de atividades no setor de produção e fornecimento de materiais sempre que eu precisava...

Agradeço à Profa. Sílvia do Departamento de Estatística sua solicitude e ajuda nas análises estatísticas desse trabalho, as quais realmente deram trabalho, bem como a amizade ao longo desse tempo...

Agradeço ao Prof. Osvaldo e Prof. Noberto, ambos da Faculdade de Farmácia da USP de Ribeirão Preto, os quais me acolheram em seus laboratórios durante minha estadia na USP para aprofundamento de conhecimentos necessários para a realização desse projeto e

estiveram sempre disponíveis para conversar e refletir sobre pontos pertinentes na minha pesquisa...

Agradeço à Profa Andrea, da Faculdade de Farmácia de Londrina – PR, as conversas enriquecedoras e norteadoras de como proceder na minha pesquisa durante minha permanência na USP, e depois pelo “msn”, mesmo estando na correria da finalização da sua tese de doutorado...

Agradeço ao farmacêutico Mário do CEDEFAR a ajuda na execução das análises cromatográficas, sempre partilhando sua vasta experiência com HPLC, bem como me socorrendo nos momentos em que o aparelho teimava em não funcionar...

Agradeço a todos os bolsistas de iniciação científica que fazem, ou fizeram, parte do Laboratório de Farmacognosia (Amanda, Breno, Camila, Diego, Elisama, Gabriela, Jean, Mailson, Rebeca, Taiana, Vitor e Vlândia) a ajuda na realização dos ensaios biológicos e de outros experimentos quando necessário, mas principalmente os momentos de diversão; e à farmacêutica Silésia o esforço em manter tudo em ordem e o seu apoio incondicional...

Agradeço a todos os funcionários e professores do Departamento de Farmácia e de Análises Clínicas (em especial à Profa. Janete, aos porteiros Nilson e Saldanha, às zeladoras Claudinha e Rose e à Fátima e ao Ivomar, ambos da secretaria do DEFA) a amizade e o apoio durante esse tempo...

Agradeço à Vilani (técnica do Laboratório de Neurofarmacologia) todos os seus ensinamentos no laboratório, estando sempre disponível para me ajudar quando precisei e, sobretudo, por se tornar minha amiga desde a época de iniciação científica...

Agradeço aos meus colegas do mestrado a amizade durante as aulas e demais atividades, em especial à Suzana, pela ajuda na realização de alguns ensaios biológicos e pelo companheirismo nos momentos difíceis, os quais não foram poucos...

Agradeço à secretária do mestrado, Raimundinha, a qual põe ordem em tudo e sempre tenta ajudar a todos com muita presteza, desde ofícios a palavras de conforto...

Agradeço a todos os funcionários do CAPS AD SER VI e pacientes do serviço, os quais me acolheram como membro da equipe, entendendo meus momentos de ausência para finalizar esse trabalho...

Agradeço à Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP) a ajuda financeira pra realização desse estudo...

Sou eternamente grato a todos vocês...

*“Eu disse a uma amiga:*

*- A vida sempre superexigiu de mim.*

*Ela disse:*

*- Mas lembre que você também superexige da vida.*

*Sim.”*

(Clarice Lispector)



## RESUMO

*Justicia pectoralis* (Acanthaceae), conhecida popularmente como chambá, é uma erva empregada principalmente no tratamento da asma, sob a forma de preparações caseiras ou de fitoterápicos em Programas Governamentais de Fitoterapia. Além disso, essa espécie está na Relação de Plantas Medicinais de Interesse para o SUS (Renuis). Pelo menos parte da atividade antiinflamatória e broncodilatadora, determinadas anteriormente, estão relacionadas à presença de cumarina (CM) e umbeliferona (UMB), considerados princípios ativos/marcadores químicos da planta. No sentido de inovar e agregar mais tecnologia aos fitoprodutos derivados de *J. pectoralis*, o presente estudo objetivou desenvolver o processo de obtenção da solução extrativa (EPJP) e do extrato seco padronizados (ESPJP), bem como investigar o seu potencial farmacológico pré-clínico. Foi desenvolvido e validado de acordo com a legislação vigente um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – DAD) para determinação do teor de CM e UMB em produtos derivados de chambá. As condições para produção da droga vegetal em estufa com circulação e renovação de ar foram estabelecidas, assim como parâmetros farmacognósticos da droga. O método extrativo empregado (percolação) foi avaliado quanto as influências de variáveis (tempo de maceração, proporção droga:solvente e teor alcoólico do solvente extrator) por meio de um planejamento fatorial (2<sup>3</sup>), no qual a proporção droga:solvente e do teor de etanol afetaram o rendimento de CM e UMB nos extratos produzidos. O extrato hidroalcoólico de chambá produzido sob condição eleita (droga:solvente, 1:15; teor de etanol: 20 %; tempo de maceração: 24 h) foi caracterizado físico-quimicamente e submetido a secagem por *spray dryer*, empregando como excipiente dióxido de silício coloidal, sendo determinadas suas propriedades físico-químicas. A avaliação toxicológica *in vitro* do ESPJP (CM: 8,84 mg/g; UMB: 1,27 mg/g) mostrou a sua baixa citotoxicidade em neutrófilos humano, mensurada pela atividade da enzima lactato desidrogenase, além de reduzir a liberação de mieloperoxidase por eles. Ainda, o EPJP (100, 200 e 400 mg/Kg) reduziu em até 38 % o edema de pata induzido por carragenina e 79,6 % a nocicepção induzida por capsaicina. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo suportam o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados a partir de *J. pectoralis*, espécie cujo extrato não se mostrou citotóxico e apresentou atividade antiinflamatória e antinociceptiva.

Palavras chaves: *Justicia pectoralis*, cumarina, umbeliferona, CLAE, farmacologia pré-clínica, *spray drying*.

## ABSTRACT

*Justicia pectoralis* (Acanthaceae), known as “chambá”, is an herb popularly used for the treatment of asthma. This species has been selected for the Phytotherapy Public Programs in Northeast and included in the National Medicinal Plants list of Interest to the Unified Health System. At least a part of the anti-inflammatory and bronchodilator activities of *J. pectoralis* has been related to the presence of coumarin (CM) and umbelliferone (UMB), active principles / chemical markers. In order to innovate and aggregate more technology to the phytoproducts from *J. pectoralis*, the present work aimed to develop the best process to obtain the standardized extract (SEJP) and to investigate its pharmacological properties. It was developed and validated a high performance liquid chromatography method (HPLC – PDA) to determine the concentration of CM and UMB in extract from aerial parts from *J. pectoralis*. It was established the conditions to produce the drug in a dryer chamber with air circulation and renovation, as well as the pharmacognostic parameters of the product obtained. The influences of the extraction variables related to the extraction method (percolation: maceration time, drug:solvent proportion and alcoholic percentage in water) were evaluated by a factorial planning (2<sup>3</sup>), on what the drug:solvent proportion and ethanol content affected the amount of CM and UMB in the extracts. The hydroalcoholic extract of “chambá” produced using the selected conditions (drug:solvent proportion 1:15; ethanol content: 20 %; maceration time: 24 h) was characterized physical-chemically and then submitted to spray drying (using colloidal silicon dioxide as adjuvant), being determined its physical-chemical properties. The toxicological evaluation in vitro of dry extract (CM: 8,84 mg/g; UMB: 1,27 mg/g) showed low cytotoxicity to human neutrophils, measured by the lactate dehydrogenase enzyme activity. The standardized extract (SE; 100, 200 and 400 mg/Kg) reduced around 38 % the paw edema induced by carrageenan in mice and also the release of MPO induced by PMA in human neutrophils. On the other hand, it did not interfere in the paw edema induced by dextran. The SE also reduced the nociception induced by capsaicin in mice, causing inhibition of until 79,6 %. In conclusion, the present study supports the development of standardized phytomedicine from *J. pectoralis*. The pharmacological evaluation of the SE from this plant demonstrated its low cytotoxicity in human neutrophil, besides the anti-inflammatory and antinociceptive.

Key words: *Justicia pectoralis*, coumarin, umbelliferone, HPLC, pre-clinic pharmacology, spray drying.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 a, b	Aspecto macroscópico de <i>Justicia pectoralis</i> .....	25
FIGURA 2	Metabólitos secundários isolados da parte aérea de <i>Justicia pectoralis</i> .....	27
FIGURA 3 a, b, c	Espectros de absorção na região do ultravioleta da cumarina, da umbeliferona e do extrato hidroalcoólico de <i>Justicia pectoralis</i> obtidos por CLAE – DAD .....	66
FIGURA 4 a, b	Cromatograma da solução padrão contendo cumarina e umbeliferona e do extrato hidroalcoólico de <i>Justicia pectoralis</i> .....	67
FIGURA 5 a, b	Representação gráfica da curva de calibração obtida por CLAE – DAD para cumarina e umbeliferona .....	69
FIGURA 6 a, b	Teor de umidade de <i>Justicia pectoralis</i> secada em estufa com circulação e renovação de ar a $35 \pm 5$ °C e aspecto macroscópico da droga vegetal obtida .....	77
FIGURA 7	Distribuição granulométrica da droga vegetal de <i>Justicia pectoralis</i> .....	78
FIGURA 8 a, b	Cromatograma da solução extrativa produzida a partir de <i>Justicia pectoralis</i> obtida em estufa com circulação e renovação de ar e a temperatura ambiente .....	80
FIGURA 9 a, b	Concentração de cumarina e umbeliferona no extrato hidroalcoólico de <i>J. pectoralis</i> em função do volume de solvente extrator .....	85
FIGURA 10 a, b	Superfície de resposta do processo extrativo de cumarina de <i>J. pectoralis</i> em função do percentual de etanol na solução hidroalcoólica e da proporção droga:solvente .....	88
FIGURA 11 a, b	Superfície de resposta do processo extrativo de umbeliferona de <i>J. pectoralis</i> em função do percentual de etanol na solução hidroalcoólica e da proporção droga:solvente .....	89
FIGURA 12 a, b, c	Aspecto macroscópico do extrato seco de <i>Justicia. pectoralis</i> acrescido de adjuvantes de secagem .....	95
FIGURA 13 a, b, c	Aspecto macroscópico do extrato seco de <i>Justicia pectoralis</i> contendo dióxido de silício coloidal .....	97

FIGURA 14 a, b	Cromatograma de uma solução de dióxido de silício coloidal e de extrato seco de <i>Justicia pectoralis</i> .....	101
FIGURA 15	Avaliação da citotoxicidade do extrato seco padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> (ESPJP) em neutrófilos isolados de sangue humano .....	104
FIGURA 16	Atividade antiedematogênica do extrato padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> (EPJP) no edema de pata induzido por carragenina em camundongos .....	106
FIGURA 17	Atividade antiedematogênica do extrato padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> (EPJP) no edema de pata induzido por dextrano em camundongos .....	107
FIGURA 18	Efeito do extrato seco padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> (ESPJP) na degranulação de neutrófilos humano estimulados por PMA, determinado pela atividade da mieloperoxidase (MPO) .....	108
FIGURA 19	Efeito do extrato padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> (EPJP) sobre a nocicepção induzida por capsaicina em camundongos .....	110

## LISTA DE TABELAS

1. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	33
2. Gradiente do método desenvolvido para separação dos marcadores de <i>Justicia pectoralis</i> .....	44
3. Protocolo experimental para precisão do método analítico para dosear os marcadores de <i>Justicia pectoralis</i> .....	45
4. Fatores e níveis utilizados para avaliar a robustez do método analítico para quantificar os marcadores de <i>Justicia pectoralis</i> .....	46
5. Gradientes utilizados para avaliar a robustez do método analítico para quantificar os marcadores de <i>Justicia pectoralis</i> .....	46
6. Planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para avaliação da robustez do método analítico para doseamento de cumarina e umbeliferona em derivados de <i>Justicia pectoralis</i> .....	47
7. Fatores e níveis utilizados para avaliar o processo extrativo de <i>Justicia pectoralis</i> .....	52
8. Planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para padronização do processo de extrativo de cumarina e umbeliferona em derivados de <i>Justicia pectoralis</i> .....	52
9. Condições operacionais para secagem por <i>Spray dryer</i> .....	54
10. Áreas absolutas dos picos de cumarina obtidas por CLAE – DAD .....	68
11. Áreas absolutas dos picos de umbeliferona obtidas por CLAE – DAD .....	68
12. Análise de variância (ANOVA) das curvas padrões de cumarina e umbeliferona.....	71
13. Avaliação da precisão do sistema para cumarina e umbeliferona em extratos de <i>Justicia pectoralis</i> .....	71
14. Avaliação da precisão intermediária da cumarina e da umbeliferona em extratos de <i>Justicia pectoralis</i> .....	71
15. Análise de variância (ANOVA) da precisão intermediária para cumarina e umbeliferona em extratos de <i>Justicia pectoralis</i> .....	72
16. Resultados da análise de exatidão para cumarina em extratos de <i>Justicia pectoralis</i> .....	72
17. Resultados da análise de exatidão para umbeliferona em extratos de <i>Justicia pectoralis</i> .....	72

18. Análise de variância (ANOVA) do estudo de robustez do método desenvolvido por CLAE – DAD para cumarina em extratos de <i>Justicia pectoralis</i> .....	73
19. Análise de variância (ANOVA) do estudo de robustez do método desenvolvido por CLAE – DAD para umbeliferona em extratos de <i>Justicia pectoralis</i> .....	73
20. Caracteres farmacognósticos de <i>Justicia pectoralis</i> .....	79
21. Análise quantitativa da cumarina e da umbeliferona na droga vegetal de <i>Justicia pectoralis</i> preparada em estufa com circulação e renovação de ar ou a temperatura ambiente .....	79
22. Análise de variância (ANOVA) da influencia das condições do método extrativo de <i>Justicia pectoralis</i> para cumarina .....	86
23. Análise de variância (ANOVA) da influencia das condições do método extrativo de <i>Justicia pectoralis</i> para umbeliferona .....	86
24. Teor de marcadores nas soluções extrativas de <i>Justicia pectoralis</i> .....	87
25. Avaliação físico-química das soluções extrativas de <i>Justicia pectoralis</i> .....	90
26. Caracterização físico-química da solução extrativa de <i>Justicia pectoralis</i> antes e depois do processo de concentração .....	94
27. Avaliação do teor de marcadores da solução extrativa de <i>Justicia pectoralis</i> após processo de concentração .....	94
28. Concentração de marcadores em amostras de xarope de <i>J. pectoralis</i> produzidos em Programas Públicos de Fitoterapia no estado do Ceará .....	94
29. Caracterização farmacotécnica do extrato seco de <i>Justicia pectoralis</i> produzido por <i>spray drying</i> .....	98
30. Doseamento dos marcadores por CLAE – DAD do extrato seco de <i>Justicia pectoralis</i> produzido por <i>spray drying</i> .....	100
31. Rendimento de secagem do extrato de <i>Justicia pectoralis</i> pelo processo de <i>spray drying</i> .....	100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEME	Central de Medicamentos
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Dióxido de silício coloidal
EHA	Extrato hidroalcoólico
EM	Espectrometria de massa
EPJP	Extrato padronizado de <i>J. pectoralis</i>
EPM	Erro padrão da média
ESPJP	Extrato seco padronizado de <i>J. pectoralis</i>
FH	Fator de hausner
IC	Índice de compressibilidade
LDH	Enzima lactato desidrogenase
MPO	Enzima Mieloperoxidase
MS	Ministério da Saúde
NUFITO	Núcleo de Fitoterapia
OMS	Organização mundial da saúde
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PMN	Células polimorfonucleares
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
Renisus	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SUS	Sistema Único de Saúde
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.</b>	<b>Generalidades .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.</b>	<b>Gênero <i>Justicia</i> (Acanthaceae) .....</b>	<b>22</b>
1.2.1.	<i>Justicia pectoralis</i> Jacq var. <i>stenophylla</i> Leonard .....	23
1.2.1.1.	Etnofarmacologia, aspectos botânicos e agrônômicos .....	23
1.2.1.2.	Constituintes químicos .....	26
1.2.1.3.	Aspectos toxicológicos e farmacológicos .....	26
<b>1.3.</b>	<b>Tecnologias no desenvolvimento de fitoprodutos .....</b>	<b>30</b>
1.3.1.	Métodos analíticos empregados na padronização de fitoprodutos .....	31
1.3.2.	Métodos de secagem empregados na produção de extratos secos .....	34
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>38</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1.</b>	<b>Geral .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2.</b>	<b>Específicos .....</b>	<b>40</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1.</b>	<b>Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE-DAD...</b>	<b>42</b>
4.1.1.	Reagentes e solventes .....	42
4.1.2.	Condições cromatográficas .....	42
4.1.3.	Preparo das soluções padrões e das amostras .....	43
4.1.4.	Especificidade e Seletividade .....	44
4.1.5.	Linearidade e intervalo .....	44
4.1.6.	Precisão .....	45
4.1.7.	Exatidão .....	45
4.1.8.	Robustez .....	46
<b>4.2.</b>	<b>Obtenção da Droga Vegetal .....</b>	<b>47</b>
4.2.1.	Coleta do material .....	47
4.2.2.	Secagem e estabilização .....	48
<b>4.3.</b>	<b>Caracterização Farmacognóstica da Droga vegetal .....</b>	<b>48</b>
4.3.1.	Cinzas totais .....	48
4.3.2.	Umidade residual .....	49
4.3.3.	Análise Granulométrica .....	49



4.3.4.	Determinação do teor de extrativos em etanol .....	49
4.3.5.	Determinação do teor de extrativos em água .....	50
<b>4.4.</b>	<b>Preparo e caracterização das soluções extrativas .....</b>	<b>51</b>
4.4.1.	Processo extrativo .....	51
4.4.2.	Caracterização físico-química do extrato .....	51
4.4.2.1.	Determinação do pH .....	51
4.4.2.2.	Determinação da densidade .....	52
4.4.2.3.	Determinação do teor de resíduo sólido .....	53
4.4.2.4.	Doseamento do teor de cumarina e umbeliferona .....	53
<b>4.5.</b>	<b>Produção do extrato seco padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> e sua caracterização .....</b>	<b>53</b>
4.5.1.	Secagem do extrato por <i>spray drying</i> .....	53
4.5.2.	Caracterização físico-química do extrato seco .....	54
4.5.2.1.	Determinação da umidade residual .....	54
4.5.2.2.	Determinação do rendimento do processo de secagem .....	54
4.5.2.3.	Determinação da densidade, do fator de Hausner e do índice de compressibilidade do pó .....	55
4.5.2.4.	Determinação do teor de marcadores nos extratos secos obtidos por <i>spray drying</i> .....	56
<b>4.6.</b>	<b>Avaliação pré-clínica do extrato padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> .....</b>	<b>57</b>
4.6.1.	Citotoxicidade .....	57
4.6.1.1.	Isolamento e purificação de neutrófilos .....	58
4.6.1.2.	Determinação da atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) .....	58
4.6.1.3.	Determinação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) .....	58
4.6.2.	Atividade antiinflamatória pré-clínica .....	59
4.6.2.1.	Avaliação da atividade antiedematogênica: edema de pata induzido por carragenina em camundongos .....	59
4.6.2.2.	Avaliação da atividade antiedematogênica: edema de pata induzido por dextrano em camundongos .....	59
4.6.2.3.	Avaliação da atividade antinociceptiva: nocicepção induzida por capsaicina em camundongos .....	60
4.6.3.	Atividade antimicrobiana .....	61
<b>4.7.</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>61</b>

<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>63</b>
<b>5.1.</b>	<b>Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE – DAD para quantificação de cumarina e umbeliferona .....</b>	<b>63</b>
<b>5.2.</b>	<b>Obtenção e caracterização farmacognóstica da droga vegetal .....</b>	<b>73</b>
<b>5.3.</b>	<b>Desenvolvimento de método de produção da solução extrativa padronizada de <i>Justicia pectoralis</i> .....</b>	<b>80</b>
<b>5.4.</b>	<b>Preparo e caracterização do extrato seco de <i>Justicia pectoralis</i> .....</b>	<b>91</b>
<b>5.5.</b>	<b>Avaliação biológica pré-clínica do extrato padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> .....</b>	<b>99</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>112</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>115</b>

-----

-----



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Generalidades

De acordo com as projeções do *Intercontinental Marketing Services Health* (IMS, 2009) para o setor farmacêutico mundial, espera-se um crescimento de 4,5 – 5,5 % em 2009, o que resultará em rendimentos em torno de 820 bilhões de dólares. Já o grupo de países emergentes, no qual o Brasil se insere, estima-se um incremento de 14 – 15 % para o setor, equivalente a US\$ 105 – 115 bilhões de lucratividade, o que corresponde participação de 34 % no montante mundial.

Atualmente, cerca de 40 % dos medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico são derivados de produtos naturais, sendo 25 % provenientes de plantas, 10% de microorganismos e 3 % de animais, mas, se forem considerados apenas os fármacos anticancerígenos e antibióticos, esse percentual sobe para 70% (CALIXTO, 2003). Nesse contexto, o crescente interesse por esses produtos está relacionado ao mercado potencial que gira na casa dos bilhões de dólares. Estima-se que em 2010 o faturamento nacional nesse setor chegue a US\$ 1 bilhão de dólares, caracterizando 15 % do mercado farmacêutico (ABIFISA, 2009).

Cerca de 60 mil espécies de plantas superiores catalogadas ocorrem no Brasil, das quais apenas 8 % tiveram seus componentes pesquisados e em torno de mil espécies foram avaliadas quanto as suas propriedades farmacológicas (BRASIL, 2006a). Essa riqueza vegetal característica do Brasil está relacionada com os diversos ecossistemas distribuídos em todo seu território devido à grande variedade de solos e climas (CORDELL, 2000). Além disso, os componentes étnicos que deram origem ao país incorporaram conhecimentos das culturas indígena, africana e europeia no Brasil. Assim, a biodiversidade brasileira, somada ao expressivo conhecimento etnofarmacológico, constitui uma vantagem importante no processo de desenvolvimento de Programas e Projetos com Plantas Medicinais, os quais visam o fortalecimento do país na área e o aproveitamento deste recurso de maneira sustentável (SILVA *et al.*, 2001).

As plantas medicinais e seus usos empíricos têm importância fundamental para os laboratórios farmacêuticos no desenvolvimento de novos fármacos (FARNSWORTH, 1988). Contudo, a importância das plantas superiores para a indústria farmacêutica não se restringe

somente à obtenção de moléculas bioativas, mas também por seu papel no desenvolvimento de fitoterápicos, que são definidos como sendo um medicamento obtido a partir do emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, sendo caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade, tanto da matéria-prima vegetal quanto do produto tecnologicamente acabado (BRASIL, 2004a).

No final dos anos 70, já reconhecendo o potencial da biodiversidade brasileira, o governo federal criou a Central de Medicamentos (CEME) que, além de favorecer o crescimento da indústria nacional de medicamentos, estava incumbida de desenvolver medidas para a pesquisa e o aproveitamento sustentável dos recursos naturais e dos fármacos por eles obtidos. Contudo, após quase duas décadas sem êxito na elaboração de um produto fitoterápico genuinamente brasileiro, sobretudo pela descontinuidade de apoio governamental, a CEME foi extinta em 1995, deixando um amplo acervo de informações sobre plantas medicinais (SANT'ANA; ASSAD, 2004).

A lei 6.360/76, regulamentada pelo decreto 79.094/77, foi o passo inicial das autoridades brasileiras visando à qualidade dos produtos de uso medicinal no país, uma vez que estabelecia que insumos e produtos farmacêuticos e demais correlatos passariam por sistema de vigilância sanitária (BRASIL, 1977). Anos mais tarde, com a criação da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) no final da década de noventa, essa autarquia federal vinculada ao Ministério da Saúde (MS) tornou-se o principal órgão para a regulamentação de fitoterápicos no país, uma vez que sua função primordial é garantir a segurança sanitária dos produtos e serviços, protegendo e promovendo, dessa forma a saúde da sociedade (BRASIL, 1999).

A partir da elaboração da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 48/04 pela ANVISA, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, observa-se o estabelecimento de uma série de resoluções específicas (RE) para garantir a qualidade e a validação de medicamentos derivados de plantas medicinais. São elas: a RE 88/04, que relaciona as referências bibliográficas para avaliação da segurança e eficácia; a RE 89/04, que estabelece o registro simplificado de medicamentos fitoterápicos; a RE 90/04, que apresenta o guia para realização de estudos toxicológicos pré-clínicos; e a RE 91/04, que trata das alterações, inclusões e cancelamentos pós-registro do produto fitoterápico (BRASIL, 2004a, b, c, d, e). Ainda, as RDC 210/03 (inspeção), 138/03 (grupo e indicação terapêutica), 140/03 (bula) e 333/03 (rotulagem), as RE 01/05 (estudos de estabilidade) e 899/03 (guia para validação de método analítico) e as portarias 196/96 e 251/97 (diretrizes e normas para

ensaios clínicos em seres humanos) do Conselho Nacional de Saúde complementam o corpo regulatório para fins de registro junto a ANVISA de produtos fitoterápicos (BRASIL, 2003a, b, c, d, e; 2005; BRASIL, 1996; 1997).

Em 2006, o Brasil avançou enormemente na consolidação da fitoterapia como prática complementar de atenção a saúde com a aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, a qual reconhece o potencial dos recursos naturais como fonte de medicamentos e a importância do seu uso racional no Sistema Único de Saúde (SUS), tornando as iniciativas para o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional relevantes para o país (BRASIL, 2006b). Outra conquista na área das plantas medicinais foi o lançamento do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos pelo Governo no fim de 2007. Dentre seus objetivos, destacam-se a inserção de plantas medicinais, fitoterápicos e produtos correlatos de segurança, eficácia e qualidade comprovadas no SUS (BRASIL, 2009a). Por fim, foi elaborada pelo MS a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus), uma lista composta por espécies vegetais, nativas ou adaptadas, a qual inclui *J. pectoralis*, com evidências científicas de segurança e eficácia e com potencial de avançar na cadeia produtiva e gerar produtos medicinais de interesse ao sistema de saúde (BRASIL, 2009b).

## 1.2. Gênero *Justicia* (Acanthaceae)

Constituída por cerca de 250 gêneros e mais de 4000 espécies, a família Acanthaceae possui grande variedade morfológica e ecológica, estando amplamente distribuída entre os trópicos de todo o mundo e sutilmente nas regiões de clima temperado (MABBERLEY, 1997; WASSHAUSEN, 1995). De acordo com Barroso *et al.* (1991), o Brasil representa um dos maiores centros de diversidade do grupo, com aproximadamente 40 gêneros e 550 espécies.

Descrita pela primeira vez pelo botânico escocês James Justice, o gênero *Justicia* é considerado o maior e o mais complexo dentre os pertencentes à família Acanthaceae (WASSHAUSEN, 2002). A classificação é baseada nas características das inflorescências, androceu, pólen e sementes e estima-se aproximadamente 600 espécimes ao redor do mundo (GRAHAM, 1988). Além disso, por apresentarem semelhanças morfológicas entre si, espécies do gênero *Justicia* compartilham alguns nomes populares e indicações fitoterápicas,

como antiinflamatória e analgésica, as quais têm sido relacionadas à presença de cumarinas (BARROS, 1992; LINO *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2000). A distribuição destes metabólitos secundários na família Acanthaceae é restrita a poucas espécies, sendo que *Justicia pectoralis* é o único membro do seu gênero a produzi-los, conferindo-lhe importância etnofarmacológica (MURRAY; MENDEZ; BROWN, 1982).

A espécie *J. gendarussa* também é empregada como antiinflamatória e analgésica no nordeste brasileiro, sendo comumente confundida com *J. pectoralis* apesar de diferenças morfológicas e ausência de cumarinas (BARROS, 1992; OLIVEIRA; ANDRADE, 2000). Suas propriedades farmacológicas são relacionadas a outros constituintes químicos, provavelmente a presença de flavonóides c-glicosilados na planta (OLIVEIRA, 1995).

#### 1.2.1. *Justicia pectoralis* Jacq var. *stenophylla* Leonard

##### 1.2.1.1. Etnofarmacologia, aspectos botânicos e agrônômicos

Tendo em vista sua ampla distribuição geográfica entre os trópicos, os usos etnofarmacológicos de *J. pectoralis* são diversos. No Panamá, a planta é usada para aliviar mal-estar no estômago e dores nas pernas na forma de chá, enquanto em Trinidad é utilizada para aliviar tosse e catarro, além de ser considerada afrodisíaca (MORTON, 1977). Na Costa Rica, o seu principal uso é como ansiolítico, sendo comercializados fitoterápicos produzidos a partir do extrato seco padronizado da planta (LISANATURA, 2009).

No Brasil, as folhas de *J. pectoralis* são utilizadas na forma de chá ou lambedor para tratamento de afecções do trato respiratório, como tosse, bronquite e asma. Alguns Programas Governamentais de Fitoterapia do Nordeste produzem o xarope de *J. pectoralis* associando *Plectranthus amboinicus* (malvariço), que possui propriedades antimicrobianas, à formulação (MATOS, 2000; NOBRE *et al.*, 2006).

*J. pectoralis* (Figura 1) pode ocorrer espontaneamente ou ser cultivada, em geral por estarquia, sendo frequentemente encontrada no México, Venezuela, Trinidad, Cuba, Jamaica, Oeste do Equador e Norte e Nordeste do Brasil (OLIVEIRA; ANDRADE, 2000). Morton (1977) relata que *J. pectoralis* denominada popularmente como *curia* é uma erva nativa do sul do México, Venezuela, Trinidad e Panamá; em Cuba, região do Caribe e Haiti é

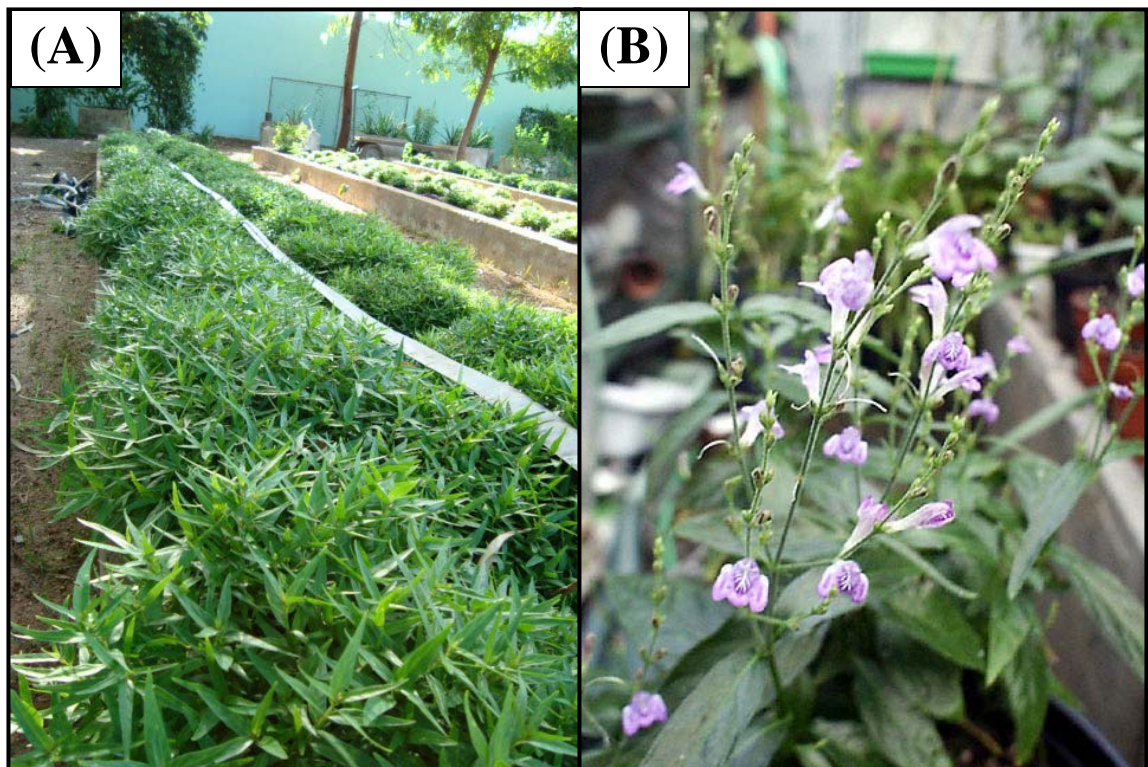
referida como *tilo* e *chapanlye*, respectivamente; já no Brasil, é conhecida popularmente como anador, trevo-cumaru e chambá (MATOS, 2000; NOBRE *et al.*, 2006).

É uma erva com aproximadamente 29 cm de altura, com caule ascendente e pêlos retrorsos esbranquiçados dispostos em linhas verticais; nós inferiores freqüentemente com raízes adventícias. Suas folhas são opostas, membranáceas e verdes, podendo apresentar pontuações vináceas. A lâmina foliar é lanceolada, ápice atenuado, base aguda, margem inteira, com pêlos em ambas as faces. Apresenta inflorescência racemosa com brácteas e bractéolas lanceoladas. As flores são sésseis e possuem cálice verde e corola de cor branca à lilás. Seu fruto é na forma de cápsula e suas sementes são achatadas de cor castanha-avermelhada. (OLIVEIRA; ANDRADE, 2000; TAVARES; VIANA, 1995).

Bezerra *et al.* (2006), ao avaliar a influência da adubação orgânica e mineral na produção de biomassa, rendimento de óleo essencial, teores de fósforo (P) e potássio (K) em chambá, observou que as adubações orgânicas e minerais não influenciaram o crescimento e a produção de biomassa da planta, nem os teores de P e K da sua parte aérea, enquanto o rendimento de óleo essencial diminuiu com os incrementos nas doses das adubações orgânicas e minerais.

Estudos agrônômicos mostraram que a concentração de cumarinas nas folhas de chambá é diretamente proporcional à intensidade de radiação solar incidente, e que as folhas vermelho-vináceas apresentam maior teor de cumarinas totais em relação às folhas verdes. Por outro lado, a elevada incidência de radiação solar no primeiro mês após o plantio afeta negativamente o crescimento da planta, acarretando um menor rendimento de biomassa. Assim, para fins medicinais, é indicado o cultivo inicial de *Justicia pectoralis* sob sombreamento até o final do primeiro mês e transferência das mudas para radiação total até a coleta (BARROS; ANDRADE; SILVA, 1997; BARROS; ANDRADE; ENCARNAÇÃO, 1988). Quanto à elaboração de canteiros para cultivo de chambá, Ferradá, Sosa e Fiallo (2003) conseguiram bons rendimentos médio de biomassa em canteiros cuja distância entre plantas variava de 10 – 20 cm, altura de corte de 10 cm e até 3 podas.





**Figura 1.** Aspecto macroscópico de *Justicia pectoralis*. (A) Planta adulta. (B) Inflorescência. (Fonte: F. N. FONSECA)

### 1.2.1.2. Constituintes químicos

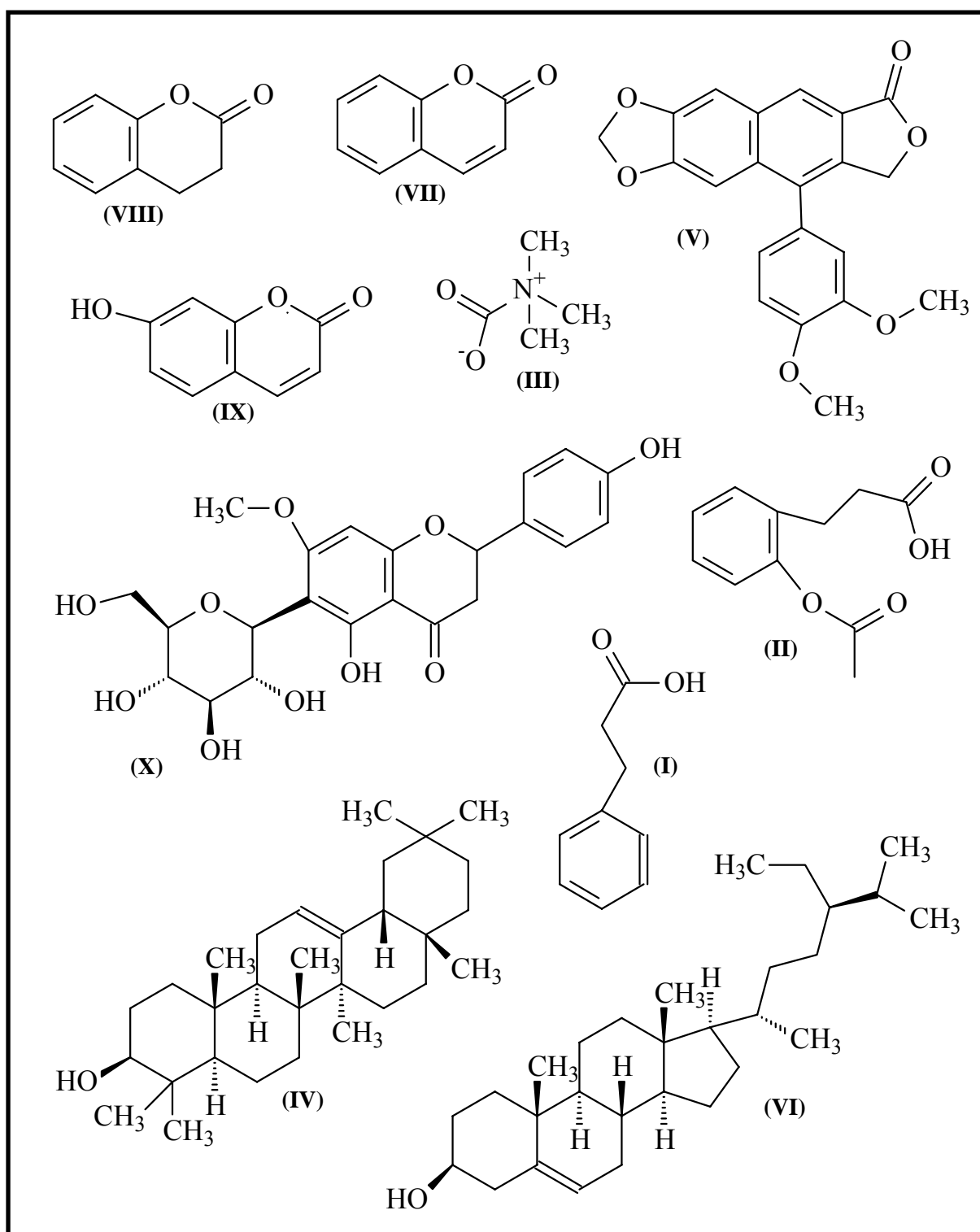
Ensaio fitoquímico realizado com o extrato metanólico da planta, por meio de testes gerais de identificação e cromatografia em camada delgada (CCD), mostraram-se positivos com relação à presença de cumarinas, flavonóides, esteróides e triterpenóides, mas negativos para alcalóides (LEAL *et al.*, 2000; OLIVEIRA; ANDRADE, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2000). Estudos cromatográficos e espectrométricos isolaram e caracterizaram derivados cumarínicos (cumarina, dihidroxicumarina e umbeliferona), assim como derivados do ácido fenilpropiônico (DE VRIES; TAUCHER; WURZEL, 1988; MACRAE; TOWERS, 1984).

Foi verificada também a ocorrência de ácido orto-hidroxitranscinâmico acetilado, ácido orto-hidroxi-diidrocinâmico acetilado,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -amirina, betaína, justicidina B e das C-glicosilflavonas o-metoxiladas como a eswertisina, 2''-o-ramnosil-eswertisina, eswertiajaponina e 2''-o-ramnosileswertiajaponina (JOSEPH; GLEYE; MOULIS, 1988a; 1988b; MACRAE; TOWERS, 1984; OLIVEIRA *et al.*, 2000; WENIGER; SAVARY; DAGUIHL, 1984) (Figura 2).

Duke (1987) menciona a presença de alcalóides (triptaminas) em baixas concentrações em *J. pectoralis*, o que possivelmente justificaria o potencial alucinógeno da espécie e o seu emprego em “rapés” por tribos indígenas da América do Sul. Contudo, outros autores afirmam a ausência de alcalóides, sendo o uso de chambá nessas preparações ritualísticas apenas como aromatizante devido ao odor agradável das cumarinas (MACRAE; TOWERS, 1984; MELO; ANDRADE, 1989).

### 1.2.1.3. Aspectos toxicológicos e farmacológicos

Estudos têm mostrado a bioatividade de compostos isolados de *J. pectoralis*, bem como de suas soluções extrativas. Dentre os constituintes químicos relacionados à espécie, os derivados cumarínicos (cumarina e umbeliferona) têm sido referidos como os principais componentes responsáveis pelos efeitos farmacológicos observados (LEAL *et al.*, 2000; LINO *et al.*, 1997; MACRAE; TOWERS, 1984).



**Figura 2.** Metabólitos secundários isolados da parte aérea de *Justicia pectoralis*. I. ácido fenilpropionico, II. orto-hidroxitranscinâmico acetilado, III. Betaína, IV. β-amirina, V. Justicidina B, VI. β-sitosterol, VII. Cumarina, VIII. Dihidrocurarina, IX. Umbeliferona e X. Eswertisina.

As cumarinas constituem uma classe de metabólitos secundários derivados do ácido cinâmico, amplamente distribuídos no reino vegetal, podendo também ser encontrados em fungos e bactérias. As propriedades farmacológicas estão relacionadas com o padrão de substituição no núcleo fundamental (1,2-benzopirano) (EVANS, 1996; MURRAY, 1989). No homem, a cumarina sofre extensa metabolização hepática, levando a produção de 7-hidroxycumarina, também conhecida como umbeliferona (LACY; O'KENNEDY, 2004; MURRAY, 1989).

Inúmeras propriedades farmacológicas descritas na literatura tem sido relacionadas às cumarinas, incluindo atividades antiinflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiviral, antitrombótica, vasodilatadora e anti-tumoral. A cumarina aumenta a ação proteolítica de macrófagos, sendo, devido a isso, empregada no tratamento de linfedema (CLODIUS; PILLER, 1978). Já a umbeliferona possui demonstradas suas atividades espasmolítica, antimicrobiana, hipoglicemiante e hipolipidêmica (LINO *et al.*, 1997; RAMESH; PUGALENDI, 2005, 2006; STEFANOVA *et al.*, 2007).

Lino (1995) observou, na avaliação da toxicológica aguda em ratos, que a dose letal (DL<sub>50</sub>) do extrato hidroalcoólico (EHA) das folhas do chambá administrado por via intraperitoneal foi de  $3,0 \pm 0,2$  g/Kg, porém o extrato administrado por via oral nas doses de até 10 g/Kg não foi letal aos animais até 48 h após o tratamento. No entanto, o tratamento diário dos ratos com EHA (400 mg/Kg) durante 30 dias causou aumento no hematócrito e na fosfatase alcalina e redução na hemoglobina, sugerindo que o uso prolongado do EHA pode causar alterações hematológicas e bioquímicas.

Na avaliação da toxicidade de vários extratos vegetais, foi observada a concentração letal (CL<sub>50</sub>) de 60,14 µg/mL para a tintura de *J. pectoralis* por meio do ensaio com *Artemia salina* L., enquanto a toxicidade oral aguda em camundongos (DL<sub>50</sub>) foi 3,5g/Kg, mostrando, dessa forma, a sua baixa toxicidade (PARRA *et al.*, 2001).

Toledo *et al.* (2007) avaliou a toxicidade aguda em ratos de seis extratos hidroalcoólicos secos e observou que o extrato de *J. pectoralis* possuía DL<sub>50</sub> acima de 2000 mg/Kg e os animais não apresentaram alterações anatomofisiológicas, sendo classificado como não tóxico de acordo com o *Global Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (UNITED NATIONS, 2007). Além disso, o extrato fluido aquoso de *J. pectoralis* não apresentou genotoxicidade em células de medula óssea de roedores (MONTERO *et al.*, 2001).

Na avaliação da atividade antinociceptiva do EHA (400 mg/Kg, v.o.) e de compostos isolados (cumarina e umbeliferona – 5 mg/Kg, v.o.) na nocicepção induzida por

formalina, foi verificado que o sistema opióide não está envolvido, visto que não houve reversão dos efeitos antinociceptivos após pré-tratamento com naloxona, um antagonista opióide; por outro lado, o pré-tratamento com L-arginina (inibidor da enzima oxido nítrico redutase) reverteu os efeitos da umbeliferona, sugerindo a participação da via do óxido nítrico nesse efeito. Além disso, o EHA do chambá mostrou atividade broncodilatadora em traquéia de cobaia, o que corrobora, pelo menos em parte, seu uso medicinal popular para problemas das vias aéreas, como asma, bronquite e tosse (LINO, 1995; LINO *et al.*, 1997).

Na avaliação das atividades de *J. pectoralis* no Sistema Nervoso Central, foi observado que o tratamento de camundongos com o decocto de *J. pectoralis* reduziu a conduta agressiva e a atividade exploratória em ratos, assim como bloqueou a excitação induzida por fenciclidina (antagonista do receptor NMDA) em ratos jovens, mas não foi capaz de prevenir as convulsões induzidas por antagonistas GABAérgicos (pentilenotetrazol e picrotoxina), ao contrário do diazepam que apresentou neuroproteção, sugerindo que a ação ansiolítica da planta não ocorre via mecanismo dos benzodiazepínicos (FERNANDÉZ *et al.*, 1989; SAAD *et al.*, 1987). Ainda, verificou-se que a administração intravenosa do decocto e do extrato seco da planta não foi capaz de reverter os efeitos da apomorfina (agonista dopaminérgico), mostrando não possuírem atividade antidopaminérgica semelhante aos neurolépticos típicos (MÁS *et al.*, 1987).

Trueba *et al.* (2001) mostraram a atividade antioxidante *in vitro* do extrato seco do chambá (0,0138 – 2,97 mg/mL) na peroxidação lipídica em homogenatos cerebrais de rato. Em modelo de diabetes induzida por estreptozotocina (nitrosoamida que destrói as células  $\beta$  do pâncreas), ratos tiveram normalizados seus parâmetros de peroxidação lipídica após administração de umbeliferona (30 mg/Kg, v.o.), sugerindo possível efeito sobre as células  $\beta$  do pâncreas (RAMESH; PUGALENDI, 2006).

Em ensaios de triagem de plantas medicinais com propriedades antimicrobianas e inseticidas realizados em Trinidad e Tobago, foi observado que a fração éter de petróleo do extrato de *J. pectoralis* apresentou atividade antimicrobiana acentuada contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella typhimurium*, e a fração acetato de etila para *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *S. typhimurium* em placa de Agar; além disso, ambas as frações na concentração de 0,5 mg/mL mostraram-se tóxicas para larvas de *Aedes aegypti* no estágio de crescimento larval IV após 2 e 9 dias, respectivamente (CHARIANDY *et al.*, 1999).

Justicidina B é uma lignana isolada de algumas espécies vegetais incluindo *J. pectoralis*. Essa molécula é capaz de inibir o crescimento de alguns fungos patogênicos do

gênero *Aspergillus* e *Candida* a partir de 1 e 12 µg/mL, respectivamente, além de apresentar atividade potente contra a forma tripomastigota de *Trypanosoma brucei* e moderada contra *Trypanosoma cruzi* (CI<sub>50</sub> – 0,2 e 2,6 µg/mL, respectivamente). Ainda, a justicidina B possui uma citotoxicidade inespecífica observada em cultura de células neoplásicas sanguíneas e brônquicas (GERTSCH *et al.*, 2003; JOSEPH; GLEYE; MOULIS, 1988b).

Em um ensaio clínico piloto, observou-se que a administração do xarope (5 mL, 3 vezes ao dia) produzido a partir de chambá e malvariço durante 1 ou 2 semanas produziu aumento significativo nos parâmetros de avaliação respiratória (volume expiratório forçado, capacidade vital forçada e fluxo expiratório máximo) de pacientes asmáticos (asma leve), indicando melhora do quadro obstrutivo das suas vias aéreas, bem como da expectoração e sem efeitos colaterais (NOBRE *et al.*, 2006).

### 1.3. Tecnologias no desenvolvimento de fitoprodutos

A produção de fitoterápicos envolve várias etapas tecnológicas, tendo início na qualificação da matéria-prima vegetal, passando pelas operações de transformação até a obtenção da forma farmacêutica final. Durante todas essas etapas, os procedimentos de preparação e os parâmetros de qualidade devem ser bem definidos, tendo em vista a complexidade do material vegetal (SONAGLIO; ORTEGA; PETROVICK *et al.*, 2000).

O controle de qualidade de fitoterápicos é realizado através da aplicação de métodos físico-químico e biológico adequados, devendo estes estarem presentes em toda a cadeia produtiva, desde a qualificação de matérias-primas e insumos intermediários, bem como da forma farmacêutica final. Esse monitoramento deve garantir a obtenção de produtos com características aceitáveis de acordo com a legislação vigente.

O processo de avaliação da qualidade de matérias-primas e produtos derivados deve compreender a determinação de três características principais: a autenticidade, a integridade e a pureza do material em análise. Nesse contexto, de acordo com o material em estudo, podem estar envolvidas a caracterização organoléptica, a identificação macroscópica e microscópica do órgão vegetal, a pesquisa de materiais estranhos e contaminantes biológicos, a umidade, as cinzas totais e insolúveis em ácido e a análise qualitativa e quantitativa dos marcadores químicos (composto ou classe de compostos presente na matéria-prima vegetal, correlacionado com o efeito terapêutico, preferencialmente, e utilizado como referência no

controle de qualidade dos produtos derivados da espécie), quando presentes, por meio de métodos analíticos adequados (BRASIL, 2004a; FARIAS, 2000).

### 1.3.1. Métodos analíticos empregados na padronização de fitoprodutos

Vários métodos são descritos na literatura para a análise qualitativa e quantitativa de marcadores, sejam eles de origem natural ou sintética. Tendo em vista que as plantas medicinais são matrizes complexas (metabólitos primários e secundários e sais minerais), a identificação e a quantificação desses compostos são fundamentais para garantir a qualidade de produtos intermediários e acabados, como os fitoterápicos.

Na análise química de extratos são empregadas amplamente técnicas gravimétricas e colorimétricas, caracterizadas pela precipitação e mudança de cor, respectivamente, após adição de reagentes específicos. Além disso, outra técnica que merece destaque é a CCD, a qual separa vários compostos de uma mesma amostra sobre uma superfície plana. No entanto, uma das principais limitações desses métodos é a possível interferência dos demais constituintes da matriz do produto em estudo, conferindo resultados imprecisos. Por outro lado, embora apresentem problema na seletividade, essas metodologias são úteis em estudos preliminares, bem como no controle de qualidade de rotina de laboratórios farmacêuticos de pequeno porte.

Avanços tecnológicos nas técnicas analíticas têm permitido a padronização de produtos derivados de plantas com o intuito de garantir a sua qualidade. Dentre as metodologias analíticas bem estabelecidas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em virtude da sua ampla capacidade de análise, é uma das técnicas mais aplicadas com essa finalidade (HOSTETTMANN; WOLFENDER; RODRIGUEZ, 1997; OLIVEIRA; BRAGA, 2003; SCHENKEL, GOSMANN; PETROVICK, 2000). Além disso, a união da CLAE a outras técnicas analíticas, como a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massa (EM), tem sido uma poderosa ferramenta na área dos produtos naturais, pois realiza, além da separação e quantificação, a determinação estrutural dos compostos da matriz (PINTO *et al.*, 2002).

As principais vantagens da CLAE estão relacionadas à sensibilidade, pois é capaz de detectar massas na faixa de  $10^{-9}$ g; à versatilidade, uma vez que pode ser aplicada aos mais diversos produtos assim como ser combinada com outras técnicas; e ao menor tempo de

análise, o que é interessante no tocante à rotina de controle de qualidade na indústria farmacêutica. Por outro lado, essa técnica requer um alto custo de instrumentação inicial e relativo custo operacional, além da falta de um detector universal e sensível para todos os tipos de analito, bem como da necessidade de recursos humanos bem treinados para manusear o sistema (CIOLA, 1998; VALLADÃO, IONASHIRO; NETTO, 2008).

Ainda, o emprego de métodos cromatográficos é útil para a determinação do *fingerprint* do extrato de uma planta, ou seja, da sua identidade fitoquímica. Quando preparados sob mesma condição, extratos vegetais devem manter um padrão qualitativo de compostos, seja de bandas, quando empregada CCD, ou de picos, quando se aplica CLAE. Bilia *et al.* (2007) realizou a análise qualitativa e quantitativa de diversas tinturas de *Crataegus oxyacantha* e de *Hieracium pilosella* por CLAE – EM e observou que o perfil fitoquímico das amostras permaneceram semelhantes mesmo após 9 meses de armazenamento, havendo alteração somente no teor dos marcadores. Embora seja um resultado qualitativo, a obtenção desse perfil tem valor, pois possíveis alterações no produto resultam em alterações no cromatograma.

Para garantir que o resultado proveniente de uma metodologia analítica seja confiável, é necessário a sua validação. Esta é definida como a garantia, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados durante o uso rotineiro (BRASIL, 2003e). Assim, buscando harmonizar os procedimentos necessários para a validação de uma metodologia analítica, os órgãos reguladores no Brasil (ANVISA, INMETRO, entre outros) e em outros países (*Food and Drug Administration, European Commission, International Harmonisation Conference*, entre outros) estabelecem critérios com essa finalidade. Dessa forma, a ANVISA publicou a RDC 899/03, que fornece orientações e estabelece os parâmetros necessários para validar métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL, 2003e).

Os parâmetros (Tabela 1) comumente encontrados nos processos de validação de métodos analíticos são a linearidade (capacidade de um método demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado), a precisão (avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, podendo ser em nível de intra-corrída ou inter-corrída), a exatidão (proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro), o limite de detecção e quantificação (menor concentração do analito que pode ser detectada e quantificada, respectivamente) e a robustez (capacidade de um método resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos).



**Tabela 1.** Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria				
	<i>Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas</i>	<i>Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas</i>	<i>Ensaio limite</i>	<i>Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)</i>	<i>Testes de identificação</i>
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

\* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico. \*\* se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária. Fonte: BRASIL (2003e).

### 1.3.2. Métodos de secagem empregados na produção de extratos secos

Considera-se um produto farmacêutico com qualidade aquele que possui suas características reprodutíveis quanto à constância de princípio ativo e propriedades físico-químicas. Por outro lado, os produtos fitoterápicos vêm sendo bastante questionados quanto a sua qualidade ao se comparar diversos lotes do mesmo produto, resultado do uso de métodos de preparação não padronizados nem controlados. Nesse contexto, o extrato seco vegetal, quando bem preparado, apresenta inúmeras vantagens, como maior estabilidade química e facilidade de armazenamento, de manuseio e de transporte, sendo utilizado como produto intermediário na elaboração de formas sólidas, semi-sólidas e líquidas, o que aumenta o valor agregado do produto final (LIST; SCHIMIDT, 1989).

Na escolha da técnica de secagem, algumas considerações devem ser avaliadas, tais como a sensibilidade da amostra ao calor, as suas propriedades físico-químicas, a natureza do líquido a ser removido e a escala de operação (AULTON, 2005). Dentre os processos de secagem de extratos vegetais mais empregados, a liofilização e o *spray drying* merecem destaque, sendo o último o mais estudado e empregado na produção de medicamentos a base de plantas medicinais (LIST; SCHIMIDT, 1989; WENDEL; ÇELIC, 1998).

A liofilização é um processo aplicado na secagem de produtos, genericamente, sensíveis ao calor, permitindo secar derivados protéicos e hematológicos, mantendo-os funcionais, e microbiológicos, os quais ainda retêm funcionalidade e viabilidade. É baseado na sublimação do gelo sob vácuo, requerendo que a amostra seja previamente congelada, não sendo necessária a sua concentração. O resultado é um pó extremamente leve, volumoso, altamente higroscópico e de fácil dissolução, devido a sua elevada porosidade. No entanto, não é uma opção muito atrativa para a indústria de fitoterápico, pois é de difícil manipulação, requerendo instalações complexas, o que eleva o custo de produção, e, em geral, que o produto seja envasado logo após a secagem para evitar contato com umidade (AULTON, 2005).

A obtenção de extrato seco por *spray drying*, também denominado de secagem por nebulização, aspersão ou atomização, consiste na pulverização de uma suspensão por um bico atomizador numa câmara aquecida sob fluxo de ar, levando a evaporação do solvente e resultando num pó seco. O produto final obtido apresenta partículas homogêneas e com elevada fluidez, solubilidade, estabilidade e teor de substâncias, tornando-o apreciável para a elaboração de formas farmacêuticas sólidas ou de matéria-prima intermediária para outras

formas. Outra vantagem desse método é a ampla gama de substâncias que podem ser secadas por ele, assim como a possibilidade de alteração dos parâmetros de funcionamento do aparelho, denominado *spray dryer*, garantido melhor adequação da técnica ao intuito desejado (DE SOUZA, 2002; LIST; SCHIMIDT, 1989; WENDEL; ÇELIC, 1998).

A qualidade dos produtos obtidos por atomização depende das características do atomizador e da transferência de calor e massa entre o ar aquecido e as gotículas da câmara de secagem. O líquido é disperso sob alta pressão para aumentar a área superficial e expor as gotículas de pequeno diâmetro, em torno de 10 a 200 $\mu$ m, ao ar de secagem a altas temperaturas, processo esse que dura de 5 a 30 segundos (FURUTA; HAYASHI; OHASHI, 1994).

Como variáveis que afetam as propriedades de produtos obtidos em *spray dryer*, têm-se as variações na concentração de alimentação, na temperatura de alimentação e do ar, nos métodos e condições de atomização e as diferenças nas propriedades físicas e químicas do material de alimentação. Com relação ao produto obtido, devem ser avaliados a densidade e o volume aparente, o tamanho da partícula e distribuição (incluindo pós finos), a friabilidade da partícula ou resistência à ruptura, o conteúdo de umidade, a dispersibilidade ou a tendência a aglomeração, além da retenção da qualidade desejada ao produto, como aroma, valor alimentício, cor, reconstituibilidade, etc (DUFFIE; MARSHALL JR, 1953).

Um dos parâmetros de qualidade de um extrato seco é a sua higroscopicidade, a qual deve ser a mais baixa possível para garantir a sua estabilidade e evitar a contaminação biológica. Para melhorar as características físico-químicas e farmacotécnicas do pó, adjuvantes de secagem são utilizados, os quais também contribuem para aumentar o rendimento do processo e o tamanho final da partícula. Os mais empregados para esse fim são a lactose, as dextrinas e gelatinas, a goma arábica, os derivados da celulose e o dióxido de silício coloidal (DSC) (LIST; SCHIMIDT, 1989).

Muitos estudos (ARARUNA, 2008; CARVALHO, 1997; DE SOUSA, 1997; DINIZ, 2008) têm mostrado o bom desempenho do DSC na secagem de soluções extrativas por *spray drying*, sendo um dos mais empregados na obtenção de extratos secos vegetais. Na obtenção do extrato seco de *Bauhinia forticata* foi verificado que um aumento no teor de DSC no extrato resultou em uma suspensão mais viscosa e com maior rendimento de secagem (SOUSA, 2007). Teixeira (1996), ao avaliar os efeitos de uma série de adjuvantes tecnológicos na secagem de extratos hidroalcoólicos de *Achyrocline satureioides*, observou que os pós produzidos com DSC apresentaram maior rendimento do processo, maior recuperação dos flavonóides e menor umidade residual.

A avaliação pré-clínica de extratos secos de *Maytenus ilicifolia* mostrou que aqueles produzidos com DSC apresentavam maior atividade antiúlcera (ACHÉ, 1999); além disso, elevados teores de DSC conferiram melhor rendimento de secagem, menor teor de umidade residual e distribuição mais homogênea das partículas (OLIVEIRA, 2009). Na otimização de secagem de extratos de *Schinus terebinthifolius* por aspersão, o teor de DSC e a temperatura de secagem influenciaram significativamente na estabilidade física do produto seco obtido, mantendo o seu aspecto fino e fluido (VASCONCELOS *et al.*, 2005). Essa estabilidade pode estar relacionada a uma possível microencapsulação das partículas do pó pelo DSC (CORNEC, 1990).

-----



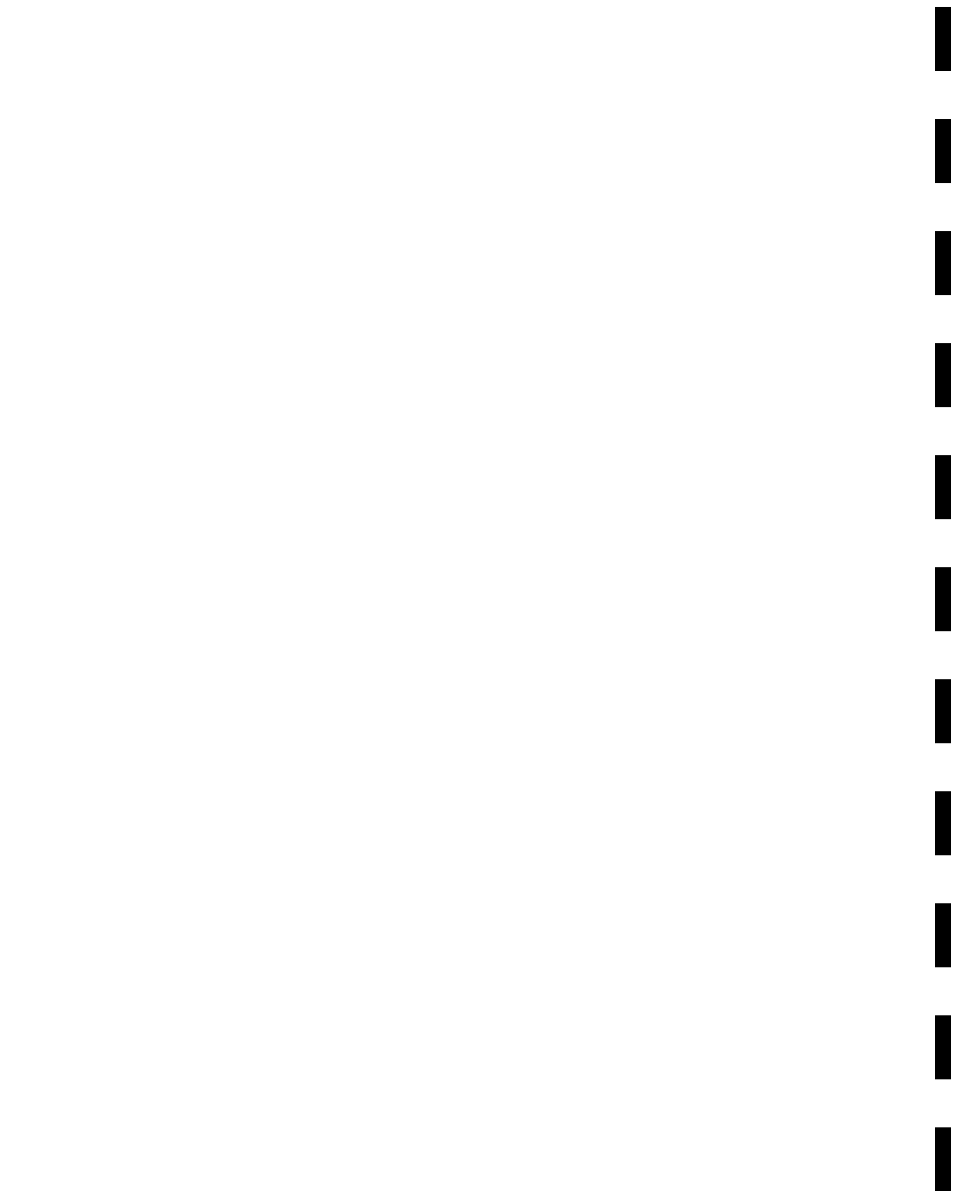
*Justificativa*

## 2. JUSTIFICATIVA

O aproveitamento do potencial das plantas medicinais como fonte de medicamentos pela população é estimulado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Nesse contexto, a inovação industrial desses produtos vem sendo desenvolvida por intermédio da academia e de institutos de pesquisa, estando o Brasil numa situação privilegiada pela sua diversidade de ecossistemas, detendo em torno de um terço da flora mundial (RATES, 2001; YUNES; PEDROSA; FILHO, 2001).

Dentre as espécies que compõem o Programa Estadual de Fitoterapia, podemos relacionar o chambá - *Justicia pectoralis*, pequena erva, cujas folhas são amplamente utilizadas nas práticas caseiras da medicina popular e nos Programas Públicos de Fitoterapia, sendo indicada no tratamento da asma, tosse e bronquite (MATOS, 1998; 2000). Ainda, ela faz parte da Rénisus, o que mostra sua potencialidade para elaboração de produtos fitoterápicos com aplicabilidade no SUS, uma vez que evidências científicas mostram sua segurança e eficácia (BRASIL, 2008; LEAL *et al.*, 2000; LINO, 1995; NOBRE *et al.*, 2006).

Atualmente, a forma farmacêutica a base de chambá é restringida ao xarope, o qual é preparado a partir do seu extrato hidroalcoólico, mas que, em geral, apresenta oscilações consideráveis na sua qualidade, por exemplo, densidade, pH, resíduo sólido e teor de marcadores (cumarina e umbeliferona). Assim, percebe-se a necessidade de incorporação tecnológica na produção e no controle de qualidade dos produtos derivados do chambá, envolvendo melhorias desde o processo de preparação da droga vegetal, da matéria-prima intermediária (extrato da planta) até produto final (xarope), considerando-se também a relevância do investimento na elaboração de uma formulação sólida (extrato seco), que possui maior estabilidade e precisão na dosagem. Além disso, é importante salientar que inovações no desenvolvimento de um medicamento requerem um monitoramento toxicológico e farmacológico.



*Objetivos*

### 3. OBJETIVOS

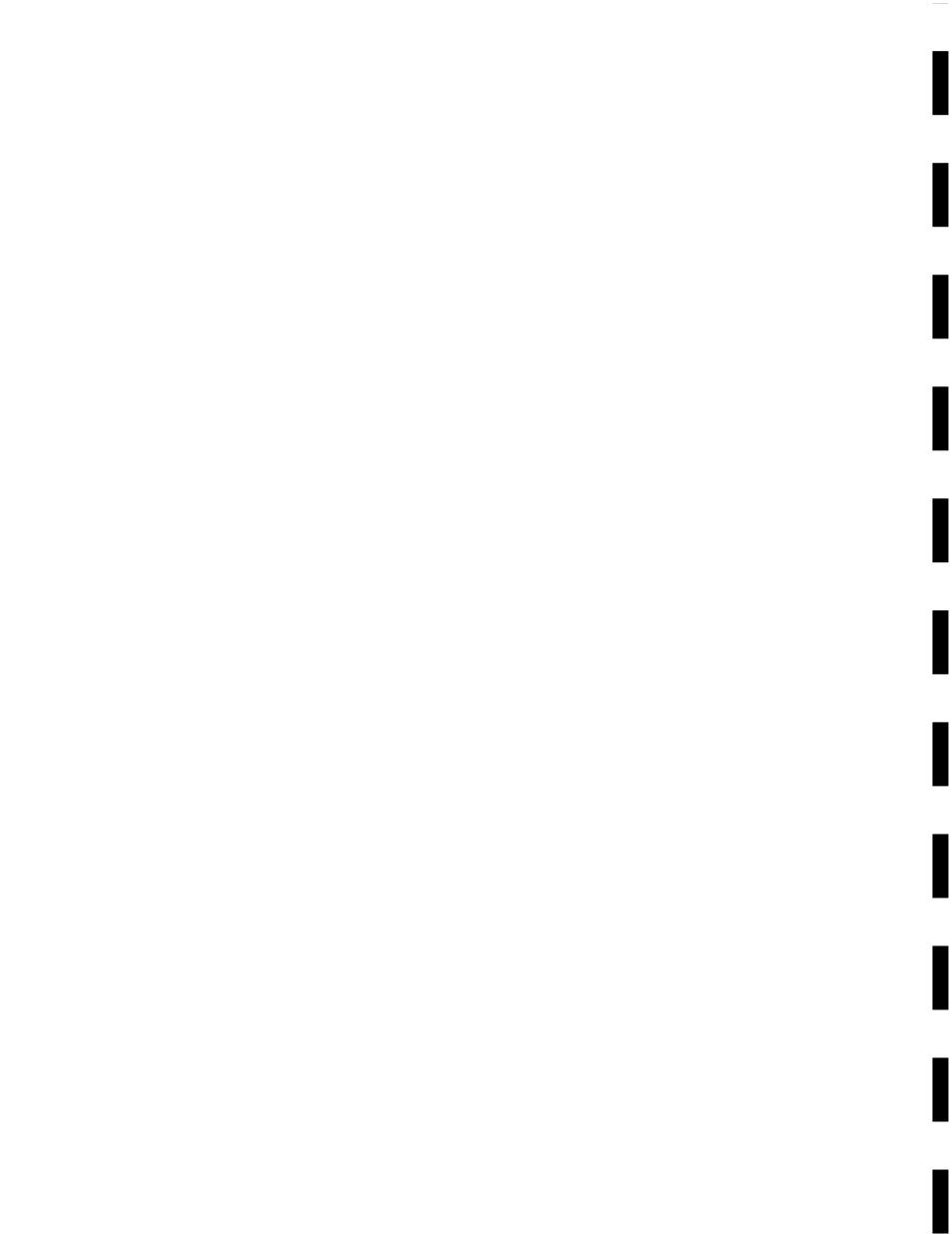
#### 3.1. Geral

- Realizar o desenvolvimento e o controle de qualidade do processo de produção da droga vegetal, da solução extrativa e do extrato seco de *Justicia pectoralis* (Chambá) padronizados, bem como investigar seu potencial farmacológico pré-clínico.

#### 3.2. Específicos

- Desenvolver e validar metodologia analítica em sistema de CLAE-DAD para a determinação do teor dos marcadores químicos, cumarina e umbeliferona, na droga vegetal, solução extrativa e extrato seco;
- Estabelecer o método de produção da droga vegetal a partir da parte aérea de chambá guiado pelo teor de umidade e de marcadores químicos;
- Desenvolver o método de produção da solução extrativa de chambá guiado pelo teor de marcadores químicos;
- Desenvolver e avaliar método de secagem do extrato de chambá por *spray drying*;
- Pesquisar os possíveis efeitos tóxicos do extrato seco padronizado de *J. pectoralis* (ESPJP) em neutrófilos humano, mensurada pela atividade da lactato desidrogenase;
- Avaliar o efeito do ESPJP sobre a degranulação de neutrófilos humano, mensurada pela concentração de mieloperoxidase;
- Avaliar a atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato padronizado de *J. pectoralis* (EPJP) em roedores;
- Determinar o perfil antimicrobiano do EPJP em ágar.





*Materiais*  
*e*  
*Métodos*

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE – DAD

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. O presente estudo teve por finalidade a realização de testes quantitativos para a determinação dos marcadores cumarina e umbeliferona na matéria-prima (droga vegetal) e nos produtos derivados de *J. pectoralis*.

Dessa forma, segundo as orientações da RE 899/03 da ANVISA (BRASIL, 2003e) e de acordo com a finalidade do método, determinou-se os seguintes parâmetros para a validação da metodologia analítica: especificidade, seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

#### 4.1.1. Reagentes e solventes

Os padrões de cumarina e umbeliferona foram obtidos da Sigma (EUA) e Aldrich (EUA), respectivamente. Os solventes para o preparo da fase móvel (acetonitrila, metanol e tetrahidrofurano) eram grau CLAE e oriundos da J. T. Baker (EUA). A água utilizada nas análises, previamente destilada, foi purificada utilizando um sistema de filtragem Milli-q da Millipore. Os demais reagentes eram de grau analítico: trietilamina (Merck, EUA) e ácido fosfórico (Dinâmica Química, Brasil).

#### 4.1.2. Condições Cromatográficas

A análise dos marcadores de *Justicia pectoralis* foi realizada utilizando um sistema cromatográfico Waters (EUA) acoplado com um detector de arranjo de diodos (CLAE – DAD), injetor automático e forno para coluna. Para tal, utilizou-se uma coluna X-

terra C18 (Waters) de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm. Utilizou-se ainda, uma pré-coluna (4,0 x 3,0 mm, Phenomenex) de constituição semelhante a da coluna.

Tomando como base a fase móvel de um método cromatográfico para determinação por CLAE de cumarina em *Amburana cearensis* (CANUTO; SILVEIRA, 2006), algumas modificações foram realizadas para que fosse possível separar e quantificar tanto a umbeliferona e quanto a cumarina em *J. pectoralis*. A fase móvel final consistia de uma solução orgânica composta por acetonitrila : metanol : tetrahydrofurano na proporção 5,8 : 2,2 : 2,0 e uma solução tampão de trietilamina : ácido fosfórico : água (0,45 : 0,24 : 99,31, pH = 3), as quais eram misturadas para formar a fase A (80 : 20) e a fase B (60 : 40) na proporção tampão : fase orgânica. Ambas as fases eram filtradas em um aparato de filtração (Millipore, EUA) contendo uma membrana filtrante com poro de 0,45 µm (Millipore, EUA) e, em seguida, desgaseificadas em banho ultrassônico (Unique, Brasil).

O fluxo da fase móvel era 1,8 mL/min e a eluição gradiente (Tabela 2). O detector foi operado sob 323 nm e a temperatura da coluna 40 °C. O volume de injeção das amostras era 20 µl, sendo necessários 20 min para completar uma corrida. Os dados obtidos eram processados pelo programa Empower® (Waters, EUA) do próprio aparelho.

#### 4.1.3. Preparo das soluções padrões e das amostras

Inicialmente, pesou-se quantitativamente cumarina e umbeliferona padrão em balança analítica (Toledo, Brasil), os quais foram dissolvidos na fase móvel A e transferidos para o balão volumétrico, de modo que as concentrações finais ficaram 1,008 mg/mL e 0,102 mg/mL, respectivamente, podendo essas soluções estoque ficarem armazenadas a temperatura ambiente (25 °C).

As soluções padrões de rotina foram preparadas a partir das soluções estoque por meio da diluição com fase A em um mesmo balão volumétrico, de modo que a solução final contivesse os dois marcadores nas concentrações desejadas.

O extrato utilizado no processo de validação foi obtido por percolação com maceração prévia por 24 h, utilizando solução hidroalcoólica 20 %. As amostras de extratos a serem analisados eram diluídas com fase A em balão volumétrico na proporção 1:4 (amostra:fase). Em seguida, a solução obtida era filtrada em unidade filtrante com poro de 0,45 µm (Millipore, EUA).

**Tabela 2.** Gradiente do método desenvolvido para separação dos marcadores de *Justicia pectoralis*

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fase A (%)</b>	<b>Fase B (%)</b>
0	100	0
10	20	80
15	0	100
16	0	100

#### 4.1.4. Especificidade e Seletividade

Uma alíquota de solução padrão de cada marcador foi injetada no aparelho, assim como uma solução padrão contendo as duas substâncias e uma amostra de extrato hidroalcoólico da planta, o qual foi produzido como descrito no item 4.1.3.

#### 4.1.5. Linearidade e intervalo

Uma série de diluições das soluções estoque dos marcadores foi analisada, contemplando o intervalo de 50 % - 150 % da quantidade presente no extrato hidroalcoólico de chambá. Tais soluções foram preparadas como descrito previamente no item 4.1.3. e correspondiam a faixa de 0,1512 – 0,4536 mg/mL e 0,0153 – 0,0459 mg/mL para cumarina e umbeliferona, respectivamente.

A partir dos dados obtidos nas análises, foi realizado o estudo de regressão linear, considerando-se o método linear quando o coeficiente de correlação ( $r$ ) fosse pelo menos 0,99 (BRASIL, 2003e).

## 4.1.6. Precisão

Inicialmente, fez-se a avaliação da precisão do sistema cromatográfico utilizado, sendo injetada a mesma amostra de extrato seis vezes seguida. Para o estudo de repetibilidade (Tabela 3), uma amostra de extrato hidroalcoólico de *J. pectoralis* foi analisada 6 vezes pelo mesmo analista, no mesmo dia e usando a mesma instrumentação.

A verificação da precisão intermediária foi desenvolvida utilizando uma amostra do mesmo extrato, a qual foi analisada por dois analistas, sendo realizado o Teste F para verificar a igualdade entre variâncias. O resultado foi expresso pelo desvio padrão relativo (DPR %), não podendo assumir valores acima de 5 %.

**Tabela 3.** Protocolo experimental para precisão intermediária do método analítico para dosear os marcadores de *Justicia pectoralis*.

<b>Dia</b>	<b>Analista I</b>	<b>Analista II</b>
1	6 alíquotas	6 alíquotas
2	6 alíquotas	-

## 4.1.7. Exatidão

Nesse caso, foram adicionadas alíquotas de solução padrão com concentração crescente dos marcadores, que correspondiam a 50 %, 100 % e 150 %, do teor de marcadores do extrato empregado, em uma amostra de extrato hidroalcoólico de *J. pectoralis*, a qual foi, então, analisada. A partir dos resultados, determinou-se a recuperação dos marcadores na amostra utilizando a seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{M1 \text{ (g)}}{M2 \text{ (g)}} \times 100$$

Onde: M1 = massa de padrão real  
M2 = massa de padrão teórica

## 4.1.8. Robustez

Para a avaliação da robustez do método, utilizou-se um planejamento fatorial do tipo 2<sup>3</sup>, a fim de se avaliar a influência da composição do gradiente da fase móvel, pH da fase móvel e o fluxo da fase móvel (Tabelas 4 e 5) na performance do método. Para tal, fez-se o uso de uma amostra de extrato hidroalcoólico da planta, preparado como descrito anteriormente (item 4.1.3.). Os resultados foram analisados no programa SPSS 14 (SPSS Inc.) e as interações foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . A combinação final das variáveis está resumida na Tabela 6.

**Tabela 4.** Fatores e níveis utilizados para avaliar a robustez do método analítico para quantificar os marcadores de *Justicia pectoralis*

Fator	Nível	
	( - )	( + )
Composição do Gradiente	A	B
Fluxo da Fase Móvel	1,7 mL/min	1,9 mL/min
pH da Fase Móvel	2,83	3,23

**Tabela 5.** Gradientes utilizados para avaliar a robustez do método analítico para quantificar os marcadores de *Justicia pectoralis*

Tempo	Gradiente A		Gradiente B	
	Fase A	Fase B	Fase A	Fase B
0	100 %	0	98 %	2 %
10 min	20 %	80 %	20 %	80 %
15 min	0	100 %	2 %	98 %
16 min	0	0	2 %	98 %

**Tabela 6.** Planejamento fatorial  $2^3$  para avaliação da robustez do método analítico para doseamento de cumarina e umbeliferona em derivados de *Justicia pectoralis*

Ensaio	Gradiente	Fluxo	pH
1	A	1,7 mL/min	2,83
2	B	1,7 mL/min	2,83
3	A	1,9 mL/min	2,83
4	B	1,9 mL/min	2,83
5	A	1,7 mL/min	3,23
6	B	1,7 mL/min	3,23
7	A	1,9 mL/min	3,23
8	B	1,9 mL/min	3,23

## 4.2. Obtenção da Droga Vegetal

### 4.2.1. Coleta do material

O material vegetal foi coletado no Horto de Plantas Medicinais do Núcleo de Fitoterapia (NUFITO), que faz parte da Coordenadoria de Assistência Farmacêutica da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, sendo realizada pela manhã. A exsicata (número 16079) da espécie está depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará.

Retirou-se manualmente com o auxílio de uma faca a parte aérea da planta, a qual foi lavada em água corrente, seguida de água destilada. Após a pesquisa de materiais estanhos, a matéria-prima vegetal foi posta para secar o excesso de água.

#### 4.2.2. Secagem e estabilização

A parte aérea do chambá foi submetida à secagem em estufa com circulação forçada de ar contínua (Lawes, Brasil) sob temperatura de  $35 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$  em tempo suficiente para obtenção do teor de umidade estabelecido pela farmacopéia brasileira que se caracterizasse droga vegetal e garantisse sua estabilidade (8 – 14 %). A cominuição do material seco foi feita em siladeira, utilizando-se a malha fina.

O monitoramento do teor de umidade da droga vegetal foi realizado em determinador de umidade de infravermelho (Marte, Brasil). Para tal, utilizou-se em torno de 3 g da planta, a qual foi picada e colocada no aparelho, ficando sob aquecimento de  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 h (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Fez-se uma comparação entre a forma de produção da droga vegetal pelo NUFITO (em sala de secagem com desumidificador) e a forma padronizada pelo presente projeto, sendo avaliados os aspectos visuais da droga obtida e o teor dos princípios ativos.

### 4.3. Caracterização Farmacognóstica da Droga vegetal

#### 4.3.1. Cinzas totais

Pesou-se exatamente 3 g da droga vegetal pulverizada, sendo transferidos para um cadinho de porcelana, previamente calcinado e pesado. Incinerou-se a amostra em forno mufla, aumentando-se a temperatura gradativamente até  $450 \text{ }^\circ\text{C}$  (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000). Terminada a incineração, resfriou-se o cadinho em dessecador e se fez a pesagem. Calculou-se o teor de cinzas em função da droga seca de acordo com a equação a seguir:

$$\text{Cinzas totais (\%)} = \frac{M1 \text{ (g)}}{M2 \text{ (g)}} \times 100$$

Onde: M1 = massa de cinzas  
M2 = massa total de droga pesada



#### 4.3.2. Umidade residual

O teor de umidade foi realizado em determinador de umidade de infravermelho (Marte, Brasil). Para tal, utilizou-se em torno de 3 g da planta, a qual foi picada e colocada no aparelho, ficando sob aquecimento de 105 °C por 1 h (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

#### 4.3.3. Análise Granulométrica

Para a análise granulométrica, realizou-se o método descrito na Farmacopéia Brasileira IV (2000). O jogo de tamises, com tamanho da abertura das malhas de 2,8 mm, 1,7 mm, 0,71 mm, 0,355 mm, 0,25 mm, 0,18 mm, 0,125 mm e fundo coletor, foram montados sobre manta vibratória (Granulotest, Brasil). Ao primeiro tamis, foram adicionados 100 g de droga vegetal triturada, ficando sob vibração por 20 min. Após isso, foi determinado o percentual de droga retida nos tamises de acordo com a equação:

$$\text{Retenção de droga (\%)} = \frac{M1 \text{ (g)}}{M2 \text{ (g)}} \times 100$$

Onde: M1 = massa retida no tamis  
M2 = massa de droga total pesada

#### 4.3.4. Determinação do teor de extrativos em etanol

Foi realizado de acordo com a metodologia estabelecida na Farmacopéia Brasileira IV (2000). Um cartucho de papel de filtro, previamente tarado, foi preenchido com cerca de 2 g de droga vegetal e alocado num sistema extrator de Soxhlet. Adicionou-se etanol, em quantidade suficiente no balão para ocorrer o sifonamento, juntamente com 200 mg de hidróxido de potássio, ficando sob extração por 5 h. Após esse tempo, o resíduo do cartucho foi secado em estufa a 105 °C por 30 min. O resultado foi referido em função do peso da droga seca de acordo com a equação:

$$\text{Teor de extrativos em etanol (\%)} = \frac{M1 - M2 \text{ (g)}}{M1 \text{ (g)}} \times 100$$

Onde: M1 = massa de droga antes da extração

M2 = massa de droga depois da extração

#### 4.3.5. Determinação do teor de extrativos em água

Empregou-se metodologia descrita pela OMS (WHO, 1998), onde cerca de 4 g da droga vegetal triturada foram macerados com 100 mL de água destilada por 24 h, sendo agitados os frascos freqüentemente nas primeiras 6 h e, em seguida, deixados em repouso por 18 h. O macerado foi filtrado, sendo transferidos 25 mL para um recipiente previamente tarado, o qual foi secado em estufa a 105 °C por 6 h. O teor de extrativos em água foi referido em função do peso do material vegetal através da equação:

$$\text{Teor de extrativos em água (\%)} = \frac{M1 \text{ (g)}}{M2 \text{ (g)}} \times \text{FD} \times 100$$

Onde: M1 = massa do resíduo do macerado

M2 = massa de droga antes da maceração

FD = fator de diluição

#### 4.4. Preparo e caracterização das soluções extrativas

##### 4.4.1. Processo extrativo

Os extratos da parte aérea do chambá foram obtidos por percolação a temperatura ambiente. Utilizou-se solução hidroalcoólica 20 % como limite inferior no estudo, pois extratos aquosos ou com teores de etanol abaixo desse valor apresentam risco de crescimento microbiano (SONAGLIO; ORTEGA; PETROVICK., 2000). Quanto à proporção droga:solvente e ao tempo de maceração, estabeleceu-se como nível inferior os parâmetros utilizados para a produção de tinturas vegetais (1:5 e 24 h) (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996). Já os outros níveis do planejamento foram múltiplos de 2 (condição intermediária) e 3 (extremo superior) do nível inferior, exceto para o solvente extrator, para o qual foi utilizado etanol absoluto.

Empregou-se um planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central para o estudo das variáveis do processo extrativo: teor da solução hidroalcoólica, tempo de extração e proporção droga:solvente (Tabela 7). A Tabela 8 mostra a combinação final dos fatores e níveis estudados. A resposta do estudo do processo extrativo foi definida pelo teor de marcadores (cumarina e umbeliferona) determinados por CLAE-DAD, conforme metodologia analítica descrita no item 4.1.2.

Os resultados foram analisados para definir a influência das variáveis no processo extrativo, sendo consideradas significativas as interações com  $p < 0,05$ . As respostas foram ajustadas numa superfície de resposta por meio do modelo matemático a seguir:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \varepsilon$$

Onde:  $Y$  = teor de princípio ativo (mg/g de droga)

$\beta_n$  = parâmetros de primeiro grau da regressão

$X_n$  = variáveis do processo extrativo

$\varepsilon$  = parâmetro aleatório da regressão

**Tabela 7.** Fatores e níveis utilizados para avaliar o processo extrativo de *Justicia pectoralis*

Fator	Nível		
	( - )	( 0 )	( + )
Solução Hidroalcoólica	20 %	60 %	100 %
Tempo de Maceração	24 h	48 h	72 h
Relação Droga:Solvente (g:mL)	1 : 5	1 : 10	1 : 15

**Tabela 8.** Planejamento fatorial  $2^3$  para padronização do processo de extrativo de cumarina e umbeliferona em derivados de *Justicia pectoralis*

Ensaio	Solvente	Maceração	Droga:solvente
1	20 %	24 h	1 : 5
2	20 %	24 h	1 : 15
3	20 %	72 h	1 : 5
4	20 %	72 h	1 : 15
5	60 %	48 h	1 : 10
6	100 %	24 h	1 : 5
7	100 %	24 h	1 : 15
8	100 %	72 h	1 : 5
9	100 %	72 h	1 : 15

#### 4.4.2. Caracterização físico-química do extrato

##### 4.4.2.1. Determinação do pH

Realizou-se de acordo com metodologia presente na Farmacopéia Brasileira IV (2000), onde 10 mL da solução extrativa foi analisada em potenciômetro calibrado com tampões de pH 4,0 e 7,0. As análises foram feitas em triplicata.

## 4.4.2.2. Determinação da densidade

A densidade do extrato foi determinada com o auxílio de um picnômetro a 25 °C, previamente calibrado com água destilada, como estabelecido na Farmacopéia Brasileira IV (2000). Os resultados foram expressos em g/mL e referem-se à média de três repetições, sendo obtidos pela equação:

$$\text{Densidade (g/mL)} = \frac{M \text{ (g)}}{V \text{ (mL)}} \quad \text{Onde: } M = \text{massa da solução extrativa}$$

$$V = \text{volume do picnômetro}$$

## 4.4.2.3. Determinação do teor de resíduo sólido

Transferiu-se 5 mL de solução extrativa para cadinho previamente tarado o qual foi secado em estufa a 105 °C por pelo menos 4 h até que não houvesse variação no peso (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2000). O teor de sólidos foi calculado em função do volume de extrato de acordo com a equação:

$$\text{Teor de resíduo sólido (\%, m/v)} = \frac{M \text{ (g)}}{V \text{ (mL)}} \times 100 \quad \text{Onde: } M = \text{massa do resíduo}$$

$$V = \text{volume do extrato}$$

## 4.4.2.4. Doseamento do teor de cumarina e umbeliferona

O doseamento dos marcadores no extrato hidroalcoólico de *J. pectoralis* desenvolvido no presente estudo foi realizado de acordo com a metodologia descrita nos itens 4.1.2. e 4.1.3. A concentração final do extrato foi obtida a partir da equação do estudo

linearidade (item 4.1.5.). Para efeito de comparação, foram analisadas amostras de xarope de chambá produzidos por Programas Públicos de Fitoterapia no estado do Ceará.

#### 4.5. Produção do extrato seco padronizado de *Justicia pectoralis* e sua caracterização

##### 4.5.1. Secagem do extrato por *spray drying*

Inicialmente, realizou-se uma avaliação preliminar em estufa dos adjuvantes de secagem comumente utilizados no processo de secagem em *spray dryer*, tais como: celulose microcristalina, amido de milho e dióxido de silício coloidal. As dispersões (extrato com excipiente) foram agitadas durante 15 min em agitador magnético (Fisaton, Brasil) e transferidas para placas de Petri de modo a formar uma fina camada sobre a superfície das mesmas, sendo, em seguida, mantidas em estufa a 60 °C por 1 h (PEIXOTO, 2005).

Os materiais secos foram avaliados quanto à distribuição do extrato e do excipiente na placa e a sua aderência à superfície da placa. Os excipientes que apresentaram boa incorporação ao extrato e facilidade de remoção da placa foram utilizados para secagem por *spray drying* nas proporções 1:0,25, 1:0,5 e 1:1 (massa de resíduo seco do extrato : massa de excipiente). Para o estudo de secagem, foi utilizado um *spray dryer* modelo MSD 1.0 (Labmaq, Brasil), com base em ensaios preliminares, as condições de secagem a serem empregadas na produção do extrato seco estão descritas na Tabela 9.

**Tabela 9.** Condições operacionais para secagem por *Spray dryer*

Parâmetros	Valor
Temperatura de entrada do ar de secagem	95 °C
Temperatura de saída do ar de secagem	45 °C
Fluxo de alimentação	0,3 mL/min
Fluxo de ar	40 L/min

#### 4.5.2. Caracterização físico-química do extrato seco

##### 4.5.2.1. Determinação da umidade residual

Foi realizada em determinador de umidade de infravermelho de acordo com a metodologia já descrita no item 4.3.2.

##### 4.5.2.2. Determinação do rendimento do processo de secagem

O rendimento do processo foi calculado após a finalização da secagem da dispersão do extrato com adjuvante. O produto foi pesado e teve sua massa calculada percentualmente em relação ao teor de sólidos totais da dispersão com a equação a seguir:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{M1 (g)}}{\text{M2 (g)}} \times 100$$

Onde: M1 = massa de extrato seco obtida

M2 = massa teórica de extrato seco (resíduo do extrato com a massa do excipiente)

##### 4.5.2.3. Determinação da densidade, do fator de Hausner e do índice de compressibilidade do pó

Em uma proveta de 5 mL, previamente pesada, adicionou-se uma amostra de 1 g de pó, de modo que a relação entre o volume e a massa de pó adicionada à proveta constituía a densidade aparente. Em seguida, a proveta foi acoplada a um sistema de agitação de peneiras e submetida à vibração intermediária (nível 4) por 1 min e em agitação máxima até

que não houvesse variações no volume. A densidade de compactação foi calculada através da relação entre o volume ocupado pelo pó depois da compactação e a massa de pó adicionada à proveta:

$$\text{Densidade aparente (g/mL)} = \frac{M \text{ (g)}}{V \text{ (mL)}}$$

Onde: M = massa de pó

V = volume ocupado pelo pó antes da agitação

$$\text{Densidade de compactação (g/mL)} = \frac{M \text{ (g)}}{V \text{ (mL)}}$$

Onde: M = massa de pó

V = volume ocupado pelo pó após da agitação

O fator de Hausner (FH) foi obtido através do quociente entre as densidades de compactação e aparente do material avaliado, pela equação a seguir:

$$FH = \frac{D1 \text{ (g/mL)}}{D2 \text{ (g/mL)}} \quad \text{Onde: } D1 = \text{densidade de compactação}$$

D2 = densidade aparente



O índice de compressibilidade (IC) foi calculado a partir da densidade aparente e de compactação de acordo com a fórmula:

$$\text{IC (\%)} = \frac{\text{D2 (g/mL)} - \text{D1 (g/mL)}}{\text{D2 (g/mL)}} \times 100$$

Onde: D1 = densidade de compactação  
D2 = densidade aparente

#### 4.5.2.4. Determinação do teor de marcadores no extrato seco obtido por *spray drying*

As análises foram realizadas conforme metodologia descrita no item 4.4.2.3.

### 4.6. Avaliação pré-clínica do extrato padronizado de *Justicia pectoralis*

- **Aspectos Éticos:**

O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará sob o protocolo 068/07, segundo os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

- **Animais:**

Foram utilizados camundongos machos (variedade Swiss) ou ratos fêmeas (variedade Wistar), adultos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e do Biotério Setorial do Departamento de Farmácia ou de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em períodos de claro/escuro de 12 h para ambientação e aclimação. Aos animais foram fornecidas água e ração *ad libitum*.

- **Sangue Humano:**

As amostras de sangue foram colhidas pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (Hemoce) e, após processo de fracionamento, foi fornecido o *buffy coat*, que consistia de uma fração rica em leucócitos, para realização dos testes *in vitro*.

#### 4.6.1. Citotoxicidade

Vários ensaios *in vitro* podem ser empregados para avaliar a citotoxicidade das substâncias químicas, tendo como vantagem a pequena quantidade do produto para ser usada nas avaliações. Os parâmetros determinados consistem na contagem direta de células, medida da integridade da membrana celular e do material genético, bem como da atividade metabólica da célula, entre outros (BARILE; DIERICKX; KRISTEN, 1994). Dessa forma, para garantir a segurança e a efetividade de um produto com fim medicinal, este não deve apresentar efeitos tóxicos sobre as células do organismo.

##### 4.6.1.1. Isolamento e purificação de neutrófilos

As células polimorfonucleadas (PMNs) foram isoladas do *buffy coat*, proveniente do Hemoce, de acordo com metodologia descrita por Lucisano e Mantovani (1984). Os *pellets* celulares foram suspensos em tampão HBSS (pH 7,0) contendo 0,1 % de gelatina (BD). As suspensões de células continham de 80 – 90 % de neutrófilos, cuja viabilidade celular, determinada pela coloração com azul de tripan, era maior que 95 %.

##### 4.6.1.2. Determinação da atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH)

Alíquotas de 1 mL de PMNs contendo  $5 \times 10^6$  células/mL eram incubadas por 15 min a 37 °C com HBSS – gelatina (controle negativo), Triton X-100 (controle positivo) ou extrato seco padronizado de *J. pectoralis* (ESPJP) nas concentrações de 1, 5, 10, 50, 100 e

200 µg/mL (LUCISANO; MANTOVANI, 1984). Todos os tubos foram centrifugados na velocidade de 755 g por 10 min a 4 °C. A avaliação da potencial toxicidade do ESPJP baseou-se na atividade da enzima LDH, a qual foi determinada por espectrometria (340 nm) segundo orientações do fabricante (Labtest, Brasil). Os resultados correspondem à média ± EPM de três experimentos realizados em triplicata em dias diferentes.

#### 4.6.1.3. Determinação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)

A produção de mieloperoxidase por neutrófilos humanos foi determinada por espectrometria utilizando 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) como substrato (SUZUKI; OTA; SASAGAWA, 1983). As células ( $5,0 \times 10^6$  células/mL) foram incubadas com ESPJP (3; 6; 12,5; 25; 50; 100 µg/mL) por 15 min a 37 °C, e, então, estimuladas com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma) 0,1 µg/mL. Após 15 min, a suspensão foi centrifugada (800 g por 10 min a 4 °C). PBS (100 µL), tampão fosfato pH 7,0 (50 µL) e peróxido de hidrogênio 0,012 % (v/v) foi adicionado em alíquotas (200 µL) de sobrenadante. Após 5 min a 37 °C, foi adicionado TMB 1,5 mM (20 µL) e, finalmente, acetato de sódio 1,5 M pH 3,0 (30 µL) para interromper a reação. A medida espectrofotométrica foi realizada sob 620 nm.

#### 4.6.2. Atividade antiinflamatória

##### 4.6.2.1. Avaliação da atividade antiedematogênica: edema de pata induzido por carragenina em camundongos

Camundongos Swiss, machos (25 – 30 g), foram tratados com EPJP (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) ou água destilada (controle) 1 h antes da injeção subcutânea de 50 µL da solução de carragenina (Sigma) 1 % na pata traseira direita do animal. O volume da pata foi medido antes e 1, 2, 3, 4 h após a injeção de carragenina, através de pletismógrafo (Ugo Basile, Itália). O volume do edema (µL) foi determinado pela diferença entre o volume da

pata nos referidos intervalos de tempo e o volume antes da injeção de carragenina (WINTER, RISELY; NUSS, 1962).

#### 4.6.2.2. Avaliação da atividade antiedematogênica: edema de pata induzido por dextrano em camundongos

Camundongos Swiss (25-30 g) foram tratados por gavagem com EPJP (100, 200 e 400 mg/kg) ou água destilada (controle). Sessenta minutos após o pré-tratamento, os animais receberam uma injeção subcutânea (50  $\mu$ L) na pata direita traseira da solução de dextrano 10% (Sigma). O volume da pata foi medido através de pletismômetro (Ugo Basile, Itália) em diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 3 e 4 h) após a injeção do estímulo inflamatório. O volume do edema ( $\mu$ L) foi determinado pela diferença entre o volume da pata nos referidos intervalos de tempo e o volume antes da injeção de dextrano (GAMSÉ; HOLZER; LEMBECK, 1980).

#### 4.6.2.3. Avaliação da atividade antinociceptiva: nocicepção induzida por capsaicina em camundongos

A nocicepção aguda foi induzida em camundongos Swiss (20-25g) machos através de injeção intraplantar de capsaicina (1,6  $\mu$ g em 50  $\mu$ L, Sigma) ou do seu veículo (80% PBS, 10% etanol, 10% Tween 80). O tempo gasto pelo animal lambendo a pata, utilizado como índice de nocicepção, foi registrado no período de 0 – 5 min após a injeção de capsaicina. Os animais foram pré-tratados com EPJP (100, 200 ou 400mg/kg, v.o.) ou água destilada (controle) 1 h antes da injeção de capsaicina (SANTOS; CALIXTO, 1997).

#### 4.6.3. Atividade antimicrobiana

Com base no uso etnofarmacológico de *J. pectoralis* para o tratamento de doenças do trato respiratório, a investigação do possível efeito antimicrobiano da planta torna-se fundamental, tendo em vista que juntamente com os vírus, as bactérias constituem o agente etiológico de muitas patologias respiratórias.

Nesse estudo, foram utilizadas cepas microbianas padrão oriundas da *American Type Culture Collection* (ATCC). Os microrganismos consistiam em quatro espécies bacterianas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC10536 e *Salmonella cholerasuis* ATCC10708) e uma fúngica (*Candida albicans* ATCC 10231).

Os microrganismos, mantidos em ágar estoque sob refrigeração, foram repicados para Caldo BHI (Brain-heart Infusion, Merck) e incubados a 35 °C até atingirem uma turvação visivelmente equivalente à do tubo 0,5 da escala de McFarland ( $10^8$  UFC/mL). Com o auxílio de *swab* estéreis, as suspensões bacterianas e fúngica foram semeadas na superfície do Ágar Mueller-Hinton (Merck) e Ágar Sabouraud-dextrose (Merck), respectivamente. Após 5 min, foram feitos poços de 6 mm de diâmetro no ágar, utilizando-se um perfurador estéril, sendo, aplicadas diluições seriadas do EPJP nesses poços (VARDAR-ÜNLÜ *et al.*, 2003). Os meios de cultura semeados, depois de 30 min, foram incubados a 35 °C/18 h. Os halos de inibição foram mensurados com auxílio de paquímetro e expressos em milímetros (mm), sendo resultado da média de três ensaios.

#### 4.7. Análise estatística

Os resultados da validação do método analítico e alguns relacionados com o preparo da droga vegetal, das soluções extrativas e do extrato seco foram processados utilizando o programa Excel® 2003 (USA), adotando os valores de referências presentes na legislação vigente quando pertinente. Os dados oriundos dos planejamentos fatoriais foram processados utilizando o programa estatístico R (Austrália), considerando  $\alpha = 0,05$ . A análise estatística dos ensaios biológicos foi realizada com auxílio do programa Graph Pad Prism® 4.0 (USA), sendo os resultados expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A

comparação entre as médias foi realizada utilizando-se o teste “t” de Student, comparação entre duas médias, ou análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, como teste *post hoc*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .



*Resultados  
e  
Discussões*

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE – DAD para quantificação de cumarina e umbeliferona

Dentre as principais técnicas analíticas empregadas na atualidade para quantificação de substâncias isoladas ou em misturas, a CLAE é uma das mais referidas pelos códigos oficiais (farmacopéias e compêndios) para tal finalidade devido a sua precisão, exatidão e, sobretudo, sua rapidez e sensibilidade (BITTENCOURT, 2003; QUATTROCCHIO; ANDRIZZ; LABA, 1992; WATSON, 2003).

Em geral, a maioria dos métodos cromatográficos descritos na literatura para quantificação das cumarinas é realizada por CLAE utilizando detector de ultravioleta (UV) (AHN *et al.*, 2008; CELEGHINI; VILEGAS; LANÇAS, 2002; SANTOS, 2005), visto que essas moléculas possuem núcleo cromóforo que absorve fortemente na região do UV, característica esta influenciada também pelos grupamentos ligados ao núcleo lactônico (KANG *et al.*, 2003; KOVAC; NOVAK, 2002). Nas Figuras 3A, 3B e 3C podem ser vistos os espectros da cumarina, da umbeliferona e do extrato hidroalcoólico de *J. pectoralis*, onde a faixa de melhor absorção para a cumarina e umbeliferona foi 277 e 323 nm, respectivamente. No espectro do extrato de *J. pectoralis*, observou-se a presença de outras moléculas, além da cumarina e umbeliferona, tendo em vista a complexidade química da matriz vegetal. Assim, no desenvolvimento do método analítico por CLAE para padronização de produto derivado de chambá foram utilizadas as faixas de melhor absorção das moléculas alvo. Em ensaios preliminares com soluções extrativas hidroalcoólicas de *J. pectoralis*, foi verificado que as áreas de umbeliferona e cumarina seguiam uma proporção em torno de 1:10. Com base nisso, como a umbeliferona apresentava menor teor na planta, quando comparada com a cumarina, foi utilizado o seu comprimento de onda, ou seja, 323 nm, para o desenvolvimento do método, condição em que a cumarina também possuía boa absorção.

Em uma análise por CLAE, a qualidade da separação e a sua reprodutibilidade não resultam apenas da qualidade da fase estacionária e do aparelho, mas também da fase móvel utilizada. Solventes que apresentam baixa absorção na faixa do UV, baixa viscosidade e que sejam miscíveis em água são os ideais para esse fim, destacando-se o metanol, a



acetonitrila e o tetrahydrofurano (SIGMA-ALDRICH, 2008), os quais foram empregados para compor a porção orgânica da fase móvel do presente estudo.

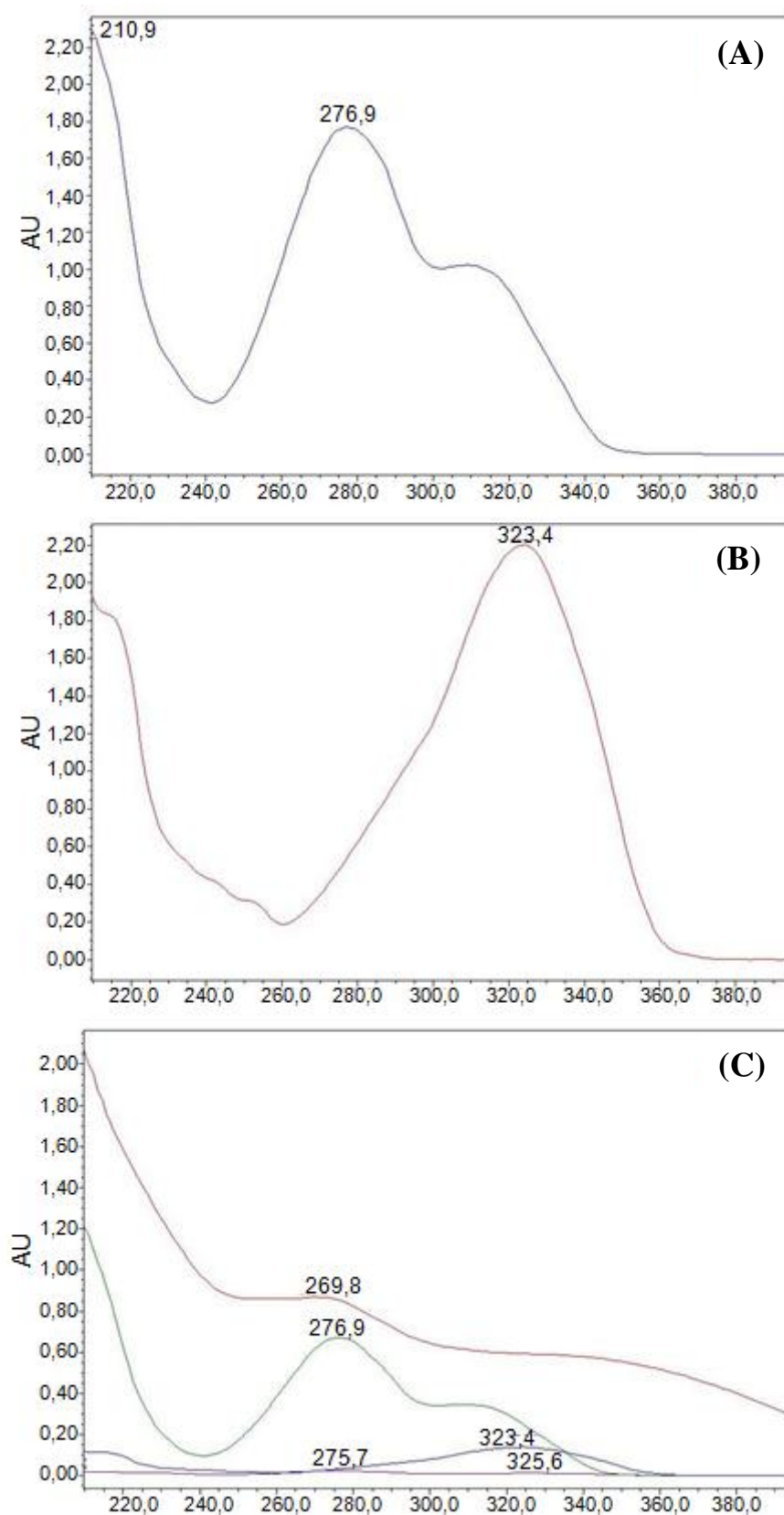
Atualmente, existe uma ampla variedade de colunas cromatográficas para CLAE, a qual é escolhida de acordo com as características da amostra a ser analisada, sobretudo sua complexidade (CIOLA, 1998). As colunas de fase reversa são as mais empregadas, pois apresentam versatilidade e boa compatibilidade com a maioria das fases hidrofílicas, sendo capazes de separar amostras tanto polares quanto apolares. Assim, foi empregada uma coluna de fase reversa octadecil (C-18) sob temperatura de 40 °C durante o estudo.

Após estabelecimento das condições de separação dos compostos de interesse, é necessário validar o método analítico. Nesse contexto, validar em análise química consiste em assegurar que o sistema funcione adequadamente dentro das condições de análise para as quais foi validado. Dependendo do intuito do método, há diferentes sistemas de validação propostos pelos órgãos nacionais e internacionais, embora eles coincidam em certos pontos (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004).

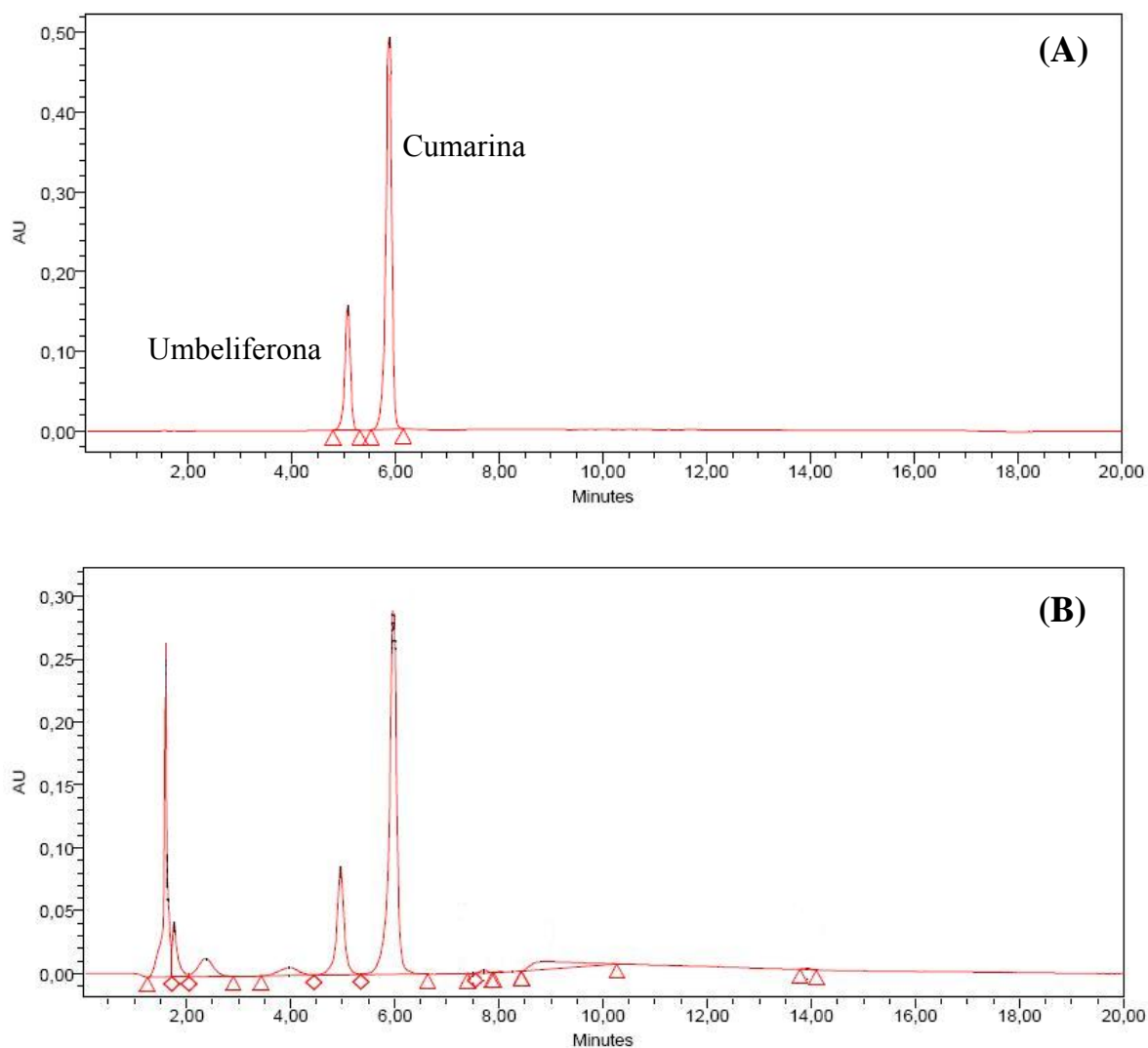
Segundo a resolução 899/03 da ANVISA, o método para quantificação dos marcadores (cumarina e umbeliferona) em produtos derivados de *J. pectoralis* enquadra-se na categoria I, cuja finalidade do teste é a determinação de princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas. Dessa forma, o método foi validado quanto à especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e ao intervalo (BRASIL, 2003e).

Na Figura 4 pode ser observada a eluição da umbeliferona e da cumarina, que apresentaram tempo de retenção ( $\pm$  DP, desvio padrão) de  $4,87 \pm 0,24$  e  $5,96 \pm 0,29$  min, respectivamente. Sob a mesma condição analítica foi observada a separação desses marcadores no EHA de chambá. Certamente, a eluição por gradiente agregou vantagens ao método, pois essa condição, em geral, confere melhor resolução dos picos, reduz o efeito do distúrbio de linha de base e ajuda a separar compostos com características químicas semelhantes (CIOLA, 1998; SCHELLINGER; CARR, 2006).

No estudo de linearidade, a equação obtida foi do tipo  $Y = aX + b$ , onde a área do pico (Y) é uma função linear da concentração da substância (X). As Tabelas 10 e 11 trazem as concentrações e as áreas absolutas de cumarina e umbeliferona, respectivamente. Os coeficientes de correlação (r) conseguidos foram de 0,9998 e 0,9998 para cumarina e umbeliferona, respectivamente, e as representações gráficas das curvas de calibração, juntamente com as equações da reta, estão nas Figuras 5A e 5B.



**Figura 3.** Espectros de absorção na região do ultravioleta da cumarina (A), da umbeliferona (B) e do extrato hidroalcoólico de *Justicia pectoralis* (C) obtidos por CLAE - DAD.



**Figura 4.** Cromatograma da solução padrão contendo cumarina e umbeliferona (A) e do extrato hidroalcoólico de *Justicia pectoralis* (B). As análises foram realizadas pelo menos em triplicata por CLAE – DAD. Condições: coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), fase móvel (A: AcN/MeOH/THF; B: tampão H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/triethylamina, pH 3), eluição gradiente, fluxo 1,8 mL/min e  $\lambda = 323$  nm.

**Tabela 10.** Áreas absolutas dos picos de cumarina obtidas por CLAE – DAD

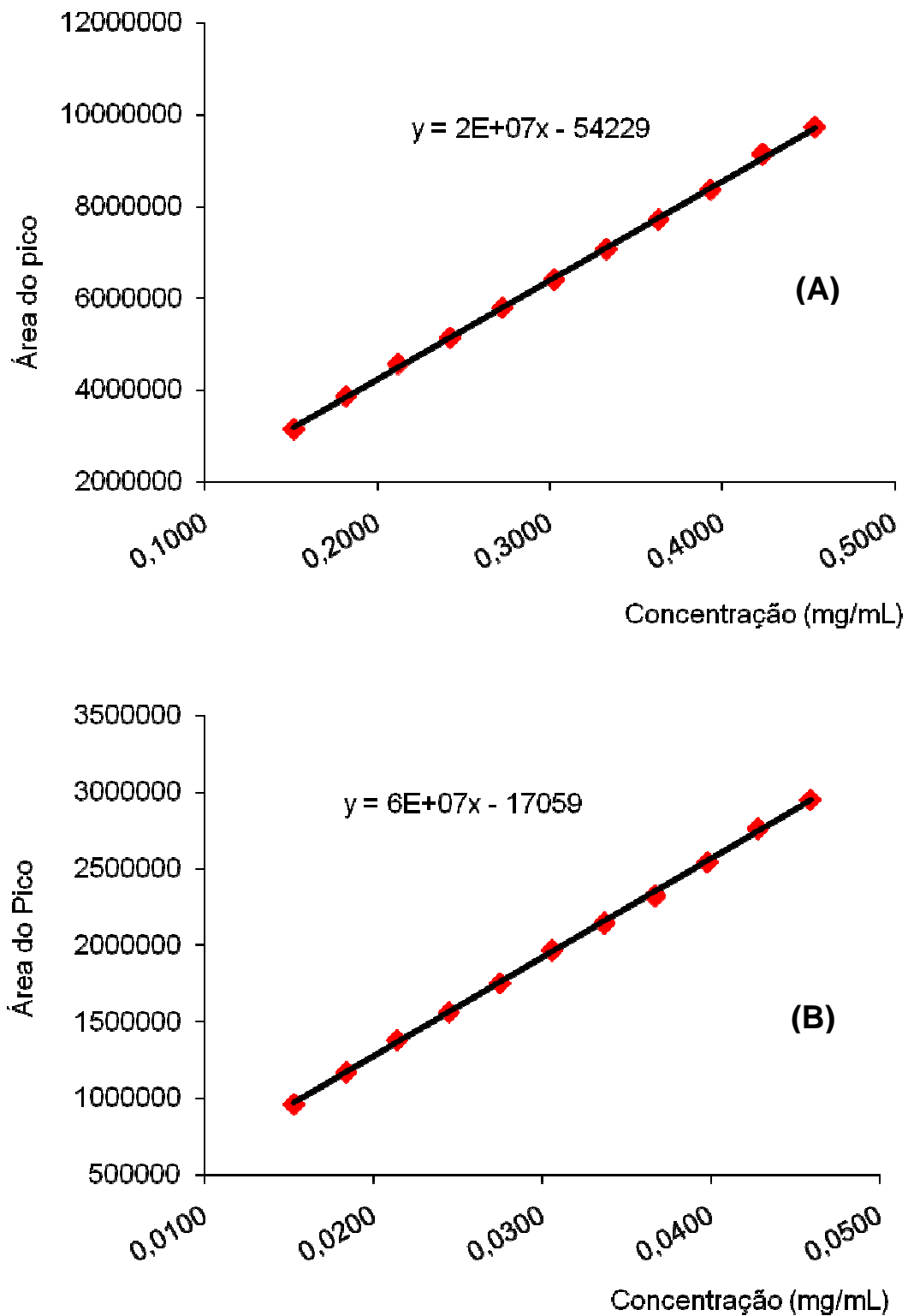
Concentração (mg/mL)	Área do Pico $\pm$ DP	DPR (%)
0,1512	3165458 $\pm$ 1833,51	0,06
0,1814	3880079 $\pm$ 7841,81	0,20
0,2117	4580023 $\pm$ 2105,13	0,05
0,2419	5153841 $\pm$ 5326,54	0,10
0,2722	5801196 $\pm$ 8586,95	0,15
0,3024	6410925 $\pm$ 14886,43	0,23
0,3326	7076154 $\pm$ 7958,88	0,11
0,3629	7718299 $\pm$ 9729,33	0,13
0,3931	8367030 $\pm$ 7055,79	0,08
0,4234	9141668 $\pm$ 24831,93	0,27
0,4536	9727844 $\pm$ 12459,11	0,13

A área do pico está expressa como a média  $\pm$  DP. As análises foram realizadas em triplicata.

**Tabela 11.** Áreas absolutas dos picos de umbeliferona obtidas por CLAE – DAD

Concentração (mg/mL)	Área média $\pm$ DP	DPR (%)
0,0153	964012 $\pm$ 3041,31	0,32
0,0184	1173475 $\pm$ 2810,87	0,24
0,0214	1383687 $\pm$ 1911,53	0,14
0,0245	1566859 $\pm$ 366,00	0,02
0,0275	1756295 $\pm$ 2043,25	0,12
0,0306	1970425 $\pm$ 3947,69	0,20
0,0337	2148061 $\pm$ 6477,78	0,30
0,0367	2327275 $\pm$ 5625,84	0,24
0,0398	2546693 $\pm$ 2347,56	0,09
0,0428	2767086 $\pm$ 4534,48	0,16
0,0459	2955730 $\pm$ 1326,98	0,04

A área do pico está expressa como a média  $\pm$  DP. As análises foram realizadas em triplicata.



**Figura 5.** Representação gráfica da curva de calibração obtida por CLAE – DAD para cumarina (A) e umbeliferona (B). Foram preparadas 11 concentrações de solução padrão de cumarina (0,1512 – 0,4536 mg/mL) e de umbeliferona (0,0153 – 0,0459 mg/mL), obtidas a partir de solução mãe de cumarina (1,008 mg/mL) e de umbeliferona (0,102 mg/mL), respectivamente.

A análise de variância dos resultados obtidos na avaliação da linearidade do método desenvolvido mostrou que existe uma relação linear entre as concentrações dos marcadores químicos (cumarina e umbeliferona) e suas respectivas áreas dos picos, ou seja, o método foi linear na faixa de concentração estudada (Tabela 12).

A precisão do sistema, obtida por várias injeções da mesma amostra, e a repetibilidade intermediária, comparando a realização do método entre analistas e períodos distintos, resultaram em DPR que variaram de 1,12 a 2,31 % e de 1,43 a 2,55 % para cumarina e umbeliferona, respectivamente (Tabelas 13 e 14). No teste F (ANOVA), para avaliar a igualdade entre as variâncias, foi verificado que não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nos resultados obtidos (Tabela 15). Portanto, o método foi preciso, inclusive com DPR dentro do limite estabelecido (5 %) pela legislação vigente (BRASIL, 2003e).

As Tabelas 16 e 17 mostram os valores de recuperação de cumarina e de umbeliferona acrescentados em uma amostra de extrato hidroalcoólico de chambá. A recuperação média para ambos os marcadores foi 98,07 e 97,34%, respectivamente, demonstrando, assim, a exatidão do método analítico (BRASIL, 2003e).

No estudo de robustez do método para cumarina, verificou-se que não houve resultado significativo do efeito principal do gradiente e do fluxo ( $p > 0,05$ ). No entanto, houve resultado significativo do pH ( $p < 0,01$ ), assim como das combinações duplas entre gradiente – fluxo e gradiente – pH ( $p < 0,01$ ) e da combinação tripla gradiente – fluxo – pH ( $p < 0,05$ ), o que sugere que a cumarina comporta-se de forma diferenciada caso ocorram alterações de pH ou variações simultâneas nas condições analíticas investigadas (Tabela 18). Na Tabela 19 pode ser observado que a umbeliferona sofreu efeito principal significativo de todas as variáveis estudadas ( $p < 0,01$ ), incluindo as combinações duplas gradiente – fluxo, gradiente – pH e fluxo – pH e a tripla gradiente – fluxo – pH, ou seja, a umbeliferona diferencia-se sob as diversas condições avaliadas, tanto quando combinadas entre si quanto isoladamente.

**Tabela 12.** Análise de variância (ANOVA) das curvas padrões de cumarina e umbeliferona

Padrão	SQ	MQ	F
Cumarina	0,301665142	0,301665	65773,89*
Umbeliferona	0,003084947	0,003085	68661,79*

(\*) p&lt;0,05

**Tabela 13.** Avaliação da precisão do sistema para cumarina e umbeliferona em extratos de *Justicia pectoralis*

Marcador	Área do pico	DPR (%)
Cumarina	29866757,67 ± 40977,54	1,37
Umbeliferona	868399,00 ± 12453,11	1,43

A área do pico está expressa como a média ± DP. As análises foram realizadas em sextuplicata.

**Tabela 14.** Avaliação da precisão intermediária da cumarina e da umbeliferona em extratos de *Justicia pectoralis*

Dia	Analista	Área do pico	
		Cumarina	Umbeliferona
1	I	3081465,67 ± 47240,87 (1,53)	897225,67 ± 14536,63 (1,62)
	II	2937207,33 ± 67938,14 (2,31)	860954,50 ± 21948,28 (2,55)
2	I	2985807,67 ± 33409,08 (1,12)	871473,33 ± 16379,70 (1,88)

A área do pico está expressa como a média ± DP (DPR, %). As análises foram realizadas em sextuplicata.

**Tabela 15.** Análise de variância\* (ANOVA) da precisão intermediária para cumarina e umbeliferona em extratos de *Justicia pectoralis*

Condição Experimental	p-valor uni-caudal	
	Cumarina	Umbeliferona
Analista I vs. Analista I / dia diferente	0,2326	0,3999
Analista I vs. Analista II / mesmo dia	0,2221	0,1934
Analista I vs. Analista II / dia diferente	0,0727	0,2681

(\*)  $\alpha = 5\%$ **Tabela 16.** Resultados da análise de exatidão para cumarina em extratos de *Justicia pectoralis*

Concentração adicionada	Recuperação (%) (DP)	Média (DP)	DPR (%)
50 %	99,82 (1,3)		
100 %	95,21 (2,27)	98,07 (2,5)	2,55
150 %	99,19 (0,51)		

Os resultados correspondem à média de três determinações. A concentração de padrão adicionada foi estabelecida em função do teor de marcador determinado no extrato.

**Tabela 17.** Resultados da análise de exatidão para umbeliferona em extratos de *Justicia pectoralis*

Concentração adicionada	Recuperação (%) (DP)	Média (DP)	DPR (%)
50 %	99,58 (2,88)		
100 %	96,98 (1,02)	97,34 (2,05)	2,14
150 %	95,46 (2,09)		

Os resultados correspondem à média de três determinações. A concentração de padrão adicionada foi estabelecida em função do teor de marcador determinado no extrato.



**Tabela 18.** Análise de variância (ANOVA) do estudo de robustez do método desenvolvido por CLAE – DAD para cumarina, marcador químico do extrato de *Justicia pectoralis*

Fontes de Variação	SQ	GI	MQ	F	p-valor
Gradiente	$2,71.10^{-5}$	1	$2,71.10^{-5}$	2,491	0,134
Fluxo	$2,34.10^{-5}$	1	$2,34.10^{-5}$	2,152	0,162
pH	0,001	1	,001	86,555	0,001 **
Gradiente x Fluxo	0,001	1	,000	11,297	0,004 **
Gradiente x pH	0,001	1	,000	14,681	0,001 **
Fluxo x pH	$9,88.10^{-5}$	1	$9,88.10^{-5}$	9,087	0,008 **
Gradiente x Fluxo x pH	$8,63.10^{-5}$	1	$8,63.10^{-5}$	7,932	0,012 *
Erro	0,001	16	$1,09.10^{-5}$	-	-
Total	0,002	23	-	-	-

(\*)  $p < 0,05$     (\*\*)  $p < 0,01$

**Tabela 19.** Análise de variância (ANOVA) do estudo de robustez do método desenvolvido por CLAE – DAD para umbeliferona, marcador químico do extrato de *Justicia pectoralis*

Fontes de Variação	SQ	gl	MQ	F	p-valor
Gradiente	$3,63.10^{-5}$	1	$3,63.10^{-5}$	29,813	0,001 *
Fluxo	0,001	1	0,001	288,074	0,001 *
pH	$2,71.10^{-5}$	1	$2,71.10^{-5}$	22,276	0,001 *
Gradiente x Fluxo	$3,11.10^{-5}$	1	$3,11.10^{-5}$	25,532	0,001 *
Gradiente x pH	$2,26.10^{-5}$	1	$2,26.10^{-5}$	18,598	0,001 *
Fluxo x pH	$3,78.10^{-5}$	1	$3,78.10^{-5}$	31,038	0,001 *
Gradiente x Fluxo x pH	$2,07.10^{-5}$	1	$2,07.10^{-5}$	17,036	0,001 *
Erro	$1,95.10^{-5}$	16	$1,22.10^{-6}$	-	-
Total	0,001	23	-	-	-

(\*)  $p < 0,01$

Wilson *et al.* (2002) mostraram que alterações no pH e na concentração do tampão alteram a seletividade de colunas cromatográficas de fase reversa, enquanto o tempo do gradiente parece não possuir muito influência no processo. O processo de adsorção e de eluição das substâncias no processo de cromatografia líquida é influenciado por diversos fatores. Assim, mudanças no pH da fase móvel podem alterar a ionização das substâncias, bem como a estabilidade da ligação silanol da coluna, refletindo alterações na retenção das moléculas.

Portanto, esses dados reforçam a sensibilidade observada para o presente método analítico frente a pequenas variações, sobretudo, de pH dentre os demais parâmetros investigados (gradiente e fluxo). Além disso, deve ser considerada, ainda, a natureza da matriz em estudo, extrato de *J. pectoralis*, que possui, além de cumarina e umbeliferona, diversas moléculas com características químicas distintas que podem influenciar ou, até mesmo, sofrer alterações em função de pequenas mudanças nas condições de análise.

O método desenvolvido mostrou características de execução adequadas para a análise qualitativa e quantitativa de cumarina e umbeliferona em produtos derivados de *J. pectoralis*, o que pode ser confirmado pelo valor de DPR dos parâmetros avaliados, os quais estão dentro do estipulado ( $\leq 5\%$ ) na legislação vigente (BRASIL, 2003e). Dessa forma, o presente método, validado dentro dos parâmetros necessários para garantir a confiabilidade dos seus resultados, pode ser empregado na rotina para análise de marcadores químicos em produtos obtidos a partir do chambá, sendo necessário, contudo, um rigor quanto ao cumprimento das condições analíticas estabelecidas para esse método.

## **5.2. Obtenção e caracterização farmacognóstica da droga vegetal**

De acordo com a ANVISA, droga vegetal corresponde à planta ou a suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada (BRASIL, 2004a). Dentre as características necessárias para garantir a qualidade das matérias primas vegetais, o teor de umidade merece destaque, visto que elevado teor de água residual pode favorecer o crescimento microbiano, sobretudo de fungos, assim como a degradação de constituintes químicos da planta dotados de ação farmacológica. Nesse contexto, o teor de umidade considerado seguro e que garante a estabilidade do material é de 8 – 14 % (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000).

Na Figura 6A, foi verificado que a perda de água da parte aérea do chambá em estufa com circulação e renovação de ar foi gradual, sendo mais intensa nas primeiras 12 horas (redução de 61,35 % de umidade), enquanto nas 12 horas seguintes houve diminuição de apenas 9,62 %. Com base nos resultados obtidos, observa-se que somente a partir de 24 h de secagem obtém-se a droga vegetal com teor de água residual dentro do aceitável (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000).

Por outro lado, a droga vegetal produzida em sala de secagem com desumidificador e sob temperatura ambiente não foi capaz de reduzir satisfatoriamente a umidade da planta, uma vez que o valor médio obtido foi 16,77 % no quinto dia de secagem. Essa condição de secagem descrita tem sido empregada por alguns Programas Públicos de Fitoterapia no Ceará. Quanto às características organolépticas, as drogas vegetais produzidas em ambas condições investigadas exalavam odor característico devido à presença de cumarina. Contudo, a planta submetida ao processo de secagem a temperatura ambiente apresentou uma coloração distinta (marrom) em relação à parte aérea submetida à secagem em estufa (coloração verde) (Figura 6B1 e 6B2).

Após a colheita do material vegetal, iniciam-se processos naturais fermentativos, enzimáticos ou não, que levam a degradação dos compostos fenólicos presentes, resultando na alteração da coloração da droga em virtude dos subprodutos formados. Esse fenômeno caracteriza uma técnica amplamente utilizada para produção de chá preto (*Camellia sinensis*), onde a planta é submetida a secagem em ambiente com elevada umidade relativa. No entanto, esse procedimento pode trazer prejuízos à qualidade final do produto, como redução do teor de ativos (FARIAS, 2000; LIN *et al.*, 2003). Por outro lado, a contínua renovação do ar numa estufa com circulação garante uma secagem mais rápida e evita a oxidação desses compostos, ajudando a manter a droga vegetal estável (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Portanto, a secagem do chambá em estufa com renovação e circulação de ar, além de ser mais rápida, reduz os riscos de alteração química da droga.

O processo de obtenção de extratos vegetais sofre influência direta de alguns parâmetros, como a natureza do solvente, método extrativo e o tamanho da partícula. Assim, quando uma droga vegetal, matéria-prima para produção de extratos, é indevidamente reduzida de tamanho, ocorre prejuízo no processo extrativo, devido a dificuldades de penetração do solvente extrator no tecido vegetal (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996). Por outro lado, quando a droga apresenta-se na forma de pó muito fino pode acontecer compactação do material, dificultando a passagem do solvente, como acontece na percolação,

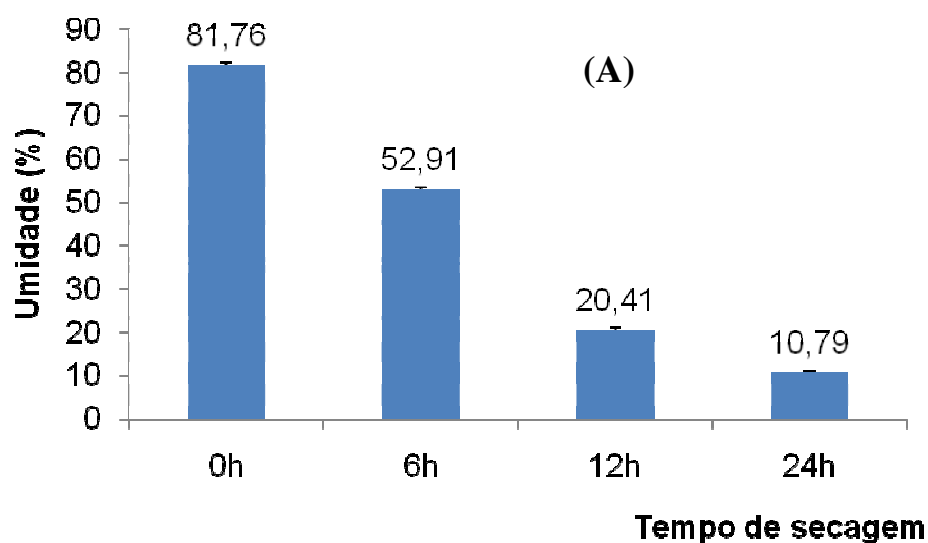
ou mesmo ficando em suspensão em extratos obtidos por maceração (LIST; SCHIMIDT, 1989; SONAGLIO; ORTEGA; PETROVICK, 2000).

Na análise granulométrica do chambá (Figura 7), verificou-se que cerca de 80 % do material ficou retido na malha de 710  $\mu\text{m}$ , sendo classificado, portanto, como pó moderadamente grosso de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV (2000). Nesse contexto, o pó moderadamente grosso do chambá traz vantagens, considerando que o uso de pós dessa natureza é recomendado para a maioria das drogas vegetais com perspectiva para o emprego na produção de medicamentos fitoterápicos (SHARAPIN, 2000).

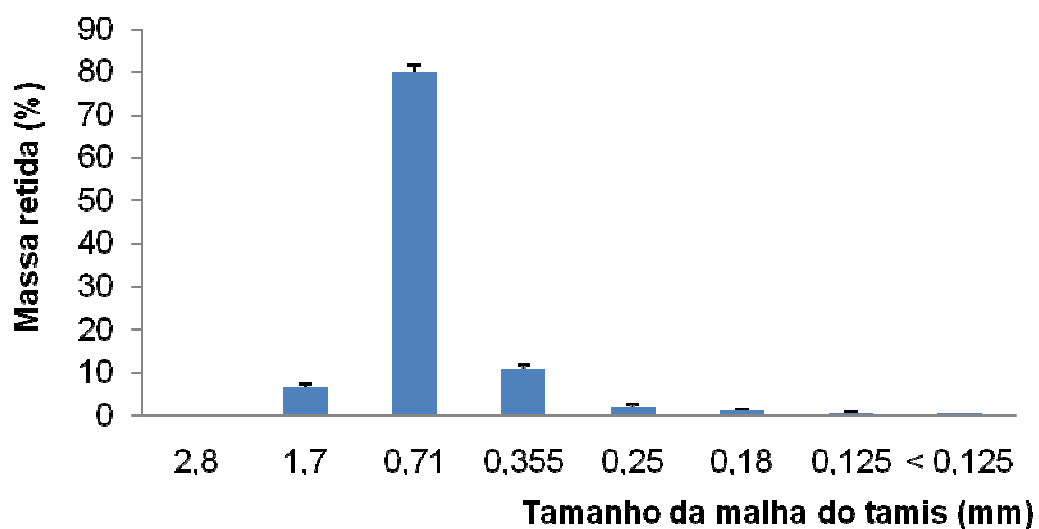
A caracterização farmacognóstica da droga vegetal de *J. pectoralis*, com determinação de parâmetros como cinzas e substâncias extraíveis, pode ser observada na Tabela 20, enquanto a Figura 8 e a Tabela 21 mostram o perfil cromatográfico (CLAE – DAD) e o teor de marcadores (cumarina e umbeliferona), respectivamente, de extratos produzidos a partir da droga vegetal preparada em estufa com circulação e renovação de ar e a temperatura ambiente.

A determinação de cinzas totais destina-se estabelecer a quantidade de substância residual não volátil ao ser eliminada a matéria orgânica após o processo de incineração. Incluem-se nesse teor as cinzas fisiológicas, que derivam dos tecidos da planta, e as não fisiológicas. (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2000; WHO, 1998). Elevado teor de cinzas para farmacógenos aéreos (folhas, inflorescências e flores) pode indicar material externo aderido na superfície do vegetal, como areia e sílica (FARIAS, 2000; OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998). Contudo, a literatura brasileira carece de valores de referência para o teor de cinzas de *Justicia pectoralis*, dessa forma, o resultado obtido no presente estudo serve como indicativo da possível composição não orgânica da espécie.

O conhecimento do teor de substâncias extraíveis em certo solvente é útil para adequação da relação droga:solvente de acordo com o teor final do extrato desejado (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Para *J. pectoralis*, observou-se que o teor de extrativos em água foi quase o dobro do teor de extrativos em etanol. Esse resultado pode estar relacionado com o tipo de solvente utilizado (etanol e água) juntamente com a técnica empregada (extração por soxhlet durante 5 h e por maceração durante 24 h, respectivamente), acarretando a extração de substâncias apolares e polares, sendo estas de maiores pesos moleculares e extraíveis em água.



**Figura 6.** Teor de umidade de *Justicia pectoralis* secada em estufa com circulação e renovação de ar a  $35 \pm 5$  °C (A) e aspecto macroscópico (B) da droga vegetal obtida. Após a secagem em estufa, três alíquotas do material tiveram determinado o teor de água. Os resultados representam a média  $\pm$  DP. A secagem a temperatura ambiente (B1) resultou numa droga de cor distinta em relação àquela produzida em estufa (B2).



**Figura 7.** Distribuição granulométrica da droga vegetal de *Justicia pectoralis*. A granulometria foi determinada a partir de três alíquotas (100 g cada) da parte aérea secada em estufa. Os valores representam a média  $\pm$  DP.

**Tabela 20.** Caracteres farmacognósticos de *Justicia pectoralis*

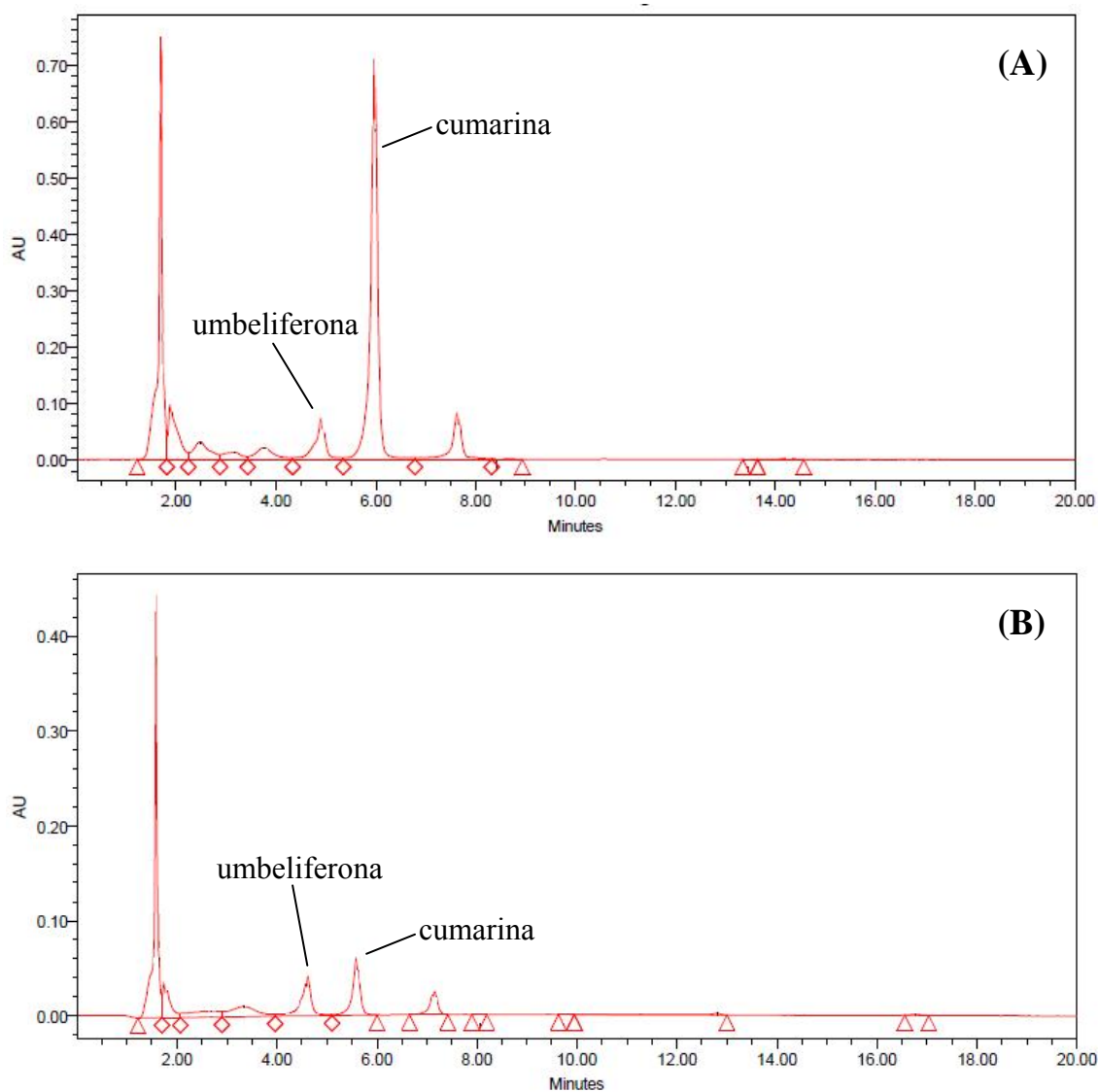
Parâmetro	Média ± DP (%)	DPR (%)
Cinzas totais	12,36 ± 0,17	1,36
Extrativos em água	28,63 ± 1,42	4,97
Extrativos em etanol	12,84 ± 0,63	4,94

As análises foram realizadas em triplicata.

**Tabela 21.** Análise quantitativa (CLAE – DAD) da cumarina e da umbeliferona na droga vegetal de *Justicia pectoralis* preparada em estufa com circulação e renovação de ar ou a temperatura ambiente.

Método de Secagem	Marcador (mg/g de droga)	
	Cumarina	Umbeliferona
Estufa com circulação de ar	16,19 ± 0,40 (2,49)	0,81 ± 0,04 (4,49)
Temperatura ambiente	2,39 * ± 0,07 (3,01)	0,78 ± 0,04 (5,59)

As análises foram realizadas em triplicata e os valores representam a média ± DP (DPR, %). (\*)  $p < 0,05$ , teste T de Student.



**Figura 8.** Cromatograma da solução extrativa produzida a partir de *Justicia pectoralis* obtida em estufa com circulação e renovação de ar (A) e a temperatura ambiente (B). As análises foram realizadas por CLAE – DAD. Condições: coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), fase móvel (A: AcN/MeOH/THF; B: tampão  $H_2PO_4$ /triethylamina, pH 3), eluição gradiente, fluxo 1,8 mL/min e  $\lambda = 323$  nm.



O extrato produzido com a droga vegetal obtida em estufa com renovação de ar apresentou maior teor de cumarina (16,19 mg/mL) quando comparada com o extrato da droga produzida a temperatura ambiente ( 2,39 mg/mL) (Teste t de Student,  $p < 0,05$ ). Por outro lado, esse fenômeno não foi verificado com relação à umbeliferona, visto que não houve diferença significativa quanto a sua concentração em ambas as soluções extrativas.

No presente trabalho, enquanto o teor de cinzas totais encontrado foi menor, os valores de extrativos (água e etanol) apresentaram-se próximos aos valores determinados por Govín *et al.* (2003) na parte aérea de *J. pectoralis* cultivada em Cuba, embora o teor de extrativos tenha sido realizado num teor alcoólico inferior (70 %) ao do presente estudo. Esse fato pode ser decorrente das alterações do conteúdo metabólico da planta de acordo com variações das condições edáficas, climáticas, nutricionais e patológicas, assim como a permanência sob condições de estresse (BARROS, 1992; BEZERRA *et al.*, 2006; MATOS, 2000).

À semelhança do presente estudo, Rocha *et al.* (2008) mostraram que a tintura de *Mikania glomerata* formulada a partir da droga vegetal produzida em estufa apresentou um teor de cumarina superior em relação àquela produzida a temperatura ambiente. Além disso, Bilia *et al.* (2007) avaliando a estabilidade química de alguns compostos na tintura de *Hieracium pilosella* (Asteraceae) mostraram que a umbeliferona, ao lado dos flavonóides, foram os que se apresentaram mais estáveis na formulação avaliada durante 9 meses. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a preparação da droga vegetal em estufa com circulação e renovação de ar (35 °C) durante 24 h traz vantagens em relação ao método a temperatura ambiente, uma vez que houve maior estabilidade química da droga frente ao teor de cumarina.

Antes dos estudos de desenvolvimento e otimização de processos para obtenção de produtos derivados de plantas medicinais, é necessário garantir inicialmente a identidade botânica da matéria prima. Nesse contexto, o controle de qualidade da droga vegetal apresenta grande importância, visto que influencia diretamente nas propriedades finais do produto. Dessa forma, os estudos anteriores de *J. pectoralis*, que avaliaram os seus aspectos macro e microscópicos (OLIVEIRA; ANDRADE, 2000; TAVARES; VIANA, 1995), associados aos parâmetros determinados no presente estudo, embora estes tenham sido obtidos a partir de uma pequena amostra em um determinado período do ano (março de 2007), compõem informações importantes para assegurar a qualidade de produtos intermediários produzidos a partir da espécie, como o extrato, com perspectiva do seu emprego na elaboração de formas farmacêuticas.

### 5.3. Desenvolvimento de método de produção da solução extrativa padronizada de *Justicia pectoralis*.

Dentre as matérias-primas utilizadas na produção de medicamentos, os extratos vegetais constituem uma das fontes mais ricas, seja para obtenção de fármacos ou pró-fármacos, bem como de medicamentos fitoterápicos constituídos de fitocomplexos. As soluções extrativas vegetais têm sido alvo de estudos visando sua aplicação na terapêutica, devido ao sinergismo dos diversos componentes da matriz, ao invés dos compostos farmacologicamente ativos isolados, como no caso do *Hypericum perforatum*. Estudos têm mostrado que o efeito antidepressivo da planta resulta do sinergismo de vários compostos bioativos, como flavonóides, hipericina e hiperforina, onde evidências sugerem que esta última é responsável por maior parte da resposta farmacológica (DI CARLO *et al.*, 2001).

Além disso, várias razões incentivam o emprego de fitocomplexos na elaboração de formulações farmacêuticas, como aumento da biodisponibilidade das moléculas ativas, instabilidade química destas quando isoladas, bem como o desconhecimento de todos os constituintes com atividade farmacológica do extrato (ERNST, 2000). Nesse contexto, a elaboração de produtos derivados de *J. pectoralis* a partir da sua matriz fitoquímica torna-se atrativa, uma vez que a espécie possui vários compostos, como cumarina e umbeliferona, com atividade farmacológica já descrita (antiinflamatória e broncodilatadora). Assim, a droga vegetal de chambá, preparada sob as condições determinadas no item anterior, foi submetida à extração empregando como método extrativo percolação com maceração prévia.

Para investigar a influência de algumas variáveis no processo extrativo foi realizado um planejamento fatorial, que facilita a execução dos experimentos, tornando-os mais organizados e reduzindo o número de ensaios (PETROVICK, 2006). Além disso, é possível determinar os parâmetros que exercem influência no processo, tanto individualmente quanto em interações entre si, sendo, dessa forma, uma ferramenta importante para aperfeiçoar processos baseando-se na melhor resposta obtida (GOUVEIA *et al.*, 2002; LINDEN *et al.*, 2000).

No presente estudo foi investigada a influência de algumas variáveis sobre a produção do extrato de chambá, como o tempo de maceração, a concentração de etanol em água e a relação droga:solvente, que foram combinadas em um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, no qual a resposta consistiu no teor dos marcadores químicos da planta (cumarina e umbeliferona) na solução extrativa.

Nessa avaliação, foi considerado como ponto superior a proporção droga:solvente 1:15, mas isso poderia resultar em um grande volume de extrato, que precisaria ser concentrado e, conseqüentemente, poderia reduzir o rendimento da extração. Com base nisso, fez-se a percolação de uma porção da planta (50 g) e foram recolhidas separadamente frações de mesmo volume do extrato (100 mL) para determinar o volume a partir do qual a quantidade de marcadores extraídos não somaria significativamente ao teor final de marcadores no extrato. As Figuras 9A e 9B mostram o teor de cumarina e de umbeliferona nas porções de extrato obtidos.

Observou-se que a partir da fração 10 o teor de cumarina e de umbeliferona não diferia significativamente nas frações seguintes ( $p < 0,05$ , ANOVA, Tukey), sugerindo que a partir daí não seria interessante continuar a extração, visto que a quantidade de marcador incorporado ao extrato final (resultante do somatório de todas as frações) não seria significativo. Contudo, do ponto de vista prático, o incremento de marcador no extrato a partir da fração 8 não era vantajoso, pois o volume de líquido a ser evaporado no processo de concentração do extrato resultaria numa perda de cumarina e umbeliferona superior ao teor incorporado. Dessa forma, foi estabelecido o ponto intermediário entre as frações 7 e 8 (750 mL) como o volume de extrato máximo a ser preparado a partir de 50 g de droga, o que correspondia a proporção droga:solvente 1:15.

A análise estatística das diversas condições de extração investigadas mostrou que somente a concentração de solvente extrator e a proporção droga:solvente influenciaram significativamente no processo extrativo de *J. pectoralis*, ou seja, tanto a concentração de cumarina quanto de umbeliferona sofreram variação em função desses fatores, enquanto o tempo de maceração não afetou o rendimento da extração (Tabelas 22 e 23). A influencia das referidas variáveis no teor de marcadores pode ser observada na Tabela 24, como, por exemplo, no ensaio 1 (CM:  $8,17 \pm 0,24$  mg/g planta; UMB:  $0,42 \pm 0,01$  mg/g planta) vs. 3 (CM:  $7,99 \pm 0,10$  mg/g planta; UMB:  $0,41 \pm 0,01$  mg/g planta), onde o teor de solvente extrator e proporção droga:solvente foram fixados e o tempo de maceração alterado, não havendo diferenças significativas (teste t de Student) no teor dos marcadores. Por outro lado, o aumento do teor de etanol no solvente extrator acarretou redução do teor de umbeliferona, como nas condições experimentais 2 (CM:  $16,19 \pm 0,40$  mg/g planta; UMB:  $0,81 \pm 0,04$  mg/g planta) vs. 7 (CM:  $14,07 \pm 0,53$  mg/g planta; UMB:  $0,32 \pm 0,01$  mg/g planta). Quanto à proporção droga:solvente, foi observado que houve um aumento do teor de cumarina nos extratos com proporção 1:15, enquanto que para umbeliferona esse aumento só ocorreu para extratos produzidos com solução hidroalcoólica 20 %.

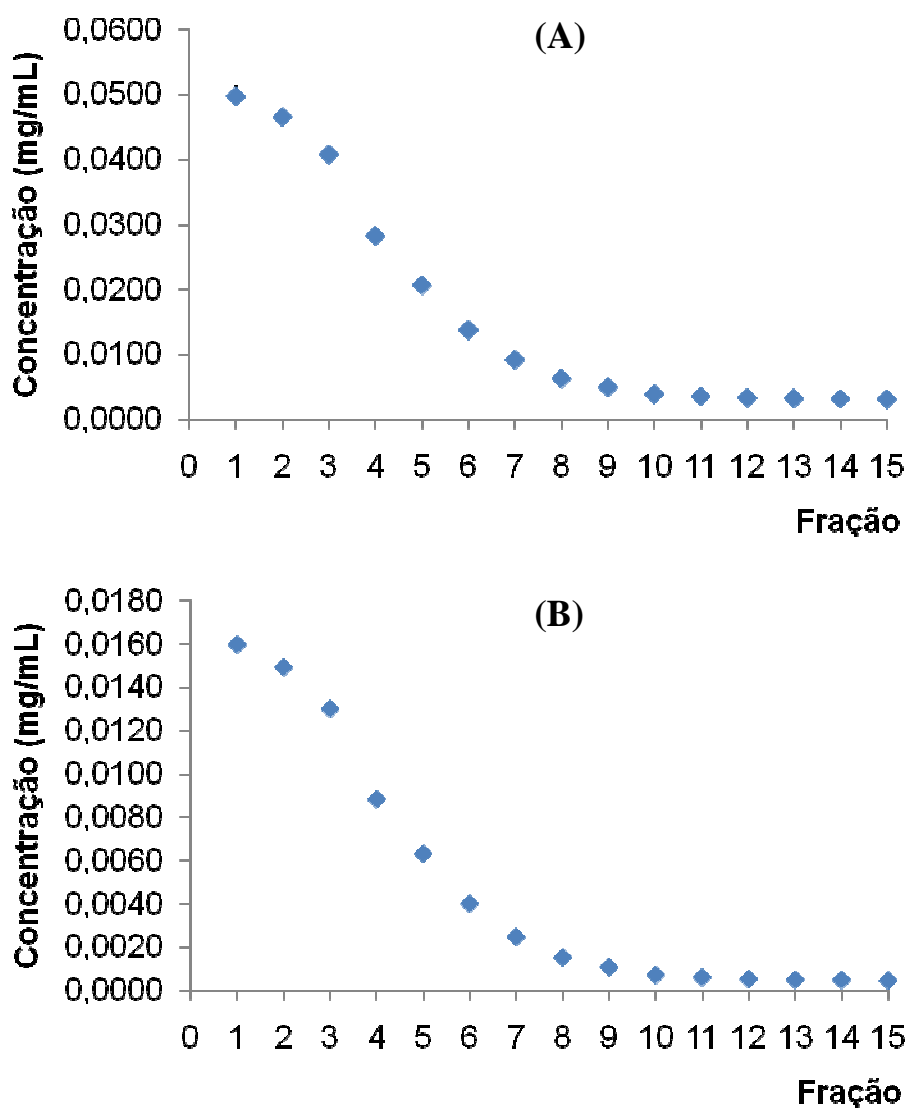
No processo de maceração, o solvente penetra na droga vegetal dissolvendo os constituintes químicos e os extraíndo por difusão. Por ser um processo descontínuo, é necessária a renovação periódica do solvente, visto que após determinado intervalo de tempo a solução torna-se saturada (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996; YRJÖNEN, 2004). Nesse contexto, o fato do tempo de maceração não ter apresentado efeito no processo extrativo pode estar relacionado com a saturação do meio, fenômeno este já observado em outros estudos (ARARUNA, 2008; CORREIA, 2006; DINIZ 2008)

Tendo em vista que o tempo não influenciou o processo extrativo de *J. pectoralis*, aplicou-se o modelo de regressão para obtenção das superfícies de resposta para cumarina (Figura 10A) e umbeliferona (Figura 11A) sem considerá-lo. Observou-se, a partir da vista superior das superfícies, que um maior teor de etanol na solução hidroalcoólica favorece a extração de cumarina (Figura 10B). Esse elevado poder extrativo do etanol para cumarina também foi observado por Biavatti *et al.* (2004) em extratos de *Mikania glomerata*, visto que aqueles produzidos com etanol em elevadas proporções apresentavam incremento na concentração de cumarina. Por outro lado, foi verificado que extratos com menor teor alcoólico apresentaram maior teor de umbeliferona (Figura 11B).

Um ponto crucial do processo extrativo de uma planta é quando este deve ser interrompido. Uma extração é considerada bem-sucedida se o extrato obtido possuir teor elevado das moléculas de interesse. Contudo, quando se emprega muito solvente para esgotar determinada quantidade de matéria-prima, a solução extrativa obtida estará muito diluída, o que não é desejável, pois será necessária a eliminação desse solvente excedente, e este passo pode acarretar perdas significativas de princípios ativos, sejam pela sensibilidade os marcadores a temperatura ou pelas reações de degradação durante o processo de concentração, além de incremento nos custos de produção.

Além do teor de ativos, o conhecimento das características físico-químicas de um extrato é fundamental para garantir sua qualidade e para que este possa ser empregado em processos tecnológicos de desenvolvimento de produtos fitoterápicos. Dentre os parâmetros comumente avaliados, destacam-se os caracteres organolépticos, densidade, resíduo seco, pH, entre outros (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996). A Tabela 25 traz os resultados da avaliação físico-química dos extratos produzidos.

O índice de acidez dos extratos variou em torno da faixa de neutralidade, sendo que os extratos preparados com etanol absoluto tenderam a levemente ácido ( $\text{pH} < 7,0$ ), enquanto aqueles produzidos com solução hidroalcoólica 20 % levemente básico ( $\text{pH} > 7,0$ ).



**Figura 9.** Concentração de cumarina (A) e umbeliferona (B) no extrato hidroalcoólico de *Justicia pectoralis* em função do volume de solvente extrator. Os extratos foram produzidos a partir de 50 g de droga vegetal, a qual foi submetida à extração (maceração seguida de percolação) com solução EtOH:H<sub>2</sub>O (20:80), onde cada fração corresponde a 100 mL.

**Tabela 22.** Análise de variância (ANOVA) da influencia das condições do método extrativo de *Justicia pectoralis* para cumarina.

Fontes de Variação	SQ	gl	MQ	F	p-valor
Solvente	0,575	1	0,575	1306,352	0,001**
Tempo	8,92.10 <sup>-5</sup>	1	8,92.10 <sup>-5</sup>	0,203	0,658
Proporção	0,299	1	0,299	679,907	0,001**
Solvente x Tempo	0,006	1	0,006	13,816	0,002**
Solvente x Proporção	0,113	1	0,113	257,628	0,001**
Tempo x Proporção	0,003	1	0,003	7,152	0,015*
Solvente x Tempo x Proporção	0,001	1	0,001	1,965	0,178
Erro	0,008	18	<0,001	-	-
Total	1,278	26	-	-	-

(\*) p&lt;0,05    (\*\*)p&lt;0,01

**Tabela 23.** Análise de variância (ANOVA) da influencia das condições do método extrativo de *Justicia pectoralis* para umbeliferona.

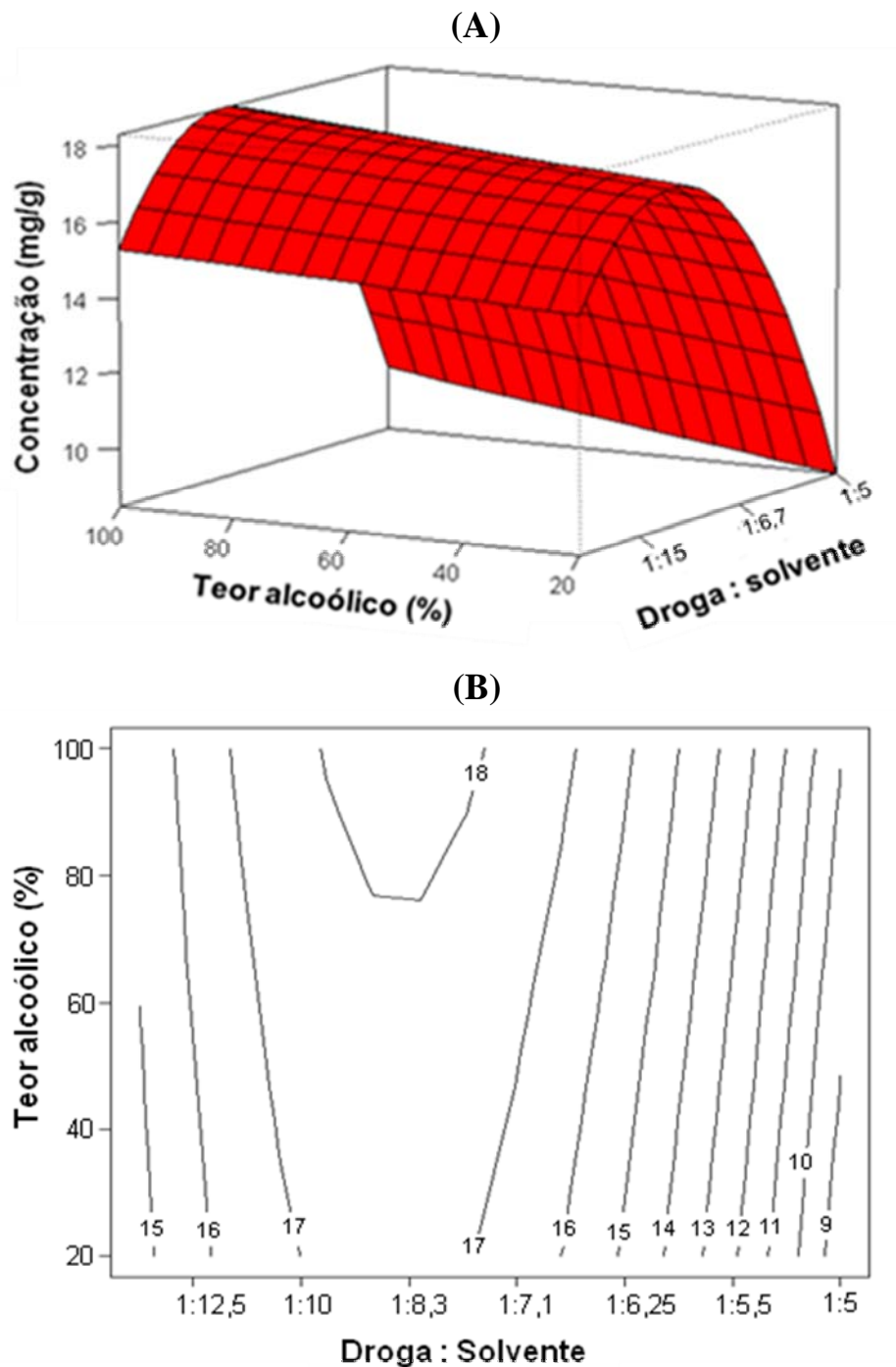
Fontes de Variação	SQ	gl	MQ	F	p-valor
Solvente	1,463	1	1,463	6,552	0,020*
Tempo	0,049	1	0,049	0,222	0,644
Proporção	199,380	1	199,380	892,661	0,001**
Solvente x Tempo	3,006	1	3,006	13,456	0,002**
Solvente x Proporção	20,007	1	20,007	89,574	0,001**
Tempo x Proporção	0,717	1	0,717	3,208	0,090*
Solvente x Tempo x Proporção	0,045	1	0,045	0,203	0,658
Erro	4,020	18	0,223	-	-
Total	304,291	26	-	-	-

(\*) p&lt;0,05    (\*\*)p&lt;0,01

**Tabela 24.** Teor de marcadores nas soluções extrativas de *Justicia pectoralis*.

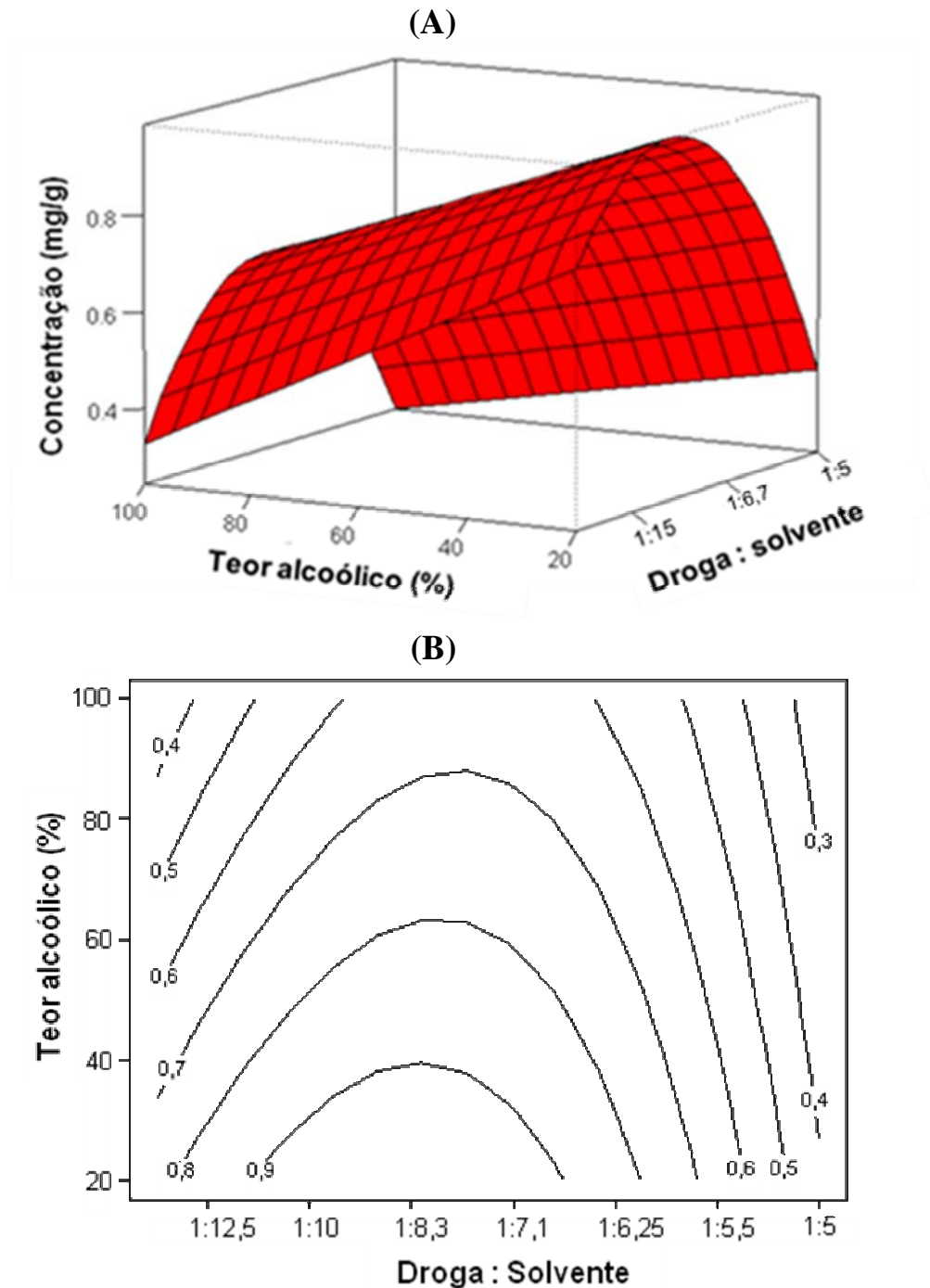
Ensaio	Condições			Teor $\pm$ DP (mg/g planta)	
	Solvente	Maceração	Droga:solvente	Umbeliferona	Cumarina
1	20 %	24 h	1 : 5	0,42 $\pm$ 0,01	8,17 $\pm$ 0,24
2	20 %	24 h	1 : 15	0,81 $\pm$ 0,04	16,19 $\pm$ 0,40
3	20 %	72 h	1 : 5	0,41 $\pm$ 0,01	7,99 $\pm$ 0,10
4	20 %	72 h	1 : 15	0,74 $\pm$ 0,03	15,14 $\pm$ 0,53
5	60 %	48 h	1 : 10	0,76 $\pm$ 0,02	17,44 $\pm$ 0,25
6	100 %	24 h	1 : 5	0,22 $\pm$ 0,02	9,87 $\pm$ 0,79
7	100 %	24 h	1 : 15	0,32 $\pm$ 0,01	14,07 $\pm$ 0,53
8	100 %	72 h	1 : 5	0,26 $\pm$ 0,02	10,93 $\pm$ 0,38
9	100 %	72 h	1 : 15	0,34 $\pm$ 0,02	14,61 $\pm$ 0,63

As análises foram realizadas em triplicata



**Figura 10.** Superfície de resposta (A) do processo extrativo de cumarina de *Justicia pectoralis* em função do percentual de etanol na solução hidroalcoólica e da proporção droga:solvente descrita pela equação:  $Y = 0,50056 + 289,001 \cdot X_1 - 1257,5416 \cdot X_1^2 + 0,1032 \cdot X_1 \cdot X_2$ , onde Y,  $X_1$  e  $X_2$  correspondem ao teor de cumarina (mg/g planta), à proporção droga:solvente (g:mL) e ao percentual de etanol em água (%), respectivamente. A curva de nível do plano (B) desse modelo mostra que a proporção droga:solvente em torno de 1:8 resulta em maior rendimento extrativo de cumarina, o qual é favorecido quando extraído em etanol 80 %.





**Figura 11.** Superfície de resposta (A) do processo extrativo de umbeliferona de *Justicia pectoralis* em função do percentual de etanol na solução hidroalcoólica e da proporção droga:solvente descrita pela equação:  $Y = -0,0923 + 20,0546 \cdot X_1 - 0,0074 \cdot X_2 - 86,5116 \cdot X_1^2 + 0,0264 \cdot X_1 \cdot X_2$ , onde Y,  $X_1$  e  $X_2$  correspondem ao teor de umbeliferona (mg/g planta), à proporção droga:solvente (g:mL) e ao percentual de etanol em água (%), respectivamente. A curva de nível do plano (B) desse modelo mostra que a proporção droga:solvente em torno de 1:8 e solvente extrator pouco alcoólico resulta em maior rendimento extrativo de umbeliferona.

**Tabela 25.** Avaliação físico-química das soluções extrativas de *Justicia pectoralis*.

Ensaio	Condições			pH ± DP	Densidade ± DP (g/mL)	Resíduo ± DP (%, m/v)
	Solvente	Maceração	Droga:solvente			
1	20 %	24 h	1 : 5	7,65 ± 0,21	0,975 ± 0,001	2,58 ± 0,05
2	20 %	24 h	1 : 15	7,46 ± 0,02	0,972 ± 0,001	1,51 ± 0,03
3	20 %	72 h	1 : 5	7,70 ± 0,14	0,978 ± 0,001	2,71 ± 0,03
4	20 %	72 h	1 : 15	7,49 ± 0,01	0,972 ± 0,001	1,49 ± 0,02
5	60 %	48 h	1 : 10	7,18 ± 0,02	0,904 ± 0,001	1,74 ± 0,06
6	100 %	24 h	1 : 5	6,11 ± 0,06	0,794 ± 0,004	0,33 ± 0,01
7	100 %	24 h	1 : 15	6,10 ± 0,09	0,791 ± 0,004	0,15 ± 0,01
8	100 %	72 h	1 : 5	6,05 ± 0,09	0,793 ± 0,001	0,44 ± 0,02
9	100 %	72 h	1 : 15	6,26 ± 0,21	0,795 ± 0,003	0,26 ± 0,01

As análises foram realizadas em triplicata.

O pH de uma solução extrativa fornece informações referentes à estabilidade e ao caráter das moléculas presentes na preparação. Com base na estrutura química da cumarina, pode-se dizer que ela é neutra por não possuir pontos de doação de prótons; já a umbeliferona, que possui uma hidroxila fenólica, um ácido fraco. No caso do extrato de *J. pectoralis*, rico nesses dois compostos, o pH, independente do teor alcoólico da solução, não seria um problema, tendo em vista que essa classe de substâncias é sensível somente a valores extremos de acidez ou alcalinidade.

O resíduo seco e a densidade são parâmetros importantes para o controle do processo de extração de plantas medicinais, servindo de base para o cálculo do rendimento extrativo e para obtenção do produto seco por *spray drying*. Em geral, os valores para resíduo e densidade para tinturas variam entre 1 – 6 % e 0,87 – 0,98 g/mL, respectivamente, podendo esses valores variar de acordo com a espécie vegetal (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996). Assim, percebe-se que as soluções extrativas de *J. pectoralis*, embora não exista valores de referência para esta espécie, apresentaram valores compatíveis com a normalidade.

Os extratos com menor teor alcoólico apresentaram maior resíduo, uma vez que a água é capaz de extrair compostos polares presentes na planta, como os glicosídeos, mostrando uma relação diretamente proporcional entre a quantidade de água e as substâncias extraídas. Embora os extratos produzidos com etanol absoluto possam ser concentrados, a pouca solubilidade das moléculas, de caráter apolar, se tornariam um ponto crítico no desenvolvimento de formulações farmacêuticas, sobretudo para uso oral. Além disso, a pouca afinidade do extrato em meio aquoso limitaria a sua utilização em etapas seguintes de processamento, como a secagem por nebulização para obtenção de pós, visto que os excipientes comumente empregados nessa técnica são praticamente insolúveis em meios apolares.

A padronização de um método extrativo é fundamental no processo de desenvolvimento de fitoterápicos, que deve apresentar um teor de princípio ativo/marcador químico necessário para garantir a eficácia e segurança do produto com mínimo de variação. Nesse sentido, os resultados obtidos mostraram que a melhor condição extrativa para a produção do extrato de *J. pectoralis* compreende em tempo de maceração de 24 h, empregando solução hidroalcoólica 20 % e proporção droga:solvente 1:15, pois se obtém bons rendimentos para as duas moléculas marcadoras, características físico-químicas da solução extrativa satisfatórias para a elaboração do extrato seco, além de ser mais econômico por utilizar menos etanol na composição do solvente extrator.

Contudo, ressalta-se a importância de um estudo mais aprofundado da influência das variáveis significativas do processo extrativo, em particular estender os níveis de avaliação baseando-se nos resultados obtidos, bem como de outras não avaliadas (temperatura, método de extração, solvente extrator, etc.), para otimização dos produtos derivados de *J. pectoralis*.

#### **5.4. Preparo e caracterização do extrato seco de *Justicia pectoralis***

Inicialmente, o extrato de chambá foi concentrado (redução de 50% do volume inicial) para melhoramento das características físico-químicas do extrato e eliminação do etanol. Nas Tabelas 26 e 27 estão descritos os resultados da avaliação físico-química antes e depois da concentração do produto. Esse procedimento, como esperado, aumentou o teor de marcadores, com rendimento médio de 79 % e 90 % para cumarina e umbeliferona, respectivamente. Ocorreu, por outro lado, um decréscimo no valor médio do pH, mas que não foi significativo e os valores mantiveram-se em torno da neutralidade. Essa característica é importante quando se pensa na elaboração de formas farmacêuticas, uma vez que alterações elevadas no pH podem alterar a estabilidade do produto, acarretando a degradação de constituintes da matriz da solução extrativa.

Foi observado que o teor dos marcadores no extrato inicial foi menor quando comparado com o extrato produzido nas mesmas condições para o estudo de influência das variáveis do processo extrativo (seção anterior). Isso pode ter ocorrido devido à influência dos fatores climáticos e da variabilidade natural no rendimento de cumarina e umbeliferona na planta, uma vez que foi preciso produzir mais droga vegetal para dar continuidade ao estudo, sendo a matéria-prima coletada em julho de 2008.

A Tabela 28 apresenta o teor de CM e UMB em cinco amostras de xarope de *J. pectoralis* produzido em Programas Públicos de Fitoterapia no Ceará. Foi verificada uma elevada variação na concentração dos marcadores entre amostras de um mesmo laboratório, como as amostras A e B, ou entre laboratórios diferentes, por exemplos as amostras C e D. Alguns fatores podem ter acarretado essas diferenças, tais como a qualidade da droga vegetal e dos excipientes utilizados no preparo dos extratos, a técnica de extração da planta e de preparo do xarope, a forma de armazenamento, entre outros.

Num estudo comparativo entre os teores de marcadores dos xaropes mais concentrados de *J. pectoralis* avaliados (amostra C para CM e amostra D para UMB) e o da solução extrativa concentrada produzida no presente estudo, foi observado que o emprego desta como matéria-prima para elaboração do xarope certamente resultaria num produto mais concentrado em até 50% para CM e 75% para UMB. Dessa forma, as condições estabelecidas neste trabalho para obtenção do extrato concentrado de chambá confere vantagens na produção do xarope quanto à concentração de marcadores, contribuindo, conseqüentemente, para um melhor ajuste da dose a ser administrada ao paciente.

Dentre os adjuvantes tecnológicos investigados para elaboração do extrato seco de *J. pectoralis* (amido, celulose microcristalina e dióxido de silício coloidal), todos dispersaram-se adequadamente na solução extrativa de chambá (Figura 12). O amido ficou com aspecto gelatinoso e fortemente aderido à placa, pois houve o intumescimento seguido do rompimento da estrutura cristalina do grão de amido em virtude do aquecimento, fenômeno este denominado gelificação (POSER, 2000). Já a celulose microcristalina resultou num pó facilmente removível da placa, contudo, observou-se heterogeneidade do material, visto que este excipiente sedimentou depois de cessada a agitação da suspensão. O dióxido de silício coloidal apresentou as melhores características na triagem realizada, pois o pó resultante foi facilmente removível da placa e homogêneo, sendo, por isso, escolhido como o adjuvante de secagem para obtenção do extrato seco de *J. pectoralis*.

A adição de excipientes em extratos de plantas medicinais serve para aumentar a eficiência do processo de secagem, bem como melhorar as características farmacotécnicas do produto final. Além disso, a proporção de adjuvante a ser acrescentado na solução extrativa é fundamental para garantir que não haja a aderência desta nas paredes do aparelho, o que pode alterar a dinâmica de secagem, e também a recuperação de pó no fim do processo. (DE SOUZA, 2002).

O bom desempenho do dióxido de silício coloidal como adjuvante na produção de extratos secos derivados de plantas medicinais tem sido referido por diversos estudos (CHAVES, 2005; DE SOUZA, 1997; PEIXOTO, 2005; PETROVICK, 2006; SOUZA *et al.*, 2009; TEIXEIRA, 1996). Dentre as vantagens deste excipiente, destacam-se o aumento da eficiência do processo, a melhoria do rendimento, a redução da umidade residual e a estabilidade físico-química do pó.

**Tabela 26.** Caracterização físico-química da solução extrativa de *Justicia pectoralis* antes e depois do processo de concentração.

Parâmetro	Valor médio $\pm$ DP	
	Antes	Depois
pH	7,18 $\pm$ 0,17	6,83 $\pm$ 0,11
Densidade (g/mL)	0,978 $\pm$ 0,001	1,004 $\pm$ 0,001
Resíduo seco (%. m/v)	1,82 $\pm$ 0,02	3,67 $\pm$ 0,04

As análises foram realizadas em triplicata

**Tabela 27.** Avaliação do teor de marcadores da solução extrativa de *Justicia pectoralis* após processo de concentração.

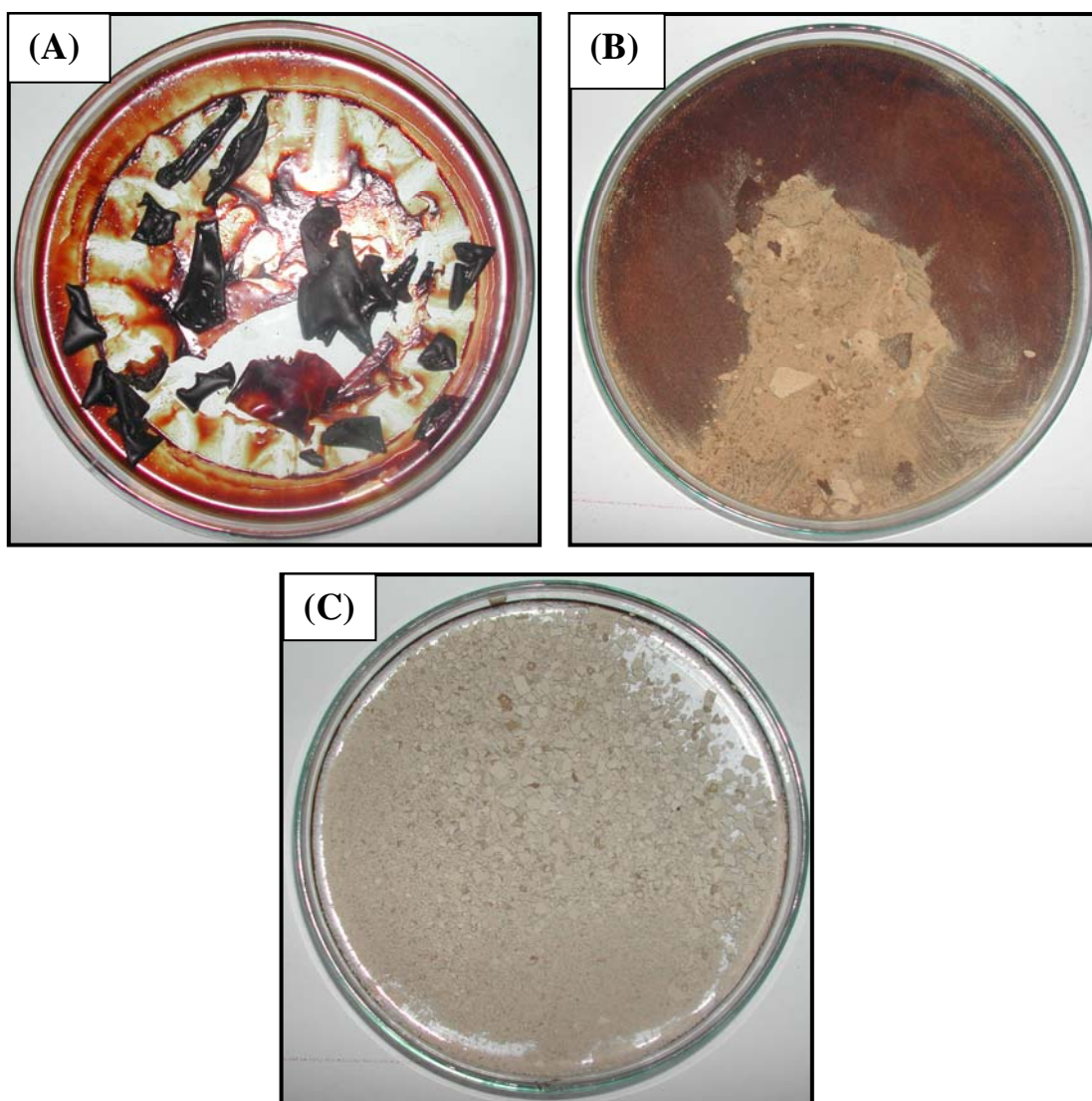
Marcador	Teor (mg/mL) $\pm$ DP			Rendimento médio (%) $\pm$ DP	DPR (%)
	Inicial	Teórico *	Real		
Cumarina	0,69 $\pm$ 0,007	1,38 $\pm$ 0,01	1,09 $\pm$ 0,006	78,82 $\pm$ 1,08	1,37
Umbeliferona	0,13 $\pm$ 0,006	0,26 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,005	92,30 $\pm$ 1,96	2,17

As análises foram realizadas em triplicata. (\*) Concentração do extrato após redução do volume em 50% sem haver perdas de marcadores durante o processo.

**Tabela 28.** Concentração de marcadores em amostras de xarope de *J. pectoralis* produzidos em Programas Públicos de Fitoterapia no estado do Ceará.

Amostra	Concentração (mg/mL)	
	Umbeliferona	Cumarina
A	0,0082 $\pm$ 0,012 (1,47)	0,2023 $\pm$ 0,001 (2,5)
B	0,0139 $\pm$ 0,029 (3,88)	0,439 $\pm$ 0,003 (3,87)
C	0,0143 $\pm$ 0,03 (2,07)	0,4844 $\pm$ 0,001 (3,26)
D	0,054 $\pm$ 0,025 (4,64)	0,0586 $\pm$ 0,013 (2,32)
E	0,0045 $\pm$ 0,021 (2,8)	0,0563 $\pm$ 0,041 (3,5)

As análises foram realizadas em triplicata e os valores representam a média  $\pm$  DP (DPR, %).



**Figura 12.** Aspecto macroscópico do extrato seco de *Justicia pectoralis* acrescido de adjuvantes de secagem. Ao extrato, após concentração, foi adicionado amido (A), celulose microcristalina (B) ou dióxido de silício coloidal (C) de modo que o resíduo sólido final da suspensão (resíduo do extrato somado ao excipiente) fosse 10 %, sendo então submetido à secagem em estufa durante 1 h a 60 °C.

Foram preparadas suspensões contendo 25 %, 50 % e 100 % de dióxido de silício coloidal em relação ao resíduo sólido do extrato de chambá. Observou-se que as menores quantidades de excipiente (25 e 50 %) resultaram em um pó úmido, que ficou retido nas paredes do aparelho e tendia a formar aglomerados. Já o pó obtido com a maior proporção apresentava-se seco e fluido, sendo facilmente recolhido no tubo coletor do *spray dryer* (Figura 13).

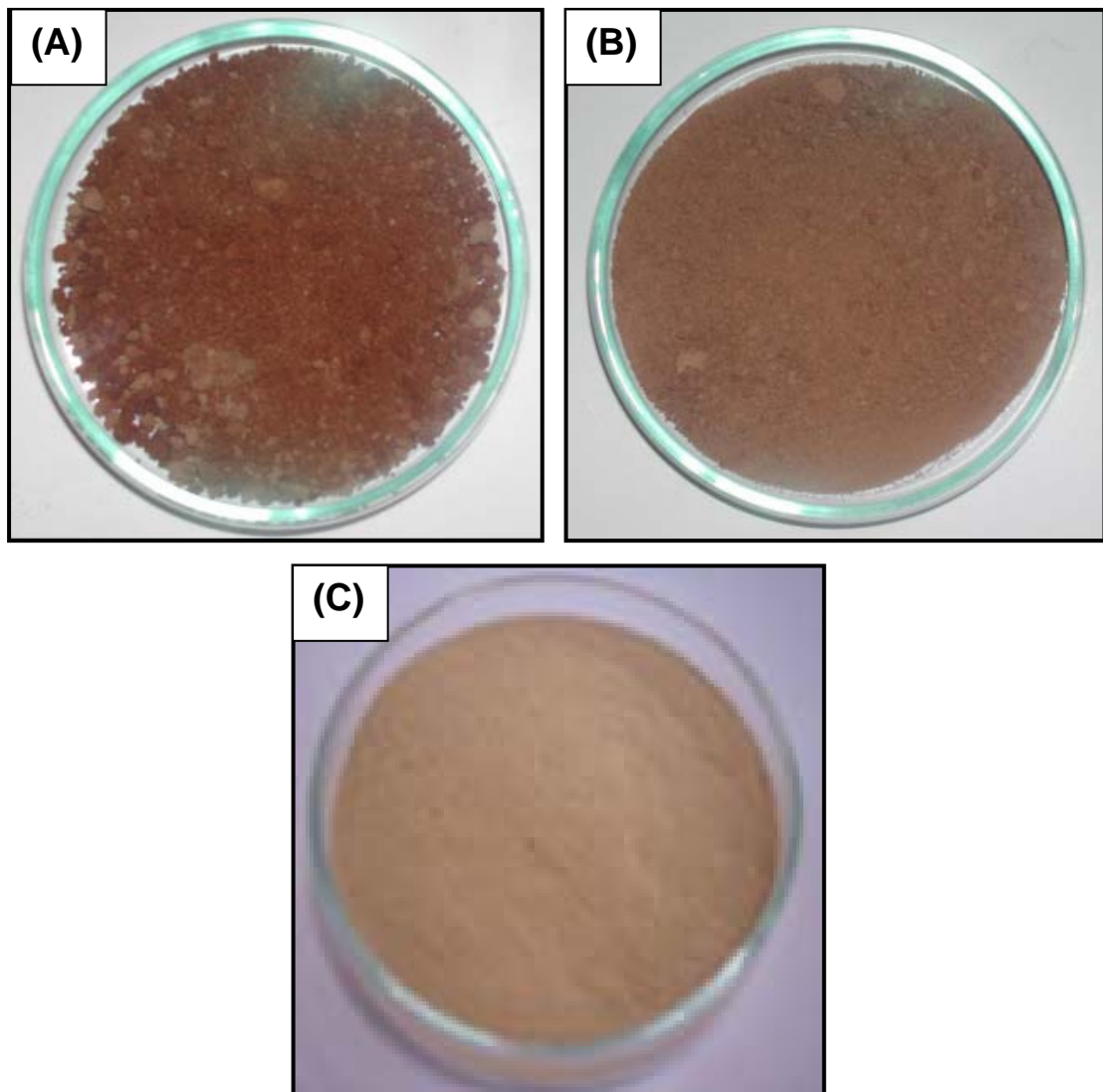
Com base nas secagens prévias por *spray drying* dos extratos de *J. pectoralis*, foi estabelecida a proporção resíduo:adjuvante de 1:1 como a mínima necessária para formação de pó. A partir de então, as condições do aparelho de secagem (temperatura de entrada e saída, fluxo de alimentação e de ar) foram trabalhadas para se obter bons rendimentos de pó e de marcadores (ver item 4.5.1.), sob as quais foram produzidos 3 lotes de extrato seco.

Pós com fins medicinais devem apresentar boa fluidez para serem empregados na produção de formas sólidas. Com base na densidade bruta e compactada do pó foram estabelecidos o seu IC, ou índice de Carr, (CARR, 1965) e o seu FH (HAUSNER, 1967), os quais estão relacionados com o comportamento do pó frente ao fluxo e à compressão. Materiais que apresentam IC de 5 – 15 % e FH variando de 1 a 1,25 são considerados de excelente fluidez e, conseqüentemente, de empacotamento estável (AULTON, 2005).

De acordo com a classificação de Carr e de Hausner, os extratos secos de *J. pectoralis* analisados apresentaram fluxo baixo, o que resultaria no preenchimento deficiente das matrizes das compressoras de comprimidos (Tabela 29). Contudo, a adição de agentes deslizantes na formulação, como sílica, estearato de magnésio e talco, ajuda a corrigir esse problema, melhorando o fluxo do material particulado durante a compressão em máquinas de alta velocidade de produção ou compressão direta, bem como a uniformização da forma da partícula e o aumento do seu tamanho (AULTON, 2005).

A umidade residual média dos extratos secos foi de 10,26 %, estando acima do valor preconizado pela Farmacopéia Brasileira (4 %) para esse tipo de material, sendo aceitáveis teores até 7 %, visto que raramente ocorrem alterações físicas nessas condições (LIST; SCHIMIDT, 1989). Segundo Couto (2000), variações na umidade final estão relacionadas com as condições ambientais (temperatura e umidade) de produção e de armazenamento do produto obtido pela técnica de secagem por nebulização.





**Figura 13.** Aspecto macroscópico do extrato seco de *Justicia pectoralis* contendo dióxido de silício coloidal. Ao extrato, após concentração, foi adicionado dióxido de silício coloidal na proporção (resíduo:adjuvante) 1:0,25 (A), 1:0,5 (B) e 1:1 (C). As suspensões foram secadas em *spray dryer* cuja temperatura de entrada/saída, fluxo de ar e fluxo de alimentação eram 95 °C/45 °C, 0,3 mL/min e 40 L/min, respectivamente.

**Tabela 29.** Caracterização farmacotécnica do extrato seco de *Justicia pectoralis* produzido por *spray drying*.

Lote	Densidade (g/mL) $\pm$ DP		FH $\pm$ DP	IC (%) $\pm$ DP
	Aparente	Compactada		
A	0,1828 $\pm$ 0,002	0,2996 $\pm$ 0,005	1,48 $\pm$ 0,015	32,37 $\pm$ 0,68
B	0,1814 $\pm$ 0,003	0,2698 $\pm$ 0,005	1,49 $\pm$ 0,013	32,74 $\pm$ 0,59
C	0,1751 $\pm$ 0,003	0,2613 $\pm$ 0,002	1,49 $\pm$ 0,014	32,96 $\pm$ 0,65
<b>DPR (%)</b>	2,18	1,82	0,44	0,92

As análises foram realizadas em triplicata

A Tabela 30 apresenta os resultados do doseamento do extrato seco de *J. pectoralis*, mostrando que o método cromatográfico desenvolvido e validado no presente estudo é aplicável para a padronização de produtos derivados da planta e não sofre interferência do excipiente utilizado (DSC) como poder ser visto nas figuras 14A e 14B. Vale destacar que o DPR das análises realizadas (em torno de 4 %) foi satisfatório, considerando que os órgãos reguladores estabelecem como aceitável um valor de até 5 %. O perfil cromatográfico do extrato seco é semelhante ao do extrato hidroalcoólico (Figura 4), com a presença de um terceiro pico, que, possivelmente, trata-se de um produto de degradação.

O rendimento do processo de secagem do extrato de *J. pectoralis* foi avaliado em função da quantidade de pó recolhida no tubo coletor do secador. Na Tabela 31 está apresentada a massa total de extrato acrescida de adjuvante submetida à secagem, a qual resultou em torno de 60 % de recuperação no fim do processo.

Ainda, mesmo tendo sido estabelecido um método para obter extrato seco a partir de soluções extrativas de *J. pectoralis*, maiores estudos são necessários para obtenção de pós com características físico-químicas melhoradas, sobretudo incremento no teor dos princípios ativos (cumarina e umbeliferona), o que poderá favorecer o ajuste de posologia no futuro e viabilizar, por conseguinte, o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas.

### **5.5. Avaliação pré-clínica do extrato padronizado de *Justicia pectoralis***

*Justicia pectoralis* trata-se de uma espécie amplamente utilizada em Programas Governamentais de Fitoterapia para o combate de problemas respiratórios, como tosse, bronquite e asma (MATOS, 2000). Estudos prévios já mostraram os efeitos analgésico, antiinflamatório e relaxante muscular tanto das moléculas (cumarina e umbeliferona) isoladas quanto do extrato hidroalcoólico não padronizado (LEAL *et al.*, 2000; LINO, 1995). No sentido de contribuir na validação etnofarmacológica da referida espécie, foi investigada a possível citotoxicidade do ESPJP em neutrófilos humano, juntamente com a avaliação dos efeitos farmacológicos do EPJP (antiinflamatório e antinociceptivo) em roedores e a atividade antimicrobiana.

**Tabela 30.** Doseamento dos marcadores por CLAE – DAD do extrato seco de *Justicia pectoralis* produzido por *spray drying*.

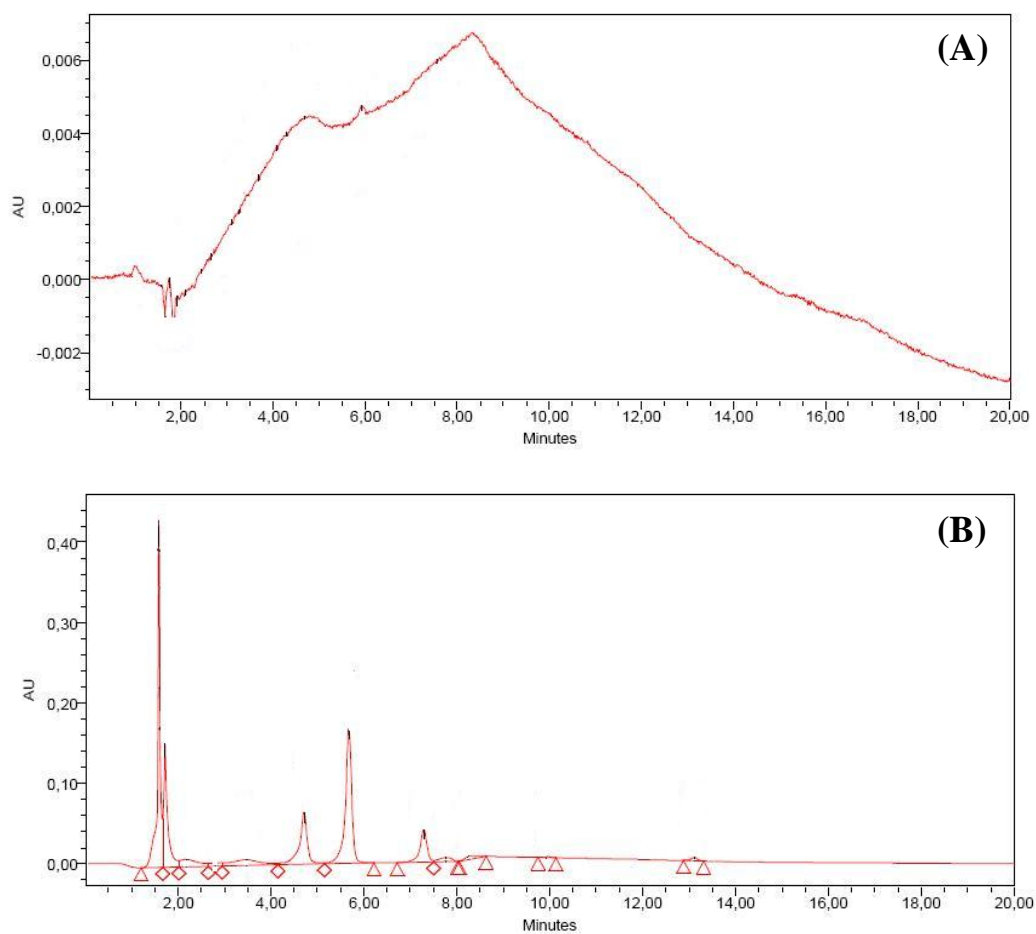
Marcador	Extrato seco	Teor (mg/g de pó) ± DP	DPR (%)
Cumarina	A	7,94 ± 0,19	3,62
	B	8,10 ± 0,19	
	C	8,49 ± 0,20	
Umbeliferona	A	3,24 ± 0,10	3,98
	B	3,25 ± 0,12	
	C	3,39 ± 0,16	

As análises foram realizadas em triplicata

**Tabela 31.** Rendimento de secagem do extrato de *Justicia pectoralis* pelo processo de *spray drying*.

Massa (g)		Rendimento (%)	Média (%) ± DP	DPR (%)
Teórica*	Real			
14,84	9,15	61,71	59,39 ± 2,19	3,69
14,84	8,51	57,36		
14,84	8,77	59,09		

(\*) 7,42g correspondem ao resíduo sólido do extrato e 7,42g ao excipiente adicionado.



**Figura 14.** Cromatograma de uma solução de dióxido de silício coloidal (A) e de extrato seco (B) de *Justicia pectoralis*. As análises foram realizadas por CLAE – DAD. Condições: coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), fase móvel (A: AcN/MeOH/THF; B: tampão  $H_2PO_4$ /trietilamina, pH 3), eluição gradiente, fluxo 1,8 mL/min e  $\lambda = 323$  nm.

Com intuito de avaliar a toxicidade dos produtos derivados do chambá, foi realizada a determinação da integridade da membrana celular por meio da determinação da enzima LDH, uma enzima citoplasmática que serve de indicativo de lesão da membrana celular e, conseqüentemente, citotoxicidade. A Figura 15 mostra que a incubação de leucócitos com ESPJP não aumentou significativamente a atividade de LDH em nenhuma das concentrações testadas em relação ao grupo controle negativo, diferentemente do grupo tratado com Triton (controle positivo), o qual consiste em um tensoativo não iônico que altera a estabilidade dos constituintes da membrana celular, levando ao rompimento desta (SHOPSIS *et al.*, 1985).

Na avaliação da possível genotoxicidade do extrato seco de chambá, Montero *et al.* (2008) observaram a ausência de efeitos mutagênicos e genotóxicos em cepas de *Salmonella* e na medula óssea de camundongos, respectivamente, devido, possivelmente, a presença de compostos fenólicos, considerados majoritários no extrato seco da planta, e seus efeitos antioxidantes. Dessa forma, a baixa citotoxicidade apresentada pelo ESPJP no presente estudo, pelo menos, quanto à indução de danos a membrana celular, corrobora as evidências da segurança de *J. pectoralis*, respaldando o seu emprego medicinal.

Ao ser exposto a um agente agressor, o organismo animal desencadeia uma série de reações, a qual compreende eventos envolvendo a produção e a liberação de mediadores químicos, o aumento da permeabilidade vascular e a migração celular, que resulta em calor, rubor, dor, edema e perda da função, sinais característicos da resposta inflamatória (RYAN; MAJNO, 1977). A inflamação pode ser aguda, cuja duração é curta, durando minutos, horas ou alguns dias, apresentando exsudato protéico e migração leucocitária, sobretudo de neutrófilos, ou crônica, que está relacionada com alterações histológicas, necrose, fibrose e vascularização da área afetada, bem como presença de outros tipos celulares, como macrófagos e mastócitos no foco inflamatório (COLLINS, 1999).

Embora a inflamação seja um processo fisiológico de defesa do organismo, uma resposta inflamatória exagerada ou persistente pode comprometer a saúde do indivíduo. Muitas doenças são decorrentes desse fenômeno, como as doenças auto-imunes (lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide e febre reumática), a aterosclerose e a asma, merecendo esta destaque por ser um dos principais usos terapêuticos de *J. pectoralis*. Trata-se de uma patologia caracterizada pela obstrução, inflamação e hiperresponsividade das vias aéreas inferiores para uma variedade de estímulos, que resulta numa limitação variável ao fluxo aéreo. Além disso, a contínua liberação de mediadores químicos no processo

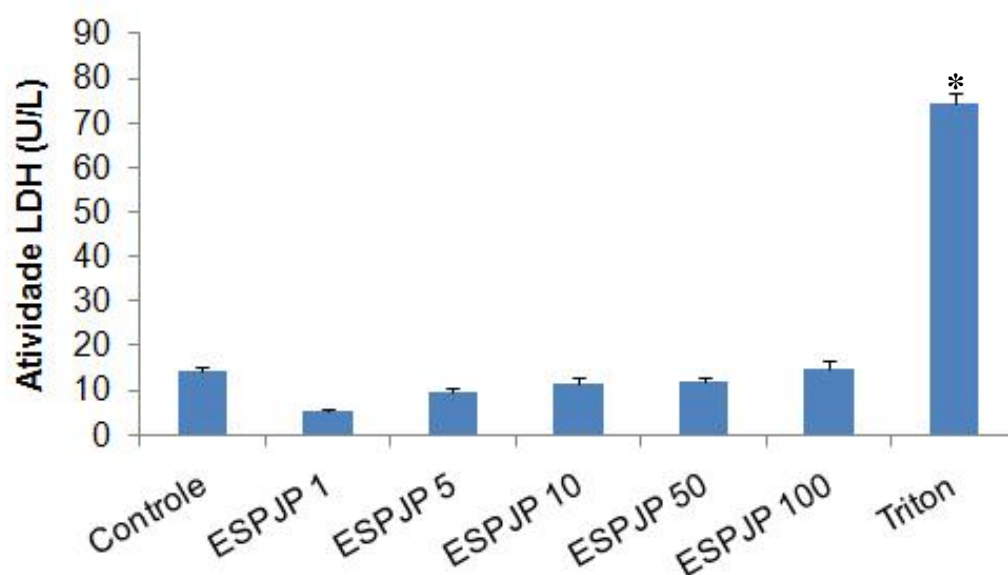
inflamatório crônico das vias aéreas acarreta alterações estruturais irreversíveis, acarretando a perda de função respiratória ao longo do tempo (MAUAD *et al.*, 2000).

Vários modelos experimentais podem ser utilizados na investigação do potencial antiinflamatório de substâncias, como o edema de pata induzido por agente flogístico, como carragenina e dextrano, que levam ao extravasamento vascular, à migração celular e à liberação de mediadores inflamatórios. No presente trabalho, foi avaliado o efeito do EPJP no modelo de edema de pata induzido por carragenina (WINTER *et al.*, 1962) e dextrano (GAMSÉ; HOLZER; LEMBECK, 1980).

O edema de pata induzido por agentes inflamatórios é um modelo útil na triagem de novos compostos com potencial antiinflamatório. A carragenina é um polissacarídeo sulfatado linear proveniente de algas marinhas e sua aplicação subcutânea promove a migração de leucócitos para o foco inflamatório, levando a produção de diferentes mediadores inflamatórios, incluindo histamina, serotonina, bradicinina, óxido nítrico e prostaglandinas (CARVALHO *et al.*, 1996; FRANÇA *et al.*, 2001; HAJARE *et al.*, 2001). No edema induzido por dextrano, um polissacarídeo de alto peso molecular derivado de glicose produzido por bactérias, a indução do edema é caracterizada pela degranulação de mastócitos, liberando, conseqüentemente, mediadores inflamatórios como histamina e serotonina (LO; ALMEIDA; BEAVAN, 1982).

Foi verificado que o tratamento prévio dos camundongos com EPJP (200 e 400 mg/Kg) reduziu significativamente o edema de pata na 3<sup>a</sup> h após a administração de carragenina ( $9,9 \pm 0,7$  e  $9,7 \pm 0,57$   $\mu$ L, respectivamente) quando comparado ao grupo controle ( $13,8 \pm 1,1$   $\mu$ L), enquanto na 4<sup>a</sup>h somente a maior dose teve atividade ( $7,3 \pm 0,6$   $\mu$ L; controle:  $11,75 \pm 1,01$   $\mu$ L), correspondendo a uma redução em torno de 38 % (Figura 16). Por outro lado, a administração do EPJP nas doses investigadas (100, 200 e 400 mg/Kg, v.o.) não interferiu no edema induzido por dextrano (Figura 17).

Lino (1995) mostrou o efeito antiedematogênico do extrato hidroalcoólico de chambá no edema induzido por carragenina e por dextrano, sugerindo que o seu efeito antiinflamatório estava relacionado tanto com a redução da migração de células para o foco inflamatório e da liberação de mediadores inflamatórios e possível interferência nos receptores para essas substâncias.



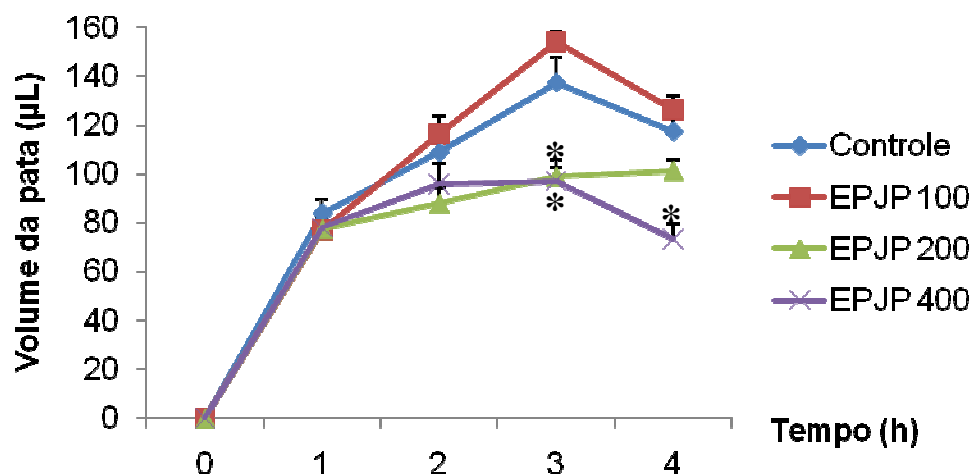
**Figura 15.** Avaliação da citotoxicidade do extrato seco padronizado de *Justicia pectoralis* (ESPJP) em neutrófilos isolados de sangue humano. O ESPJP (1 – 100  $\mu\text{g/mL}$ ) foi adicionado 15 min antes da avaliação da atividade da enzima lactado desidrogenase (LDH). Os valores representam a média  $\pm$  EPM. As análises foram realizadas em triplicata e repetidas em três dias diferentes. \*  $p < 0,05$  vs. controle (ANOVA, Tukey, *post hoc*).



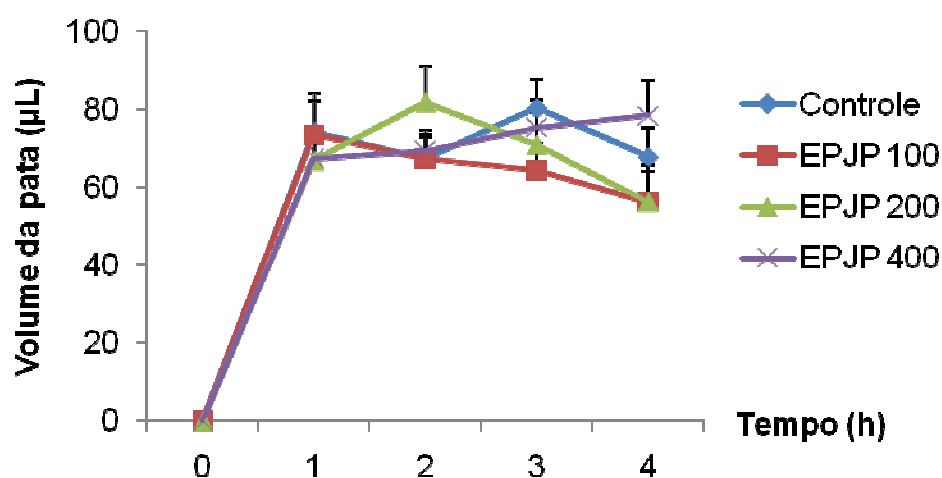
Por outro lado, essa diferença na resposta antiinflamatória do EPJP no presente trabalho pode ser decorrente, por exemplo, da técnica de produção do extrato (método: maceração/percolação; solvente: solução hidroalcoólica 20%), que difere da utilizada por Lino (método: extração em microondas; solvente: solução hidroalcoólica 35%), o que pode ter resultado em teor diferente de cumarina e de umbeliferona nos extratos; aliás, somente o do presente estudo foi padronizado (CLAE – DAD) em função da concentração dos marcadores (cumarina e umbeliferona).

Uma das características do modelo de edema de pata induzido por carragenina é a migração de leucócitos, em especial neutrófilos, para o foco inflamatório, os quais desempenham importante papel, pois são uma fonte endógena de radicais livres e de enzimas que produzem substâncias tóxicas (SAKURAI; OSAKA; YAMASAKI, 2005). Dentre as enzimas presentes nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, a mieloperoxidase merece destaque, pois é a principal enzima liberada em resposta a processos inflamatórios, infecciosos e isquêmicos, podendo ser utilizada como indicativo de infiltração leucocitária, além disso, sua ativação também acarreta a produção de espécies reativas de oxigênio (ARNHOLD, 2004; KRAWISZ; SHARON; STENSON, 1984). A Figura 18 apresenta o efeito do ESPJP sobre a MPO, sendo observado que todas as concentrações estudadas (3 – 100 µg/mL) inibiram significativamente a liberação de MPO por neutrófilos, com inibição máxima em torno de 68 %. Portanto, o extrato padronizado de chambá possui um efeito antiinflamatório, observado em modelo experimental dependente de PMNs, que parece estar relacionado à redução da ativação particularmente de neutrófilo.

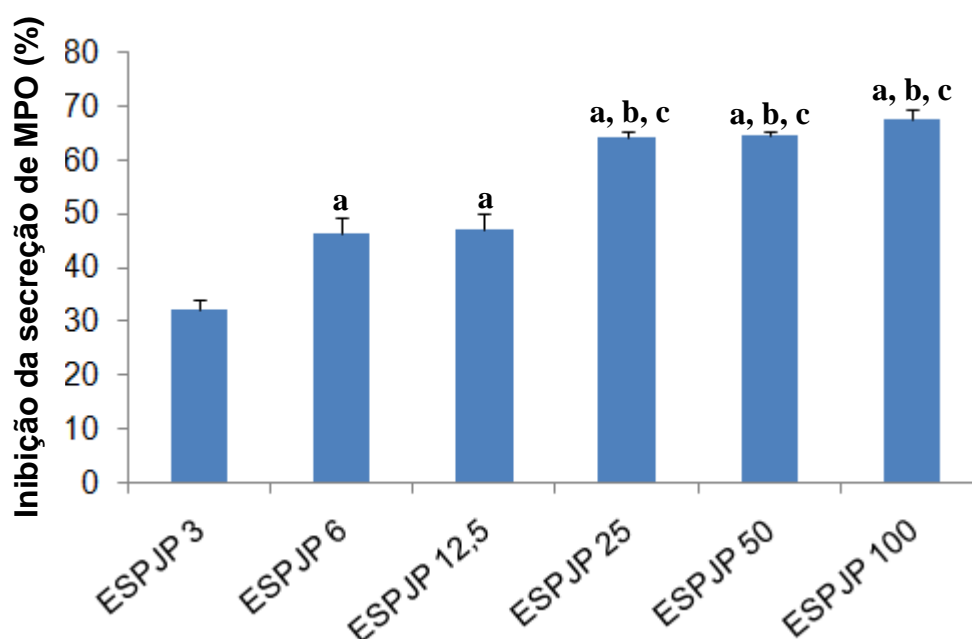
O tecido, após sofrer uma agressão externa, induz a produção e a liberação de substâncias endógenas, como mediadores inflamatórios (prostanóides, citocinas, amins e cininas) e neuropeptídeos, e também migração de células. A injúria tecidual, juntamente com a resposta inflamatória associada, facilita a neurotransmissão e acarreta a ativação das vias nociceptivas, por meio da sensibilização de receptores na superfície dos neurônios, os nociceptores (BJÖRKMAN, 1995). Nesse contexto, com o intuito de verificar se a resposta antiinflamatória do chambá tinha participação do sistema nervoso, o presente trabalho investigou o efeito do EPJP no modelo de nocicepção induzida por capsaicina (SANTOS; CALIXTO, 1997).



**Figura 16.** Atividade antiedematogênica do extrato padronizado de *Justicia pectoralis* (EPJP) no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Veículo (salina, v.o.) ou EPJP (100, 200, 400 mg/Kg, v.o.) foram administrados 1 h antes da injeção intraplantar de carragenina 1% na pata direita. Os resultados representam a média  $\pm$  E.P.M. do volume da pata em microlitros ( $\mu$ L) de 6 – 8 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  vs. Controle (ANOVA, Tukey, *post hoc*).



**Figura 17.** Atividade antiedematogênica do extrato padronizado de *Justicia pectoralis* (EPJP) no edema de pata induzido por dextrano em camundongos. Veículo (salina, v.o.) ou EPJP (100, 200, 400 mg/Kg, v.o.) foram administrados 1h antes da injeção intraplantar de dextrano 10 % na pata direita dos animais. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM do volume da pata em microlitros ( $\mu$ L) de 6 – 8 animais por grupo.

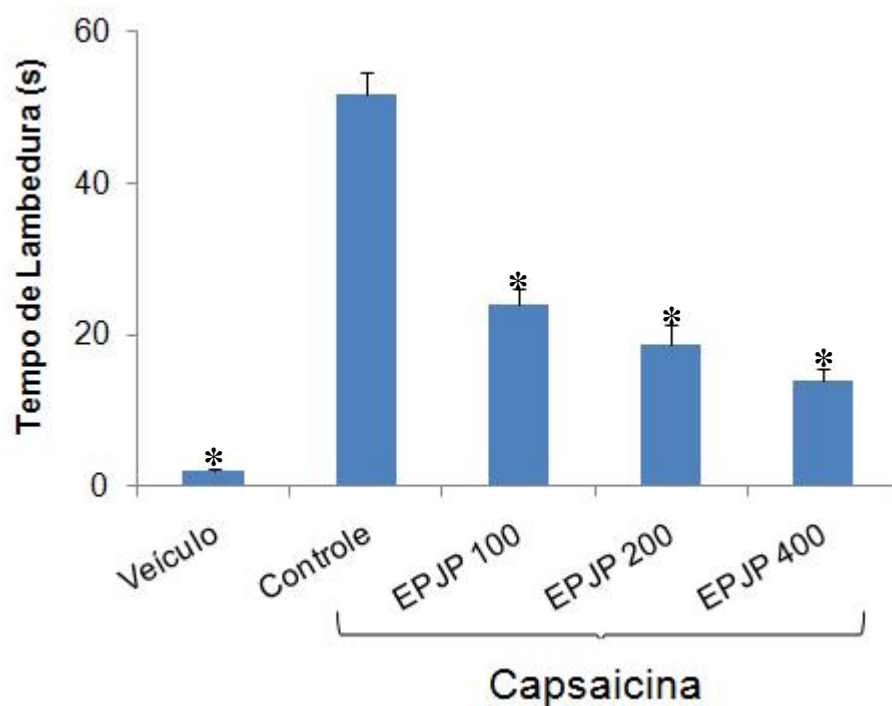


**Figura 18.** Efeito do extrato seco padronizado de *Justicia pectoralis* (ESPJP) na liberação de mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos humano estimulados por PMA. Os resultados obtidos na presença do extrato foram comparados em relação ao controle (100 % atividade enzimática). Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. As análises foram realizadas pelo menos em triplicata e repetidas em três dias diferentes. **a** vs. ESPJP 3  $\mu\text{g/ml}$ , **b** vs. ESPJP 6  $\mu\text{g/ml}$  e **c** vs. ESPJP 12,5  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ , ANOVA, Tukey, *post hoc*).

A capsaicina é um composto responsável pelo ardor da pimenta vermelha do gênero *Capsicum*. Ela interage com um receptor denominado vanilóide, que abre canais iônicos e gera, por meio disso, um influxo de cálcio na fibra nervosa, despolarizando fibras C e A $\delta$  e resultando na sensação de ardência, hiperalgesia e inflamação (CATERINA *et al.*, 1997; JANCSÓ; JANCSÓ; SZOLCSÁNYI, 1967). Além disso, o aumento de cálcio acarreta a liberação de outros neurotransmissores e neuromoduladores nas fibras sensoriais, como substância P e peptídeo relacionado ao gene de calcitonina, responsáveis pela inflamação neurogênica, bem como pelo extravasamento plasmático, vasodilatação e migração celular (GAMSÉ, 1982; HOLZER, 1988). Por outro lado, a ativação por agonistas de canais de K<sub>ATP</sub> dependentes, como morfina e diazóxido, induz a hiperpolarização da célula e a diminuição dos níveis de Ca<sup>++</sup>, produzindo efeito antinociceptivo (LOHMANN; WELCH, 1999; OCANA *et al.*, 2004).

A Figura 19 mostra o efeito da administração oral do EPJP sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. O EPJP reduziu significativamente o tempo de lambertura da pata nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg (23,86  $\pm$  2,13; 18,67  $\pm$  2,6 e 13,8  $\pm$  1,7 s, respectivamente) quando comparado ao grupo controle (51,6  $\pm$  3,0s). A injeção do veículo sozinho induziu somente uma resposta mínima na lambertura da pata (2,0  $\pm$  0,41 s). Dessa forma, os resultados sugerem que o EPJP possui atividade antinociceptiva. O mecanismo de ação desse efeito não foi investigado, mas pode estar relacionado a participação dos receptores vanilóides ou a interferência na liberação de neuropeptídeos por neurônios sensoriais.

O chambá é amplamente empregado em preparações caseiras e formulações fitoterápicas para tratamento de afecções respiratórias. Estudos mostraram que a cumarina simples possui atividade inibitória contra bactérias gram(+) e, sobretudo, gram(-), onde o grau de substituição e a polaridade das moléculas resultantes são fatores importantes na definição da atividade antimicrobiana, sendo menos potentes os derivados mais polares (JURD; KING; MIHARA, 1971; KAYSER; KOLODZIEJ, 1999). Ainda, considerando que boa parte dos problemas respiratórios é decorrente de infecções virais e bacterianas, foi investigado o potencial antimicrobiano do EPJP em cepas padrões de microorganismos, incluindo bactérias gram (+) e gram (-) e fungo.



**Figura 19.** Efeito do extrato padronizado de *Justicia pectoralis* (EPJP) sobre a nociceção induzida por capsaicina em camundongos. Água destilada (controle) ou EPJP (100, 200, 400 mg/Kg, v.o.) foram administrados 1 h antes da injeção intraplantar de capsaicina na pata direita traseira (1,6  $\mu$ g em 50  $\mu$ L). Outro grupo recebeu o mesmo volume de veículo da capsaicina (80 % PBS, 10 % etanol, 10 % Tween 80) intraplantar para avaliar possível efeito nociceptivo. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM do tempo de lambedura da pata em segundos (s) de 6 – 8 animais por grupo durante 5 min. \*  $p < 0,05$  vs. Controle (ANOVA, Tukey, *post hoc*).

No entanto, não foi observado inibição do crescimento microbiano das cepas avaliadas em nenhuma das diluições do EPJP, embora outros estudos (CHARIANDY *et al.*, 1999; VARÓN *et al.*, 2007) tenham mostrado ação antimicrobiana da fração acetato de etila de *J. pectoralis*. Contudo, essa resposta diferente pode ser em virtude, em parte, à natureza química do material utilizado decorrente do tipo de solvente e da técnica extrativa empregada na produção dos extratos, bem como do uso de cepas microbianas distintas no estudo.

Assim, os resultados obtidos mostraram que o extrato hidroalcoólico padronizado de *J. pectoralis* possuiu uma baixa citotoxicidade, assim como atividades antinociceptiva e antiinflamatória, contudo, não apresentou ação antimicrobiana. Certamente, o presente estudo contribui para agregar mais tecnologia e qualidade na obtenção de produtos derivados a partir do chambá, servindo de matéria-prima na elaboração de formulação farmacêuticas. Somado a isso, o potencial farmacológico apresentado por esse produto farmacêutico ajudou a validar o seu uso terapêutico.



*Conclusões*



## 6. CONCLUSÕES

- O método analítico desenvolvido por CLAE-DAD foi linear, sensível, específico, preciso e exato para a determinação qualitativa e quantitativa simultânea de cumarina e umbeliferona em produtos derivados de *Justicia pectoralis*, podendo, dessa forma, ser utilizado no controle de qualidade destes.
- A utilização de estufa com circulação de ar a 35 °C durante 24 h foi um método eficiente para preparação da droga vegetal de *Justicia pectoralis*, que apresentou teor de umidade de acordo com o limite estabelecido pela Farmacopéia Brasileira.
- A droga vegetal triturada de *Justicia pectoralis* foi classificada como pó moderadamente grosso, a qual foi, também, caracterizada quanto ao teor de cinzas totais, de extrativos em água e em etanol.
- No processo extrativo de cumarina e de umbeliferona, a relação droga:solvente e o teor de etanol da solução hidroalcoólica influenciaram significativamente o rendimento dos marcadores nos extratos produzidos.
- O método extrativo desenvolvido e padronizado compreendeu o emprego de extração por percolação com maceração prévia de 24 h, utilizando solução hidroalcoólica 20% como solvente extrator e relação droga:solvente (g:mL) 1:15. Nessas condições foram obtidos melhores rendimentos dos princípios ativos (cumarina e umbeliferona).
- Considerando o emprego do extrato de chambá para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, líquidas e sólidas, o extrato hidroalcoólico 20 % da planta apresentou melhores características físico-químicas (resíduo, pH e densidade).
- O dióxido de silício coloidal apresentou melhor desempenho na proporção resíduo:excipiente 1:1 como adjuvante de secagem por *spray drying* de extratos de *Justicia pectoralis*. Após secagem, o extrato apresentou um teor médio de 8,17 e 3,29 mg/g de pó para cumarina e umbeliferona, respectivamente.

- O extrato seco padronizado de *Justicia pectoralis* não apresentou toxicidade em neutrófilos humano.
- A solução extrativa padronizada de *Justicia pectoralis* apresentou atividade antiedematogênica e antinociceptiva. A ação antiinflamatória do extrato de chambá está possivelmente relacionada a uma redução da ativação de neutrófilos, interferindo, assim, na secreção de enzimas proteolíticas, como a MPO.
- Não foi observada atividade antimicrobiana frente às cepas de microorganismos avaliadas.
- O presente estudo validou metodologia analítica e desenvolveu método extrativo para produção de extratos vegetais padronizados a partir de *J. pectoralis*. Além disso, as atividades farmacológicas determinadas para o extrato de chambá irão contribuir para o desenvolvimento de um fitoterápico à luz da regulamentação vigente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIFISA. **Fitoterápicos: uma tendência natural**. Disponível em:

<[http://www.abifisa.org.br/noticias\\_ver.asp?news=50](http://www.abifisa.org.br/noticias_ver.asp?news=50)>. Acesso em: 21 abr. 2009.

ACHÉ LABORATÓRIOS FARMACÊUTICOS S/A; UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA. CARLINI, E. A. e PETROVICK, P. R. Droga antiulcerogênica de *Maytenus ilicifolia* e processo de obtenção do mesmo. BR n. PI 9904502-8, 06 abr. 1999, 14 nov. 2000.

AHN, M.; LEE, M. K.; KIM, Y. C.; SUNG, S. H. The simultaneous determination of coumarins in *Angelica gigas* root by high performance liquid chromatography–diode array detector coupled with electrospray ionization/mass spectrometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 46, n. 2, p. 258-66, 2008.

ARARUNA, S. M. **Desenvolvimento, padronização (CLAE-DAD) e avaliação pré-clínica do extrato seco por spray-dryer de *Amburana cearensis* A. C. Smith (cumaru)**: 2008. Dissertação ( Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ARNHOLD, J. Free radicals-friends or foes? Properties, functions and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69, p. 4-9, 2004.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2 ed. Porto alegre: Artmed, 2005.

BARILE, F.A., DIERICKX, P.J., KRISTEN, U. In vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. **Cell Biology and Toxicology**, v. 10, p. 155-162, 1994.

BARROS, R. F. M. **Efeito da radiação solar sobre o crescimento e produção de cumarinas em *Justicia pectoralis* var. *Stenophylla* Leonard**; 1992. 156f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1992.

BARROS, R. F. M.; ANDRADE, L. H. C.; ENCARNAÇÃO, C. R. F. Estarquia em *Justicia pectoralis* var. *stenophylla* Leonard (Acanthaceae): influência da radiação solar. **Phyton**, v. 63, n. 1/2, p. 245-248, 1997.

BARROS, R. F. M.; ANDRADE, L. H. C.; SILVA, N. H. Concentração de cumarinas em folhas de *Justicia pectoralis* var. *stenophylla* Leonard com diferentes colorações. **Phyton**. v. 60, n. 1/2, p. 141-145, 1997.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991.

BEZERRA, A. M. E.; JÚNIOR, F. T. N.; LEAL, F. R.; CARNEIRO, J. G. M. Rendimento de biomassa, óleo essencial, teores de fósforo e potássio de chambá em resposta à adubação orgânica e mineral. **Rev. Ciênc. Agron.**, v. 37, p. 124-129, 2006.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIAVATTI, M. W.; KOERICH, C. A.; HENCK, C. H.; ZUCATELLI, E.; MARTINELLI, F. H.; BRESOLIN, T. B.; LEITE, S. N. Coumarin content and physicochemical profile of *Mikania laevigata* extracts. **Z. Naturforsch.**, v. 59, p. 197-200, 2004.

BILIA, A. R.; ETERNO, F.; BERGONZI, M. C.; MAZZI, G.; VINCIERI, F. F. Evaluation of the content and stability of the constituents of mother tinctures and tinctures: the case of *Crataegus oxyacantha* L. and *Hieracium pilosella* L. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 44, p. 70-78, 2007.

BITTENCOURT, M. S. **Cefixima: validação de métodos analíticos e estudo preliminar de estabilidade**: 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

BJÖRKMAN, R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 39, p. 1-44, 1995.

BRASIL, **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Ministério da Saúde, Brasília, DF, 2007. Disponível em: <  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/politica\\_plantas\\_medicinais\\_fitoterapia.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/politica_plantas_medicinais_fitoterapia.pdf)>. Acesso em: 15 abr. 2009a.

BRASIL, **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Ministério da Saúde, Brasília, DF, 2008. Disponível em: <  
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2009b.

BRASIL, Resolução CNS 251 de 07 de agosto de 1997, Contempla a norma complementar para a área temática especial de novos fármacos, vacinas e testes diagnósticos e delega aos CEPs a análise final dos projetos nessa área, que deixa de ser especial. **Diário Oficial da União**, Conselho Nacional de Saúde. Brasília, DF, 07 ago. 1997.

BRASIL. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da Central de Medicamentos**. Série B: textos básicos de saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Ministério da Saúde, Brasília, DF, 22 jun. 2006.

BRASIL. Decreto nº 79.094 de 05 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei 6.360 de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneamento e outros. **Diário Oficial da União**, Congresso Nacional, DF, 07 jan. 1977.

BRASIL. Lei nº 9.782 de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, Congresso Nacional, DF, 27 jan. 1999.

BRASIL. Resolução – RDC nº 138 de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o enquadramento na categoria de venda de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, 29 mai. 2003a.

BRASIL. Resolução – RDC nº 140 de 29 de maio de 2003. Estabelece regras das bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde. **Diário Oficial da União**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, 29 mai. 2003b.

BRASIL. Resolução – RDC nº 210 de 04 de agosto de 2003. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos, conforme ao Anexo I da presente Resolução. **Diário Oficial da União**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, 04 ago. 2003c.

BRASIL. Resolução – RDC nº 333 de 19 de novembro de 2003. Dispõe sobre rotulagem de medicamentos e outras providências. **Diário Oficial da União**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, 21 nov. 2003d.

BRASIL. Resolução – RDC nº 48 de 16 de maio de 2004. Dispõe sobre o registro de fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, 16 mar. 2004a.

BRASIL. Resolução – RE nº 01 de 29 de julho de 2007. Autoriza *ad referendum*, a publicação do “Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade”. **Diário Oficial da União**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, 29 jul. 2005.

BRASIL. Resolução – RE nº 88 de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos”. **Diário Oficial da União**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, 16 mar. 2004b.

BRASIL. Resolução – RE nº 89 de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “Lista de registro simplificado de fitoterápicos”. **Diário Oficial da União**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, 16 mar. 2004c.

BRASIL. Resolução – RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, 29 mai. 2003e.

BRASIL. Resolução – RE nº 90 de 16 de março de 2004. Determina a publicação do “Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”. **Diário Oficial da União**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, 16 mar. 2004d.

BRASIL. Resolução – RE nº 91 de 16 de março de 2004. Determina a publicação do “Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro de fitoterápicos”. **Diário Oficial da União**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, 16 mar. 2004e.

BRASIL. Resolução CNS 196 de 10 de outubro de 1996. Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos. **Diário Oficial da União**, Conselho Nacional de Saúde. Brasília, DF, 10 out. 1996.

BRUNETON, J. C. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. 1 ed, Paris:Intercepted Ltd, 1995.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v.55, n.3, 2003.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* A.C. Smith. **Química Nova**, v. 29, p. 1241-1243, 2006.

CARR, R.L., Evaluating flow properties of solids. **Chem. Eng.**, v. 18, p. 163-168, 1965.

CARVAHLO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; FILHO, D. S.; SARTI, S. J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia férrea* crude extract. **J. of Ethnopharm.**, v. 53, p. 175-178, 1996.

CARVALHO, E. L. S. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss - Celastraceae (espinheira-santa):** 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.

CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Extraction and Chromatographic Analysis of Coumarin in Hydroalcoholic Extracts of *Mikania glomerata* Spreng. (Guaco) leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 6, p. 706-709, 2002.

CHARIANDY, C. M.; SEAFORTH, C. E.; PHELPS, R. H.; POLLARD, G. V.; KHAMBAY, B. P. S. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 265-270, 1999.

CHAVES, J. S. **Obtenção e caracterização de um fitoterápico a partir de *T. parthenium*: caracterização química e física do pó das partes aéreas e obtenção e caracterização química, física e físico-química dos extratos hidroalcoólico e seco e comprimidos de dissolução entérica:** 2005. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC.** São Paulo: Edgard Blücher, 1998.

CLODIUS, L., PILLER, N.B. Conservative therapy for postmastectomy lymphedema. **Cirurgia Plástica**, v. 4, p. 193-202, 1978.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation.. In: \_\_\_\_\_ **Robbins pathologic basis of disease.** Philadelphia: WB Saunders Company, 1999, cap. 2.

CORDELL, G.A. Biodiversidade and drug discovery – a simbiotic relationship. **Phytochemistry**, v. 55, p. 463-480, 2000.

CORNEC, M. Aérosil: un adjuvant effi cace pour lês formes sèches, liquids et pâteuses. **STP. Pharma. Sci.**, v.6, p. 110-112, 1990.

CORREIA, C. C. **Padronização e otimização das condições de extração de *Peumus boldus***: 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

COUTO, A. G. **Desenvolvimento e avaliação técnica de granulado contendo produto seco nebulizado de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra)**: 2000. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

DE SOUZA, K. C. B. **Avaliação biológica de preparações obtidas a partir das inflorescências de *Achyroclines satureoides* (Lam.) D.C. (Macela)**: 2002. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

DE SOUZA, K. C. B. **Desenvolvimento de metodologia analítica e tecnológica na obtenção de estratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* variedade flavicarpa**: 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

DE VRIES, J. X.; TAUCHER, B.; WURZEL, G. Constituents of *Justicia pectoralis* Jacq. 2. Gas chromatography/mass spectrometry of simple coumarins, 3-phenylpropionic acids and their hydroxyl and methoxy derivatives. **Biomedical and Environmental Mass Spectrometry**, v. 15, p. 413-417, 1988

DI CARLO, G.; BORRELLI, F.; ERNST, E.; IZZO, A. A. St John's wort: Prozac from the plant kingdom. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 6, 2001.

DINIZ, A. **Avaliação do perfil de absorção da vicenina-2 e desenvolvimento de extrato seco padronizado de *Lychnophora ericoides* com máxima extração deste flavonóide**: 2008. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

DUFFIE, J. A; MARSHALL Jr., W. R. Factors influencing the properties of spray dried materials. **Chemical Engineering Progress**, v.49, n.8, p. 417-423, 1953.

DUKE, J. A. **Handbook of medicinal herbs**. Florida: CRC Press, 1987.



ERNST, E. **Herbal Medicine: a concise overview for professionals**. London: Butterworth-Heinemann, 2000.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14 ed. London: WB Saunders, 1996.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: \_\_\_\_\_  
**Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2000, cap. 12, p. 197-220.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4<sup>a</sup> edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

FARNSWORTH, N.R. Screening plants for new medicines. In: \_\_\_\_\_ **Biodiversity**. Washington: American Chemical Society, 1988, p. 83-97.

FERNÁNDEZ, L.; MÁZ, R.; SAAD, H. P.; BISCAY, R.; GALÁN, L. Evaluación preliminar de los efectos neurofarmacológicos de *Justicia pectoralis*. **Rev. Cuba. Farm.**, v. 23 (1/2), p. 161-166, 1989.

FERRADÁ, C. A. R.; SOSA, I. H.; FIALLO, V. R. F. Fecha y distancia de plantación en el cultivo del tilo (*Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonard). **Rev Cubana Plant Med.** v. 1, 2003. Disponível em: < [http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol8\\_1\\_03/pla04103.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol8_1_03/pla04103.htm)>. Acesso em: 10 jun. 2008.

FRANÇA, D. S.; SOUZA, A. L. S.; ALMEIDA, K. R.; DOLABELLA, S. S.; MARTINELLI, C. COELHO, M. M. B Vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **Eur. J. Pharm.**, v. 421, p. 157-164, 2001.

FURUTA, T.; HAYASHI, H.; OHASHI, T. Some criteria of spray dryer design for food liquid. **Drying technology**. v.12, p.151-177, 1994.

GAMSE, R. Capsaicin and nociception in the rat and the mouse. Possible role of substance P. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 320, p. 205-216, 1982.

GAMSÉ, R.; HOLZER, P.; LEMBECK, F. Decrease of substance P in primary afferent neurons and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. **British Journal of Pharmacology**. v. 68, p. 207-213, 1980.

GERTSCH, J.; TOBLER, R. T.; BRUN, R.; STICHER, O.; HEILMANN, J. Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscidal properties of Justicidin B a new aryl-naphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. **Planta Med.**, v. 69, p. 420-424, 2003.

GOUVEIA, J. P. G.; MOURA, R. S. F.; ALMEIDA, F. A. C.; OLIVEIRA, M. V. O.; SILVA, M. M. Avaliação da cinética de secagem de caju mediante um planejamento experimental. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, n. 3, p. 471-474, 2002.

GOVÍN, E. S.; HERNÁNDEZ, L. F.; FIGUEREDO, D. C.; FERRADÁ, C. A. R. Estudio farmacognóstico de *Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonard. **Rev. Cubana Plant. Med.**, v. 8, 2003.

GRAHAM, V. A. W. Delimitation and infra-generic classification of *Justicia* (Acanthaceae). **Kew Bulletin**, v. 43, p. 551-624, 1988.

HAJARE, S. W.; CHANDRA, S.; SHARMA, J.; TANDAM, S. K.; LAL, J.; TELANG, A. G. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia sissoo* leaves. **Fitoterapia**, v. 72, p. 131-139, 2001.

HAUSNER, H. H., Friction conditions in a mass of metal powder. **Int. J. Powder Metall.**, v. 3, p. 7-13, 1967.

HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v. 24, p. 739-768, 1988.

HOSTETTMANN, K., WOLFENDER, J. L., RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. **Planta Med.**, v. 63, p. 2-10, 1997.

IMS. Health 2009 Global Pharmaceutical Market Forecast. Disponível em: <<http://clients.mediaondemand.net/imshealth/2009global/webcast.aspx>>. Acesso em: 31 mar. 2009.

JANCSÓ, N.; JANCSÓ, G. A.; SZOLCSÁNYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v. 31, n. 1, p. 138-151, 1967.

JOSEPH, H., GLEYE, J., MOULIS, C. Justicidin B. A cytotoxic principle from *Justicia pectoralis*. **J. Nat. Prod.**, v. 51, p. 599-600, 1988a.

JOSEPH, H., GLEYE, J., MOULIS, C. O-methoxylated C-glycosylflavones from *Justicia pectoralis*. **J. Nat. Prod.**, v. 51, p. 804-5, 1988b.

JURD, L.; KING Jr. A. D.; MIHARA, K. Antimicrobial properties of umbelliferone derivatives. **Phytochemistry**, v.10, p. 2965-2970, 1971.

KANG, Y. G.; LEE, J. H.; CHAE, H. J.; KIM, D. H.; LEE, S.; PARK, S. Y. HPLC Analysis and Extraction Methods of Decursin and Decursinol Angelate in *Angelica gigas* Roots. **Korean J. Pharmacogn.**, v. 34, p. 201–205, 2003.

KAYSER, O.; KOLODZIEJ, H. Antibacterial Activity of Simple Coumarins: Structural Requirements for Biological Activity. **Z. Naturforsch.**, v. 54, p. 169-174, 1999.

KOVAC, B.; NOVAK, I. Electronic structure of coumarins. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 58, p. 1483-1488, 2002.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v. 87, n. 6, p. 1344-1350, 1984.

LACY, A.; O'KENNEDY, R. J. The therapeutic applications of coumarins and coumarin derivatives in cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 30, p. 3979-3811, 2004.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: Rima, 2004.

LEAL, L. K. A. M.; FERREIRA, A. A. G.; BEZERRA, G. A.; MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p. 151-159, 2000.

LIN, Y. S.; TSAI, Y. J.; TSAY, J.S.; LIN, J. K. Factors Affecting the Levels of Tea Polyphenols and Caffeine in Tea Leaves. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 1864-1873, 2003.

LINDEN, R.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. P.; BASSANI, V. L. Response surface analysis applied to the preparations of tablets containing a high concentration of vegetable spray-dried extract. **Drug Development and Industry Pharmacy**, v. 26, p. 441-446, 2000.

LINO, C. S. **Efeito farmacológico de *Justicia pectoralis* Jacq. e seus princípios ativos: cumarina e umbeliferona**: 1995. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1995.

LINO, C. S.; VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. **Phytotherapy Res.**, v. 11, p. 211-215, 1997.

LISANATURA, Bula do medicamento “Estilo®”. Disponível em: <[http://www.lisanatura.com/esp/productos/info/estilo\\_prospecto.htm](http://www.lisanatura.com/esp/productos/info/estilo_prospecto.htm)>. Acesso em: 24 mar. 2009.

LIST, P. H.; SCHIMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. London: Heyden, 1989.

LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVAN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indometacin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapy**, v. 221, p. 261-267, 1982.

LOHMANN, A. B.; WELCH, S. P. ATP-gated k(+) channel openers enhance opioid antinociception: indirect evidence for the release of endogenous opioid peptides. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 385, p. 119-127, 1999.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **Journal of Immunology**, v. 132, p. 2015–2020, 1984.

MABBERLEY, D. J. **The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. *Justicia pectoralis*: a study of the basis for its use as hallucinogenic snuff ingredient. **J. Ethnopharmacology**, v. 12, p. 93-111, 1984.

MÁS, R.; MENÉNDEZ, R.; FERNÁNDEZ, L.; SAAD, H. P.; RIVERA, R. L.; KAMMERER, E. Posee *Justicia pectoralis* las características farmacológicas de los neurolépticos clásicos? In: Centro Nacional de Investigaciones Científicas. **Estudios avanzados en neurociencias**. s.l, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, p. 273-283, 1987.

MATOS, F. J. A. **Farmácia Vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. Fortaleza: Editora UFC, 1998.

MATOS, F. J. A. **Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. 2 ed., Fortaleza: Editora UFC, 2000.

MAUAD, T.; SOUZA, A. S. L.; SALDIVA, P. H. N.; DOLHNIKOFF, M. Remodelamento brônquico na asma. **Journal de Pneumologia**, v. 26, p. 91-115, 2000.

MELO, R. F.; ANDRADE, L. H. C. Contribuição ao estudo farmacognóstico do chambá - *Justicia pectoralis* Jacq (Acanthaceae). **Biologica Brasilica**, v.1, p. 195-207, 1989.

MONTERO, A. C. R.; ARNÁEZ, G. P.; ESPERÓN, N. F.; BARRO, A. M. B.; PÉREZ, M. E. A.; RODRÍGUEZ, A. M. Estudio genotóxico in vivo de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. **Rev Toxicol**. v. 18, p. 75-78, 2001

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, K. Effects of the new antiulcer agent kb-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine. **Japan J. Pharmacology**, v. 57, p. 495-505, 1991.

MORTON, J. P. Some folk-medicine plants of Central American markets. **Quat. J. Crude Drug Research**, v. 15, p. 162-165, 1977.

MURRAY R. D. H. Coumarins. **Nat. Prod. Rep**, v. 8, p. 591-624, 1989.

MURRAY, R. D. H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, S. A. **The natural coumarins: occurrence, chemistry and biochemistry**. Chinchester: John Wiley & Sons, 1982.

NOBRE, M. E. P.; LEITE, G. L.; BARBOSA, M. A. C.; PROHASKA, F.; SOUSA, L. R.; SÓLON, P. C. D.; DE BRITO, S. P. C.; VIANA, G. S. B. Avaliação da eficácia do xarope de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq.) na função pulmonar de pacientes asmáticos. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 4, n. 1, p. 4-10, 2006.

OCANA, M.; CENDAN, C. M.; COBOS, E. J.; ENTRENA, J. M.; BAEYENS, J. M. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 500, p. 203-219, 2004.

OLIVEIRA, A. B., BRAGA, F. C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v. 1, p. 49-58, 2003.

OLIVEIRA, A. F. M. **Caracterização de Acanthaceae medicinais conhecidas como anador no nordeste do Brasil**: 1995, 125 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1995.

OLIVEIRA, A. F. M.; ANDRADE, L. H. Caracterização morfológica de *Justicia pectoralis* Jacq. e *J. gendarussa* Burm. F. (Acanthaceae). **Acta Amazônica**, v. 30, n. 4, p. 569-578, 2000.

OLIVEIRA, A. F. M.; XAVIER, H. S.; SILVA, N. H.; ANDRADE, L. H. C. Screening cromatográfico de Acanthaceae medicinais: *Justicia pectoralis* Jacq. e *J. geradarussa* Burm. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 3, n. 1, p. 37-41, 2000.

OLIVEIRA, A. L.; PADILHA, C. D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Marcela), Asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração. **Caderno de Farmácia**, v. 17, n. 1, p. 33-38, 2001.

OLIVEIRA, F; AKISUE, G; AKISUE, MK. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu. 1998.  
OLIVEIRA, O. W. **Parâmetros de produção e caracterização de produto seco de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek - celastraceae - em torre de secagem por aspersão**: 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PARRA, A. L.; YEHBRA, R. S.; SARDIÑAS, G. I.; BUELA, L. I. Comparative Study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PEIXOTO, M. P. G. **Obtenção do extrato seco das sementes de *Syzygium cumini* L. e avaliação da atividade hipoglicemiante**: 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

PETROVICK, G. F. **Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado revestido contendo produto seco por spray drying de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Asteraceae (Marcela)**: 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. **Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectiva**. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

POSER, G. L. Polissacarídeos. In: \_\_\_\_ **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2000, cap. 19, p. 417-432.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 4 ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

QUATTROCCHIO, O. A.; ANDRIZZ, S. A.; LABA, R. F. **Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica**. Argentina: Farro S.A., 1992.

RAMESH, B.; PUGALENDI, K. V. Antihyperlipidemic and antidiabetic effects of umbelliferone in streptozotocin diabetic rats. **Yale J. Biol. Med.**, v. 78, n. 4, p. 189–196, 2005.

RAMESH, B.; PUGALENDI, K. V. Antioxidant role of umbelliferone in STZ-diabetic rats. **Life Sci.**, v. 79 (3), p. 306-310, 2006

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCHA, L.; LUCIO, E.M.A.; FRANÇA, H.S.; SHARAPIN, N. *Mikania glomerata* Spreng: Desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, p. 744-747, 2008.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation. **American Journal of Phatology**, v. 86, n. 1, 1977.

SAAD, P. H.; MÁŠ, R.; FERNÁNDEZ, L.; RIVERA, L. R. *Justicia pectoralis* no previne las convulsiones inducidas por PTZ y PTX. In: Centro Nacional de Investigaciones Científicas. **Estudios avanzados en neurociencias**. s.l, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, p.265-72, 1987.

SAKURAI, K.; OSAKA, T.; YAMASAKI, K. Rebamipide reduces recurrence of experimental gastric ulcer: Role of free radicals and neutrophils. **Digestive Disease and Sciences**, v. 50, n. 1, p. 90-96, 2005.

SANT' ANA, P. J. P.; ASSAD, A. L. D. Programa de pesquisa em produtos naturais: a experiência da CEME. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 3, 2004.

SANTOS, S. C. **Caracterização cromatográfica de extratos medicinais de guaco: *Mikania laevigata* schultz bip. ex baker e *M. glomerata* sprengel e ação de *M. laevigata* na inflamação alérgica pulmonar**: 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, n. 4, p. 381-389, 1997.

SCHELLINGER, A. P.; CARR, P. W. Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, n. 2, p. 253-266, 2006.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: \_\_\_\_\_ **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS / Editora UFSC, 2000, cap. 15, p. 291-322.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. 1 ed. Colômbia: CAB e CYTED, 2000.

SHOPSIS, C.; BORENFREUND, E.; WALBERG, J.; STARK, D. M. A battery of potential alternatives to the Draize test: uridine uptake inhibition, morphological cytotoxicity, macrophage chemotaxis and exfoliative cytology. **Food Chem Toxicol**, v. 23, p. 259-266, 1985.

SIGMA-ALDRICH. **HPLC-Troubleshooting Desde a Perspectiva do Desenvolvimento de Método**: Como Evitar os 12 Problemas mais Frequentes Atraves do um Desenvolvimento de Métodos Inteligente. [on line] Disponível em:<[http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/20640/HPLC\\_Troubleshooting.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/20640/HPLC_Troubleshooting.pdf)>. Acesso em 29/04/2008.

SILVA, S. R.; BUITRÓN,X.; OLIVEIRA, L. H. de; MARTINS, M. V. **Plantas medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comercialização**. Brasília: TRAFFIC, 2001.



SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: \_\_\_\_ **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2000, cap. 13, p. 221-256.

SOUZA, C. R. F. **Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras: estudo da viabilidade técnica e econômica do processo leito de jorro**: 2007. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

SOUZA, C. R. F.; DONIDA, M. W.; ROCHA, S. C. S.; OLIVEIRA, W. P. The role of colloidal silicon dioxide in the enhancement of the drying of herbal preparations in suspended state. **Chemical Engineering Communications**, v. 196, n. 3, p. 391-405, 2009.

STEFANOVA, T.; NIKOLOVA, N.; MICHAILOVA, A.; MITOV, I.; IANCOV, I.; ZLABINGER, G. J.; NEYCHEV, H. Enhanced resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice after coumarin treatment. **Microbes Infect.**, v. 9, p. 7-14, 2007.

SUZUKI, K.; OTA, H.; SASAGAWA, S. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 132, n. 2. p. 345-352, 1983.

TAVARES, E. S.; VIANA, V. R. C. Contribuição ao estudo de *Justicia pectoralis* Jacq. – Anador. **Rev. Bras. Farm.**, v. 76, n. 3, p. 63-66, 1995.

TEIXEIRA, H. F. **Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureoides* (LAM) DC. Compositae (Marcela)**: 1996. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

TOLEDO, D. B.; JIMÉNEZ, E. M.; CÁRDENAS, M. B.; COSTA, L. E. D.; SIMEÓN, A. R.; MORGADO, E. B.; PRADO, E. A. S. Evaluación, de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo. **Revista Electrónica de Veterinaria**. v. 8, n. 3, 2007. Disponível em: < <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030307/030706.pdf>>. Acesso em: 30 mar. 2008.

TRUEBA, G. P.; MARTÍNEZ, R. R.; RUIZ, Z. P.; CHANFRAU, J. R. Evaluación de la actividad antioxidante de *Justicia pectoralis* Jacq **Rev. Cubana Invest. Bioméd.**, v.20, p. 30-33, 2001.

UNITED NATIONS. **Global Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – GSH**. 2ed. Geneva, 2007. Disponível em: <  
[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev02/02files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html)>. Acesso em: 05 abr. 2008.

VALLADÃO, D. M. S.; IONASHIRO, M.; NETTO, J. Z. Determinação de fármacos diuréticos em associação por cromatografia em camada delgada e espectrofotometria. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 44-48, 2008.

VARDAR-ÜNLÜ, G.; CANDAN, F.; SOKMEN, A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, M.; DONMEZ, E.; TEPE, B. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 63–67, 2003.

VARÓN, E. Y.; OSPINA, F. S.; MURILLO, E.; MÉNDEZ, J. J. Tamizaje fitoquímico y actividad antioxidante de extractos acuoso y orgánicos de *Justicia pectoralis* Jacq. (amansa toros) y de volátiles y no volátiles de *Lippia alba* Mill. (pronto alivio) cultivadas en diferentes pisos térmicos. **Scientia Et Technica**, v. 13, n. 33, 2007.

VASCONCELOS, E. A. F.; MEDEIROS, M. G. F.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 243-249, 2005.

WASSHAUSEN, D. C. Acanthaceae. In: \_\_\_\_\_ **Flora of the Venezuelan Guayana**. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1995, p. 335-373.

WASSHAUSEN, D. C. New species of *Justicia* (Acanthaceae) from the Guianas. **Brittonia**, v. 54, n. 4, p. 286–297, 2002.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis. A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemist**. London: Churchill Livingstone, 2003.

WENDEL, S.; ÇELIC, M. Uma visão geral sobre o uso da tecnologia de Spray-drying. **Pharmaceutical Technology**, v. 5, p. 31-43, 1998.

WENIGER, B.; SAVARY, H.; DAGUIHL, R. Tri phytochimique de plantes de la liste **TRAMIL**. Laboratoire de chimie des substances naturelles, Faculté de médecine et de pharmacie, Université d'Etat d'Haïti, Port au Prince, Haïti. TRAMIL I, Port au Prince, Haïti, Fac. de Médecine/enda-caribe. 1984.

WHO. **Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials**. Genève: WHO, 1998

WILSON, N. S.; NELSON, M. D.; DOLAN, J. W.; SNYDER, L. R.; CARR, P. W. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography II. Effect of a change in conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 961, p. 195–215, 2002.

WINTER, C. A, RISELY, E. A., NUSS, G. W. Carragenan-induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

YRJÖNEN, T. **Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products**. Helsinki, 2004. Disponível em: < <http://ethesis.helsinki.fi/>>. Acesso em: 20 nov. 2007.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e Fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.