

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS

ALESSANDRA RIBEIRO SARTOR LIMA

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE EXTRATOS PADRONIZADOS EM
CUMARINAS DAS PARTES AÉREAS DE *Justicia pectoralis* Jacq. (Acanthaceae)**

ANÁPOLIS – GO

2017

ALESSANDRA RIBEIRO SARTOR LIMA

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE EXTRATOS PADRONIZADOS EM
CUMARINAS DAS PARTES AÉREAS DE *Justicia pectoralis* Jacq. (Acanthaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde.

Área de Concentração: Pesquisa e Obtenção de Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Dra. Joelma Abadia Marciano de Paula

ANÁPOLIS – GO

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE EXTRATOS PADRONIZADOS EM CUMARINAS DAS PARTES AÉREAS DE *Justicia pectoralis* Jacq. (Acanthaceae)

Dissertação defendida no dia 01 de agosto de 2017 ao Programa de Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás – Mestrado – para a obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em Anápolis em ____/____/____

Banca examinadora:

Profa. Dra. Joelma Abadía M. de Paula

Profa. Dra. Vanessa Cristiane de Santana Amaral

Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges

Dedico este trabalho aos meus filhos, como exemplo de obstinação e resiliência e ao meu esposo por todo apoio, compreensão e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar o meu caminho e colocar pessoas maravilhosas em minha vida.

Ao meu esposo e meus filhos pelo apoio e incentivo, por sempre estarem ao meu lado com carinho e compreensão.

Aos meus pais: Maria Aparecida e Renato, pelo amor, pela dedicação e educação. Sem eles nada disso seria possível.

A Profa. Dra Joelma Abadia Marciano de Paula, minha querida orientadora, pelos ensinamentos, pela paciência e inestimável experiência na área científica.

Ao Sr. Nilton Marciano Junior, engenheiro agrônomo responsável pelo Horto de Plantas Medicinais do Jardim Botânico de Goiânia, pela atenção especial na fase de cultivo das mudas, sendo imprescindível para realização deste projeto.

Ao Sr. Waldeir Costa e Silva, técnico do Laboratório de Secagem e Armazenamento de Produtos Vegetais da Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas pela atenção, paciência e auxílio nas várias etapas deste projeto.

Aos alunos e estagiários de iniciação científica: Ana Eloísa Gomes, Luan Augusto Cândido Lôbo e Thaísa Lorrana da Cruz Costa, pelo auxílio e companhia.

Ao Horto de Plantas Medicinais do Jardim Botânico de Goiânia por fornecer as mudas utilizadas neste projeto.

A Universidade Estadual de Goiás e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo auxílio financeiro.

Muito Obrigada!

RESUMO

Justicia pectoralis Jacq. (Acanthaceae) é uma erva de interesse medicinal utilizada como analgésico, anti-inflamatório e sedativo na medicina popular de países da América Central e América do Sul. Possui atividade farmacológica relacionada a presença de seus marcadores, as cumarinas (1,2-benzopirona e umbeliferona). O presente trabalho objetivou o desenvolvimento tecnológico de extratos secos por aspersão a partir das partes aéreas de *J. pectoralis* e a avaliação da toxicidade oral aguda, afim de gerar conhecimento na elaboração e controle de qualidade de insumos fitoterápicos. Foram realizadas as etapas de cultivo, caracterização morfoanatômica, coleta, secagem, pulverização e caracterização do material vegetal, o qual foi utilizado na preparação dos extratos líquidos. Para o estudo da qualidade do material vegetal com base na determinação de cumarinas, uma metodologia por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência foi desenvolvida e validada. O extrato líquido foi obtido por extração assistida por ultrassom (EAU) e o processo foi otimizado por planejamento fatorial Box Behnken (3^3) com avaliação das concentrações das cumarinas pela metodologia de superfície de resposta (MSR) em função dos parâmetros: teor alcoólico (% p/p), tempo (minutos) e proporção droga:solvente (g/mL). O extrato líquido em maior escala foi obtido por percolação com solução hidroetanólica à 20% (p/p). Foi realizada a otimização das condições de secagem por aspersão (*spray drying*) em um modelo fatorial Box Behnken (3^3) associado a MRS, como variável resposta foram analisados os resultados do rendimento da secagem (%), umidade (%), atividade de água e teor de cumarinas (% p/p) em função dos diferentes níveis de temperatura do ar de entrada (°C), vazão do extrato (mL/min) e concentração do adjuvante (% p/p). A toxicidade oral aguda do extrato seco obtido nas condições otimizadas foi avaliada em ratas *Wistar*. Os resultados demonstraram que os parâmetros ótimos para o processo de EAU foram: teor alcoólico 15% (p/p), tempo de extração de 34 minutos e proporção droga: solvente 0,1 g/mL. Para a obtenção do extrato seco por aspersão os parâmetros ótimos foram: temperatura de entrada de 140 °C, fluxo de alimentação de 0,60 L/h e concentração do adjuvante maltodextrina de 48%. A caracterização do material vegetal indica que a planta cultivada no Estado de Goiás corresponde a espécie *J. pectoralis* a qual pode apresentar os mesmos potenciais medicinais da espécie cultivada em outras partes do mundo. As extrações realizadas foram eficientes na obtenção de alto teor de cumarinas e o extrato seco resultante do processo otimizado de secagem demonstrou potencial tecnológico para a obtenção de formas farmacêuticas sólidas, apresentando baixa toxicidade e DL_{50} estimada entre 2000 e 5000 mg/kg.

PALAVRAS-CHAVE: *Justicia*, cumarina, umbeliferona, *spray drying*, extrato padronizado.

ABSTRACT

Justicia pectoralis (Acanthaceae) is an herb of medicinal interest employed in folk medicine in several Latin American countries, as an analgesic, anti-inflammatory and sedative. It is globally known for the properties of its coumarins, especially 1,2-benzopyrone and umbelliferone, which are used as chemical markers in quality control of the medicinal plant. The aim of this work was to develop spray-dried extracts from aerial parts of the *J. pectoralis* and assessment its acute oral toxicity, with a view to obtaining an intermediate to produce herbal medicines and to acquisition the quality control parameters. The species used in the preparation of the liquid extracts was cultivated, collected, dried, pulverized and characterized. The HPLC-UV/VIS analytical method for measurement of 1,2 benzopyrone and umbelliferone was validated. Box-Behnken design and response surface methodology (RSM) were used to investigate the effect of process variables on the ultrasound-assisted extraction (UAE). The ethanol concentration (% w/w), extraction time (min) and material-to-solvent ratio (g/mL) were the variables studied. The liquid extract was achieved on a larger scale by percolation of powdered material using ethanol concentration of 20% (w/w). The optimization of spray drying conditions evaluated the independent variables: inlet air temperature (°C), extract flow (mL/min.), and adjuvant concentration (% w/w), in function of the dependent variables: yield drying (%), moisture (%), water activity, and coumarins content (% w/w) in a Box Behnken factorial design (3³). The acute oral toxicity of the dry extract obtained under the optimized conditions was evaluated in *Wistar* rats. The results demonstrated that the optimal UAE condition was obtained with ethanol concentration of 15% (w/w), time of 34 min and material-to-solvent ratio of 0.1 g mL⁻¹. The optimal conditions for spray drying process were: inlet temperature of 140 ° C, feed flow of 0.60 L/h and adjuvant concentration maltodextrin of 48%. The plant material characterization shows that the plant cultivated in Goiás's state is the *J. pectoralis* and that may present the same medicinal potentials of *J. pectoralis* cultivated in other parts of the world. The extractions were efficient to obtain a high coumarin content and the dry extract resulting from the optimized drying process demonstrated technological potential to made solid medicines. The dry extract obtained under the optimized conditions demonstrated low toxicity with LD₅₀ estimated between 2000 and 5000 mg/kg.

KEYWORDS: *Justicia*, coumarin, umbelliferone, spray drying, standardized extract.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Justicia pectoralis</i> Jacq., aspecto geral da planta em antese.....	21
Figura 2	Mapa com a indicação (pontos vermelhos) da distribuição geográfica da <i>J. pectoralis</i> no Brasil.....	21
Figura 3	Principais metabólitos presentes na <i>J. pectoralis</i>	22
Figura 4	Fluxograma representando a metodologia seguida para o ensaio de toxicidade aguda em dose única, a partir da dose de 300 mg/kg.....	53
Figura 5	<i>J. pectoralis</i> em canteiro cultivado no Horto de Plantas Medicinais do Jardim Botânico de Goiânia.....	55
Figura 6	Folhas de <i>J. pectoralis</i> em vista frontal. Face adaxial (A); Face abaxial (B)	56
Figura 7	Secção transversal da região internervura da lâmina foliar de <i>J. pectoralis</i> , coloração Alcian/Safranina.....	57
Figura 8	Secção transversal do bordo da folha de <i>J. pectoralis</i> ambos em coloração Azul de Alcian/Safranina.....	57
Figura 9	Secção paradérmica da lâmina foliar de <i>J. pectoralis</i> , coloração Azul de Alcian/Safranina.	58
Figura 10	Secção transversal da nervura principal em coloração Azul de Alcian/Safranina.....	58
Figura 11	Secção transversal do pecíolo em coloração Sudam III.....	58
Figura 12	Material vegetal de <i>J. pectoralis</i> , seco e pulverizado, colorações em Azul de Alcian/Safranina, estômatos diacíticos (A) e Tricoma tector pluricelular (B), em coloração de Sudam III, epiderme uniestratificada com presença de tricomas tectores (C).	59
Figura 13	Distribuição granulométrica da droga vegetal de <i>J. pectoralis</i>	61
Figura 14	Cromatograma dos padrões das cumarinas, 1,2-benzopirona e umbeliferona.....	63
Figura 15	Cromatograma da droga vegetal obtida a partir das partes aéreas de <i>J. pectoralis</i>	63
Figura 16	Espectros de absorção na região do UV dos padrões de benzopirona e umbeliferona.....	65
Figura 17	Perfis cromatográficos via CLAE dos padrões de referência de cumarinas (A), extrato líquido concentrado (B) e diluente metanol / água (40:60) (C)	66
Figura 18	Curva padrão de 1,2-benzopirona (A) e umbeliferona (B)	67

Figura 19	Gráficos de superfície de resposta representando a concentração de 1,2-benzopirona em função das variáveis independentes para a extração assistida por ultrassom (EAU) de <i>J. pectoralis</i>	78
Figura 20	Gráficos de superfície de resposta representando a concentração de umbeliferona em função das variáveis independentes para a extração assistida por ultrassom (EAU) de <i>J. pectoralis</i>	79
Figura 21	Correlação entre os valores observados e os valores preditos pelo modelo para a concentração de umbeliferona ($\mu\text{g/mL}$)	80
Figura 22	Correlação entre os valores observados e os valores preditos pelo modelo para a concentração de benzopirona ($\mu\text{g/mL}$)	80
Figura 23	Curva termogravimétrica do padrão de 1,2-benzopirona.....	82
Figura 24	Curva termogravimétrica do padrão de umbeliferona.....	83
Figura 25	Gráficos de superfície de resposta representando o rendimento da secagem (%) em função das variáveis independentes.....	86
Figura 26	Gráficos de superfície de resposta representando a umidade (%) do extrato seco em função das variáveis independentes.....	87
Figura 27	Gráficos de superfície de resposta representando a atividade de água (AW) do extrato seco em função das variáveis independentes.....	88
Figura 28	Gráficos de superfície de resposta representando o teor de umbeliferona (%) presente no extrato seco em função das variáveis independentes.....	89
Figura 29	Gráficos de superfície de resposta representando o teor de benzopirona (%) presente no extrato seco em função das variáveis independentes.....	90
Figura 30	Correlação entre os valores preditos e observados para as respostas avaliadas na secagem dos extratos.....	91
Figura 31	Extrato seco de <i>J. pectoralis</i> visualizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A/B- fotomicrografias da 1 ^a replicata; C/D- fotomicrografias da 2 ^a replicata; G/H- fotomicrografias da 3 ^a replicata....	94
Figura 32	Gráfico da massa corporal relativa das ratas <i>Wistar</i> , durante teste de toxicidade oral aguda do extrato seco das partes aéreas de <i>J. pectoralis</i> padronizado em cumarinas.....	96
Figura 33	Gráfico do consumo relativo de ração das ratas <i>Wistar</i> , durante teste de toxicidade oral aguda do extrato seco das partes aéreas de <i>J. pectoralis</i>	97
Figura 34	Gráfico do consumo relativo de água das ratas <i>Wistar</i> , durante teste de toxicidade oral aguda do extrato seco das partes aéreas de <i>J. pectoralis</i> padronizado em cumarinas.	97
Figura 35	Gráfico da massa relativa dos rins (A) e do fígado (B), das ratas <i>Wistar</i> , ao término do teste de toxicidade oral aguda do extrato seco das partes aéreas de <i>J. pectoralis</i> padronizado em cumarinas.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros da metodologia de CLAE para avaliação de 1,2-benzopirona e umbeliferona nos extratos de <i>J. pectoralis</i>	40
Tabela 2	Variáveis independentes e seus níveis, avaliados por MSR, para otimização da extração assistida por ultrassom de cumarinas em <i>J. pectoralis</i> , 1º planejamento fatorial.....	43
Tabela 3	Variáveis independentes e seus níveis, avaliados por MSR, para otimização da extração assistida por ultrassom de cumarinas <i>J. pectoralis</i> , 2º planejamento fatorial.....	43
Tabela 4	Parâmetros de secagem por aspersão (<i>spray drying</i>) para avaliação de duas diferentes condições referentes ao adjuvante de secagem.....	47
Tabela 5	Variáveis independentes e seus níveis avaliados pela metodologia de superfície de resposta para otimização do processo de secagem por aspersão (<i>spray drying</i>) do extrato líquido.....	48
Tabela 6	Classes de metabólitos secundários encontradas no pó das partes aéreas de <i>J. pectoralis</i>	61
Tabela 7	Valores médios (\pm DP) dos critérios de adequabilidade do sistema (<i>System suitability</i>) obtidos a partir de seis avaliações dos marcadores.....	65
Tabela 8	Áreas dos picos dos padrões de 1,2-benzopirona e umbeliferona utilizadas na construção da curva padrão.....	68
Tabela 9	Resumo dos parâmetros da curva de calibração de umbeliferona e 1,2 benzopirona.....	69
Tabela 10	Dados da precisão do método analítico por CLAE na repetibilidade e níveis de precisão intermediária para a quantificação de cumarinas no extrato líquido.....	70
Tabela 11	Recuperação do padrão de umbeliferona adicionado à amostra.....	71
Tabela 12	Recuperação do padrão de 1,2-benzopirona adicionado à amostra.....	71
Tabela 13	Parâmetros cromatográficos no teste de robustez do método analítico de CLAE para quantificação de umbeliferona.....	72
Tabela 14	Parâmetros cromatográficos no teste de robustez do método analítico por CLAE para quantificação de 1,2-benzopirona.....	73
Tabela 15	Matriz experimental do modelo Box Behnken (3^3) e concentração de 1,2-benzopirona e umbeliferona para a EAU de <i>J. pectoralis</i>	75
Tabela 16	Análise variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrática polinomial para umbeliferona, valores de <i>p</i> e <i>F</i> para efeitos lineares (L), quadráticos (Q) e interações, das variáveis independentes avaliadas pelo modelo Box Behnken (3^3) na otimização da EAU.....	76

Tabela 17	Análise variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrática polinomial para 1,2-benzopirona, valores de p e F para efeitos lineares (L), quadráticos (Q) e interações, das variáveis independentes avaliadas pelo modelo Box Behnken (3^3) na otimização da EAU.....	76
Tabela 18	Caracterização do extrato líquido das partes aéreas de <i>J. pectoralis</i>	81
Tabela 19	Matriz experimental do modelo Box Behnken (3^3) e seus respectivos resultados de rendimento e testes de caracterização dos extratos secos obtidos por aspersão (<i>spray drying</i>)	84
Tabela 20	Sumário dos efeitos das variáveis independentes sobre as respostas avaliadas no planejamento Box Behnken (3^3) na obtenção do extrato seco de <i>J. pectoralis</i>	85
Tabela 21	Valores preditos para rendimento e dados de caracterização do extrato seco obtido das partes aéreas de <i>J. pectoralis</i> por aspersão (<i>spray drying</i>).....	92
Tabela 22	Valores reais para rendimento e dados de caracterização do extrato seco.....	92
Tabela 23	Resultados da avaliação de fluxo dos pós obtidos nas 3 replicatas da secagem do extrato de <i>J. pectoralis</i> por <i>spray drying</i>	95
Tabela 24	Sinais clínicos apresentados por ratas <i>Wistar</i> , durante as primeiras 8 horas do teste de toxicidade oral aguda do extrato seco das partes aéreas de <i>J. pectoralis</i> padronizado em cumarinas.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA – Análise de variância
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATG – Atividade Termogravimétrica
- CLAE – Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
- DPR – Desvio Padrão Relativo
- EAU – Extração Assistida por Ultrassom
- ICH – Conferência internacional de harmonização de requerimentos técnicos para registro de fórmulas farmacêuticas para uso humano
- LD – Limite de Detecção
- LQ – Limite de Quantificação
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
- r – Coeficiente de correlação
- r^2 – Coeficiente de determinação
- RDC – Resolução de Diretoria Colegiada
- RE – Resolução
- RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
- Tr – Tempo de retenção
- UEG – Universidade Estadual de Goiás
- UV – Ultravioleta
- WHO – Organização mundial da saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 <i>Justicia pectoralis</i> JACQ. (ACANTHACEAE).....	20
1.2 PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS	24
1.3 PROCESSOS EXTRATIVOS.....	25
1.4 PROCESSO DE SECAGEM	27
1.5 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS	30
1.6 JUSTIFICATIVA	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3. METODOLOGIA	34
3.1 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DO ESPÉCIME DE <i>J. pectoralis</i>	34
3.1.1 Material botânico	34
3.1.2 Descrição morfológica da planta	34
3.1.3 Descrição macroscópica foliar	35
3.1.4 Descrição microscópica.....	35
3.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL	35
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL.....	35
3.3.1 Identificação microscópica	36
3.3.2 Determinação de umidade.....	36
3.3.3 Determinação de cinzas totais	36
3.3.4 Determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico.....	37
3.3.5 Análise granulométrica.....	37
3.3.6 Prospeção fitoquímica	38
3.3.7 Perfil cromatográfico	38

3.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BENZOPIRONA E UMBELIFERONA POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	38
3.4.1 Identificação de constituintes e seleção do marcador químico	39
3.4.2 Validação da metodologia analítica	39
3.4.2.1 Adequabilidade do sistema	40
3.4.2.2 Especificidade	40
3.4.2.3 Linearidade	40
3.4.2.4 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	41
3.4.2.5 Precisão.....	41
3.4.2.6 Exatidão.....	41
3.4.2.7 Robustez	42
3.5 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS	42
3.5.1 Otimização das condições de EAU para a obtenção de cumarinas a partir de <i>J. pectoralis</i>.....	43
3.5.2 Obtenção do extrato líquido por percolação	44
3.5.3 Caracterização do extrato líquido	45
3.5.3.1 Determinação de Sólidos Totais	45
3.5.3.2 Determinação do pH.....	45
3.5.3.3 Determinação da densidade relativa.....	45
3.5.3.4 Doseamento de 1,2-benzopirona e umbeliferona	46
3.5.3.5 Viscosidade.....	46
3.6 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DAS PARTES AÉREAS DE <i>J. pectoralis</i>	46
3.6.1 Análise termogravimétrica (ATG) dos padrões de cumarinas	46
3.6.2 Delineamento experimental.....	47
3.6.3 Otimização da secagem dos extratos por aspersão (<i>spray drying</i>).....	47
3.6.4 Rendimento e caracterização dos extratos secos obtidos nas condições de secagem otimizadas	48
3.6.4.1 Determinação do Rendimento de Secagem	48

3.6.4.2 Determinação da umidade	49
3.6.4.3 Determinação da atividade de água	49
3.6.4.4 Determinação do teor de 1,2-benzopirona e umbeliferona por CLAE.....	49
3.6.4.5 Reprodução das condições de secagem otimizadas.	49
3.6.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	49
3.6.6 Densidade aparente (ρ_a).....	50
3.6.7 Densidade compactada (ρ_c)	50
3.6.8 Fator de Hausner (FH) e Índice de Carr (IC)	50
3.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EXTRATO SECO PADRONIZADO EM CUMARINAS DE <i>J. pectoralis</i> EM RATAS <i>Wistar</i>	51
3.7.1 Aspectos éticos	51
3.7.2 Animais.....	51
3.7.3 Preparo da amostra para administração em roedores.....	51
3.7.4 Toxicidade oral aguda.....	52
3.7.5 Avaliação ponderal.....	54
3.7.6 Análise estatística	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 DESCRIÇÃO MORFOANATÔMICA DO ESPÉCIME DE <i>J. pectoralis</i>	55
4.1.1 Descrição morfológica da planta	55
4.1.2 Descrição macroscópica foliar	56
4.1.3 Descrição microscópica.....	56
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL	59
4.2.1 Identificação microscópica	59
4.2.2 Determinação de umidade	59
4.2.3 Determinação de cinzas totais	60
4.2.4 Determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico.....	60
4.2.5 Análise Granulométrica.....	60
4.2.6 Prospecção fitoquímica	61
4.2.7 Perfil cromatográfico	62

4.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BENZOPIRONA E UMBELIFERONA POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	63
4.4.1 Identificação de constituintes e seleção do marcador químico	64
4.4.2 Validação da metodologia analítica	65
4.4.2.1 Adequabilidade do sistema	65
4.4.2.2 Especificidade	66
4.4.2.3 Linearidade	67
4.4.2.4 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	68
4.4.2.5 Precisão.....	69
4.4.2.6 Exatidão.....	70
4.4.2.7 Robustez	71
4.5 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS	73
4.5.1 Otimização das condições de EAU de cumarinas a partir das partes aéreas de <i>J. pectoralis</i>.	73
4.5.2 Caracterização do extrato líquido	81
4.6 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DAS PARTES AÉREAS DE <i>J. pectoralis</i>	82
4.6.1. Análise termogravimétrica (ATG) dos padrões de cumarinas	82
4.6.2. Delineamento experimental.....	83
4.6.3 Otimização da secagem dos extratos por aspersão (<i>spray drying</i>).....	84
4.6.4 Rendimento e caracterização dos extratos secos obtidos nas condições de secagem otimizadas	91
4.6.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	93
4.6.6 Avaliação de fluidez do pó extrato seco	94
4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>J. pectoralis</i> EM RATAS <i>Wistar</i>	95
4.7.1 Toxicidade oral aguda e observação dos sinais de toxicidade (<i>screening hipocrático</i>)	95

4.7.2 Avaliação ponderal.....	96
5 CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
ANEXO I.....	110

1 INTRODUÇÃO

A investigação de produtos naturais sempre foi objeto de inúmeros estudos e tem fornecido notável contribuição na busca de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. Porém, ao avaliar sua evolução, observa-se uma significativa queda de interesse em meados da década de 1960, provavelmente em função da complexidade química dos produtos naturais e difícil obtenção através da utilização de processos muitas vezes lentos, caros e que resultavam em quantidades ínfimas, não suficientes para conclusão dos estudos. Contudo, estes obstáculos têm sido contornados com os avanços tecnológicos alcançados, como o desenvolvimento de técnicas para aquisição, isolamento e elucidação estrutural, métodos de triagem biológica (que permitem avaliar uma grande quantidade de amostras em um tempo relativamente curto) e métodos extrativos mais eficientes. Com isso, a investigação de produtos naturais tornou-se novamente alvo do interesse de pesquisadores e do mercado farmacêutico (SIMÕES et al., 2017).

Em análise feita por Newman e Cragg (2016) relacionando o registro de novos medicamentos junto à agência reguladora norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) entre os anos de 1981 e 2014, foi demonstrado que 65% dos registros neste período foram de produtos naturais ou derivados de produtos naturais.

No Brasil, os fitoterápicos e as plantas medicinais são a classe de produtos que possuem maior potencialidade de crescimento. As vendas têm crescido de 10 a 15% ao ano, porém ainda com participação de apenas 2% do mercado de medicamentos (BRASIL, 2010). Além disso, mais de 80% da população do mundo em desenvolvimento usam a medicina tradicional, incluindo remédios à base de plantas na gestão da saúde. Em 2008, nos Estados Unidos da América, movimentou-se 14,8 bilhões de dólares na aquisição de produtos naturais (OMS, 2013).

Diante desse mercado em ascensão, intensificou-se nos últimos anos a cooperação regional e internacional para regulamentação dos produtos fitoterápicos no sentido de estabelecer sistemas regulatórios eficazes para o registro, garantia de qualidade e segurança dos medicamentos fitoterápicos. Estes esforços tiveram como resultado recente a criação de uma rede global de regulamentação, a *International Regulatory Cooperation for Herbal Medicines* (IRCH), através da qual a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem implementado periodicamente, diretrizes técnicas aos seus países membros para que garantam

progressivamente a segurança, eficácia e controle de qualidade dos medicamentos de origem vegetal (OMS, 2013).

A agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA), órgão brasileiro de regulamentação sanitária tem trabalhado no sentido de atender às diretrizes da OMS. Para tanto, são considerados marcos regulatórios importantes as publicações da Portaria nº 971 que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2006a) e do decreto 5813 que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006b).

Em 2009, o Ministério da Saúde através do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), a qual apresenta as plantas medicinais com potencial para gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS). A finalidade da lista é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração de fitoterápicos para uso da população, com segurança e eficácia (BRASIL, 2009).

A legislação sanitária brasileira define fitoterápico como o produto obtido exclusivamente de matéria-prima ativa vegetal, com finalidade profilática, curativa ou paliativa e não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais. Dentre os fitoterápicos incluem-se o medicamento fitoterápico (MF) e o produto tradicional fitoterápico (PTF), podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal. O insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) é a matéria-prima ativa vegetal, ou seja, droga ou derivado vegetal, utilizado no processo de fabricação de um fitoterápico (BRASIL, 2014). Para o registro, manipulação/produção e comercialização de MF, PTF e IFAV, o Brasil tem normas sanitárias e uma legislação rígida que solicitam comprovações científicas de segurança e eficácia.

Dentre as exigências da ANVISA previstas na Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 26/2014 (BRASIL, 2014), está a realização de testes para a comprovação da qualidade, como a caracterização físico-química do derivado vegetal, incluindo:

- Para extratos fluidos: caracterização, resíduo seco, pH, teor alcoólico e densidade relativa;
- Para extratos secos: determinação de umidade, solubilidade e densidade aparente;

A produção adequada de um fitoterápico, como fator determinante na constância da qualidade do produto e conformidade regulatória frente a legislação vigente (RDC nº26, de 13

de maio de 2014), necessita do monitoramento de todo o processo produtivo, que envolve desde a caracterização botânica da matéria-prima vegetal, processo extrativo, processo farmacotécnico, caracterização/avaliação de qualidade dos insumos e dos princípios bioativos e consolidação do produto final. Para tanto, torna-se necessário o conhecimento intrínseco tanto do material vegetal de interesse, quanto dos processos a serem aplicados para seu processamento (BRASIL, 2014).

1.1 *Justicia pectoralis* JACQ. (ACANTHACEAE)

No Brasil a família Acanthaceae compreende cerca de 45 gêneros, 706 espécies e 9 variedades, as quais estão distribuídas nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (PROFICE et al., 2015).

O gênero *Justicia* é um dos maiores da família Acanthaceae, sendo constituído mundialmente por cerca de 4000 espécies que abrangem uma gama de diversidade morfológica, habitats e padrões biogeográficos (MCDADE; DANIEL; KIEL, 2008). Muitas das espécies de *Justicia* são utilizadas como ornamentais e algumas também possuem importância forrageira e ecológica, sendo abundantes em florestas úmidas e dominantes em ambientes semiáridos (EZCURRA, 2002). Estudos fitoquímicos têm revelado que algumas espécies desta família também são promissoras do ponto de vista farmacológico (CABRAL et al., 2012; CORTÊS; RAPINI, 2013). No Brasil, o gênero *Justicia* é representado por 196 espécies e 2 variedades (PROFICE et al., 2015).

A espécie *Justicia pectoralis* Jacq. (Figura 1) é uma planta de porte arbustivo, amplamente distribuída na América Latina. No Brasil é conhecida popularmente como “chambá”, “anador” e “trevo-cumarú”, sendo utilizada em preparações caseiras para o tratamento da tosse, bronquite e asma, sobretudo na região Nordeste (VIANA; LEAL; VASCONCELOS, 2013). Em Cuba e na América Central é conhecida como “Tilo”. Esta espécie cresce selvagem em campos montanhosos, sendo encontrada também em Porto Rico, Santo Domingo, Haiti, Jamaica e na América Tropical Continental (MARTÍN-VIAÑA et al., 2011; SILVA; COSTA; CASTRO, 2000). Nestas regiões é amplamente utilizada pela população devido às suas propriedades sedativa, calmante e redutora de sintomas da menopausa. Apresenta duas principais variedades conhecidas: *J. pectoralis* var. *pectoralis* e *J. pectoralis* var. *stenophylla*; a primeira é a mais estudada, o que permitiu, desde 1992, seu uso como sedativo pelo sistema nacional de saúde cubano. Entre os bioativos presentes nesta espécie estão cumarinas, betaína, flavonoides, saponinas, aminoácidos entre outros. Porém, as

cumarinas são o principal componente dos extratos obtidos a partir desta planta (MARTÍN-VIAÑA et al.,2011).

Figura 1 – *Justicia pectoralis* Jacq., aspecto geral da planta em antese cultivada no horto de plantas medicinais da Universidade Estadual de Goiás, campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas.



Fonte: Lima (2016).

Justicia pectoralis é uma espécie considerada nativa do Brasil, com substrato terrícola e que, em território brasileiro ocorre nos estados da região Norte (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima), Nordeste (Ceará e Maranhão) e Centro-Oeste (Goiás e Mato Grosso) (PROFICE et al., 2015) (Figura 2).

Figura 2 – Mapa com a indicação (pontos vermelhos) da distribuição geográfica da *J. pectoralis* no Brasil.

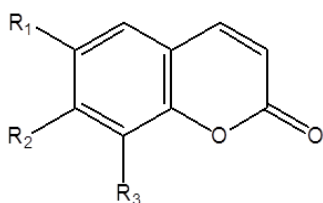


Fonte: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (2015).

As espécies do gênero *Justicia* apresentam semelhanças morfológicas entre si, compartilham alguns nomes populares e indicações fitoterápicas. Dentre os seus vários epítetos, "Chambá" e "Anador" são os mais empregados no Nordeste e Centro-Oeste brasileiro tanto para *J. pectoralis*, quanto para *J. gendarussa*, porém ensaios fitoquímicos realizados por Oliveira e Andrade (2000) com *J. gendarussa*, verificaram a ausência de alcaloides e cumarinas nesta planta, já a espécie *J. pectoralis* apresentou forte presença de cumarinas.

Análises fitoquímicas e processos tecnológicos para obtenção do extrato seco e do extrato hidroalcoólico de *J. pectoralis* confirmam que as cumarinas (1,2-benzopirona e umbeliferona) (Figura 3) são os principais componentes das partes aéreas da planta, utilizadas como marcadores no controle de qualidade do produto vegetal derivado da *J. pectoralis* (CHANFRAU; RODRIGUEZ, 2014; OLIVEIRA et al., 2000).

Figura 3 - Principais metabólitos presentes na espécie *J. pectoralis*.



R1 = R2 = R3 = H; 1,2-benzopirona

R1 = R3 = H, R2 = OH; umbeliferona

No estudo comparativo entre cinco plantas medicinais brasileiras contendo cumarinas, *Torresea cearensis* Fr. All. (Fabaceae), *J. pectoralis*, *Eclipta alba* Hassk. (Asteraceae), *Pterodon polygaliflorus* Benth. (Fabaceae) e *Hybanthus ipecacuanha* Oken. (Violaceae), foram avaliadas as atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e broncodilatadora (LEAL et al., 2000). O extrato hidroetanólico (etanol 20%) das folhas de *J. pectoralis* apresentou efeito antinociceptivo significativo em camundongos *Swiss* machos, redução do edema de pata induzido por carragenina (quando administrada por via intraperitoneal) e atividade broncodilatadora em isolados de traqueias pré-contraídos de cobaias, o que justifica o seu uso tradicional no tratamento de doenças do trato respiratório. As cumarinas e outros metabólitos (por exemplo, taninos e flavonoides) são, provavelmente, responsáveis pelas atividades da espécie *J. pectoralis* (LEAL et al., 2000). Na inflamação induzida por carragenina os resultados obtidos com o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *J. pectoralis*, demonstraram que as cumarinas 1,2- benzopirona e umbeliferona têm um mecanismo de ação semelhante ao da

indometacina e fenilbutazona, com duração do efeito anti-inflamatório por pelo menos 3 horas. Por outro lado, apenas a 1,2-benzopirona foi eficaz na diminuição do edema de pata de rato induzido por dextrano, indicando que esta substância pode também atuar como estabilizador de membrana especialmente em mastócitos, impedindo a sua degradação e a liberação de mediadores inflamatórios, tais como histamina e serotonina. Surpreendentemente, o extrato de *J. pectoralis* e a umbeliferona não mostraram qualquer efeito neste modelo (LINO et al., 1997).

Estudos de Trueba e colaboradores (2001) confirmaram a ação antioxidante do extrato seco das partes aéreas de *J. pectoralis* devido a presença de seus metabólitos polifenólicos. Além disso, Varón e colaboradores (2007) demonstraram maior atividade antioxidante para os extratos aquosos de *J. pectoralis* do que o observado com extratos obtidos em acetato de etila, sendo relatada também concentrações mais elevadas de compostos fenólicos nas frações aquosas.

Pesquisas realizadas em Cuba, onde formas farmacêuticas para o medicamento fitoterápico do extrato de *J. pectoralis* padronizado em cumarina (Tilo®) já estão em desenvolvimento, demonstraram que ratos tratados com os comprimidos de Tilo® apresentaram um comportamento antiagressivo, resultado este possivelmente mediado por efeitos inibitórios sobre a ação das aminas biogênicas do cérebro ou sobre a liberação de neurotransmissores excitatórios, sugerindo um efeito inibidor sobre o sistema nervoso central. Esta hipótese foi reforçada pelo aumento do tempo de sono nos grupos tratados com o composto teste no modelo de sono induzido por tiopental. Resultados semelhantes foram observados durante os estudos das matérias-primas e confirmam o efeito sedativo dos comprimidos de Tilo® (CHANFRAU; FIGUEREDO; MORENO, 2015).

No Brasil, estudos clínicos preliminares do xarope de “chambá” (matérias-primas ativas: *Plectranthus amboinicus* e *Justicia pectoralis* var. *sthenophylla*) no tratamento de pacientes com asma leve a moderada (37 pacientes) avaliaram a eficácia do produto administrado diariamente durante 1-2 semanas (NOBRE et al., 2006). Uma semana após o tratamento com o xarope de chambá, os pacientes apresentaram diminuição da obstrução das vias aéreas com aumento do volume expiratório forçado no 1º segundo, aumento da capacidade vital forçada e do fluxo expiratório máximo de 14,5; 14,0 e 9,0%, respectivamente. Além disso, observou-se uma melhora na expectoração e a ausência de efeito colateral (VIANA; LEAL; VASCONCELOS, 2013).

1.2 PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS

Em geral, todos os medicamentos, sejam eles sintéticos ou de origem vegetal, devem satisfazer os requisitos básicos de segurança e eficácia (BRASIL, 2014; OMS, 2013). A matéria-prima vegetal está propensa a uma grande variação de seus constituintes, devido a vários fatores, como local de coleta (ex. plantas nativas e naturalizadas), tempo e época de coleta, diferentes condições ambientais (causas primárias como luz, umidade) e variações genotípicas e quimiotípicas, presença de xenobióticos (substâncias químicas estranhas encontradas dentro de um organismo que naturalmente não se espera que ocorram) (KUNLE et al., 2012). Desta forma, há necessidade de testes de controle de qualidade para garantir a uniformidade tanto para a droga vegetal quanto para o medicamento fitoterápico (AHMED; HASAN, 2015).

A palavra padronização deve englobar todo o campo de estudo, desde o cultivo de plantas medicinais até a sua aplicação clínica e focar todos os aspectos desde a etnofarmacologia (uso medicinal tradicional), utilização (como uso de plantas em doenças específicas), isolamento e identificação de agentes ativos para avaliação da eficácia, segurança, formulação e avaliação clínica. A padronização garante que a substância correta se apresente em quantidade correta para o efeito terapêutico desejado com segurança, qualidade e eficácia (SHUKLA; SARAF; SARAF, 2009).

O controle de qualidade de insumos farmacêuticos ativos vegetais necessita da avaliação constante de fontes de variabilidade química do insumo, de maneira que seja possível estabelecer especificações de concentrações para compostos que estejam relacionados ou que sejam indicativos da resposta clínica (SOARES; FARIAS, 2017). Deve ser realizado através da aplicação de métodos químicos, físico-químicos e biológicos específicos, os quais devem ser aplicados em toda a cadeia produtiva, abrangendo a qualificação da matéria-prima, insumos e produto acabado, compreendendo os fatores de autenticidade, integridade e pureza (KUNLE et al., 2012; ZOU et al., 2013).

Neste contexto, na avaliação da qualidade de um material vegetal, podem estar envolvidas análises para a caracterização organoléptica, identificação macroscópica e microscópica do órgão vegetal, pesquisa de materiais estranhos, contaminantes biológicos, umidade, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido e análises qualitativas e quantitativas dos marcadores químicos (compostos ou classe de compostos presentes na matéria-prima vegetal, correlacionado com o efeito terapêutico e utilizado como referência no controle de qualidade dos produtos derivados da espécie) (BRASIL, 2014; FONSECA, 2009).

Padrões para fitoterápicos estão sendo desenvolvidos em todo o mundo, mas ainda não há consenso sobre como estes devem ser adotados. A padronização, a estabilidade e o controle de qualidade para esta classe de medicamentos são viáveis, mas difíceis de realizar (MATHEW; BABU, 2011).

Padronizar um extrato, portanto, significa estabelecer a relação ideal entre droga vegetal e extrato, e entre extrato e marcador. Muitos extratos são comercializados sem ao menos apresentar a concentração dos princípios ativos. A utilização de extratos padronizados colabora significativamente para assegurar a eficácia de um fitoterápico, garantindo sua segurança e qualidade (ISAAC et al., 2008). O uso de extratos padronizados centrados em grupos específicos de princípios ativos visando garantir a homogeneidade química do produto lote a lote, pode contribuir para a melhoria da qualidade das matérias-primas vegetais e, conseqüentemente, dos medicamentos assim elaborados (BARA et al., 2006; CALIXTO, 2000).

Entre os vários métodos analíticos empregados para a avaliação qualitativa e quantitativa dos marcadores químicos em fitoterápicos, as análises via cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) têm se destacado como uma das técnicas mais aplicadas, em virtude de sua ampla capacidade de análise, alta especificidade, seletividade e repetibilidade.

1.3 PROCESSOS EXTRATIVOS

O estudo das plantas medicinais começa com a pré-extração e extração, os quais são passos importantes no processamento dos constituintes bioativos. Métodos tradicionais, como maceração, percolação e extração de Soxhlet são comumente usados no ambiente de pesquisa ou até mesmo em pequenas empresas, porém apresentam limitações à produção de fitoterápicos, que estão relacionadas ao seu rendimento, alto consumo de solvente e custo de produção. Estas limitações impulsionaram estudos que resultaram em importantes avanços no processamento de plantas medicinais, com o desenvolvimento de modernos métodos de extração. Dentre estes métodos podem ser citados, a extração por micro-ondas (AZWANIDA, 2015), extração assistida por ultrassom (PAULA et al., 2016), extração com fluidos supercríticos (MUSHTAQ et al., 2014) e extração a quente com fluido pressurizado (CAMEL, 2001), os quais têm por objetivo comum aumentar o rendimento e diminuir o custo do processo extrativo. Além disso, as modificações nestes métodos são desenvolvidas continuamente, disponibilizando uma grande variedade de possibilidades extrativas. Portanto, com a variedade de métodos existentes, a seleção do método de extração adequado requer uma avaliação

meticulosa que deve ir além da simples comparação dos rendimentos do extrato bruto, gerando a necessidade de conhecer o fundamento e o impacto de cada técnica ao composto bioativo de interesse (GHOSH; HAQ; CHAKRABORTY, 2011; MUSHTAQ et al., 2014; PAULA et al., 2016; ZHOU et al., 2016).

Entre as técnicas mais recentes, a extração assistida por ultrassom (EAU) tem se destacado por ser uma alternativa com menor consumo de solvente, simples e eficiente, e que tem sido amplamente aplicada na obtenção de extratos em escala laboratorial de forma rápida e econômica, para fins de análises de controle de qualidade. Seu mecanismo de extração envolve cavitação, forças mecânicas e impacto térmico (ILBAY, SAHIN, KIRBASLAR, 2013; PAULA et al., 2016; WANG et al., 2013; ZOU et al., 2013).

A sonicação promove a formação de cavidades, para onde os gases dissolvidos no sistema migram, formando microbolhas, que aumentam e diminuem de tamanho, gerando ciclos de expansão, compressão e implosão, liberando calor e exercendo elevada pressão nas regiões próximas à implosão (CÁRCEL et al., 2012). As colisões causadas por este ciclo fazem com que a célula vegetal seja rompida, facilitando a difusão do solvente extrator para o interior da matriz (PATIST; BATES, 2008). Soma-se ainda a este processo, o calor liberado pelas implosões, que aumenta a solubilidade do soluto e favorece o aumento da eficiência da extração, possibilitando, simultaneamente, agitar a mistura e extrair os compostos em um tempo muito curto e utilizando pequena quantidade de solvente (CHEMAT; HUMA; KHAN, 2011; VILKHU et al., 2008).

Há evidências de que a EAU facilita o processo de extração de uma variedade de componentes alimentares (por exemplo, óleos, proteínas, polissacarídeos), bem como ingredientes bioativos (por exemplo, antioxidantes) de recursos vegetais e animais (VILKHU et al., 2008).

Estudos de Wong Paz e colaboradores (2015), para avaliação do uso da EAU de polifenóis de plantas nativas do deserto mexicano demonstraram a eficiência do método nas preparações antioxidantes, com tempo médio de extração de 40 minutos e uso de solução hidroetanólica 35% (v/v).

Conforme Pradal e colaboradores (2016), a técnica de EAU tem sido largamente aplicada para a extração de antioxidantes devido à sua elevada eficiência em termos de rendimento de recuperação e taxa de extração. O processo de EAU para a obtenção de um insumo antioxidante, proveniente de polifenóis da espécie *Cichorium intybus* L. var. *sativum* (Asteraceae), mostrou-se adequado. Durante estudos preliminares foi possível identificar o

tempo de extração, o teor de etanol no solvente, a temperatura e a potência do ultrassom, como os principais parâmetros que influenciam o processo de extração (PRADAL et al., 2016).

Pesquisas para a avaliação cinética do processo de EAU de polifenóis a partir da casca de *Picea abies* (Pinaceae) característica da área dos Cárpatos (Romênia), demonstraram que o efeito do ultrassom no processo de extração melhora significativamente a taxa de extração, sendo o teor de fenólicos duplicado em relação ao processo de extração clássico sem ultrassom. Analisando os dados comparativos entre a EAU à 323 K (Kelvin) por 30 minutos e 333 K por 45 minutos, observou-se que a quantidade recuperada de cada composto fenólico individual aumentou em alguns casos de 1% para 37%, com a elevação da temperatura de 323 para 333 K. Por outro lado, um maior tempo de exposição à ação de ultrassom provocou uma suave diminuição de fenóis, devido à possível ocorrência de processos de degradação (LAZAR et al., 2016).

Experimentos para a otimização do processo de EAU a partir da espécie *Allium ursinum* L. foram realizados por meio de um planejamento *face-centered cubic experimental design* (FDC), de 3 níveis com 4 variáveis, combinado com o método de superfície de resposta (MSR). O modelo polinomial forneceu uma descrição matemática adequada da EAU com respostas direcionadas ao rendimento da extração, teor de fenóis totais, teor de flavonoides totais e atividade antioxidante. A otimização das condições de extração, a fim de proporcionar rendimentos máximos para cada resposta observada, foi efetiva e os efeitos dominantes observados no processo de EAU de *A. ursinum* foram a temperatura de extração seguida pela concentração de etanol no solvente de extração. A análise estatística e gráfica mostrou que a temperatura teve influência notável em cada resposta direcionada, com exceção à extração de flavonoides totais. A interação de temperatura e energia ultra-sônica levam ainda à diminuição da extração de fenóis totais, provavelmente devido à degradação de constituintes sensíveis. O estudo demonstrou ainda que para uma EAU eficiente de fenóis totais da *A. ursinum* são necessárias temperaturas mais altas e menor potência de ultrassom, já para extração de flavonoides de *A. ursinum* por EAU a concentração de etanol desempenhou um importante papel, devido à necessidade de ajuste da polaridade do solvente (TOMSIK et al., 2016)

1.4 PROCESSO DE SECAGEM

O desenvolvimento tecnológico de extratos secos tem proporcionado uma crescente expansão de formas fitoterápicas sólidas. No Brasil dos 512 medicamentos fitoterápicos registrados até outubro de 2007, 71,93% foram de formas farmacêuticas sólidas (CARVALHO

et al., 2008). A matéria-prima para estes produtos é constituída, majoritariamente, por extratos secos, os quais possuem como vantagens a maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, fácil padronização, maior concentração de compostos ativos e elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Dentre as técnicas de secagem conhecidas, a secagem por aspersão ou atomização (*spray drying*) é uma das principais técnicas aplicadas a extratos vegetais (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Este processo foi reconhecido pela primeira vez há 129 anos, mas os princípios básicos de operação permanecem essencialmente os mesmos, isto é, um processo de energia intensiva, contínua e escalável, que pode gerar partículas de tamanho nanométrico a micrométrico, com distribuição estreita em um período de tempo muito curto (HUANG et al., 2006).

Historicamente a secagem por aspersão tem sido extensivamente utilizada na indústria química e de alimentos, porém seu uso foi rapidamente estendido para outras áreas da indústria, incluindo a farmacêutica, principalmente na obtenção e pureza de insumos ativos. A partir de então, seu emprego tem aumentado ainda mais com a aplicação especializada para microcápsulas, partículas de liberação controlada, micropartículas, nanopartículas e lipossomas (SINGH; MOOTER, 2015). Nesta técnica, pequenas gotas do extrato são geradas por atomização durante a alimentação líquida, o que aumenta a área superficial de contato do extrato líquido com um fluxo de ar quente, provocando uma evaporação muito rápida do solvente, evitando a degradação de compostos bioativos, portanto preservando a bioatividade do extrato (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2015).

A definição das condições de funcionamento e o *design* do secador dependem das características de secagem desejáveis ao produto final (extrato seco) e da especificação requerida do pó. O produto final deve geralmente respeitar padrões de qualidade precisos como, por exemplo, tamanho de partícula, distribuição do tamanho de partícula, massa e densidade das partículas, friabilidade, dispersibilidade e teor de umidade. A massa e a densidade das partículas são importantes uma vez que têm uma influência sobre os custos de transporte, definição de embalagem e até mesmo a cor geral do produto. O teor de umidade, o tamanho de partícula, a distribuição do tamanho de partícula, a morfologia da partícula, a densidade aparente do efeito e fluidez do pó são, da mesma maneira características importantes para a qualidade do pó obtido. A capacidade de controlar tais características é uma grande vantagem do processo de secagem por aspersão em relação a outros métodos de secagem, especialmente quando se trata de produtos de elevado desempenho (alto custo, baixo volume). Muitas

propriedades a granel em pó e em partículas estão relacionadas à morfologia das partículas (WALTON; MUMFORD, 1999).

A introdução do conceito de difusão seletiva de Thijssen durante a década de 1970, levou a uma maior compreensão de como as variáveis do processo, como a temperatura do ar de secagem, fluxo de alimentação, porcentagem de adjuvantes e condições de atomização podem ser otimizadas para dar maior retenção volátil, por exemplo, aroma e sabor de produtos alimentícios. Do mesmo modo, estudos morfológicos sobre partículas secas proporcionam uma visão valiosa dos fundamentos da secagem de gotículas, assim como das suas características físico-químicas. Esses estudos permitem a comparação das taxas de secagem entre diferentes produtos e a seleção e melhoria das condições do processo, proporcionando uma concepção e simulação do processo de secagem (WALTON; MUMFORD, 1999).

A secagem por aspersão é uma abordagem eficiente de microencapsulação para bioativos (BAKAR et al., 2013; SOUKOULIS et al., 2014; SUN-WATERHOUSE; WADHWA; WATERHOUSE, 2013). Porém a aderência do pó após secagem é um importante problema de derivados vegetais, principalmente aos que apresentam altas concentrações de açúcares de baixo peso molecular e ácidos orgânicos (BHANDARI et al., 1997). Adjuvantes de secagem de elevado peso molecular, tais como a maltodextrina e o dióxido de silício coloidal, são frequentemente adicionados ao extrato líquido antes da secagem por pulverização para contornar este problema, reduzindo ao mesmo tempo a higroscopicidade do pó (RIGHETTO; NETTO, 2005; SAÉNZ et al., 2009).

As maltodextrinas, que compreendem a unidades de D-glicose ligadas principalmente através de ligações glicosídicas (1 → 4), são consideradas seguras pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA e têm sido amplamente utilizadas nos processos de secagem por *spray drying* para produtos alimentícios (BAKAR et al., 2013; VILLACREZ; CARRIAZO; OSORIO, 2014).

Sun-Waterhouse e Waterhouse (2015), em seu trabalho para o desenvolvimento de um processo por *spray drying* para dispersos do suco de kiwi verde e dourado, descreveram o método de secagem por aspersão como eficaz para preservar, através da encapsulação *in situ*, os pigmentos e antioxidantes incluindo vitamina C, fenólicos e carotenoides do sumo de kiwi, produzindo pós com densidade desejável para embalagem (isto é, 0,40-0,57 g/cm³), propriedades satisfatórias de reconstituição em água (eficiência de dissolução 21-28 s, viscosidade 2-23 mPa.s) e boa vida útil (ou seja, baixo risco de deterioração microbiana devido a valores de atividade da água de 0,22-0,28). A maltodextrina foi o adjuvante de secagem escolhido neste estudo, utilizado em quantidade mínima, visando as melhores propriedades

físico-químicas, de segurança e saltares do produto final (SUN-WATERHOUSE; WATERHOUSE, 2015).

O dióxido de silício coloidal, que apresenta elevada superfície específica e alto poder sorvente, é extensivamente empregado e apresenta excelentes resultados na obtenção de produtos secos por aspersão a partir de soluções extrativas de diferentes espécies vegetais (CAMPOS, 1996; SOUZA, 1997; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Porém, conforme a Notificação da Determinação *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*) do dióxido de silício quando adicionado diretamente ou indiretamente a alimentos humanos, emitida pelo FDA (Food and Drug Administration), este adjuvante apresenta perfil de toxicidade aguda de moderado a baixa, sendo seu uso aprovado e classificado como seguro em concentrações de até 2% (p/p) em alimentos, o que limita em muito o emprego do dióxido de silício como adjuvante em processos de secagem de extratos com baixo teor de sólidos.

A influência da concentração de dióxido de silício coloidal foi analisada na secagem de soluções extrativas de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek. (Celastraceae), em que a adição deste adjuvante a 10% (p/p) e a 20% (p/p), em relação ao teor de sólidos na solução extrativa, causou redução significativa na higroscopicidade dos produtos secos, não ocorrendo formação de aglomerados (CARVALHO, 1997).

Em estudos com o extrato de *Bidens pilosa* L., Cortés-Rojas e colaboradores (2015) concluíram que o processo de secagem por aspersão foi eficaz na produção de extratos secos padronizados, obtendo pós com maior teor de compostos bioativos e maior atividade antioxidante a temperaturas de secagem de entrada menores e com maior fluxo de entrada. A temperatura de secagem mais baixa na saída aumentou o teor de umidade do produto, o que melhorou as propriedades de escoamento. No que diz respeito às composições de secagem, verificou-se que os menores tamanhos de partículas foram obtidos quando a proporção de dióxido de silício aumentou em relação à celulose microcristalina. Observou-se ainda, maior recuperação do produto com maior proporção de dióxido de silício coloidal, maior temperatura de entrada e maior taxa de fluxo de alimentação do extrato (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2015).

1.5 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS

Os ensaios de avaliação da toxicidade de fitoterápicos são exigência das agências regulatórias, uma vez que atestam a segurança do produto (BRASIL, 2014). Sendo assim,

informações sobre a toxicidade *in vitro* e *in vivo* de extratos vegetais são de suma importância para o futuro registro de um fitoterápico produzido a partir dessa matéria-prima vegetal.

Os testes de toxicidade já estão sendo padronizados em ensaios *in vitro*, no entanto, os resultados destes estudos não excluem a necessidade de realização dos ensaios *in vivo*, principalmente porque essa é uma das exigências das Agências Normativas para a liberação do uso de substâncias para a etapa I dos ensaios clínicos em humanos (BRASIL, 2013, 2014). Ademais, os estudos para a determinação de DL₅₀ (dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) e que demandavam número elevado de animais, não são mais necessários, conforme recomendações da ANVISA (BRASIL, 2013), podendo ser utilizados métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um menor número de animais, tais como os preconizados nos guias da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD).

Em relação às espécies de animais mais utilizadas nestes estudos, recomenda-se que os animais apresentem atributos fisiológicos que mais se aproximem dos encontrados em humanos. Ratos, camundongos e coelhos geralmente são os mais utilizados. Entre estes, os ratos fêmeas são as espécies de roedores indicadas pelo *Guideline* 423 (Guia da OECD para testes de toxicidade oral aguda de produtos químicos) (OECD, 2001). Isso se justifica pelo fato dos testes convencionais de DL₅₀ já relatados na literatura terem mostrado pouca diferença na sensibilidade de ambos os sexos, sendo que onde alguma diferença foi observada as fêmeas demonstraram ser mais sensíveis (OECD, 2001).

1.6 JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial da Saúde em seu documento “Estratégia da Medicina Tradicional 2014-2023 – seus objetivos, componentes e resultados esperados frente ao uso de fitoterápicos” estimula o aproveitamento do potencial das plantas medicinais como fonte de medicamentos para a população (OMS, 2013).

No Brasil, em 2016, 7 anos após a criação da RENISUS a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) que estabelece o elenco de medicamentos e insumos, oferecidos pelo governo no âmbito do SUS, possui apenas 12 fitoterápicos (RENAME, 2014), demonstrando a carência de estudos que, além de investigar o potencial terapêutico da nossa biodiversidade, possam aplicar o vasto conhecimento científico já adquirido na obtenção de medicamentos fitoterápicos viáveis que possam ser disponibilizados à população.

A primeira observação que se deve considerar diz respeito à necessidade de aprimoramento da tecnologia farmacêutica na área de fitoterápicos, o que permite um melhor controle de qualidade baseado em tecnologias modernas de identificação, determinação e quantificação de compostos químicos, tornando possível a fabricação de fitoterápicos seguros, eficazes e de efeito totalmente reproduzível. Ademais, os avanços na pesquisa de fitoterápicos em níveis farmacológico, toxicológico e molecular permitiram constatar que estes apresentam um mecanismo de ação total ou parcialmente esclarecido, com avaliação toxicológica segura, e estudos de farmacologia pré-clínica e farmacologia clínica realizados segundo as normas que regem os processos de validação de fármacos puros (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

A espécie *Justicia pectoralis* Jacq. é amplamente conhecida na medicina popular e em programas públicos de fitoterapia, indicada para o tratamento de asma, tosse e bronquite, e está na Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS (RENISUS). Porém sua forma farmacêutica no Brasil é restrita ao xarope, com o extrato hidroalcoólico, o qual apresenta oscilações consideráveis em sua qualidade, como pH, densidade, resíduo de sólidos e teor dos ativos (1,2-benzopirona e umbeliferona) (BRASIL, 2011; FONSECA; SILVA; LEAL, 2010).

Dessa forma, identifica-se a necessidade do desenvolvimento tecnológico do processo de extração das partes aéreas desta espécie, assim como o desenvolvimento de um processo de secagem eficiente para a obtenção de um extrato seco padronizado e a avaliação da sua toxicidade. Contribuindo, portanto, para o desenvolvimento de insumos tecnologicamente elaborados com alto valor agregado, possibilitando o desenvolvimento de fórmulas farmacêuticas sólidas, as quais apresentam maior estabilidade, uniformidade de dosagem e aderência terapêutica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o desenvolvimento tecnológico do extrato seco padronizado em cumarinas obtido das partes aéreas de *J. pectoralis* e avaliação de sua toxicidade oral aguda em ratas *Wistar*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização morfoanatômica das partes aéreas de *J. pectoralis*;
- Caracterizar a droga vegetal obtida a partir das partes aéreas de *J. pectoralis*;
- Desenvolver e otimizar o método de extração assistida por ultrassom para 1,2-benzopirona e umbeliferona presentes nas partes aéreas de *J. pectoralis*;
- Obter e caracterizar o extrato líquido de *J. pectoralis*.;
- Identificar e quantificar os marcadores químicos nos extratos líquido e seco;
- Desenvolver e otimizar o método de secagem por *spray drying*, para obtenção do extrato seco de *J. pectoralis*;
- Padronizar e caracterizar o extrato seco de *J. pectoralis*;
- Avaliar a toxicidade oral aguda do extrato seco padronizado de *J. pectoralis* em ratas *Wistar* conforme preconizado pela OECD;
- Estimar a dose letal 50 (DL₅₀) do extrato seco padronizado de *J. pectoralis* em ratas *Wistar*.

3. METODOLOGIA

3.1 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DO ESPÉCIME DE *J. pectoralis*

As análises morfológicas das partes aéreas de *J. pectoralis* foram realizadas no Laboratório de Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Anápolis.

3.1.1 Material botânico

O material botânico constituído das partes aéreas de *J. pectoralis* foi cultivado no Horto de Plantas Medicinais do Jardim Botânico de Goiânia (Latitude 16°19'36" S; Longitude 48°57'10" O; Altitude 1017m) e no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Anápolis (Latitude 16° 17' 13,8" S; Longitude 48° 57' 22,7" O; Altitude 1.074 m), ambos no estado de Goiás, Brasil. Os cultivos foram realizados em canteiros, com espaçamento aproximado de 40x40 cm, com adubação orgânica, irrigação com água potável e sem o abrigo da luz.

Foi realizada a avaliação do perfil cromatográfico via CLAE dos dois diferente locais de cultivo separadamente. Os cromatogramas demonstraram que em ambos os cultivos, os marcadores químicos característicos da espécie 1,2-benzopirona e umbeliferona foram isolados e identificados, não sendo identificada diferença significativa na constituição dos mesmos.

As coletas foram realizadas, no período da manhã, nos meses de fevereiro, junho e dezembro de 2016. Foram utilizadas plantas adultas completamente expandidas, com e sem florescência, sendo as folhas utilizadas para o estudo morfoantômico, coletadas abaixo do terceiro nó. O material foi identificado pela Profa. Dra. Josana de Castro Peixoto na Universidade Estadual de Goiás (UEG), e as exsicatas foram depositadas no herbário desta universidade, sob os registros HUEG10764 e HUEG11027.

3.1.2 Descrição morfológica da planta

A descrição morfológica da planta foi realizada à vista desarmada e por meio de observação da planta *in natura* e exsicatas, seguindo parâmetros descritos por Oliveira; Akisue (2000) e Oliveira; Akisue (2014).

3.1.3 Descrição macroscópica foliar

A caracterização macroscópica das folhas foi feita à vista desarmada e por meio de observação, segundo parâmetros descritos por Oliveira; Akisue (2000) e Oliveira; Akisue (2014).

3.1.4 Descrição microscópica

Para o estudo morfoanatômico das folhas foram utilizados fragmentos de nervura principal, região de internervura, bordo e pecíolo. Para isso, as amostras foram fixadas em FPA [formaldeído a 37%, ácido propiônico e etanol a 70% na proporção de 1:1:18 - (V/V) por um período de 24 horas e posteriormente conservadas em etanol 70% (V/V) (KRAUS; ARDUIN, 1997). Foram realizadas secções transversais à mão livre dos fragmentos fixados e cortes paradérmicos das faces adaxial e abaxial de folhas frescas. Os cortes foram submetidos ao processo de dupla coloração com azul de Alcian/safranina 9:1, sudam III e cloreto férrico 9% (p/v). As lâminas foram confeccionadas utilizando solução de glicerina 1:1 (KRAUS; ARDUIN, 1997). Os registros fotográficos das estruturas anatômicas foram realizados no Laboratório de Pesquisa Ecológica e Educação Científica da Universidade Estadual de Goiás, em microscópio Leica DM500, com câmera Leica ICC50.

3.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

Após a coleta das partes aéreas de *J. pectoralis* o material vegetal foi limpo e submetido à secagem em estufa com circulação forçada de ar, Marca Solab e modelo SL-102, à 40 °C (\pm 5 °C) até atingir o teor de umidade entre 8 a 14%, conforme especificação da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (V) caracterização de drogas vegetais (BRASIL, 2010). Após a secagem, o material foi triturado em moinho de facas, Marconi MA-580.

O pó obtido foi acondicionado em sacos plásticos escuros, identificado e armazenado em local protegido da luz e umidade até sua utilização nos experimentos.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL

3.3.1 Identificação microscópica

O material vegetal seco e pulverizado foi analisado através do tratamento com corantes reativos adequados a cada tipo de estrutura a ser visualizada, conforme Oliveira e Akisue (2000).

3.3.2 Determinação de umidade

O teor de umidade da droga vegetal foi avaliado em triplicata conforme Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010) utilizando balança com lâmpada de halogênio Shimadzu modelo MOC63u/UniBloc. Foram pesadas amostras de aproximadamente 1g do material vegetal pulverizado, distribuídos de forma uniforme sobre o prato da balança, com tempo de leitura de 5 minutos à temperatura de 105 °C.

3.3.3 Determinação de cinzas totais

Para a determinação de cinzas totais os ensaios foram realizados em triplicata conforme a Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). Pesou-se em balança analítica (GEHAKA modelo AG2205) aproximadamente 1g da amostra pulverizada, os quais foram transferidos para um cadinho de porcelana previamente calcinado, resfriado e pesado. A amostra foi distribuída uniformemente e incinerada em mufla (QUIMIS modelo Q318924), aumentando a temperatura até cerca de 600 °C e obtenção de cinzas brancas. Em seguida, a amostra foi resfriada em dessecador e pesada. A porcentagem de cinzas totais foi calculada em relação a amostra seca conforme fórmula a seguir:

$$\% \text{ teor de cinzas} = \frac{N}{P_1} \times 100$$

Em que:

P₁ – peso inicial da amostra (g);

N – peso de cinzas totais da amostra (g).

3.3.4 Determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico

Na determinação deste parâmetro de qualidade, conforme a Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010) os resíduos obtidos na análise de cinzas totais, foram levados à fervura com ácido clorídrico diluído e filtrado, lavados, incinerados e pesados. O método destina-se à determinação de sílica e constituintes silícicos da droga.

$$\% \text{ teor de cinzas soluveis em ácido} = \frac{(P_2 - P_1)}{P_3} \times 100$$

Em que:

P₁ – peso do cadinho após a calcinação e resfriamento (g);

P₂ – peso do cadinho com a amostra após a calcinação e resfriamento (g);

P₃ – peso inicial da amostra (g).

3.3.5 Análise granulométrica

A determinação da distribuição granulométrica foi realizada em triplicata no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Estadual de Goiás, conforme procedimento descrito na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010).

Foram utilizados os tamises de abertura 250 µm, 425 µm, 850 µm, 1,0 mm, 1,4 mm e 2,0 mm, dispostos de forma que os de maior abertura ficassem sobre os de menor e em fim sobre o receptor. Pesou-se aproximadamente 25g da amostra e transferiu-se para o tamis superior. A agitação foi desenvolvida por meio de dispositivo mecânico (BERTEL modelo 2156) durante 15 minutos. O cálculo do percentual retido em cada tamis foi realizado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Retida pelo tamis} = \frac{P_1}{P_2} \times 100$$

Em que:

P₁ – peso da amostra retida em cada tamis (g);

P₂ – soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (g).

3.3.6 Prospecção fitoquímica

Para a prospecção fitoquímica das partes aéreas de *J. pectoralis* foram realizadas reações de caracterização de compostos fenólicos (fenóis simples, cumarinas, flavonoides, antraquinonas, taninos), compostos nitrogenados (alcaloides) e terpenos (heterosídeos cardioativos), descritas e adaptadas de Costa (2001), Matos (2009), Matos e Matos (1989) e Simões et al. (2017). Para a reação de caracterização de saponinas, foram adaptadas as recomendações da Farmacopeia Brasileira V, volume 1 (BRASIL, 2010).

As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás.

3.3.7 Perfil cromatográfico

Estudos prévios para avaliação do perfil cromatográfico das partes aéreas de *J. pectoralis* foram realizados a fim de identificar a presença dos marcadores químicos, 1,2-benzopirona e umbeliferona. Para tanto, foram preparadas soluções extrativas em etanol a 20% (p/p) na proporção droga/solvente de 1:15 (g/mL) assistidos em equipamento de ultrassom (UNIQUE mod. USC-2800A, frequência 40 kHz e potência 154 W) durante 30 minutos a temperatura ambiente. O extrato foi homogeneizado, filtrado em papel de filtro e posteriormente em membrana de PVDF 0,45 µm para o *vial* apropriado.

O perfil cromatográfico foi desenvolvido em um sistema de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) Varian® ProStar equipado com bomba ternária (modelo 240), injetor automático (modelo 310) e detector de UV (modelo 20599). Foi utilizada coluna C-18 Supelco® (250 x 4,6 mm, 5 µm). As condições cromatográficas para avaliação do perfil foram adaptadas do trabalho de Chanfrau, Hernández e Apan (2008). Foi utilizado como fase móvel metanol:água (40:60). O fluxo foi mantido em 1,0 mL/min., o volume de injeção foi de 20 µL e os cromatogramas foram obtidos com o comprimento de onda de 323 nm.

3.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BENZOPIRONA E UMBELIFERONA POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As análises de CLAE para este trabalho foram realizadas no Laboratório de Análise Instrumental da Universidade Estadual de Goiás. Foi utilizado um sistema de Cromatografia a

Líquido de Alta Eficiência (CLAE) Varian® ProStar equipado com bomba ternária (modelo 240), injetor automático (modelo 310) e detector de UV (modelo 20599). Foi utilizada coluna C-18 Supelco® (250 x 4,6 mm, 5 µm). Os reagentes utilizados para o estudo foram: metanol grau CLAE (J. T. Baker), água purificada através de sistema de osmose reversa, padrões analíticos de umbeliferona e 1,2-benzopirona (Sigma-Aldrich).

3.4.1 Identificação de constituintes e seleção do marcador químico

A partir de dados bibliográficos dos constituintes isolados no extrato líquido das folhas da espécie *J. pectoralis*, os bioativos cumarínicos 1,2-benzopirona e umbeliferona foram selecionados como marcadores a serem identificados e quantificados no perfil cromatográfico dos extratos.

O método analítico por CLAE desenvolvido e validado por Chanfrau, Hernández e Apan (2008), foi escolhido para este estudo, dentre os métodos publicados para a avaliação de cumarinas em *J. pectoralis*, o que melhor se adequou às condições analíticas do Laboratório de Análise Instrumental da Universidade Estadual de Goiás. O método em questão, recebeu uma adaptação relacionada a alteração do comprimento de onda de análise, conforme Fonseca (2009) e curva da varredura dos padrões dos marcadores no ultra-violeta (UV), o comprimento de onda de 323 nm demonstrou ser mais adequado aos estudos que incluem a avaliação simultânea de 1,2-benzopirona e umbeliferona.

3.4.2 Validação da metodologia analítica

A validação da metodologia analítica foi conduzida segundo as orientações estabelecidas pelo ICH (*International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) (ICH, 2005), pela Resolução – RE nº 899, 29 de maio de 2003 da ANVISA e pelo Guia de Orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico de junho de 2014 da ANVISA (BRASIL, 2003, 2014). Foram realizados os testes de especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez. Os parâmetros cromatográficos validados, obtidos a partir dos estudos de bibliografia da espécie vegetal em estudo, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros da metodologia de CLAE para avaliação de 1,2-benzopirona e umbeliferona nos extratos de *J. pectoralis*.

Parâmetro	Descrição
Coluna Cromatográfica	C-18 250 x 4,6 mm 5 μ m
Fase móvel	Água/Metanol (40:60)
Comprimento de onda	323 nm
Volume de injeção	20 μ L
Fluxo	1,0 mL/minuto

3.4.2.1 Adequabilidade do sistema

A avaliação da adequabilidade do sistema (*System Suitability*) permite verificar critérios importantes que demonstram se o sistema (bomba, injetor, detector e coluna) está funcionando corretamente (ICH, 2005).

A adequabilidade do sistema foi realizada por meio de seis injeções consecutivas de uma mesma solução amostra. Foram considerados os parâmetros de número de pratos teóricos, *K prime*, resolução, fator de calda (*taling*) e desvio padrão relativo (DPR) das áreas dos picos de benzopirona e umbeliferona.

3.4.2.2 Especificidade

A especificidade ou seletividade da metodologia foi avaliada pela comparação dos cromatogramas da solução branco (metanol:água, 40:60 V/V), da fase móvel e da solução amostra para a detecção de interferentes em uma co-eluição.

3.4.2.3 Linearidade

A linearidade da metodologia foi determinada por meio da curva padrão obtida das análises por CLAE das soluções padrões de 1,2 benzopirona e umbeliferona. Foram preparadas três soluções volumétricas de cada padrão, diluídos em fase móvel e a partir destas foram obtidas seis diferentes concentrações. Sendo as concentrações: 512,0; 409,6; 286,7; 172,0; 103,2 e 41,3 μ g/mL para 1,2-benzopirona e 29,7; 23,7; 16,6; 9,9; 5,9; 2,4 μ g/mL para umbeliferona. As soluções foram filtradas em membrana de PVDF 0,45 μ m para os *vials* apropriados e submetidas à metodologia de CLAE. O coeficiente de correlação (*r*) e a equação da reta foram determinados por análise de regressão linear.

3.4.2.4 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Foram preparadas seis diferentes concentrações das soluções padrão de 1,2-benzopirona (512,0; 409,6; 286,7; 172,0; 103,2 e 41,3 µg/mL) e umbeliferona (29,7; 23,7; 16,6; 9,9; 5,9; 2,4 µg/mL) diluídas em fase móvel. As soluções foram filtradas em membrana PVDF 0,45 µm e transferidas para os *vials* apropriados. Este procedimento foi realizado em triplicata de forma que ao final dos testes foram obtidas três curvas padrão.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados a partir das três curvas padrão utilizando as fórmulas descritas abaixo:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

Em que:

DP_a – Desvio padrão do intercepto com o eixo Y, das três curvas padrão;

IC – Média da inclinação das três curvas padrão.

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

Em que:

DP_a – Desvio padrão do intercepto com o eixo Y, das três curvas padrão;

IC – Média da inclinação das três curvas padrão.

3.4.2.5 Precisão

Foram preparadas seis amostras através da diluição de 1 g da droga vegetal em 10 mL de solução com etanol à 15% (p/p), esta solução foi levada ao banho de ultrassom por 30 minutos e após este período foi filtrada em papel de filtro qualitativo. Após filtração, 1mL do filtrado foi diluído em balão volumétrico de 5 mL com fase móvel. As amostras foram filtradas em membrana de PVDF 0,45 µm para os *vials* apropriados. A análise em CLAE foi realizada com duas injeções de cada uma das seis preparações. A precisão da metodologia foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. O desvio padrão e o desvio padrão relativo foram avaliados intra-corrída e inter-corrída.

3.4.2.6 Exatidão

A exatidão da metodologia foi determinada pela capacidade de recuperação de quantidades conhecidas de 1,2-benzopirona e umbeliferona. Foram preparadas soluções volumétricas em fase móvel do extrato líquido em três níveis de concentração, correspondendo

a 80, 100 e 120% da concentração do padrão no intervalo linear, com e sem a adição de quantidade conhecida dos padrões, em triplicata. A exatidão foi calculada, para cada nível de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Recuperada} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

Em que:

C_1 – concentração dos marcadores na amostra acrescida de padrão

C_2 – concentração dos marcadores na amostra sem adição de padrão

C_3 – concentração teórica do padrão

3.4.2.7 Robustez

A robustez da metodologia foi determinada para variações de fluxo (0,9 mL/min., 1,0 mL/min e 1,1 mL/min), volume de injeção (19 μ L, 20 μ L e 21 μ L) e lote da coluna analítica (7727 e 8209). Para cada uma das condições foi preparada uma amostra, obedecendo a proporção droga/solvente de 15% (p/p), em equipamento de ultrassom (UNIQUE mod. USC-2800 A) durante 30 minutos a temperatura ambiente com frequência e potência fixadas (40 kHz e 154 W respectivamente). Ao final do processo o extrato foi homogeneizado e filtrado em papel de filtro, e em seguida foi realizada a diluição de 1 mL do extrato para balão volumétrico de 5 mL com fase móvel. As amostras foram filtradas em membrana de PVDF de 0,45 μ m e transferidas para seus respectivos *vials*. Cada avaliação foi injetada em triplicata no sistema de CLAE e a análise dos dados foi realizada por meio dos cálculos de média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

3.5 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS

A obtenção dos extratos líquidos foi abordada em dois níveis: a) a produção do extrato em pequena escala, para a obtenção de parâmetros de controle de qualidade e realização de ensaios de otimização da EAU das cumarinas 1,2-benzopirona e umbeliferona em *Justicia pectoralis*; e b) produção do extrato em maior escala visando o desenvolvimento tecnológico de extratos secos. A identificação e quantificação das cumarinas em ambos os casos foram realizadas por CLAE, a partir do método analítico desenvolvido e validado conforme descrito anteriormente.

3.5.1 Otimização das condições de EAU para a obtenção de cumarinas a partir de *J. pectoralis*

Na otimização da extração de 1,2-benzopirona e umbeliferona, assistida por ultrassom, em *J. pectoralis*, foi utilizado o planejamento Box Behnken 3³ associado a metodologia de superfície de resposta (MSR). Com base em dados da literatura (ILBAY; SAHIN; KIRBASLAR, 2013; SAHIN; AYBASTIER; ISIK, 2013; WANG et al., 2013) foram selecionadas três variáveis independentes em três diferentes níveis, para o planejamento fatorial foram realizadas duas baterias de testes conforme descrito nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Variáveis independentes e seus níveis, avaliados por MSR, para otimização da extração assistida por ultrassom de cumarinas em *J. pectoralis*, 1º planejamento fatorial.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
Teor alcoólico (% p/p)	10	20	30
Relação Droga:Solvente (g/mL)	1:10	1:15	1:20
Tempo de extração (minutos)	10	20	30

Tabela 3 - Variáveis independentes e seus níveis, avaliados por MSR, para otimização da extração assistida por ultrassom de cumarinas *J. pectoralis*, 2º planejamento fatorial.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
Teor alcoólico (% p/p)	15	30	45
Relação Droga:Solvente (g/mL)	1:10	1:15	1:20
Tempo de extração (minutos)	20	40	60

Com o auxílio do software Statistica[®] versão 12.0 (STATSOFT, 2010) foi planejada a sequência aleatória das análises de acordo com o modelo estatístico, contendo 15 experimentos com três repetições do ponto central para a avaliação do erro puro.

As concentrações de 1,2-benzopirona e umbeliferona foram avaliadas como variáveis dependentes (resposta) para os 30 experimentos desenvolvidos. Para isso foi realizada em CLAE uma curva com padrões Sigma-Aldrich para os ativos 1,2-benzopirona e umbeliferona. As curvas foram preparadas em triplicata, com 6 soluções volumétricas diluídas na fase móvel metanol: água (40:60) grau CLAE nas concentrações: 512; 409,6; 286,7; 172,0; 103,2 e 41,3

$\mu\text{g/mL}$ para 1,2-benzopirona e 29,7; 23,7; 16,6; 9,9; 5,9; 2,4 $\mu\text{g/mL}$ para umbeliferona. As soluções foram filtradas em membrana PVDF 0,45 μm e transferidas para os *vials* apropriados. As concentrações dos marcadores foram calculadas a partir da equação da reta, obtida por regressão linear com avaliação do coeficiente de correlação entre os diferentes níveis.

Os dados foram analisados utilizando o software Statistica® versão 12.0 (STATSOFT, 2010) e os coeficientes foram interpretados utilizando o teste F. Três principais ferramentas foram utilizadas na análise de dados: análise de variância (ANOVA), análise de regressão e plotagem de superfície de resposta. Foram considerados efeitos significativos aqueles com valor de $p < 0,05$. A melhor condição de extração foi determinada de acordo com a equação definida pelo método dos mínimos quadrados:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3$$

Em que:

Y – resposta predita;

B_0 – constante do modelo;

X_1 , X_2 e X_3 – variáveis independentes;

B_1 , B_2 e B_3 – coeficientes lineares;

B_{12} , B_{13} e B_{23} – coeficientes de interação entre as variáveis independentes;

B_{11} , B_{22} e B_{33} – coeficientes quadráticos.

As condições ótimas para a extração assistida por ultrassom de 1,2-benzopirona e umbeliferona das partes aéreas de *J. pectoralis* foram investigadas dentro do intervalo estudado e adquiridas a partir da função geral de otimização e desejabilidade por MSR.

As condições consideradas ótimas foram validadas em triplicata avaliando a recuperação dos ativos estudados em comparação com o valor predito pelo modelo.

3.5.2 Obtenção do extrato líquido por percolação

O extrato líquido das partes aéreas de *J. pectoralis* foi obtido por percolação. Cerca de 2 kg de material vegetal pulverizado foi deixado em maceração durante 24 horas em etanol 20% (p/p), conforme concentração sugerida no estudo de otimização da extração por percolação de cumarinas de *J. pectoralis*, realizado por Fonseca (2009). Após as 24 horas, o material macerado e seu solvente foram transferidos para percoladores de aço inox. Após mais 24 horas

de maceração nos percoladores, iniciou-se a percolação propriamente dita, mantida em fluxo contínuo por 5 dias até a exaustão com consumo de 35 litros de solvente. O extrato coletado foi rotulado, acondicionado em frascos plásticos e armazenado à -20 °C.

Foram obtidos 33 litros do extrato, o qual foi concentrado em rotaevaporador Büchii (temperatura de 40 °C, 50 rpm com ponto de evaporação em 90 bar) até cerca de metade do volume inicial. Ao final do processo todo o volume do extrato concentrado foi homogeneizado e armazenado em frascos âmbar sob refrigeração (8 °C).

3.5.3 Caracterização do extrato líquido

A caracterização do extrato líquido foi realizada por meio dos testes de determinação de sólidos totais, pH e densidade relativa, desenvolvidos no Laboratório de Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás.

3.5.3.1 Determinação de Sólidos Totais

A determinação de sólidos totais do extrato líquido foi realizada em triplicata utilizando balança com lâmpada de halogênio SHIMADZU modelo UniBloc. Foram pesados aproximadamente 1 g do extrato líquido e durante 30 minutos foi mantida a temperatura de 105°C. A porcentagem de sólidos totais foi calculada utilizando a fórmula:

$$\% \text{ sólidos totais} = 100 - U$$

Em que:

U – perda por dessecação

3.5.3.2 Determinação do pH

A leitura do pH do extrato líquido foi realizada em triplicata pelo método potenciométrico, de acordo com a Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). Foi utilizado equipamento da marca MARCONI modelo MA-552 previamente calibrado com soluções tampões pH 7,0 e 4,0.

3.5.3.3 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa do extrato líquido foi determinada de acordo com a Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010) por metodologia gravimétrica, com uso de picnômetro com capacidade para 10 mL, limpo, seco e previamente calibrado e pesado. A densidade relativa foi

determinada através da razão entre a massa da amostra e a massa de água purificada, de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Densidade Relativa} = \frac{(P_e - P_v)}{(P_a - P_v)}$$

Em que:

P_e – massa do picnômetro com o extrato líquido

P_v – massa do picnômetro vazio

P_a – massa do picnômetro com água purificada

3.5.3.4 Doseamento de 1,2-benzopirona e umbeliferona

O doseamento dos marcadores químicos no extrato hidroalcoólico percolado de *J. pectoralis* foi realizado conforme metodologia descrita no item 3.4. A concentração final dos marcadores no extrato foi obtida a partir da equação da curva de calibração determinada com os padrões de 1,2-benzopirona e umbeliferona.

3.5.3.5 Viscosidade

As medidas de viscosidade foram realizadas em um viscosímetro Brookfield, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). Foi utilizado um aparelho Brookfield - DV-II + Viscometer, com um conjunto de spindles tipo LV nas configurações: 60 rotações por minuto, torque 10,6% e temperatura de 25 °C.

3.6 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DAS PARTES AÉREAS DE *J. pectoralis*

O processo de secagem do extrato líquido foi realizado no Laboratório de Secagem e Armazenamento de Produtos Vegetais da Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, em equipamento do tipo “mini” *Spray Dryer* (LABMAQ® - modelo LM-MSD 1.0), com fluxo co-corrente.

3.6.1 Análise termogravimétrica (ATG) dos padrões de cumarinas

A análise termogravimétrica foi realizada para avaliação do comportamento dos marcadores químicos (1,2-benzopirona e umbeliferona) frente à temperatura. Os dados obtidos podem influenciar nas condições de secagem do extrato de forma a se preservar a molécula do

marcador. Para isso, cerca de 10 mg dos padrões Sigma[®] (pureza > 99%) foram submetidos ao equipamento de análise termogravimétrica (PERKIN ELMER modelo Pyris 1 TGA).

3.6.2 Delineamento experimental

A fim de se determinar variáveis independentes para a otimização do processo de secagem por aspersão (*spray drying*) foi realizado um levantamento bibliográfico, tendo como descritores: *spray drying*, *Dry Extract*, *Box Behnken*, *Optimisation*, *Coumarins*, *Justicia pectoralis* e *Response Surface Methodology* (CORTÉS-ROJAS, 2015; FONSECA, 2009; PAULA et al., 2016; SAID; AMIN, 2015).

A partir dos dados obtidos, foram realizados três experimentos de secagem no *spray drying* avaliando duas diferentes condições em relação à concentração dos adjuvantes, dióxido de silício coloidal (Aerosil[®]) e maltodextrina: com adição de Aerosil ao extrato líquido (25% (p/p) de adjuvante em relação à massa de sólidos totais do extrato líquido); e com adição do adjuvante maltodextrina (dextrose equivalente 4,0-7,0/Aldrich) na concentração de 10% (p/p) em relação à massa total do extrato líquido. Os parâmetros de secagem utilizados encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros de secagem por aspersão (*spray drying*) para avaliação de duas diferentes condições referentes ao adjuvante de secagem.

Parâmetro	Unidade
Diâmetro do bico de aspersão	0,7 mm
Fluxo do ar comprimido	40 L/min.
Pressão do ar comprimido	4,0 kg/F
Temperatura de entrada	110 °C
Fluxo de alimentação do extrato	0,2 L/h.

3.6.3 Otimização da secagem dos extratos por aspersão (*spray drying*)

Foi utilizada na otimização da secagem do extrato líquido obtido das partes aéreas de *J. pectoralis* a metodologia de superfície de resposta (MSR) em um modelo Box Behnken (3³) (três variáveis independentes em três diferentes níveis) selecionadas, com base na literatura e nos experimentos realizados no item 3.6.1 (Tabela 5). A maltodextrina foi escolhida como adjuvante, pois apresentou resultados satisfatórios durante os testes prévios, além de ser um adjuvante de primeira escolha devido a sua baixa toxicidade.

Com o auxílio do software Statistica® versão 12.0 (STATSOFT, 2010) foi planejada a sequência aleatória das análises de acordo com o modelo estatístico, contendo 15 experimentos com três repetições do ponto central para a avaliação do erro puro. Os coeficientes foram interpretados utilizando o teste F e as três principais ferramentas utilizadas na análise de dados foram: análise de variância (ANOVA), análise de regressão e plotagem de superfície de resposta. Foram considerados efeitos significativos aqueles com valor de $p < 0,05$.

Uma bateria de testes prévios foi realizada para avaliação dos parâmetros de secagem e definição dos intervalos a serem utilizados no modelo fatorial de estudo.

Tabela 5 - Variáveis independentes e seus níveis avaliados pela metodologia de superfície de resposta para otimização do processo de secagem por aspersão (*spray drying*) do extrato líquido.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
Concentração de adjuvante (% p/p) *	20	40	60
Temperatura de entrada (°C)	80	110	140
Fluxo de alimentação do extrato (L/h)	0,20	0,40	0,60

Legenda: * porcentagem em relação à massa de sólidos totais.

3.6.4 Rendimento e caracterização dos extratos secos obtidos nas condições de secagem otimizadas

A avaliação do rendimento e os testes de caracterização dos extratos secos foram desenvolvidos nos laboratórios de Secagem e Armazenamento de Produtos Vegetais e Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde, respectivamente.

3.6.4.1 Determinação do Rendimento de Secagem

Para a determinação do rendimento foi realizada a pesagem do frasco coletor, anexado ao *spray dryer*, antes (frasco vazio) e após o processo de secagem (frasco contendo o extrato seco) bem como a quantidade em gramas de extrato líquido utilizado para a secagem. O rendimento de secagem foi calculado em relação à porcentagem de sólidos totais presentes no extrato líquido, pela equação abaixo:

$$\% \text{ rendimento} = \frac{P_2 - P_1}{S_t \times P_{EL}} \times 10000$$

Em que:

P_1 – peso do frasco coletor vazio (g)

P_2 – peso do frasco coletor contendo o extrato seco (g)

S_t – massa de sólidos totais (incluindo a quantidade acrescida de adjuvante) presentes na amostra (g)

P_{EL} – massa do extrato líquido submetido ao processo de secagem (g)

3.6.4.2 Determinação da umidade

A determinação do teor de umidade dos extratos secos foi realizada em triplicata utilizando balança com lâmpada de halogênio SHIMADZU modelo UniBloc. Foram pesados aproximadamente 200 mg das amostras dos extratos secos, mantidos a temperatura de 105 °C por 5 minutos.

3.6.4.3 Determinação da atividade de água

A atividade de água foi determinada em triplicata no equipamento PRE AQUA LAB modelo 450 com aproximadamente 200 mg do extrato seco.

3.6.4.4 Determinação do teor de 1,2-benzopirona e umbeliferona por CLAE

Para avaliação do teor dos marcadores químicos foram realizadas análises por CLAE de acordo com a metodologia validada no item 3.4.

3.6.4.5 Reprodução das condições de secagem otimizadas.

Os valores otimizados para as variáveis independentes avaliadas, com função de desejabilidade mais próxima de 1, foram testados em uma triplicata do processo de secagem e avaliados quanto ao rendimento, teor de umidade, atividade de água e teor dos marcadores químicos. Os valores observados foram comparados com os valores preditos do experimento da análise multifatorial para avaliar a eficiência do processo de otimização.

3.6.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização morfológica das partículas do extrato seco otimizado foi realizada em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com microscópio Tabletop Microscope TM3030Plus – Hitachi, no Laboratório de Análise Instrumental da Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas.

3.6.6 Densidade aparente (ρ_a)

Foram adicionadas amostras de 1g do pó do extrato seco otimizado a uma proveta de 10 mL, previamente pesada. A densidade aparente de cada amostra foi calculada pela relação entre os volumes e as massas do pó adicionado à proveta. (USP, 2011), conforme equação abaixo:

$$\rho_a = \frac{m}{V_a}$$

Em que:

ρ_a - densidade aparente (g/cm³)

m - massa da amostra (g)

V_a - volume aparente (cm³)

3.6.7 Densidade compactada (ρ_c)

A mesma proveta acima citada foi submetida a batidas constantes, aproximadamente 100 batidas ou até o máximo de compactação. A relação entre os volumes ocupados pelo pó antes e após a compactação e a massa dos mesmos constituíram a densidade de compactação (USP, 2011), conforme equação abaixo.

$$\rho_c = \frac{m}{V_c}$$

Em que:

ρ_c - densidade compactada (g/cm³)

m - massa da amostra compactada (g)

V_c - volume obtido na compactação (cm³)

3.6.8 Fator de Hausner (FH) e Índice de Carr (IC)

O fator de Hausner e o índice de Carr, foram calculados, em triplicata, sendo o fator de Hausner o quociente da razão entre a densidade compactada e a densidade aparente, conforme equação abaixo:

$$FH = \frac{\rho_c}{\rho_a}$$

O índice Carr foi determinado conforme a seguinte equação:

$$Ic(\%) = \frac{(\rho_c - \rho_a)}{\rho_c} \times 100$$

3.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EXTRATO SECO PADRONIZADO EM CUMARINAS DE *J. pectoralis* EM RATAS WISTAR

3.7.1 Aspectos éticos

Todos os experimentos realizados neste estudo foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Além disso, foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso em Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Goiás (UEG), conforme protocolo N°. 002/2016 (Anexo 1).

3.7.2 Animais

Foram utilizadas ratas *Wistar (Rattus norvegicus)*, virgens, sexualmente maduras, com idade entre 70 - 92 dias, pesando entre 155 - 186 g. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais e Sintéticos do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Goiás, em caixas de polipropileno (41 cm de comprimento x 34 cm de largura x 16 cm de altura) e utilizados nos experimentos após um período de 25 dias de adaptação a este local. No biotério as fêmeas foram mantidas em ciclo claro/escuro de 12 h, temperatura de 22 ± 2 °C, livres de ruídos, com água e ração *ad libitum*. Um dia antes do teste foram pesadas, identificadas e alojadas em número de três por caixa. A ração foi retirada 12 h antes do teste, mantendo-se a água *ad libitum*. Após a conclusão dos experimentos os animais foram eutanasiados por meio da administração de uretana na dose letal de 5 mL/kg via intraperitoneal. O procedimento cirúrgico de necropsia foi realizado após a eutanásia dos animais.

3.7.3 Preparo da amostra para administração em roedores

O extrato seco das partes aéreas de *J. pectoralis* padronizado em cumarinas, obtido nas condições otimizadas conforme item 3.5.1, foi dissolvido em água nas concentrações de acordo com o peso dos animais, a fim de se obter as doses de 300 e 2000 mg/kg. O volume de administração utilizado foi de 1,0 mL para cada 100 g de massa corporal para a dose de 2000 mg/kg e 0,5 mL para cada 100 g de massa corporal para a dose de 300 mg/kg.

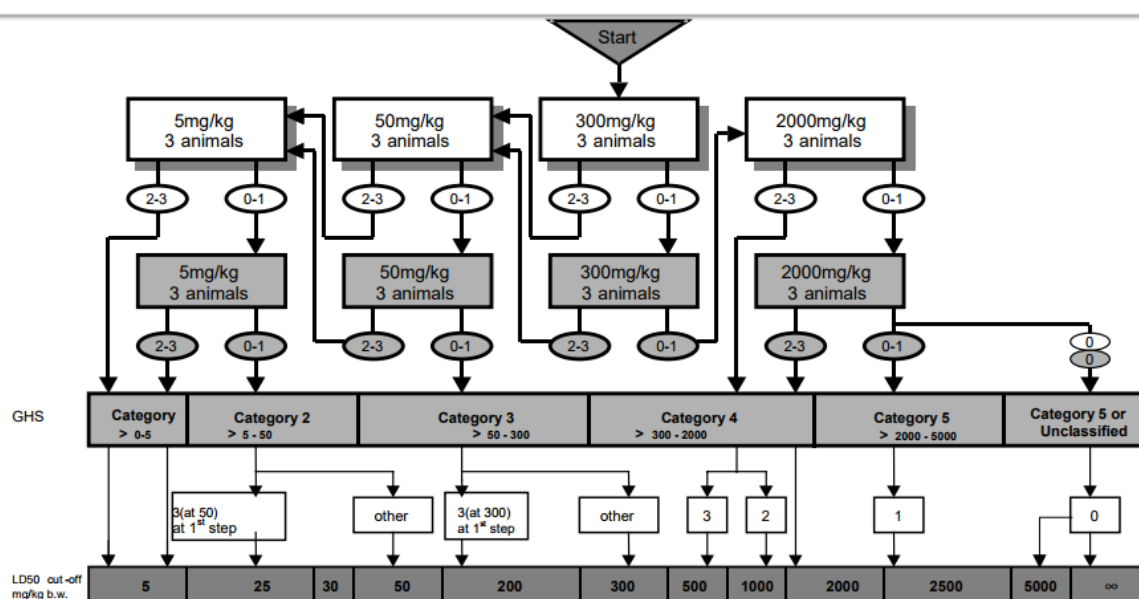
3.7.4 Toxicidade oral aguda

O ensaio para avaliação da toxicidade oral aguda foi realizado com base no protocolo nº 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD). Este guia estabelece 4 níveis de dose: 5, 50, 300 e >2000 mg/kg (Figura 4). De acordo com os resultados de mortalidade obtidos por cada dose é que elas serão progressivamente aumentadas ou repetidas (OECD, 2001). A dose inicial deve ser a mais provável para produzir mortalidade em alguns dos animais tratados. Na ausência de informação sobre a substância a ser testada, recomenda-se usar a dose inicial de 300 mg/kg de peso corporal. Desta forma, a dose inicialmente testada neste estudo foi a de 300 mg/kg.

Para cada etapa do teste os animais foram separados em dois grupos experimentais, com três ratas em cada grupo (grupo 01-teste e grupo 02- repetição). Na manhã do experimento, os animais foram pesados novamente para determinar o volume de administração. A administração do extrato foi realizada por gavagem.

Os animais foram observados individualmente durante as primeiras 8 horas. Foi realizada observação a cada 30 minutos nas primeiras 4 horas e a cada 60 minutos até completarem 8 horas, sendo verificada a incidência ou não de morte dos animais e também registrados os sinais de toxicidade, conforme *screening hipocrático*. Os animais foram privados de alimentação por 4 horas após a administração do extrato e a água foi oferecida *ad libitum* até o término do experimento. A observação se estendeu, com avaliações diárias, por 14 dias. Ao final do período experimental todos os animais foram submetidos à necropsia (grosseira), com observação do aspecto geral e determinação da massa dos rins, fígado e baço.

Figura 4 – Fluxograma representando a metodologia seguida para o ensaio de toxicidade aguda em dose única, a partir da dose de 300 mg/kg.



Fonte: OECD (2001)

- 0,1,2,3: número de animais mortos em cada etapa

- GHS: Sistema de Classificação Mundial Harmonizado (mg/kg de peso corporal).

- ∞: não classificado.

As alterações comportamentais dos animais durante o teste de toxicidade aguda foram avaliadas utilizando-se o *screening* hipocrático. Os sinais de toxicidade avaliados incluíram:

- Mudanças ou alterações na pele ou no pelo;
- Alterações nos olhos (ex. sangue ao redor dos olhos) e nas membranas mucosas (ex. cianose);
- Alterações nos sistemas circulatório (sangramentos em algum orifício, edema) e respiratório;
- Alterações no sistema nervoso central (convulsões, excitabilidade) e autônomo (salivação excessiva ou anormal, diarreia, letargia, sonolência, coma, constrição ou dilatação pupilar);
- Alterações no padrão comportamental (ex. apresentação de comportamentos compulsivos, tais como: roer ou morder partes do corpo, vocalização) e somatomotor (tremores, prostração, paralisia, respostas exageradas ao barulho ou ao toque – hiperreflexia);
- Resposta a pressão na cauda.

3.7.5 Avaliação ponderal

A análise ponderal foi realizada com a pesagem dos animais em balança semi-analítica antes da administração do extrato e diariamente durante os 14 dias do teste de toxicidade oral aguda. De posse destes dados, foi calculado o ganho de massa corporal relativa dos animais e massa relativa dos órgãos (rins e fígado).

Durante o período de 14 dias foram também avaliados o consumo relativo de ração e água dos animais.

Para o cálculo do ganho de massa corporal relativa, consumos relativos de água e ração a cada 3 dias, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Massa corporal relativa} = \frac{\text{massa corporal diária (g)}}{\text{massa corporal no 1º dia do teste (g)}} \times 100$$

$$\text{Consumo relativo de água} = \frac{\text{ingestão média de água (mL) no período de 3 dias}}{\text{massa corporal média (g) no período de 3 dias}} \times 100$$

$$\text{Consumo relativo de ração} = \frac{\text{ingestão média de ração (g) no período de 3 dias}}{\text{massa corporal média (g) no período de 3 dias}} \times 100$$

3.7.6 Análise estatística

As diferenças estatísticas entre os grupos controle e experimental foram determinadas pela análise de variância ANOVA seguida pelo teste Student-Newman-Keuls, através do software Statistica® versão 12.0 (STATSOFT, 2010). Para avaliação do ganho de massa corporal e massa relativa dos órgãos foi utilizada ANOVA unifatorial e para avaliação do consumo de água e ração, ANOVA para medidas repetidas. As diferenças estatisticamente significativas foram indicadas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESCRIÇÃO MORFOANATÔMICA DO ESPÉCIME DE *J. pectoralis*

4.1.1 Descrição morfológica da planta

O espécime em estudo é uma erva ramificada, ereta decumbente até cerca 1,5 m de altura. Ramos hexagonais a cilíndricos, com duas faixas longitudinais de tricomas, glabrescentes. Folhas sésseis ou com pecíolo de até 1mm, lanceoladas, 3,5-6×0,4-0,6 cm, ápice agudo a atenuado, base atenuada, margem crenada a inteira, ciliadas, pubescentes nas nervuras. Panícula secundiflora, eixos da inflorescência hirsutos com tricomas tectores simples e glandulares. Flores sésseis, brácteas e bractéolas subuladas, 0,5-1 mm comprimento; sépalas 5, linear-lanceoladas com cerca de 3 mm de comprimento, glandular-pubescentes; corola branca com manchas róseas a lilases, 7-9 mm comprimento, tubo 3-5 mm comprimento, lábio superior com cerca de 3 mm comprimento, unilobado, ápice arredondado, lábio inferior 4-5 mm comprimento, trilobado, palato com venação peninervia evidente, lobos com cerca de 1 mm comprimento, lobos laterais cerca de 1,5 mm largura, lobo central cerca de 2 mm largura, ápice arredondado a obtuso; estames levemente exsertos, tecas das anteras inseridas em alturas diferentes no conectivo, divergentes, sem apêndices, a inferior menor (Figura 5), caule ascendente e pelos retrorsos esbranquiçados dispostos em linhas verticais, nós inferiores frequentemente com raízes adventícias. Características estas em conformidade com descrição da espécie *J. pectoralis* Jacq. (OLIVEIRA; ANDRADE, 2000; SARTIN, 2015; VARGEM, 2015; VIANA; LEAL; VASCONCELOS, 2013).

Figura 5 - *J. pectoralis* em canteiro cultivado no Horto de Plantas Medicinais do Jardim Botânico de Goiânia.

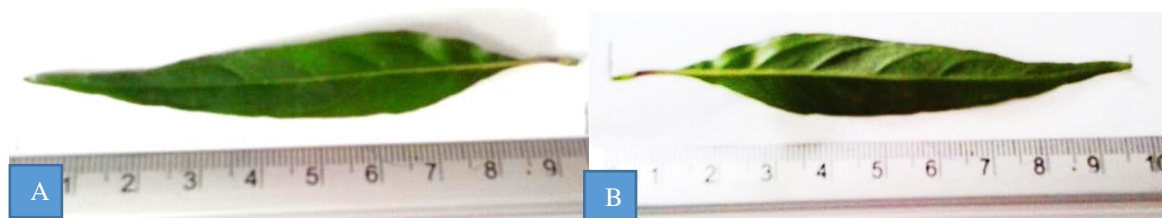


Fonte: Próprio autor.

4.1.2 Descrição macroscópica foliar

A planta apresenta folhas opostas membranáceas e verdes, podendo apresentar pontuações vináceas. A lâmina foliar (Figura 6) é lanceolada, 3,5-8,0 x 0,4-1,2 cm, sem e com pecíolo de até 0,3 cm, ápice atenuado, base aguda, margem inteira, pubescentes em ambas as faces e de superfície adaxial brilhante. Coerente com a descrição da espécie *J. pectoralis* Jacq. (OLIVEIRA; ANDRADE, 200; SARTIN, 2015; VARGEM, 2015; VIANA; LEAL; VASCONCELOS, 2013).

Figura 6 - Folhas de *J. pectoralis* em vista frontal. Face adaxial (A); Face abaxial (B).



Fonte: Próprio autor.

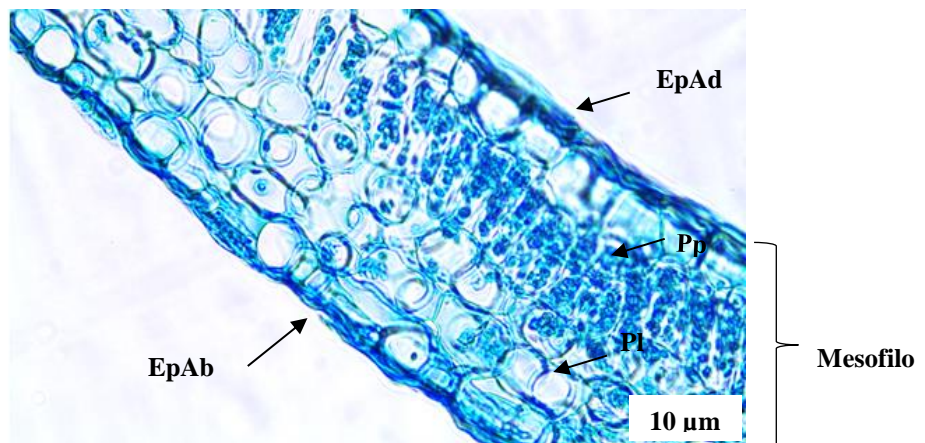
4.1.3 Descrição microscópica

Na secção transversal da região internervura foliar observa-se a epiderme uniestratificada na face adaxial, com células epidérmicas retangulares com eixo anticlinal maior que o periclinal, as células são recobertas por cutícula lisa e delgada, tendo uma única camada de parênquima paliádico e até quatro camadas de parênquima lacunoso (Figura 7). O bordo reto em forma arredondada apresenta tricomas tectores de forma conspícua (Figura 8). Há predominância de tricomas tectores pluricelulares com até quatro células e tricomas glandulares, os quais são visíveis nas secções paradérmicas. Nas secções paradérmicas da superfície adaxial são registradas células de formato irregular, com paredes celulares sinuosas (Figura 9). Estão presentes na face abaxial estômatos diacíticos (folhas hipoestomáticas) comuns à família Acanthaceae, além de tricomas glandulares peltados e tectores. Em secção transversal a nervura mediana apresenta-se biconvexa ao nível do terço médio, sendo maior o arco abaxial (Figura 10). O sistema vascular (Figura 10) está disposto na forma de um arco central com feixes colaterais e dois pequenos feixes acessórios nas extremidades dispostos de maneira descontínua, diferentemente de outras espécies como *J. gendarussa* na qual são contínuos. Na secção transversal do pecíolo (Figura 11) foi observada sua forma plano-convexa na porção distal, alas laterais que correspondem à expansão da lâmina foliar, epiderme

uniestratificada com células de tamanho reduzido com paredes periclinais externas e tricomas tectores pluricelulares.

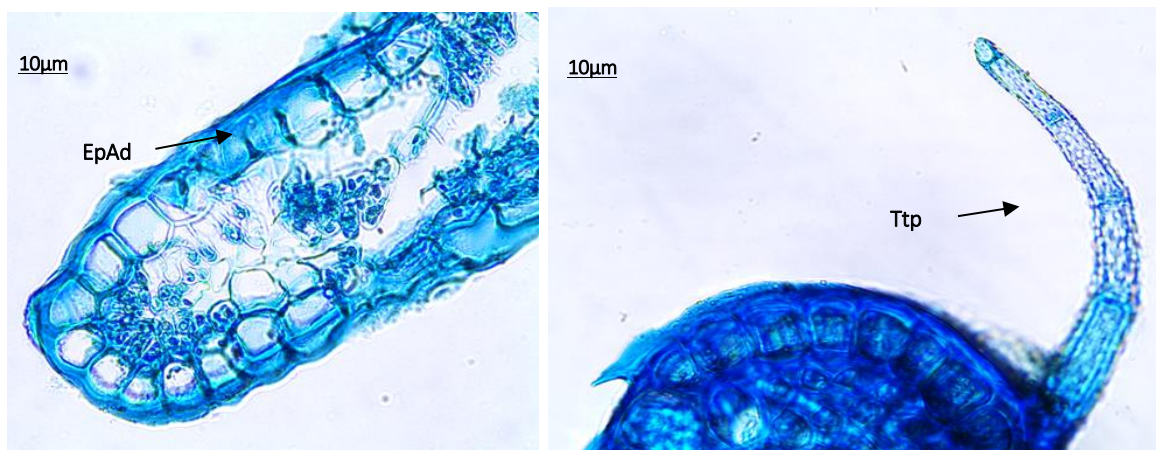
Desta forma considerando à anatomia foliar, a espécie estudada possui características semelhantes às observadas para a família Acanthaceae e para a espécie *J. pectoralis*. Confirmou-se a presença de características situadas no quadro de caracteres gerais da família: folhas hipostomáticas, células epidérmicas alongadas anticlinalmente na face adaxial; cutícula geralmente espessa; estômatos predominantemente diacíticos, tricomas tectores e glandulares em ambas as faces; mesofilo dorsiventral (PATIL; PATIL, 2012; AOYAMA; INDRIUNAS, 2014; VAGEM, 2015).

Figura 7 - Secção transversal da região internervura da lâmina foliar de *J. pectoralis*, coloração Alcian/Safranina.



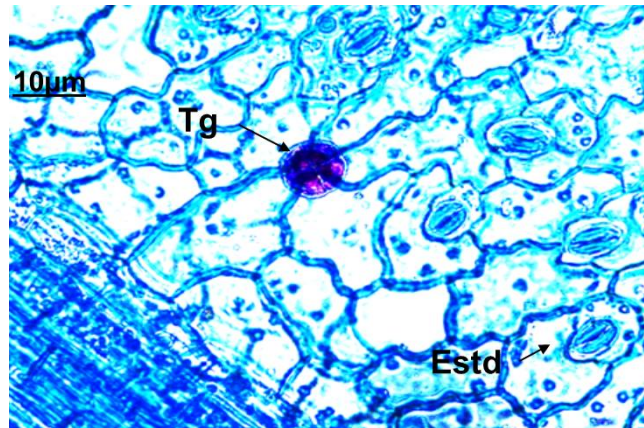
Legenda: EpAd – Epiderme adaxial; EpAb – Epiderme Abaxial; Pl – Parênquima lacunoso; Pp – Parênquima paliçádico.
Fonte: Próprio autor.

Figura 8 - Secção transversal do bordo da folha de *J. pectoralis* ambos em coloração Azul de Alcian/Safranina.



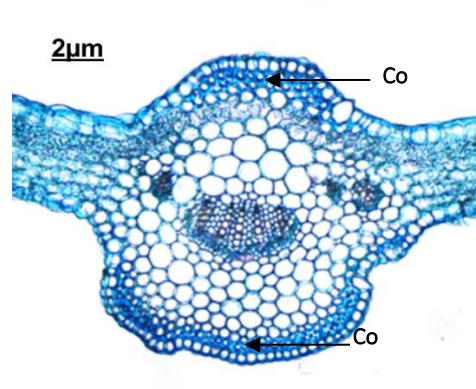
Legenda: EpAd – Epiderme adaxial; Ttp – Tricoma tector pluricelular alongado
Fonte: Próprio autor.

Figura 9 – Secção paradérmica da lâmina foliar de *J. pectoralis*, coloração Azul de Alcian/Safranina.



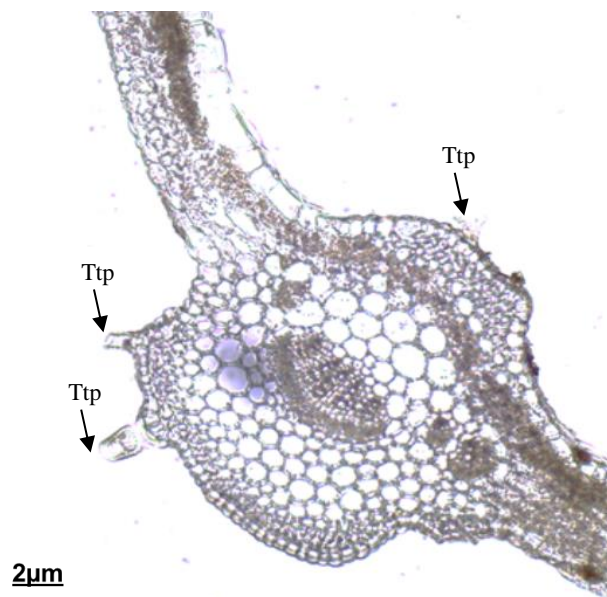
Legenda: Tg – Tricoma glandular; Estd – Estômatos diacíticos
Fonte: Próprio autor.

Figura 10 - Secção transversal da nervura principal em coloração Azul de Alcian/Safranina.



Legenda: Co – Colênquima
Fonte: Próprio autor.

Figura 11 - Secção transversal do pecíolo em coloração Sudam III.



Legenda: Ttp – Tricoma tector pluricelular.
Fonte: Próprio autor.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL

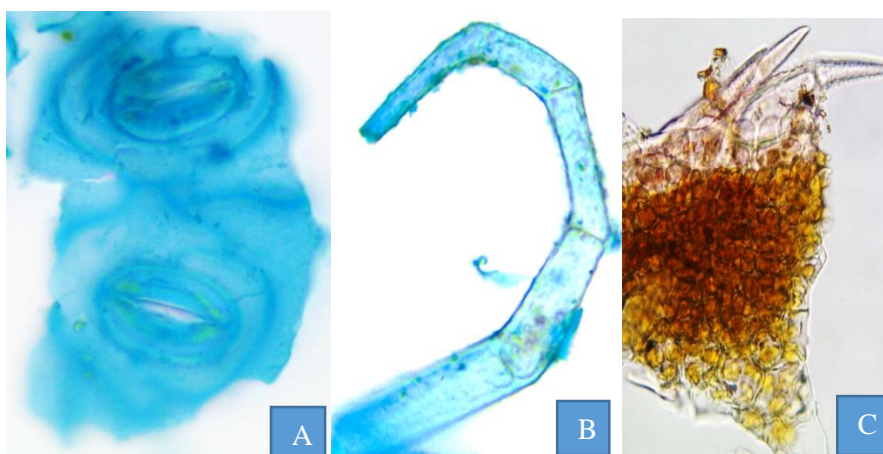
A droga vegetal corresponde à planta ou suas partes, após processo de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada (BRASIL, 2004).

A droga vegetal obtida a partir das partes aéreas de *J. pectoralis* apresentou coloração predominantemente verde clara, com forte odor aromático característico de cumarinas.

4.2.1 Identificação microscópica

Através da avaliação microscópica do material vegetal seco e pulverizado em pó, foi possível identificar a presença de estruturas características à espécie vegetal *J. pectoralis*, como tricomas tectores, estômatos diacíticos e epiderme uniestratificada (Figura 12), confirmando estudos realizados por Aoyama e Indriunas (2014) e Vargem (2015). A realização desta análise demonstra que a técnica em questão tem potencial para ser utilizada como uma avaliação prévia, rápida e de baixo custo na identificação de drogas vegetais provenientes da espécie *J. pectoralis*.

Figura 12 - Material vegetal de *J. pectoralis*, seco e pulverizado, colorações em Azul de Alcian/Safranina, estômatos diacíticos (A) e Tricoma tector pluricelular (B), em coloração de Sudam III, epiderme uniestratificada com presença de tricomas tectores (C).



Fonte: Próprio autor.

4.2.2 Determinação de umidade

O teor de umidade de drogas vegetais é um parâmetro que pode interferir consideravelmente na estabilidade dos componentes ativos, uma vez que a água em excesso no

material vegetal favorece a ação de enzimas cuja atividade pode levar à degradação dos constituintes químicos, bem como permitir o desenvolvimento de fungos e bactérias (FONSECA; SILVA; LEAL, 2010). Por esta razão o teor de umidade estabelecido em várias farmacopeias, incluindo a do Brasil, é de 8-14%. No presente trabalho a secagem da planta em estufa resultou em um teor de umidade $8,76\% \pm 0,18$ e desvio padrão relativo (DPR) 2%, dentro dos limites recomendados (BRASIL, 2010).

4.2.3 Determinação de cinzas totais

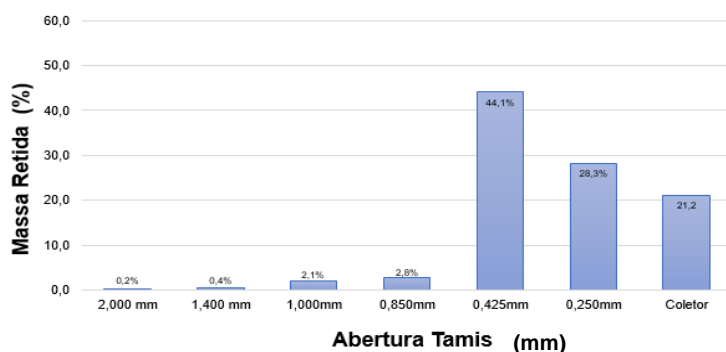
A determinação de cinzas totais permite a verificação na droga vegetal de impurezas inorgânicas não voláteis, como as de origem fisiológica (carbonatos, fosfatos, cloretos e óxidos) e de origem não fisiológica (areia, pedra, gesso e terra), as quais podem estar presentes na droga vegetal (SIMÕES et al., 2017). O resultado de cinzas totais para a droga vegetal obtida a partir das partes aéreas de *J. pectoralis* foi de $12,26\% \pm 0,50$ e DPR 4%. Estudos anteriores de Fonseca (2009) e Vagem (2015) confirmam o valor encontrado para a somatória de cinzas fisiológicas e não fisiológicas da espécie.

4.2.4 Determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico

A determinação de cinzas insolúveis em ácido visa avaliar separadamente a presença de cinzas que não são de origem fisiológica, como resíduos silicosos. Os insumos de origem natural normalmente apresentam teores inferiores a 1% para cinzas insolúveis em ácido (SIMÕES et al., 2017). O resultado de cinzas insolúveis em ácido clorídrico para a droga vegetal em estudo foi de $0,79\% \pm 0,56$. Estudos anteriores de Vagem (2015) confirmam o valor encontrado para cinzas não fisiológicas da espécie.

4.2.5 Análise Granulométrica

Partículas com dimensões homogêneas aumentam a área de contato entre o material sólido e o líquido extrator, podendo tornar mais eficiente a operação de extração, porém pós finos (tamanho de partícula inferior a 0,125 mm) podem comprometer a extração. Desta forma, a utilização de pós moderadamente grossos é recomendada para a maioria das drogas vegetais (SHARAPIN, 2000). A determinação do diâmetro médio de partículas forneceu d_{50} de 0,425 mm, com perfil moderadamente grosso conforme apresentado na Figura 13.

Figura 13 - Distribuição granulométrica da droga vegetal de *J. pectoralis*.

4.2.6 Prospecção fitoquímica

Os resultados dos testes fitoquímicos para a detecção das principais classes de metabólitos secundários presentes no pó das partes aéreas de *J. pectoralis* estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 - Classes de metabólitos secundários encontradas no pó das partes aéreas de *J. pectoralis*.

Classe de Metabólito Secundário	Reação	Resultado
Flavonoides	Reação de Shinoda	Positivo
	Reação Oxalo-Bórica	Positivo
	Reação com H ₂ SO ₄ concentrado	Positivo
Compostos Fenólicos	Reação com hidróxidos alcalinos	Positivo
	Reação com AlCl ₃	Positivo
	Reação com FeCl ₃	Positivo
Heterosídeos Antraquinônicos	Reação de Bornträger indireta I	Positivo
	Reação de Bornträger indireta II	Positivo
Cumarinas	Reação com NaOH	Positivo
Taninos	Reação com alcaloides (Quinino)	Negativo
	Reação com alcaloides (Brucina)	Negativo
	Reação com sais metálicos (Cu ₂ (OAc) ₄)	Negativo
	Reação com sais metálicos (FeCl ₃)	Negativo
	Reação com hidróxidos alcalinos (NaOH)	Negativo
Alcaloides	Reação com reagente de Mayer	Negativo
	Reação com reagente de Dragendorff	Negativo
	Reação com reagente de Bouchardat	Negativo
	Reação com reagente de Hager	Negativo
	Reação com ácido tânico	Negativo
Heterosídeos Cardioativos	Reação de Liebermann-Burchard	Positivo
	Reação de Pesez	Positivo
	Reação de Keller-Kiliani	Positivo
Saponinas	Reação de Kedde	Negativo
	Presença de espuma	Negativo

O perfil de metabólitos secundários encontrados foi semelhante ao dos trabalhos de Corrêa (2013), Leal et al. (2000), Oliveira et al. (2000) e Vargem (2015).

A presença de cumarinas é apontada como característica à espécie *J. pectoralis* sendo comumente relatados em ensaios de prospecção fitoquímica, cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia a líquido de alta eficiência (CORRÊA, 2013; OLIVEIRA et al., 2000; VARGEM, 2015). No presente estudo foi evidenciada a presença desta classe de metabólitos secundários.

Vagem (2015) relatou a presença de saponinas nas folhas de *J. pectoralis* coletadas na Universidade Estadual de Goiás, município de Anápolis. Este grupo de metabólitos não foi observado no presente trabalho e no estudo de Oliveira e colaboradores (2000). Esta variação pode ser devido a diferenças dos parâmetros climáticos e geográficos, como temperatura, altitude, pluviosidade, tipo de solo entre outros.

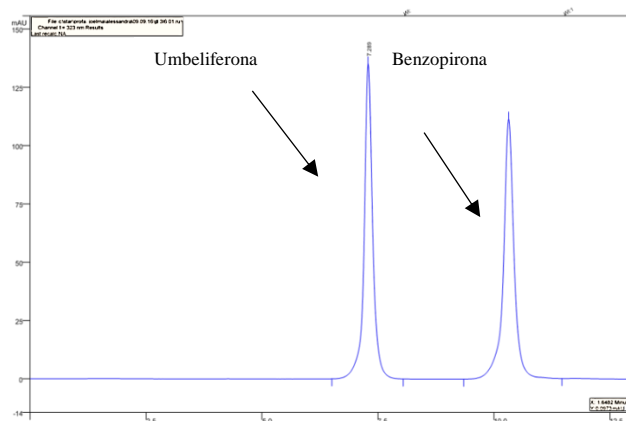
A identificação de núcleo esteroide e desoxiaçúcares, caracterizada nas reações de Liebermann-Burchard, Pesez e Keller-Kiliani, não permite afirmar a presença de heterosídeos cardioativos, uma vez que, não foi possível identificar a presença do anel lactônico característico desta classe de metabólitos secundários pela reação de Kedde.

Duke (1987) menciona a presença de alcaloides (triptaminas) em baixas concentrações em *J. pectoralis*, o que possivelmente justificaria o potencial alucinógeno da espécie e seu emprego em “rapés” por tribos indígenas da América do Sul. Porém, outros autores assim como no presente estudo, não verificaram a presença de alcaloides, indicando que o uso de *J. pectoralis* em preparações ritualísticas deve-se apenas ao seu efeito aromatizante causado pela presença intensa das cumarinas (CORRÊA, 2013; LEAL et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2000; VARGEM, 2015).

4.2.7 Perfil cromatográfico

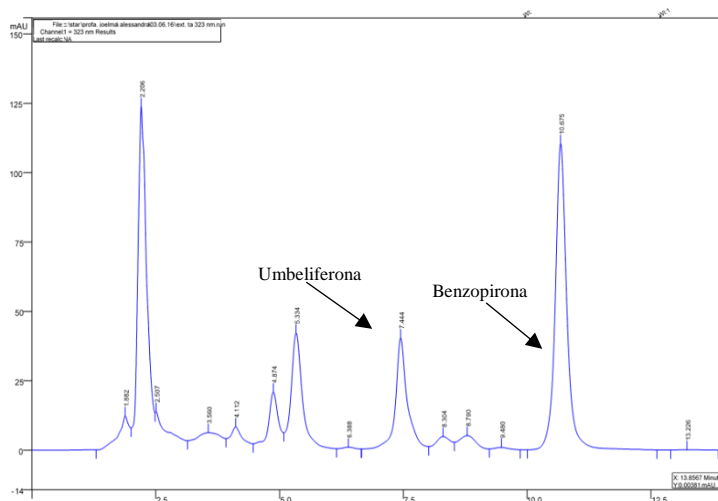
Os dois padrões de referência dos marcadores químicos da espécie, avaliados pela metodologia adaptada de Chafrau e colaboradores (2008), foram identificados na amostra das partes aéreas de *J. pectoralis*: umbeliferona (TR=7,43 minutos) e 1,2-benzopirona (TR=10,67 minutos) (Figuras 14 e 15).

Figura 14 - Cromatograma dos padrões das cumarinas, 1,2-benzopirona e umbeliferona.



Fonte: Próprio autor.

Figura 15- Cromatograma da droga vegetal obtida a partir das partes aéreas de *J. pectoralis*.



Fonte: Próprio autor.

4.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE 1,2-BENZOPIRONA E UMBELIFERONA POR CROMATOGRÁFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Apesar de o extrato de chambá já ser utilizado na forma de xarope fitoterápico na região nordeste brasileira, poucos são os métodos encontrados na literatura para a análise quantitativa de cumarinas nesse extrato. No entanto, o controle de qualidade de insumos fitoterápicos da espécie é baseado no teor de cumarinas, sendo a quantificação destes metabólitos secundários, um importante parâmetro que pode inferir na qualidade da matéria-prima vegetal, bem como na eficiência do método de extração empregado. Além disso, a quantificação de cumarina tem importância não somente devido às suas comprovadas atividades farmacológicas, mas também

devido aos efeitos colaterais em decorrência do uso excessivo, podendo causar vômitos, diarreias e hipertensão (NOLLA; SEVERO, 2005). Neste sentido, a recomendação da ANVISA (BRASIL, 2004) é de que a dose diária máxima de cumarina seja de 4,89 mg de acordo com a lista de registro simplificado de fitoterápicos (BERTOLDI et al., 2016).

A quantificação de marcadores químicos por métodos cromatográficos, como por exemplo, CLAE e cromatografia gasosa (CG), tem sido cada vez mais frequente em função dos avanços na instrumentação analítica. A eleição desses métodos se deve à eficiência na separação da mistura química complexa que apresentam os insumos farmacêuticos naturais, além de elevada sensibilidade para detecção de compostos em concentrações significativamente reduzidas. Enquanto os marcadores voláteis são quantificados por cromatografia a gás, quase todos os demais metabólitos secundários podem ser quantificados por cromatografia a líquido (SIMÕES et al., 2017).

Desta forma, no presente trabalho foi decidido estabelecer um método analítico rápido e confiável via CLAE para determinação das cumarinas 1,2-benzopirona e umbeliferona no extrato de *J. pectoralis*, contribuindo com o controle de qualidade deste fitoterápico.

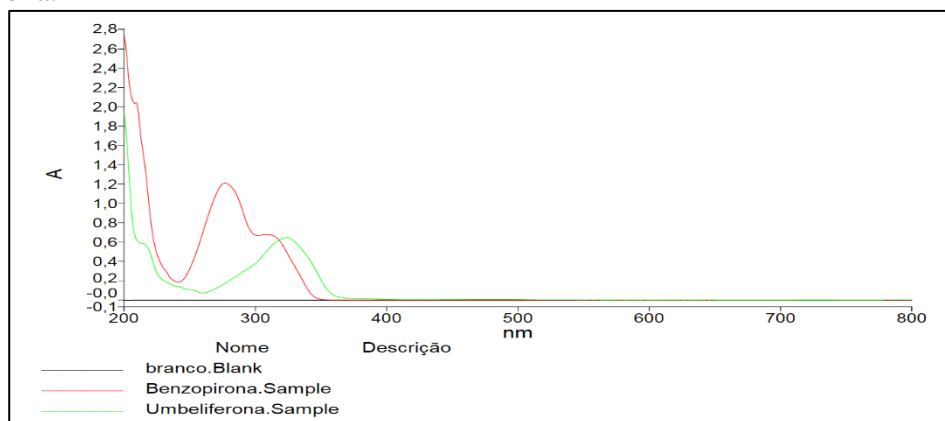
4.4.1 Identificação de constituintes e seleção do marcador químico

Os bioativos cumarínicos, 1,2-benzopirona e umbeliferona foram amplamente descritos como marcadores químicos do extrato de *J. pectoralis* (CHANFRAU et al., 2008, 2013, 2014, 2015; FONSECA, 2009; LINO et al., 1997; MACRAE; TOWERS, 1984; MARTÍN-VIAÑA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2000; VENÂNCIO et al., 2011). A 1,2-benzopirona é a molécula progenitora dos derivados da cumarina, o composto mais simples de uma grande classe de substâncias fenólicas naturais formada pela fusão de anéis benzeno e pirona. Entretanto, estudos demonstram a umbeliferona (7-hidroxicumarina) como principal metabólito cumarínico (O'KENNEDY; DOUGLAS, 1997; RITSCHER; HOFFMAN, 1981; SHARIFI et al., 1992).

Considerando que as moléculas de interesse, os marcadores químicos cumarínicos 1,2-benzopirona e umbeliferona possuem núcleo cromóforo que absorve fortemente na região do ultravioleta (UV), foram realizadas leituras de varredura na faixa do UV com ambos os padrões (Figura 16) e identificados os picos de absorção em 274 nm para a 1,2-benzopirona e 323 nm para umbeliferona. Estes resultados confirmam dados de Fonseca (2009) e, portanto, considerando que o marcador umbeliferona apresenta menor teor na planta, quando comparado à 1,2-benzopirona foi utilizado o seu comprimento de onda de maior absorção, ou seja, 323 nm

para o desenvolvimento do método analítico, condição em a 1,2-benzopirona também possui boa absorção (FONSECA, 2009).

Figura 16 - Espectros de absorção na região do UV dos padrões de 1,2-benzopirona e umbeliferona.



Fonte: Próprio autor.

4.4.2 Validação da metodologia analítica

4.4.2.1 Adequabilidade do sistema

A Tabela 7 demonstra os valores obtidos para os parâmetros avaliados na adequabilidade do sistema com base em seis replicatas de uma mesma preparação da solução amostra do extrato líquido das partes aeres de *J.pectoralis*.

Tabela 7 - Valores médios (\pm desvio padrão) dos critérios de adequabilidade do sistema (*System suitability*) obtidos a partir de seis avaliações dos marcadores.

Adequabilidade do Sistema			
	Fator de Cauda (<i>taling</i>)	Resolução (R_s)	Pratos teóricos
Umbeliferona	0	2,97 (\pm 0,05)	5157,8 (\pm 259,37)
Benzopirona	1,03 (\pm 0,01)	2,16 (\pm 0,05)	6220 (\pm 241,65)
Limites ICH	≤ 2	≥ 2	> 2000

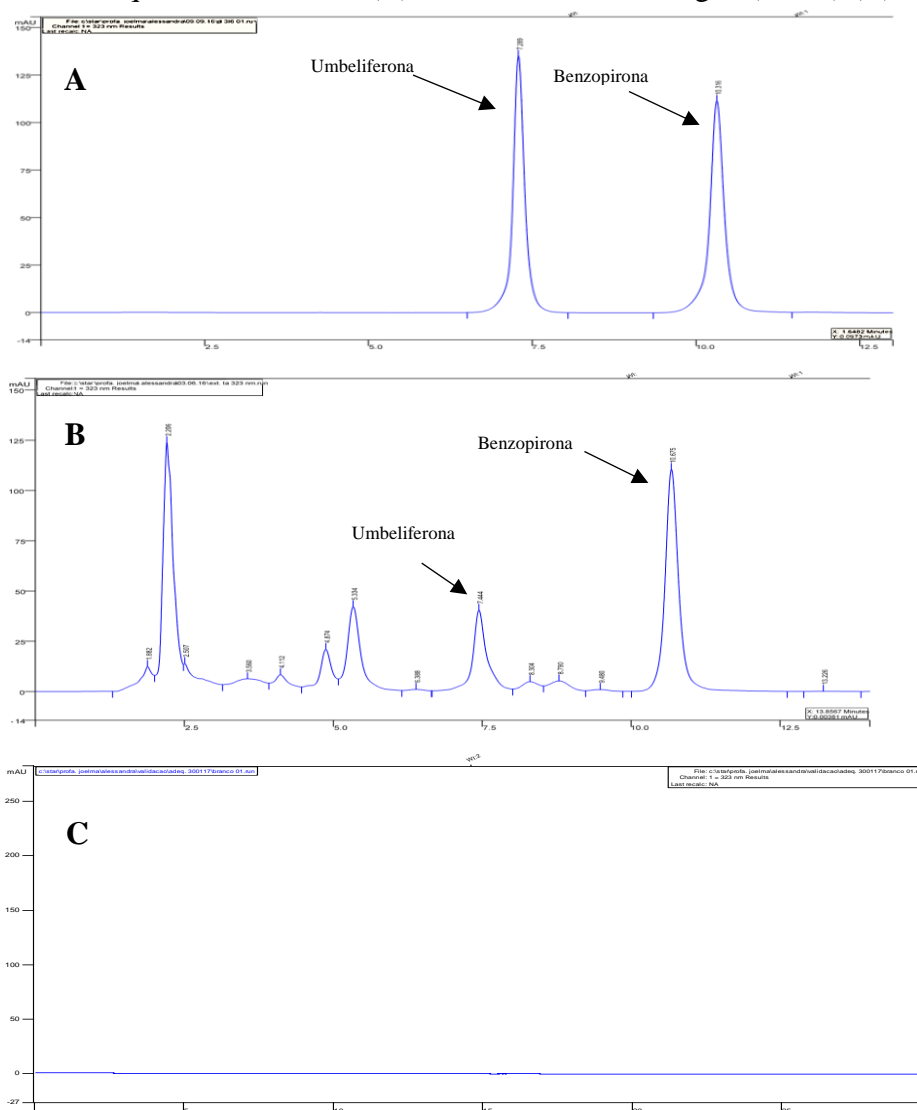
Todos os parâmetros do *system suitability* se mostraram dentro dos valores preconizados (ICH, 2005), demonstrando que o método desenvolvido é adequado para a separação e quantificação inequívoca dos marcadores umbeliferona e benzopirona.

4.4.2.2 Especificidade

A especificidade da metodologia foi comprovada mediante a comparação dos cromatogramas do diluente (60:40, água/metanol), da solução amostra do extrato líquido e solução padrão (Figura 17).

A seletividade ou especificidade de uma metodologia pode ser traduzida na capacidade da mesma de avaliar uma substância na presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2014). No presente teste não foi observada interferência por co-eluição do diluente ou fase móvel no tempo de retenção dos marcadores 1,2-benzopirona e umbeliferona a 323 nm, demonstrando a seletividade da metodologia desenvolvida.

Figura 17 - Perfis cromatográficos via CLAE dos padrões de referência de cumarinas (A), extrato líquido concentrado (B) e diluente metanol / água (40:60) (C).

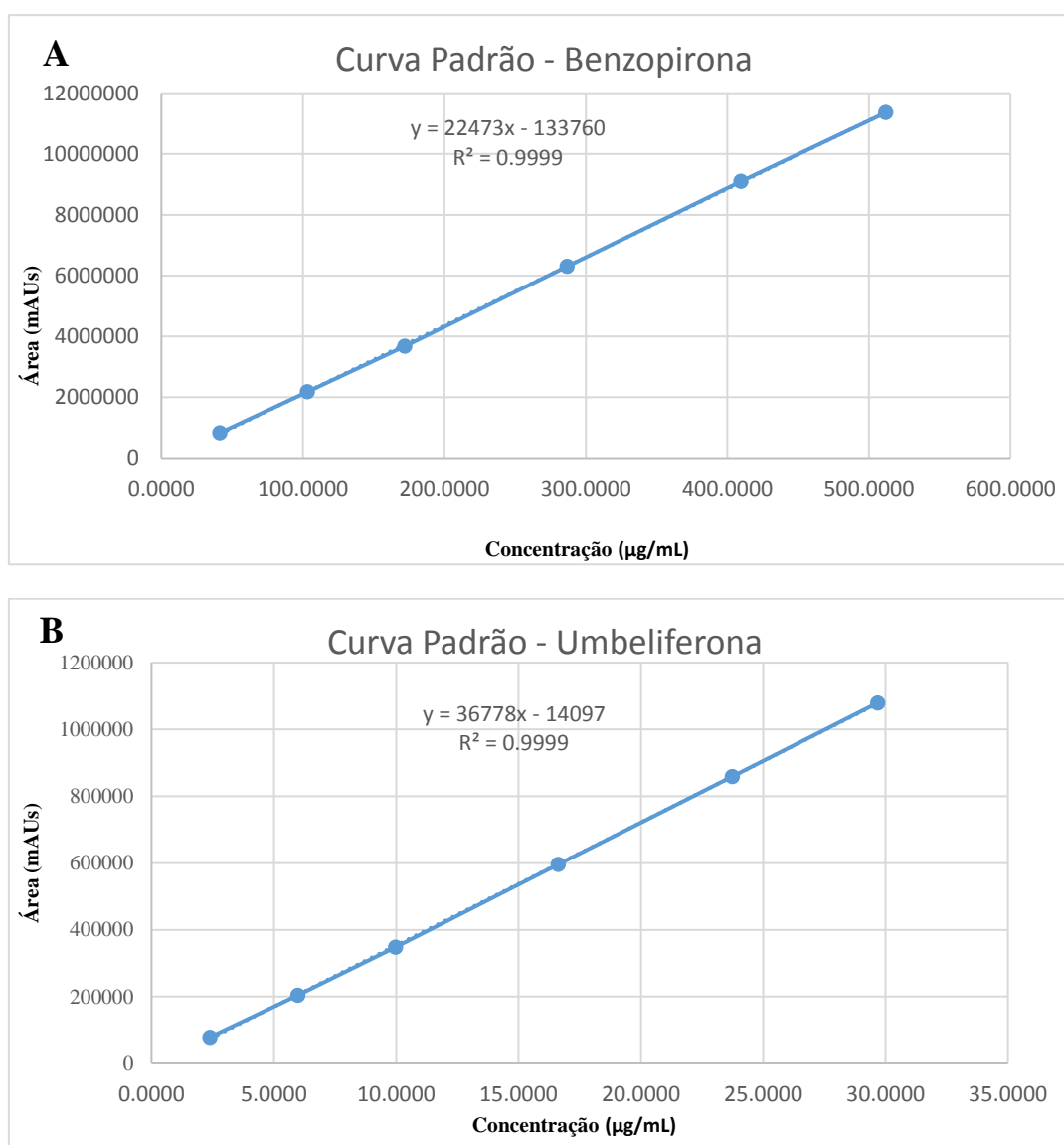


Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m); Fase móvel metanol / água (40:60); Fluxo de 1,0 ml.min⁻¹, λ = 323 nm; Volume de injeção de 20 μ L.

4.4.2.3 Linearidade

A curva de calibração para 1,2-benzopirona foi linear na faixa de 41,3-512,0 µg/ml (Figura 18A) e para umbeliferona foi linear na faixa de 2,4 - 29,7 µg/ml (Figura 18B). As equações lineares representativas foram: $y = 22473x - 13376$ (N = 6; $r = 1,0000$ e $r^2 = 0,9999$) para 1,2-benzopirona e $y = 36778x - 14097$ (N = 6, $r = 1,0000$ e $r^2 = 0,9999$) para umbeliferona.

Figura 18 - Curva padrão de 1,2-benzopirona (A) e umbeliferona (B).



A Tabela 8 contém as áreas dos picos dos padrões de 1,2-benzopirona e umbeliferona utilizadas para a construção da curva padrão. Estes dados se mostraram em conformidade com as especificações da Resolução – RE nº 899, 29 de maio de 2003 da ANVISA demonstrando a

capacidade da metodologia em determinar áreas diretamente proporcionais à concentração dos marcadores.

Tabela 8 - Áreas dos picos dos padrões de 1,2-benzopirona e umbeliferona utilizadas na construção da curva padrão.

Benzopirona ($\mu\text{g/mL}$)	Área Benzopirona (mAU.s)	Média	DPR	Umbeliferona ($\mu\text{g/mL}$)	Área Umbeliferona (mAU.s)	Média	DPR
	11397978				1070945		
512,0000	11348415	11362296	0,27	29,6800	1088045	1079527	0,79
	11340495				1079590		
	9109438				846272		
409,6000	9128041	9102830	0,32	23,7440	862552	858852	1,30
	9071012				867733		
	6290004				587584		
286,7200	6303591	6309952	0,38	16,6208	592382	596420	1,91
	6336260				609294		
	3614203				338426		
172,0320	3710369	3680967	1,57	9,9725	354564	348358	2,49
	3718329				352083		
	2149068				197936		
103,2192	2187833	2182079	1,40	5,9835	208224	204551	2,81
	2209336				207494		
	820851				76990		
41,2877	819137	827489	1,57	2,3934	78527	78715	2,32
	842479				80629		

Legenda: DPR – desvio padrão relativo.

4.4.2.4 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites encontrados com base nas três curvas padrão dos marcadores foram: LD 5,81 $\mu\text{g/mL}$ para 1,2-benzopirona e 0,35 $\mu\text{g/mL}$ para umbeliferona; LQ 19,37 $\mu\text{g/mL}$ para 1,2-

benzopirona e 1,17 µg/mL para umbeliferona. A Tabela 9 apresenta um resumo dos parâmetros da curva de calibração de umbeliferona e 1,2-benzopirona.

Tabela 9 - Resumo dos parâmetros da curva de calibração de umbeliferona e 1,2 benzopirona.

	Umbeliferona	Benzopirona
Intervalo linear (µg/mL)	29,7 – 2,4	512,0 – 41,3
Limite de detecção (µg/mL)	0,3539	5,8110
Limite de quantificação (µg/mL)	1,1799	19,3700
Dados da regressão linear*		
N	6	6
Inclinação (<i>a</i>)	36778	22473
Desvio padrão da inclinação	210,01	125,19
Desvio padrão relativo da inclinação (%)	0,57	0,55
Intercepto com o eixo y (<i>b</i>)	14097	133760
Coefficiente de correlação linear (<i>r</i>)	1,0000	1,0000

* $y = ax + b$, onde x é a concentração e y é a área do pico.

O LD, determinado com base no cálculo de regressão linear, é considerado como a menor concentração detectável, mas não necessariamente quantificável, do analito em uma solução. A menor concentração quantificável do analito em uma solução é traduzida no valor de LQ (KLEIN, LONGHINI; MELLO, 2012). Desta forma é de interesse para as demais avaliações que a concentração de 1,2-benzopirona permaneça acima de 19,37 µg/mL para 1,2-benzopirona e acima de 1,17 µg/mL para umbeliferona, para que a metodologia analítica possa quantificar os marcadores com precisão e exatidão.

4.4.2.5 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2014). Os dados de precisão da metodologia foram expressos pela determinação do desvio padrão relativo (DPR) obtido pela relação entre o desvio padrão entre os dados e a média. O valor do DPR para as áreas de 1,2 benzopirona no teste de repetibilidade foi de 2,89% e para umbeliferona foi de 3,69%. A precisão intermediária da metodologia foi determinada em um segundo dia por um segundo analista. Os dados das seis preparações da amostra de extrato líquido estão descritos na Tabela 10. Estes dados se mostraram em conformidade com as especificações da Resolução – RE nº 899, 29 de maio de 2003 da ANVISA (DPR<15%) (BRASIL, 2014), demonstrando a repetibilidade e precisão da metodologia para ambos marcadores. O DPR obtido entre os resultados foram: 5,57% para 1,2 benzopirona e 6,68% para umbeliferona.

Tabela 10 - Dados da precisão do método analítico por CLAE na repetibilidade e níveis de precisão intermediária para a quantificação de cumarinas no extrato líquido.

ELC (mg/mL)	Área Umbeliferona (μ AU.s)	Umbeliferona (%)	Área 1,2- Benzopirona (μ AU.s)	1,2 Benzopirona (%)
20,00	657402	0.091	3288381	0,761
20,00	705851	0.098	3491743	0,807
20,00	715908	0.099	3412532	0,789
20,00	660265	0.092	3285847	0,761
20,00	706409	0.098	3436584	0,794
20,00	700542	0.097	3258105	0,755
RSD%	3,69		2,88	
Intra-dia (dia 2, analista 2)				
ELC (mg/mL)	Área Umbeliferona (μ AU.s)	Umbeliferona (%)	Área Benzopirona (μ AU.s)	1,2 Benzopirona (%)
20,00	614058	0.085	3191275	0,740
20,00	602106	0.084	3238746	0,750
20,00	610580	0.085	3287354	0,761
20,00	667741	0.093	3257975	0,755
20,00	594413	0.083	2766740	0,645
20,00	653270	0.091	3197253	0,741
RSD%	4,76		6,16	
Inter-dias (precisão intermediária)				
RSD%	6,68		5,57	

Legenda: ELC- extrato líquido concentrado; RSD% - Desvio padrão relativo

4.4.2.6 Exatidão

A exatidão de um método pode ser abordada como a concordância entre os resultados de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro (BRASIL, 2014). A metodologia demonstrou exatidão, com valores de recuperação entre 86,36% e 97,81% para 1,2-benzopirona e 92,44% e 99,48% para umbeliferona, conforme apresentado nas Tabelas 11 e 12. Estes dados estão em conformidade com a especificação adotada para o teste em matrizes complexas (80-120%) segundo o *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005).

Tabela 11- Recuperação do padrão de umbeliferona adicionado à amostra.

Nível de concentração do extrato	Concentração da amostra (mg/mL)	Área Umbeliferona amostra (μ AU.s)	Área Umbeliferona amostra+padrão (μ AU.s)	Recuperação (%)
80%	16,00	224301	854074	99,19
	16,00	227265	858875	99,48
	16,00	227244	857293	99,23
100%	20,00	308132	915043	95,59
	20,00	308859	926675	97,30
	20,00	307114	902810	93,82
120%	24,00	427262	1009063	91,63
	24,00	424750	968860	85,70
	24,00	411044	997989	92,44
Média recuperação (DPR%)				94,93 (4,81)

DPR% = Desvio padrão relative

Tabela 12 - Recuperação do padrão de 1,2-benzopirona adicionado à amostra.

Nível de concentração do extrato	Concentração da amostra (mg/mL)	Área Benzopirona amostra (μ AU.s)	Área Benzopirona amostra+padrão (μ AU.s)	Recuperação (%)
Baixa	16,00	1310212	2593707	95,01
	16,00	1311437	2593128	94,87
	16,00	1300852	2604603	96,51
Média	20,00	1767001	3025277	93,14
	20,00	1776719	3075676	96,15
	20,00	1757502	3078873	97,81
Alta	24,00	2099650	3335969	91,51
	24,00	2093301	3380720	95,30
	24,00	2091712	3258432	86,36
Recuperação média (DPR%)				94,07 (3,65)

DPR% = Desvio padrão relativo

4.4.2.7 Robustez

Um método é considerado robusto quando demonstra capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações (BRASIL, 2014). Nas Tabelas 13-14 são mostrados dados de variações no fluxo, volume de injeção e lote de coluna resultando em valores de DPR de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2003), abaixo de 15% para o tempo de retenção, área do pico e conteúdo de cumarina, demonstrando a robustez do método. A robustez de um método analítico

avalia sua capacidade de resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003). A demonstração de robustez é crítica na transferência do processo analítico para outros laboratórios (RIBANI et al., 2004).

Tabela 13 - Parâmetros cromatográficos no teste de robustez do método analítico de CLAE para quantificação de umbeliferona.

Parâmetro	Média (DPR% intra)		
	Tr	Área	Umbeliferona (µg/mL)
Fluxo (mL/min)			
0,9	10,265 (0,195)	764522 (1,525)	21,17 (1,50)
1,0	9,364 (0,323)	724408 (2,223)	20,08 (2,18)
DPR% inter	5,032	3,400	3,34
Fluxo (mL/min)			
1,1	8,416 (0,269)	668009 (0,732)	18,55 (0,72)
1,0	9,364 (0,323)	724408 (2,223)	20,08 (2,18)
DPR% inter	5,847	4,693	4,60
Volume injeção (µL)			
19	9,260 (0,412)	671516 (3,952)	18,91 (3,87)
20	9,364 (0,323)	724408 (2,223)	20,08 (2,18)
DPR% inter	0,694	4,375	4,30
Volume injeção (µL)			
21	9,176 (0,364)	750199 (3,461)	20,78 (3,40)
20	9,364 (0,323)	724408 (2,223)	20,08 (2,18)
DPR% inter	1,154	3,247	3,18
Lote Coluna			
BL:7727	9,367 (0,432)	702147 (1,694)	19,47 (1,66)
BL:8209	9,364 (0,323)	724408 (2,223)	20,08 (2,18)
DPR% inter	0,342	2,464	2,43

Tr = tempo de retenção; DPR% = Desvio padrão relativo

Tabela 14 - Parâmetros cromatográficos no teste de robustez do método analítico por CLAE para quantificação de 1,2-benzopirona.

Parâmetro	Média (DPR% intra)		
	Tr	Área	1,2 Benzopirona ($\mu\text{g/mL}$)
Fluxo (mL/min)			
0,9	15,071 (0,037)	3568892 (1,711)	164,76 (1,65)
1,0	13,665 (0,455)	3344597 (1,486)	154,78 (1,43)
DPR% inter	5,366	3,835	3,69
Fluxo (mL/min)			
1,1	12,357 (0,382)	3100854 (0,675)	143,94 (0,65)
1,0	13,665 (0,455)	3344597 (1,486)	154,78 (1,43)
DPR% inter	5,521	4,276	4,10
Volume injeção (μL)			
19	13,594 (0,242)	3181368 (1,382)	147,52 (1,33)
20	13,665 (0,455)	3344597 (1,486)	154,78 (1,43)
DPR% inter	0,435	3,027	2,91
Volume injeção (μL)			
21	13,523 (0,263)	3480361 (3,771)	160,82 (3,63)
20	13,665 (0,455)	3344597 (1,486)	154,78 (1,43)
DPR% inter	0,662	3,393	3,27
Lote Coluna			
BL:7727	13,533 (0,411)	3462454 (0,516)	160,02 (0,50)
BL:8209	13,665 (0,455)	3344597 (1,486)	154,78 (1,43)
DPR% inter	0,342	2,135	2,06

Tr = tempo de retenção; DPR% = Desvio padrão relativo

4.5 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS

No presente estudo foram desenvolvidos dois diferentes extratos hidroetanólicos a partir das partes aéreas de *J. pectoralis*, sendo o primeiro obtido através da extração assistida por ultrassom (EAU) visando desenvolvimento e otimização da técnica extrativa para fins analíticos e o segundo obtido através de maceração seguida por percolação, realizada em maior quantidade que o primeiro, visando o desenvolvimento tecnológico de extratos secos.

4.5.1 Otimização das condições de EAU de cumarinas a partir das partes aéreas de *J. pectoralis*.

O método de EAU é abordado como uma alternativa moderna de extração (YOLMEH; NAJAF; FARHOOK, 2014; SAHIN; AYBASTIER; ISIK, 2013). Em comparação com os

métodos de extração convencionais que envolvem aquecimento e refluxo, a EAU oferece uma alternativa com menores perdas de compostos fenólicos devido a oxidação, ionização e hidrólise (LI; CHEN; YAO, 2005).

Zhou e colaboradores (2016) avaliaram a eficiência entre o método de extração assistida por micro-ondas e a extração assistida por ultrassom na extração da raiz seca de *Scutellaria baicalensis* Georgi através da comparação dos resultados de rendimento, perfil químico, propriedade antioxidante e efeitos inibidores do citocromo P450. Durante o estudo, os autores ressaltam a aplicação do método de EAU, principalmente nos processos de extração analítica e salientam que sua eficiência e eficácia é altamente dependente do solvente de escolha, destacando a necessidade de um estudo aprimorado para otimização da técnica quando escolhida.

O aprimoramento da performance de um sistema, processo ou produto com o intuito de se obter maior benefício pode ser compreendido no conceito de otimização (BEZERRA et al., 2008). Nos últimos anos a utilização de ferramentas estatísticas de análise multivariada tem sido frequentemente empregada na otimização de métodos analíticos principalmente devido à redução no número de experimentos.

A metodologia de superfície de resposta (RSM - *Response Surface Methodology*) foi originalmente descrita por Box e Wilson, podendo ser definida como uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas que são úteis para modelagem e análise nas aplicações em que a resposta de interesse é influenciada por várias variáveis (BOX; WILSON, 1951). Estudos recentes têm demonstrado com sucesso que a MSR pode ser usada para otimizar a extração de composto bioativos em plantas medicinais (PAULA et al., 2016; WONG PAZ et al., 2015; YOLMEH, NAJAFI, REZA; 2014; ZOU et al., 2013). Esta metodologia possui ampla utilização e pode ser empregada em diversas análises de experimentos e processos, quando se deseja analisar quais as variáveis exercem maior influência sobre a resposta de interesse e com isso determinar qual a condição ótima de ajuste de parâmetros. Dentre os planejamentos mais utilizados associados a MSR estão os experimentos de Box-Behnken (BBD - *Box-Behnken Design*).

Neste trabalho foi selecionado o delineamento Box-Behnken 3^3 como ferramenta de análise multivariada na avaliação da influência das variáveis independentes: teor alcoólico (% p/p), tempo (minutos) e proporção droga:solvente (g/mL) sobre a concentração de 1,2-benzopirona e umbeliferona no extrato líquido das partes aéreas de *J. pectoralis* obtido por EAU. A Tabela 15 mostra a matriz experimental do modelo Box Behnken (3^3) utilizada na otimização da metodologia de EAU. A concentração dos marcadores variou para 1,2-

benzopirona entre 71,51 e 171,47 e para umbeliferona entre 7,81 e 22,58 expressos em $\mu\text{g/mL}$ da concentração final da solução injetada em CLAE.

Tabela 15 - Matriz experimental do modelo Box Behnken (3^3) e concentração de 1,2-benzopirona e umbeliferona para a EAU de *J. pectoralis*.

	Teor Alcoólico (%p/p)	Tempo (min)	PDS (g/mL)	Umbeliferona ($\mu\text{g/mL}$)	Benzopirona ($\mu\text{g/mL}$)
1	15	20	15	14,00	166,78
2	45	20	15	10,41	105,63
3	15	60	15	16,81	109,34
4	45	60	15	12,34	118,24
5	15	40	10	22,58	161,04
6	45	40	10	17,95	171,47
7	15	40	20	11,41	84,85
8	45	40	20	9,81	86,46
9	30	20	10	17,38	150,69
10	30	60	10	21,62	163,11
11	30	20	20	7,81	71,51
12	30	60	20	9,94	85,52
13	30	40	15	12,34	111,61
14	30	40	15	12,59	110,67
15	30	40	15	12,47	106,48

Nota: concentração dos marcadores expressa em $\mu\text{g/mL}$ da solução final injetada em CLAE.

Legenda: PDS – proporção droga solvente.

As análises foram realizadas por ANOVA e regressão múltipla empregando MSR. Os resultados são exibidos nas Tabelas 16 e 17. A ideia central da análise de variância (ANOVA) é a de comparar as variâncias dos diferentes tratamentos com a variância decorrente do erro do experimento e assim determinar a significância da regressão adotada para prever respostas (BEZERRA et al., 2008). Sendo assim, o modelo foi significativo ($p = 0,000011$), não demonstrando falta de ajuste ($p = 0,072124$), o coeficiente de determinação (r^2) foi de 0,99916 e r^2 ajustado de 0,99 para umbeliferona. Para 1,2-benzopirona o modelo foi significativo ($p = 0,000084$), não demonstrando falta de ajuste ($p = 0,426266$), o coeficiente de determinação (r^2) foi de 0,9978 e r^2 ajustado de 0,99.

Tabela 16 - Análise variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrática polinomial para umbeliferona, valores de p e F para efeitos lineares (L), quadráticos (Q) e interações, das variáveis independentes avaliadas pelo modelo Box Behnken (3^3) na otimização da EAU.

Fator	Soma dos quadrados	Grau de Liberdade	Media dos Quadrados	F	p
1L	24,9761	1	24,9761	1597,62	0,000625*
2L	12,5611	1	12,5611	803,48	0,001242*
3L	179,2208	1	179,2208	11464,02	0,000087*
1Q	3,1250	1	3,1250	199,89	0,004965*
3Q	2,1819	1	2,1819	139,57	0,007089*
1L e 2Q	0,4186	1	0,4186	26,78	0,035376*
1Q e 2L	0,3321	1	0,3321	21,24	0,043990*
1Q e 2Q	0,0985	1	0,0985	6,30	0,128760
1L e 3L	2,2952	1	2,2952	146,82	0,006742*
1Q e 3L	0,4705	1	0,4705	30,09	0,031661*
2L e 3L	1,1130	1	1,1130	71,20	0,013757*
Falta de ajuste	0,193	1	0,1936	12,38	0,072124
Erro puro	0,031	2	0,0156		
Soma Quadrados total	268,3766	14			

Legenda: 1 – teor alcoólico (% p/p); 2 – tempo de extração (min); 3 – proporção droga: solvente (g/mL); L – linear; Q – quadrático; * $p < 0,05$.

Tabela 17 - Análise variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrática polinomial para 1,2-benzopirona, valores de p e F para efeitos lineares (L), quadráticos (Q) e interações, das variáveis independentes avaliadas pelo modelo Box Behnken (3^3) na otimização da EAU.

Fator	Soma dos quadrados	Grau de Liberdade	Media dos Quadrados	F	p
1L	39,68	1	39,68	5,319	0,147508
1Q	1,65	1	1,65	0,221	0,684861
2L	3,22	1	3,22	0,432	0,578452
3L	11268,90	1	11268,90	1510,692	0,000661*
1L e 2L	1226,75	1	1226,75	164,456	0,006026*
1L e 3Q	516,65	1	516,65	69,261	0,014133*
1Q e 3Q	1,83	1	1,83	0,246	0,669163
2L e 3Q	634,75	1	634,75	85,093	0,011549*
2Q e 3L	2,45	1	2,45	0,329	0,624220
2Q e 3Q	38,99	1	38,99	5,227	0,149562
Falta de ajuste	20,08	2	10,04	1,346	0,426266
Erro puro	14,92	2	7,46		
Soma Quadrados total	15885,45	14			

Legenda: 1 – teor alcoólico (% p/p); 2 – tempo de extração (min); 3 – proporção droga: solvente (g/mL); L – linear; Q – quadrático; * $p < 0,05$.

Como a extração de compostos fenólicos depende amplamente da polaridade dos solventes, é possível que um único solvente não seja eficiente para a extração dos compostos bioativos (WANG et al., 2013). Consequentemente, a combinação de álcool e água é mais eficiente na extração de compostos fenólicos do que somente o álcool (GAN; LATTIF, 2011).

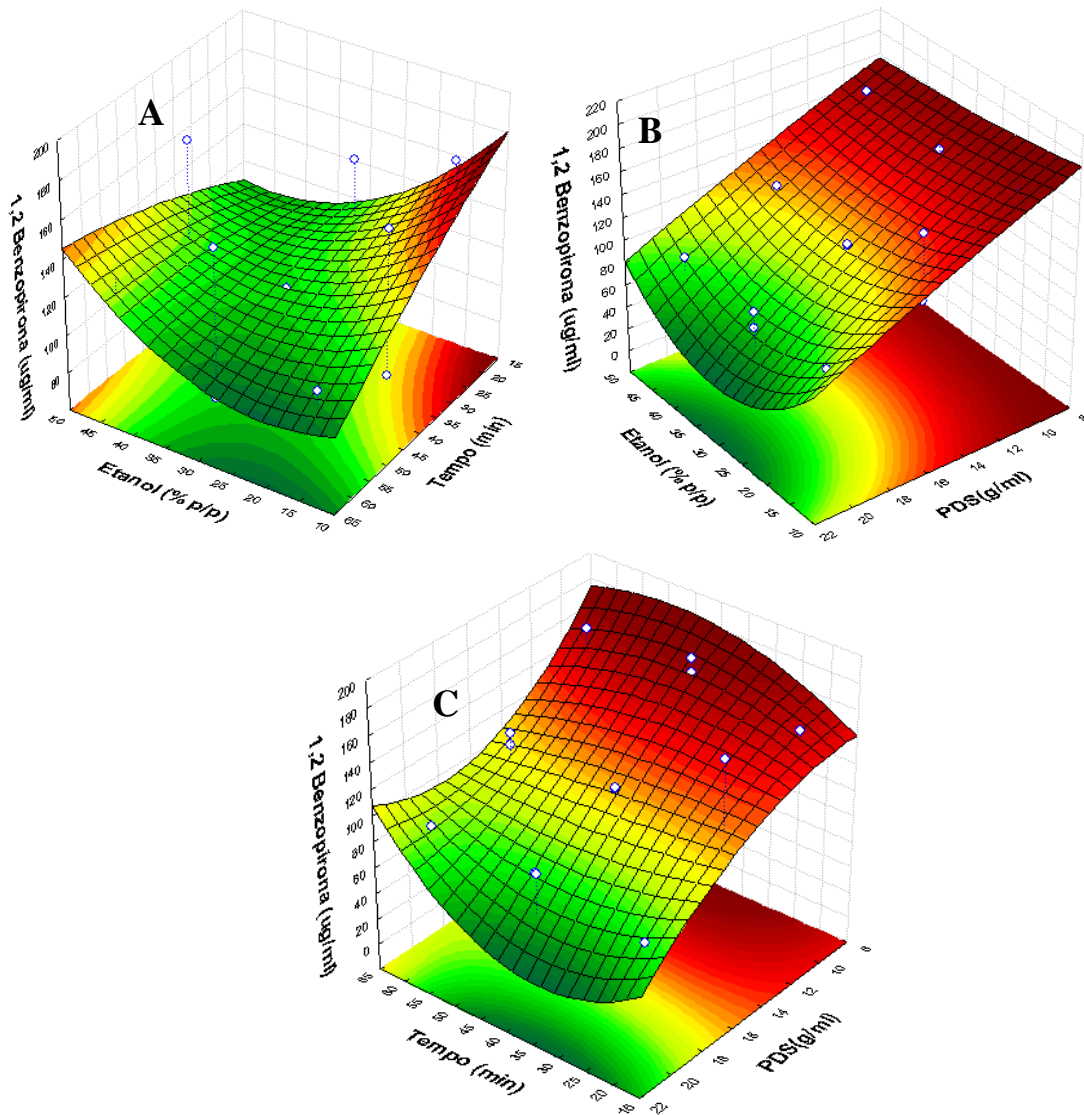
Os dados da Tabela 16 mostram um efeito linear primário significativo ($p < 0,05$) da concentração de etanol (1L), tempo (2L) e relação sólido-solvente (3L) e um efeito quadrático primário significativo ($p < 0,05$) da concentração de etanol (1Q) e da relação material-solvente (3Q) no teor de umbeliferona. As interações de segunda ordem foram significativas ($p < 0,05$) para a concentração de etanol (1L)/tempo (2Q), concentração de etanol (1Q)/tempo (2L), concentração de etanol (1L)/relação material-solvente (3L), concentração de etanol (1Q)/relação material-solvente (3L) e tempo (2L)/relação material-solvente (3L). Dados semelhantes foram relatados no trabalho Fonseca (2009).

Os dados da Tabela 17 mostram um efeito linear primário significativo ($p < 0,05$) da relação material-solvente (3L) no teor de 1,2-benzopirona. As interações de segunda ordem foram significativas ($p < 0,05$) para a concentração de etanol (1L)/tempo (2L), concentração de etanol (1L)/relação material-solvente (3Q) e tempo (2L)/relação material-solvente (3Q).

A Figura 19A mostra que a extração máxima de 1,2-benzopirona foi obtida em baixa concentração de etanol e em pequenos intervalos de tempo de extração, evidenciando o efeito quadrático identificado pelo modelo, uma menor concentração de etanol diminuiu a extração de 1,2-benzopirona quando o tempo de extração foi superior a 35 min.

A Figura 19B-C mostra que os maiores teores de 1,2-benzopirona foram observados em baixos valores de PDS independente das concentrações de etanol e tempo. O parâmetro PDS analisado nos gráficos da superfície de resposta (Figura 20A-B e 19B-C), indica que seu ponto máximo está fora da área experimental. Nestes casos, níveis mais baixos deveriam ser usados em novos planejamentos experimentais para obter o valor ótimo. No entanto, isso não é viável experimentalmente devido à alta intumescência do material vegetal.

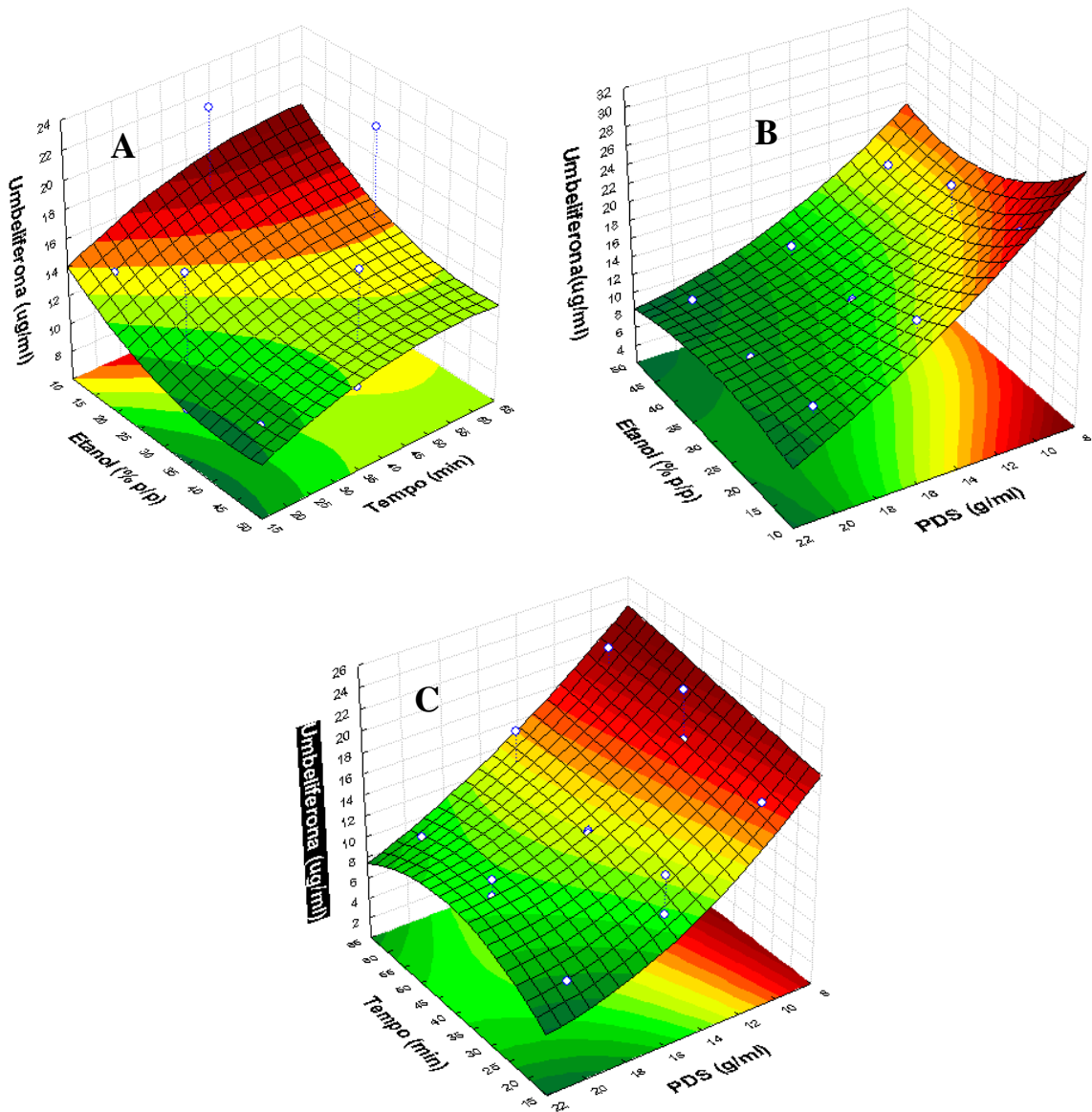
Figura 19 - Gráficos de superfície de resposta representando a concentração de 1,2-benzopirona em função das variáveis independentes para a extração assistida por ultrassom (EAU) de *J. pectoralis*.



Legenda: (A) tempo de extração (min) e teor alcoólico (% p/p); (B) proporção droga:solvente PDS (g/mL) e teor alcoólico (% p/p); (C) proporção droga: solvente PDS (g/mL) e tempo de extração (min).

Nota: concentração de benzopirona expressa em µg/mL da solução final injetada em CLAE.

Figura 20 - Gráficos de superfície de resposta representando a concentração de umbeliferona em função das variáveis independentes para a extração assistida por ultrassom (EAU) de *J. pectoralis*.



Legenda: (A) tempo de extração (min) e teor alcoólico (% p/p); (B) proporção droga:solvente PDS (g/mL) e teor alcoólico (% p/p); (C) proporção droga: solvente PDS (g/mL) e tempo de extração (min).

Nota: concentração de umbeliferona expressa em µg/mL da solução final injetada em CLAE.

As Figuras 21 e 22 demonstram a relação entre os valores preditos pelo modelo e os dados observados. A proximidade destes resultados representa a adequabilidade do modelo em prever respostas.

Figura 21 - Correlação entre os valores observados e os preditos pelo modelo para a concentração de umbeliferona ($\mu\text{g/mL}$).

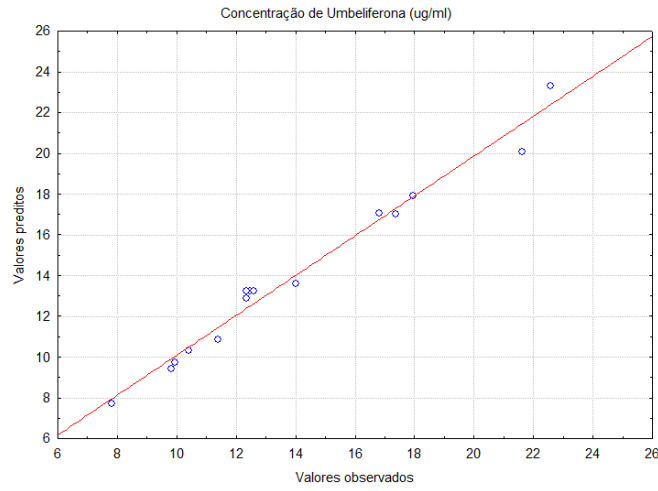
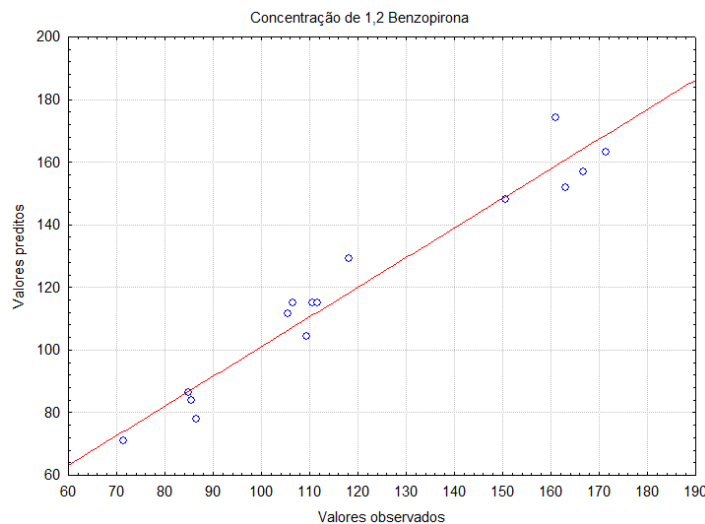


Figura 22 - Correlação entre os valores observados e os valores preditos pelo modelo para a concentração de 1,2-benzopirona ($\mu\text{g/mL}$).



Baseado na análise dos dados de superfície de resposta e na função geral de otimização, foram determinadas as condições de EAU para a otimização das respostas. O objetivo era obter as maiores concentrações de 1,2-benzopirona e umbeliferona por meio da metodologia de extração. Desta forma foram sugeridos os seguintes parâmetros de extração: teor alcoólico de 15% (p/p), tempo de extração de 34 (min.) e proporção droga:solvente de 1:10 (g/mL), para um valor de 22,16 $\mu\text{g/mL}$ de umbeliferona e 163,86 $\mu\text{g/mL}$ de 1,2-benzopirona preditos pelo modelo estatístico, com desejabilidade de 0,981851. Essas condições foram validadas em experimentos independentes realizados em triplicada, dando uma média de 1,2-benzopirona de 169,36 $\mu\text{g/mL}$ e 19,77 $\mu\text{g/mL}$ para o conteúdo de umbeliferona. Isso corresponde a 103,3% do valor previsto para 1,2-benzopirona e 89,2% para umbeliferona, demonstrando a validade do modelo na predição do fenômeno estudado.

4.5.2 Caracterização do extrato líquido

A Tabela 18 demonstra os resultados dos testes de caracterização do extrato líquido. Foi encontrado um valor médio de 2,52 % de sólidos totais, um pH de 6,34, densidade de 1,0146 g/mL e viscosidade de 5,56 cp.

Tabela 18 - Caracterização do extrato líquido das partes aéreas de *J. pectoralis*.

Replicata	Sólidos Totais (% p/p)	Viscosidade (cP)	pH	Densidade (g/mL)
1	2,59	5,70	6,40	1,0146
2	2,49	5,45	6,29	1,0144
3	2,48	5,53	6,35	1,0147
Média	2,52	5,56	6,34	1,0146
DP	0,06	0,12	0,05	0,0001
DPR	2,41	2,29	0,86	0,0150

Legenda: DPR – desvio padrão relativo; DP – Desvio padrão.

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 densidade, teor de sólidos, pH e viscosidade (FONSECA, 2009).

A concentração de sólidos presente no extrato líquido e sua viscosidade exercem grande impacto sobre a eficiência da operação de secagem, influenciando diretamente o rendimento e no tamanho da partícula (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Desta forma extratos com conteúdo de sólidos menores tendem a formar partículas com maior espaço interno e paredes menos espessas após a secagem. O valor médio de sólidos totais encontrado no presente estudo confirma os valores reportados por Fonseca (2009) durante a otimização do processo extrativo das partes aéreas de *J. pectoralis* por percolação.

O pH do extrato líquido variou próximo da faixa de neutralidade em conformidade com outros trabalhos que envolveram a utilização da espécie *J. pectoralis* (FONSECA, 2009; CHANFRAU, 2014).

O teor de sólidos, a densidade e a viscosidade são parâmetros importantes para o controle do processo de extração de plantas medicinais servindo também de base para o cálculo de rendimento do processo de secagem por *spray drying*.

4.6 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DAS PARTES AÉREAS DE *J. pectoralis*

4.6.1. Análise termogravimétrica (ATG) dos padrões de cumarinas

A curva de decaimento de massa do padrão de 1,2-benzopirona frente a temperatura é demonstrada na Figura 23. É possível observar um decaimento inicial de massa pela desidratação do padrão que se estabiliza em 96% entre as temperaturas de 50 °C e 150 °C. A degradação 1,2-benzopirona teve início em torno de 150 °C e se estabilizou novamente em aproximadamente 260 °C. Para o padrão de umbeliferona é possível observar um decaimento inicial de massa pela desidratação do padrão que se estabiliza em 99% entre as temperaturas de 50 e 220 °C, conforme Figura 24. A degradação da umbeliferona teve início em torno de 220 °C e se estabilizou em 440 °C.

Figura 23 - Curva termogravimétrica do padrão de 1,2-benzopirona.

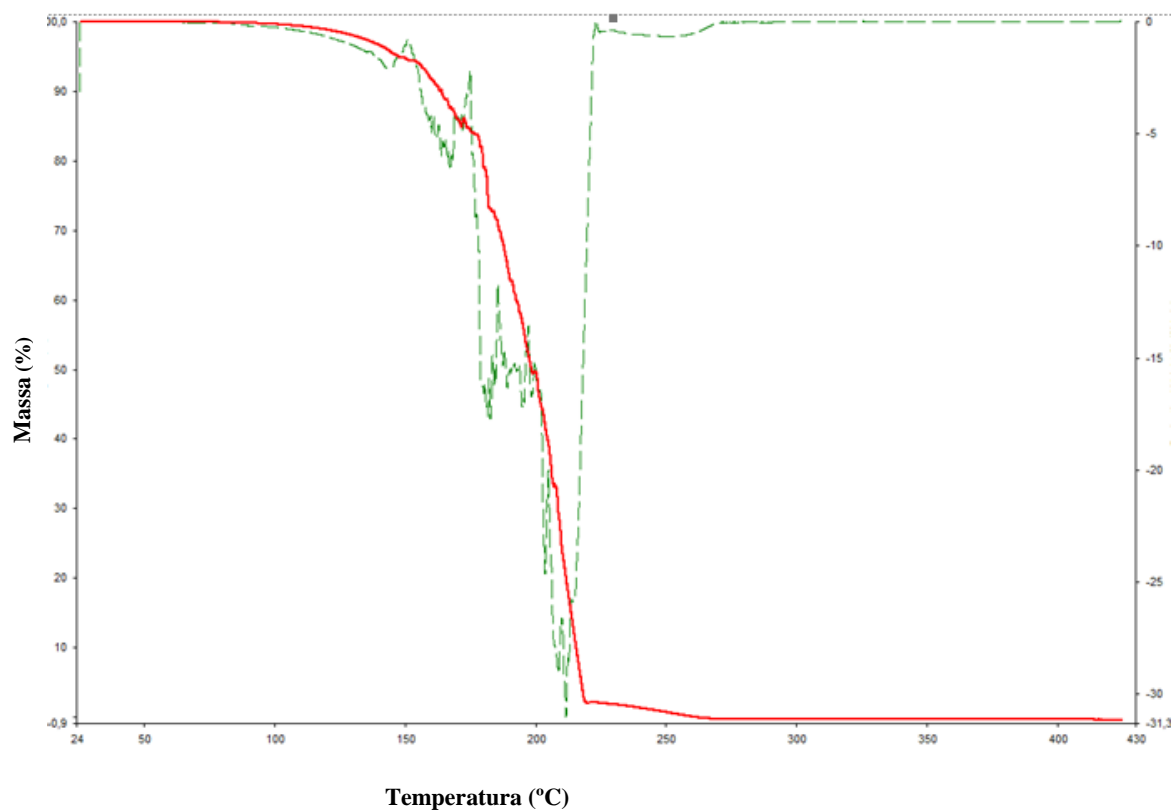
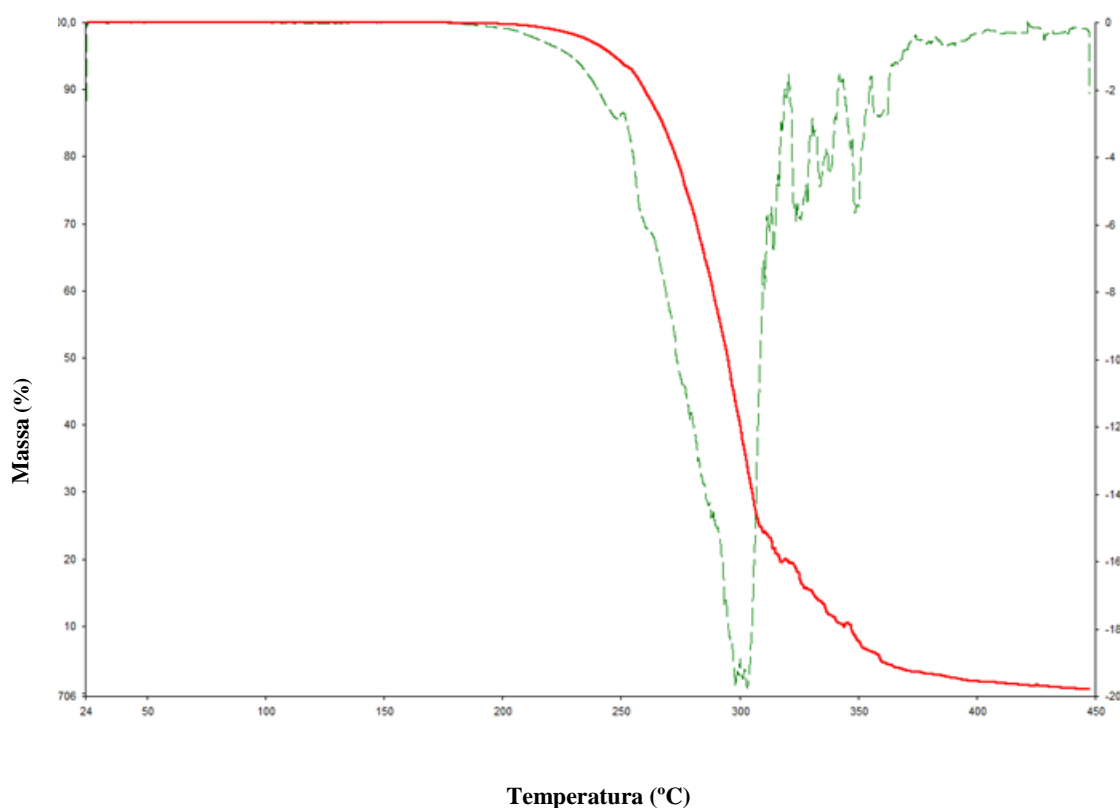


Figura 24 - Curva termogravimétrica do padrão de umbeliferona.



Desta forma, as análises termogravimétricas demonstraram a necessidade de trabalho com faixas de temperaturas mais baixas devido a maior sensibilidade da 1,2-benzopirona, ou seja, aproximadamente 150 °C sem que ocorra a degradação dos marcadores. Dados semelhantes foram encontrados em estudos de Owiti (2011).

4.6.2. Delineamento experimental

Fundamentado na literatura foram selecionados parâmetros para o estudo de otimização das condições de secagem por aspersão do extrato líquido. Segundo Oliveira e Petrovick (2010) a maior parte dos trabalhos envolvendo secagem por aspersão (*spray drying*) faz utilização da técnica com o auxílio de adjuvantes de secagem, visto que estes afetam as características de biodisponibilidade do extrato seco, influenciando sua estabilidade, além de aumentarem o rendimento do processo.

Adjuvantes de secagem geralmente são adicionados ao processo com o intuito de se melhorar a eficiência de secagem e propriedades do produto (GEORGETTI et al., 2008). As maltodextrinas, devido as suas características físico-químicas e segurança toxicológica, têm

sido amplamente utilizadas nos processos de secagem por *spray drying*, principalmente em produtos alimentícios, mas com potencial aplicação em fitoterápicos (BAKAR et al., 2013; SUN-WATERHOUSE; WATERHOUSE, 2015; VILLACREZ; CARRIAZO; OSORIO, 2014).

A temperatura de saída do extrato seco é um resultado da temperatura de entrada e da vazão do extrato durante o processo de secagem por aspersão. Ela apresenta impacto direto sobre a degradação química dos constituintes do extrato líquido e a umidade e atividade de água (AW) do extrato seco (ASSUNÇÃO, 2016; CORTÉS-ROJAS, SOUZA; OLIVEIRA, 2015). Desta forma a temperatura de entrada, a vazão do extrato e a concentração do adjuvante foram as variáveis independentes selecionadas para o estudo de otimização.

4.6.3 Otimização da secagem dos extratos por aspersão (*spray drying*)

Os resultados dos 15 experimentos na matriz do modelo experimental Box Behnken (3^3) são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Matriz experimental do modelo Box Behnken (3^3) e seus respectivos resultados de rendimento e testes de caracterização dos extratos secos obtidos por aspersão (*spray drying*).

Nº	TE (°C)	FA (mL/min.)	CA (% p/p)*	R (%)	U (%)	AW	Teor UMB (%)	Teor BZP (%)
1	80	0,40	20	27,41	8,63	0,435	0,434	1,620
2	140	0,40	20	55,46	5,18	0,327	0,375	1,500
3	80	0,40	60	38,15	9,05	0,393	0,281	1,223
4	140	0,40	60	47,07	6,64	0,306	0,274	1,198
5	80	0,20	40	40,25	7,97	0,323	0,217	1,350
6	140	0,20	40	43,71	6,94	0,279	0,338	1,455
7	80	0,60	40	29,60	9,78	0,464	0,345	1,293
8	140	0,60	40	71,27	8,55	0,404	0,402	1,723
9	110	0,20	20	26,09	6,00	0,34	0,363	1,473
10	110	0,20	60	38,96	6,91	0,331	0,319	1,324
11	110	0,60	20	33,16	9,52	0,414	0,367	1,303
12	110	0,60	60	38,82	7,01	0,373	0,310	1,252
13	110	0,40	40	38,91	8,40	0,400	0,324	1,295
14	110	0,40	40	31,68	8,98	0,408	0,332	1,289
15	110	0,40	40	30,77	8,34	0,395	0,417	1,641

Legenda: TE – temperatura de entrada; FA- fluxo de alimentação; CA- concentração de adjuvante; R- rendimento; U- umidade; AW – atividade de água; UMB- umbeliferona; BZP- benzopirona. *porcentagem de maltodextrina em relação à massa de sólidos totais. Condições mantidas fixas durante a secagem: diâmetro do bico de aspersão de 0,7 mm, fluxo do ar comprimido de 40 L/min., pressão do ar comprimido de 4,0 kg/F.

A análise de variância com o sumário dos efeitos das variáveis independentes e suas significâncias são apresentados na Tabela 20, com exceção das variáveis dependentes, teor de umbeliferona e teor de 1,2-benzopirona, que não demonstraram valores significativos de R^2 e R^2 ajustado na análise de variância ANOVA.

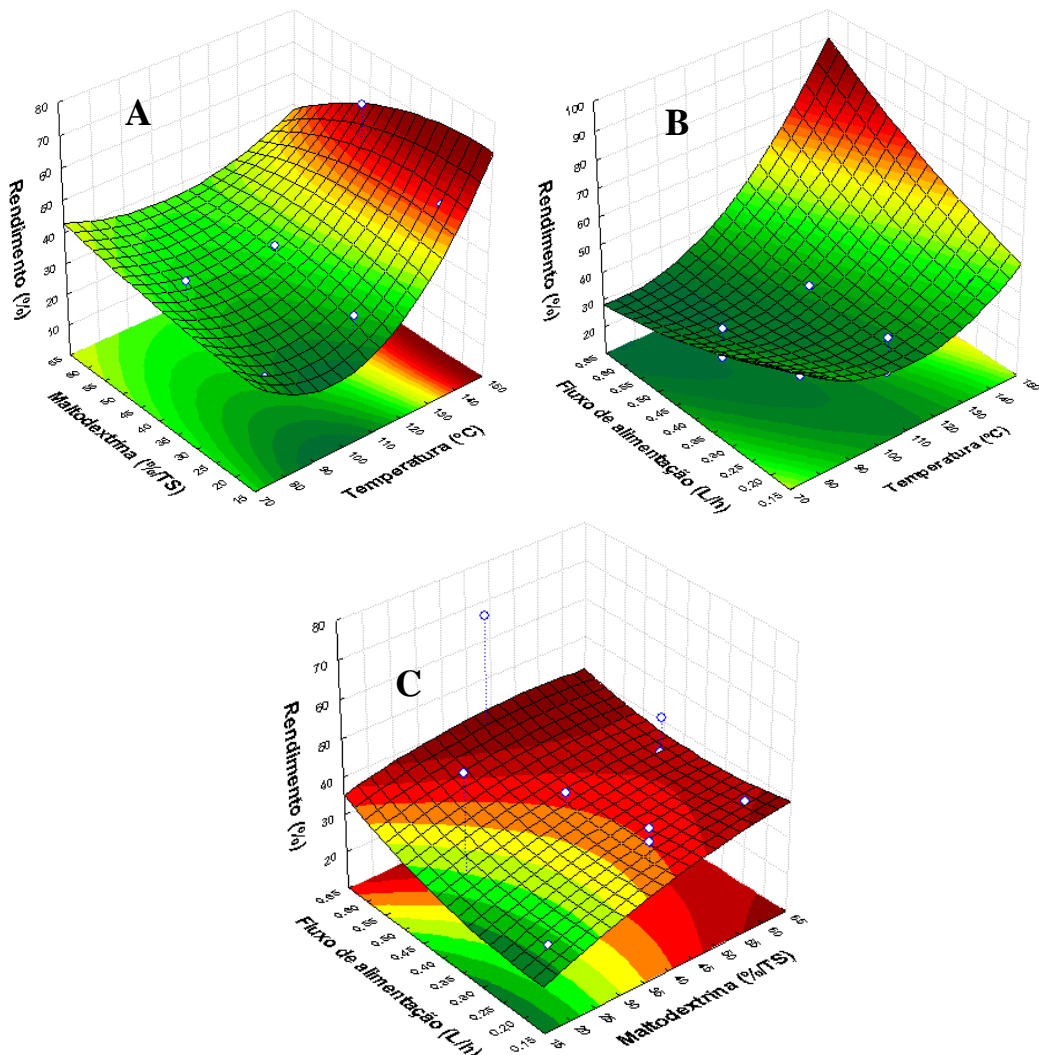
Tabela 20 - Sumário dos efeitos das variáveis independentes sobre as respostas avaliadas no planejamento Box Behnken (3^3) na obtenção do extrato seco de *J. pectoralis*.

Parâmetro	Rendimento		Umidade		AW	
	<i>p</i>	efeito	<i>p</i>	efeito	<i>p</i>	efeito
1L	0,026934*	19,8450	0,012545*	-2,33000	0,003506*	-0,082333
1Q	0,049033*	-10,0929	0,569244	0,12417	0,040793*	0,016375
2L	0,364306	3,8717	0,305137	0,36000	0,026658*	-0,029333
2Q	0,507604	1,8571	0,028095*	1,07417	0,029650*	0,019375
3L	0,744295	2,1358	0,046621	2,02167	0,004020*	0,129750
3Q	0,421532	-4,6558	0,528288	0,27833	0,037492*	0,034250
1L e 2L	0,165181	-9,5650	0,279075	0,52000	-	-
1L e 2Q	0,584063	2,0400	0,069209	0,90000	-	-
1Q e 2L	0,328213	4,0450	0,073541	-0,87000	-	-
1L e 3L	0,050416	19,1050	0,803834	-0,10000	-	-
2L e 3L	0,503798	-3,6050	0,040169*	-1,71000	0,134819	-0,016000
Falta de ajuste	0,511801	-	0,859935	-	0,054821	-

Legenda: AW – atividade de água; 1 – Temperatura de entrada; 2 – concentração do adjuvante; 3 – fluxo de alimentação; L – Linear; Q – quadrático. * $p < 0,05$.

O rendimento da secagem foi influenciado significativamente pela temperatura, de forma que, o aumento da temperatura de entrada favoreceu um maior rendimento. Nos níveis avaliados os gráficos de superfície de resposta demonstram um aumento do rendimento em função da temperatura de entrada e da vazão do extrato sugerindo que estas variáveis afetariam positivamente esta resposta nessas condições (Figura 25). Os referidos dados indicam para a utilização de níveis mais altos de temperatura de entrada e fluxo de alimentação em futuros planejamentos experimentais.

Figura 25 - Gráficos de superfície de resposta representando o rendimento da secagem (%) em função das variáveis independentes.



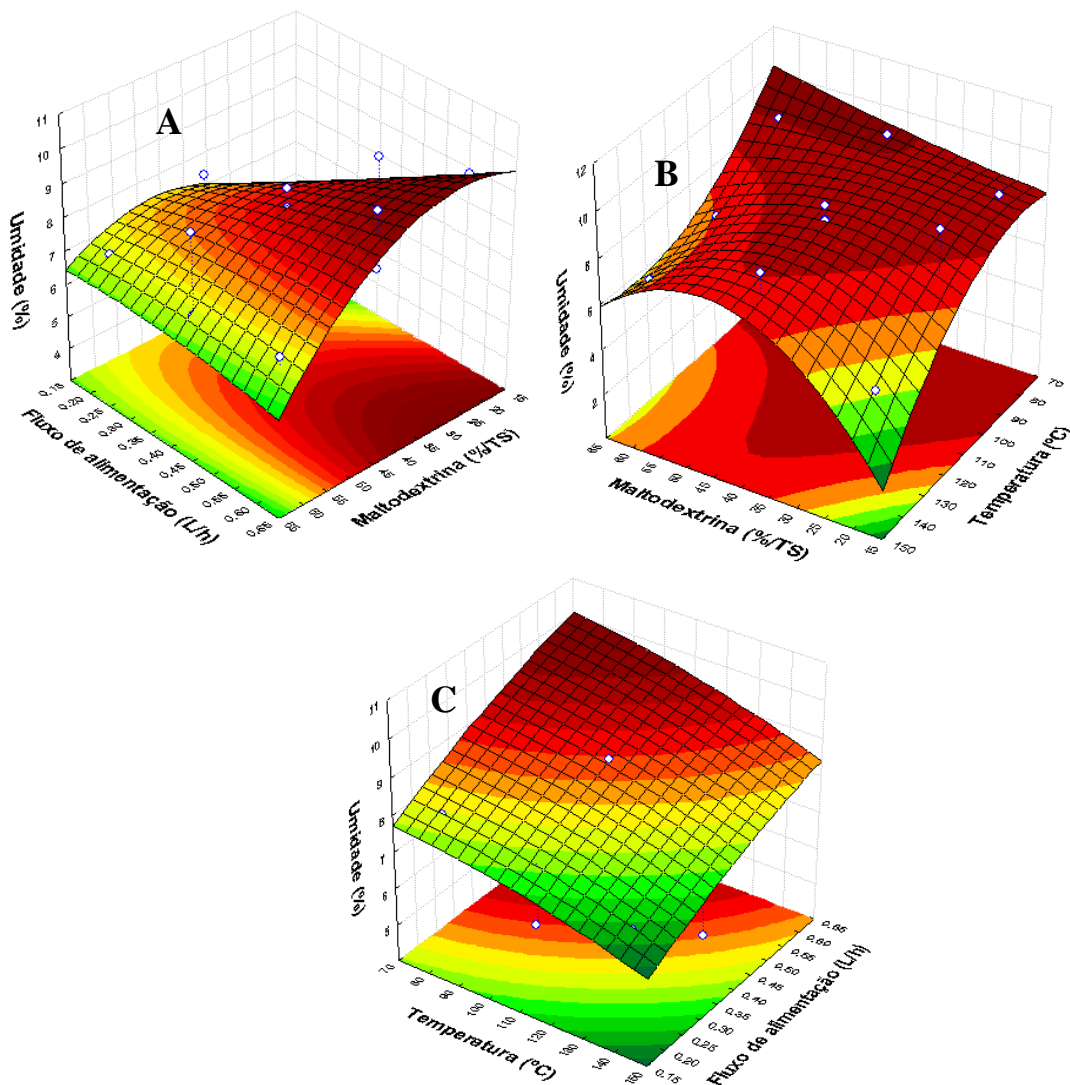
Legenda: (A) concentração de adjuvante (% p/p) e temperatura de entrada (°C); (B) fluxo de alimentação (L/h) e temperatura de entrada (°C); (C) fluxo de alimentação (L/h) e concentração do adjuvante (% p/p).
Nota: concentração de adjuvante maltodextrina em % (p/p) em relação a massa de sólidos totais do extrato líquido.

A umidade foi influenciada pela temperatura e concentração do adjuvante, sendo que, o aumento da temperatura de entrada favoreceu uma queda no valor da umidade do extrato seco, já o aumento da concentração do adjuvante favoreceu o aumento da umidade. A atividade de água foi influenciada pelas três variáveis independentes, sendo que, um aumento na temperatura de entrada e na concentração do adjuvante influenciaram uma queda na atividade de água, enquanto que o aumento do fluxo de alimentação indicou um aumento na atividade de água.

O gráfico de superfície de resposta da Figura 25A demonstra um efeito linear positivo da temperatura de entrada sobre o rendimento, sem influência significativa das concentrações

do adjuvante (maltodextrina). A Figura 25B, indica um efeito linear positivo das variáveis temperatura de entrada e fluxo de alimentação sobre o rendimento. Nos níveis avaliados os gráficos de superfície de resposta demonstram um platô em função do fluxo de alimentação e da concentração de adjuvante em relação do rendimento, sugerindo que estas variáveis não afetariam esta resposta nessas condições (Figura 25C). O modelo apresentou significância estatística sem demonstrar falta de ajuste ($p = 0,002859$ e $0,511801$ respectivamente). O coeficiente de determinação (r^2) foi de $0,97313$ e o r^2 ajustado foi de $0,87461$.

Figura 26 - Gráficos de superfície de resposta representando a umidade (%) do extrato seco em função das variáveis independentes.

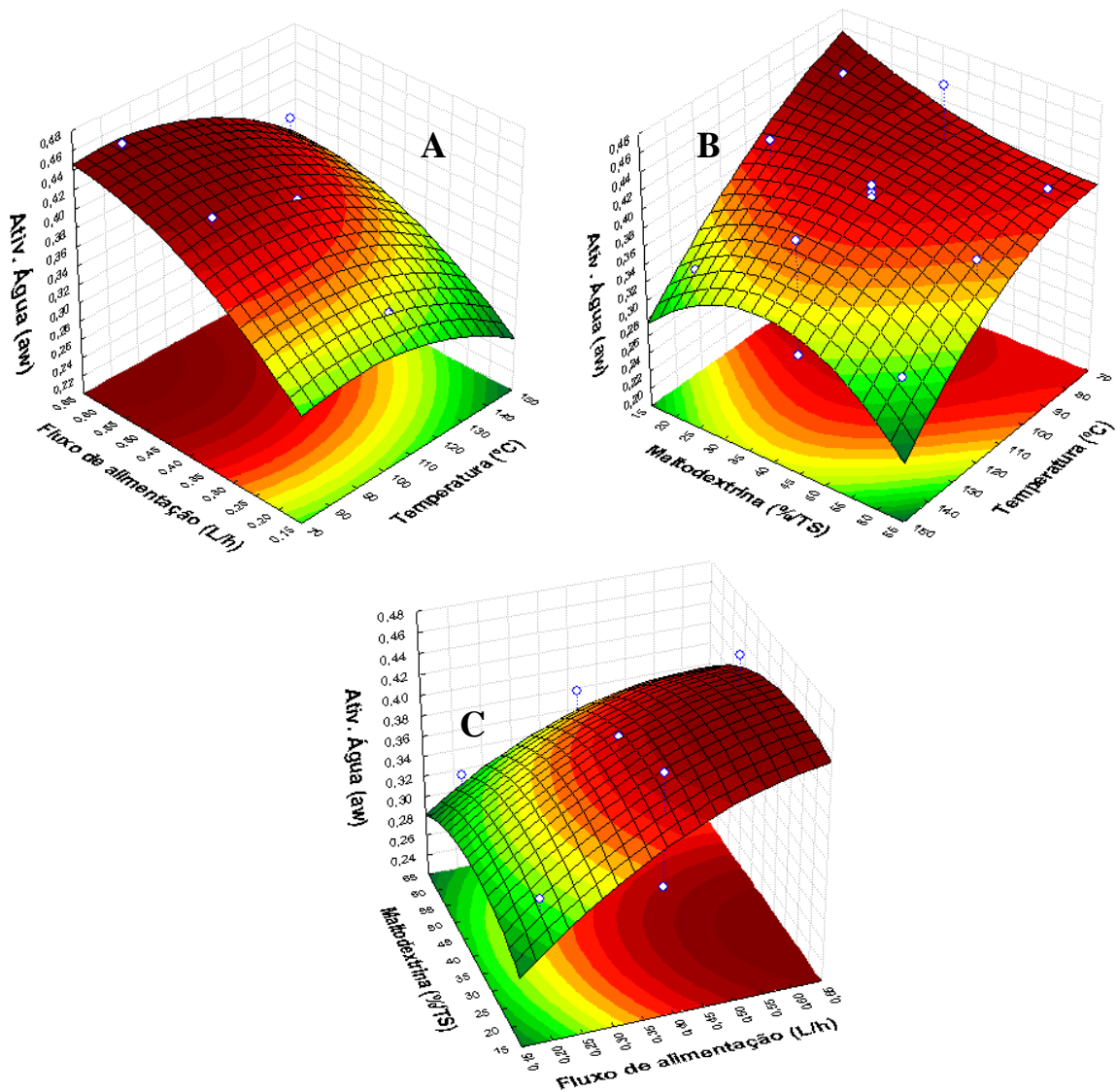


Legenda: (A) concentração de adjuvante (% p/p) e fluxo de alimentação (L/h); (B) temperatura (°C) e concentração de adjuvante (% p/p); (C) fluxo de alimentação (L/h) e temperatura (°C).

Nota: concentração de adjuvante maltodextrina em % (p/p) em relação a massa de sólidos totais do extrato líquido.

A Figura 26A demonstra um efeito linear positivo da interação do fluxo de alimentação com a concentração de adjuvante (maltodextrina), já a Figura 26B apresenta um platô da umidade com valores de temperatura de entrada abaixo de 115 °C e concentração de adjuvante acima de 35%. Na Figura 26C, observa-se menores valores de umidade em temperaturas acima de 130 °C com fluxo de alimentação abaixo de 0,25 L/h. O modelo apresentou significância estatística sem demonstrar falta de ajuste ($p = 0,000562$ e $0,859935$ respectivamente). O coeficiente de determinação (r^2) foi de $0,99013$ e o r^2 ajustado foi de $0,93091$.

Figura 27 - Gráficos de superfície de resposta representando a atividade de água (AW) do extrato seco em função das variáveis independentes.



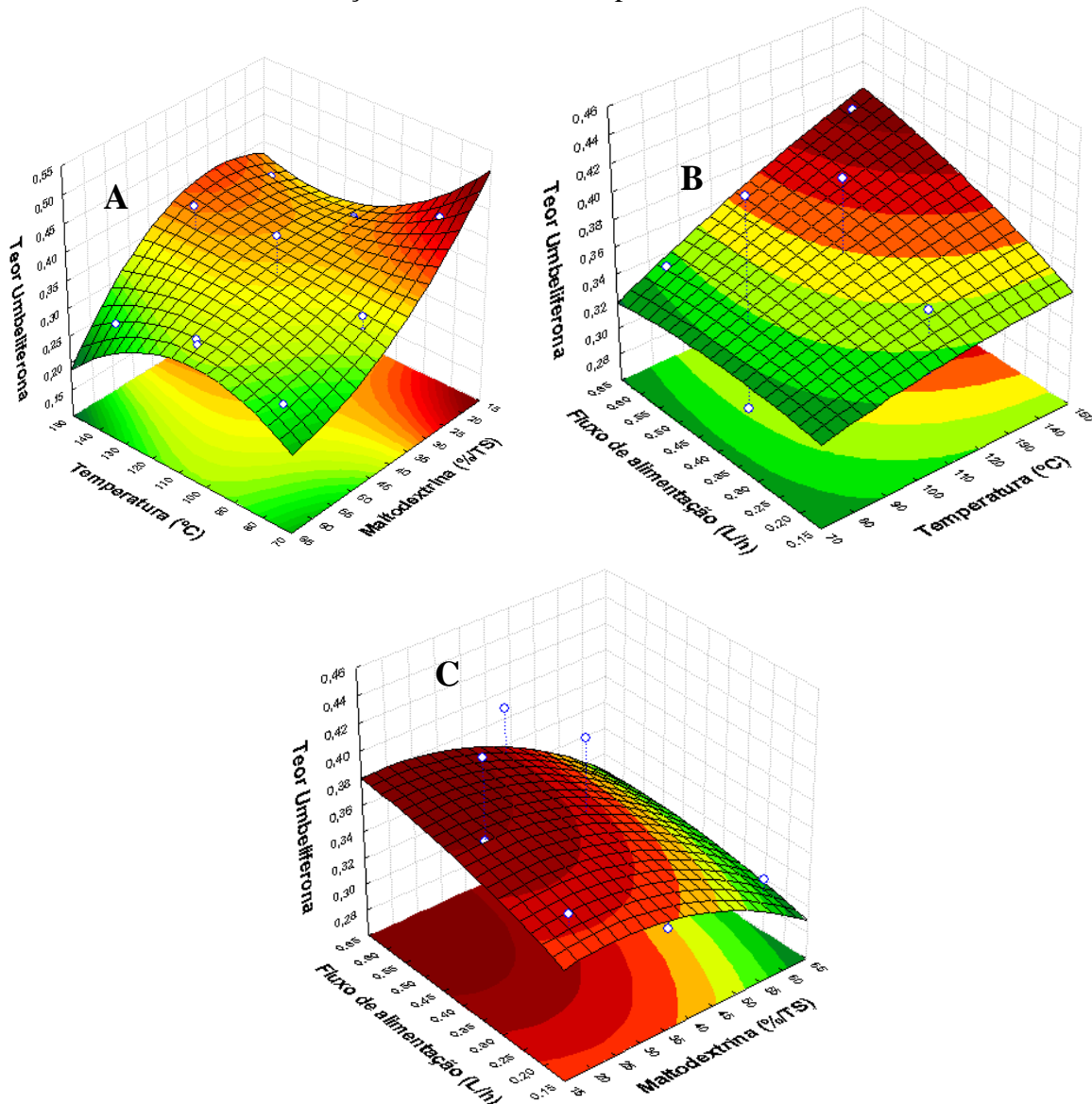
Legenda: (A) temperatura (°C) e fluxo de alimentação (L/h); (B) temperatura (°C) e concentração de adjuvante (% p/p); (C) fluxo de alimentação (L/h) e concentração de adjuvante (% p/p).

Nota: concentração de adjuvante maltodextrina em % (p/p) em relação a massa de sólidos totais do extrato líquido.

As Figuras 27A e 27C demonstram o efeito linear positivo do fluxo de alimentação sobre a atividade de água independente da concentração do adjuvante e temperatura. A Figura

27B apresenta menores valores de atividade de água com maiores temperaturas de entrada sem grande influência da concentração de adjuvante. O modelo apresentou significância estatística sem demonstrar falta de ajuste ($p = 0,000089$ e $0,054821$ respectivamente). O coeficiente de determinação (r^2) foi de $0,91943$ e o r^2 ajustado foi de $0,812$.

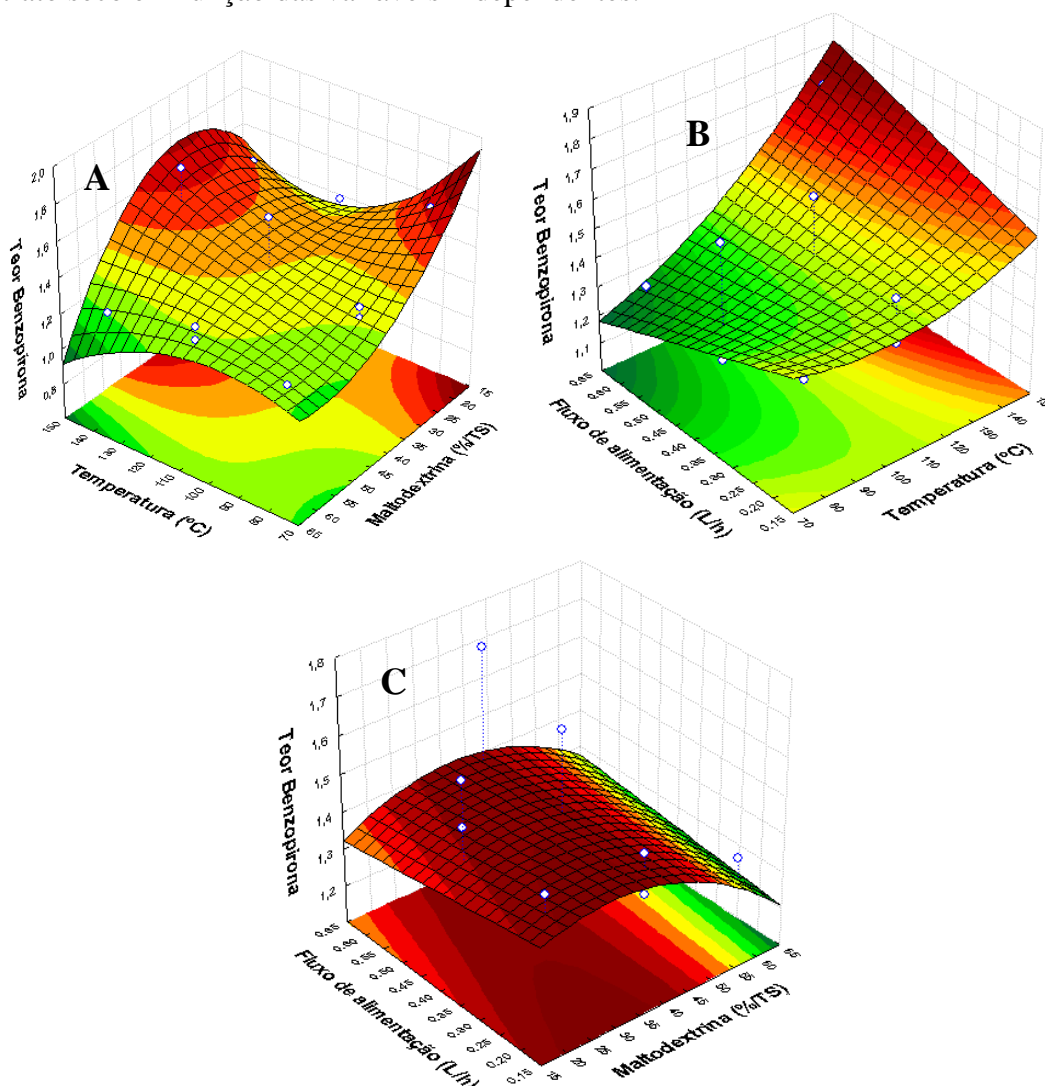
Figura 28 - Gráficos de superfície de resposta representando o teor de umbeliferona (%) presente no extrato seco em função das variáveis independentes.



Legenda: (A) temperatura (°C) e concentração de adjuvante (% p/p); (B) temperatura (°C) e fluxo de alimentação (L/h); (C) fluxo de alimentação (L/h) e concentração de adjuvante (% p/p).

Nota: concentração de adjuvante maltodextrina em % (p/p) em relação a massa de sólidos totais do extrato líquido.

Figura 29 - Gráficos de superfície de resposta representando o teor de benzopirona (%) presente no extrato seco em função das variáveis independentes.

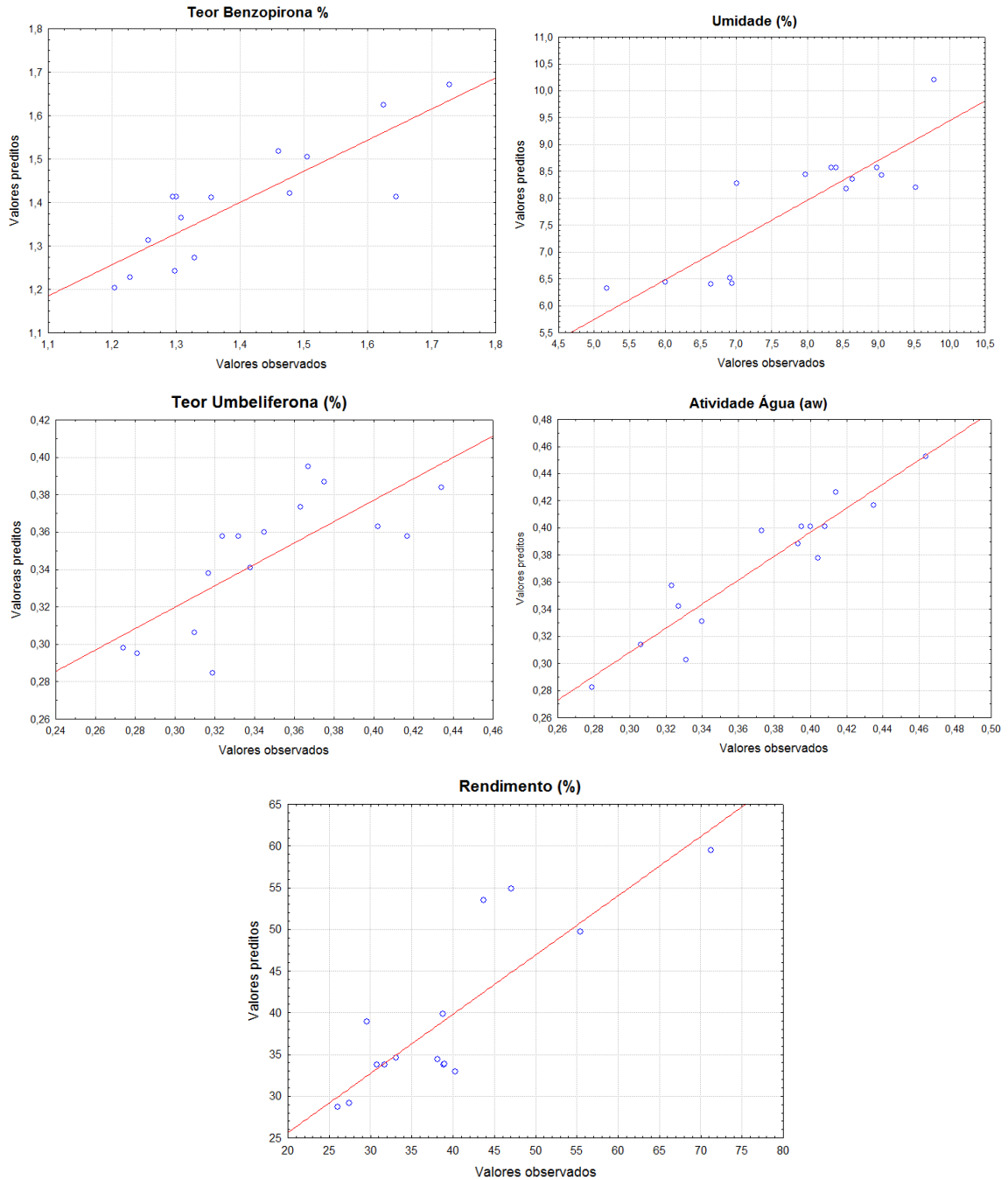


Legenda: (A) temperatura (°C) e concentração de adjuvante (% p/p); (B) temperatura (°C) e fluxo de alimentação (L/h); (C) fluxo de alimentação (L/h) e concentração de adjuvante (% p/p).

Nota: concentração de adjuvante maltodextrina em % (p/p) em relação a massa de sólidos totais do extrato líquido.

As Figuras 28 e 29, demonstram o comportamento semelhante do teor dos dois marcadores frente as variáveis independentes. As Figuras 28A e 29A demonstram a influência negativa não linear da temperatura e da concentração de adjuvante no teor de umbeliferona e benzopirona. As Figuras 28B e 29B demonstram que o teor máximo dos marcadores umbeliferona e benzopirona foram obtidos na interação de temperaturas acima de 120 °C com fluxo de alimentação acima de 0,30 L/h. Quando avaliada a interação entre a concentração de adjuvante e o fluxo de alimentação sobre o teor de umbeliferona, foi observado nas Figuras 28C e 29C que maiores valores de teor de umbeliferona e benzopirona foram obtidos com as menores concentrações do adjuvante, independente do fluxo de alimentação utilizado.

Figura 30 - Correlação entre os valores preditos e observados para as respostas avaliadas na secagem dos extratos.



4.6.4 Rendimento e caracterização dos extratos secos obtidos nas condições de secagem otimizadas

Com base nos gráficos de superfície de resposta e utilizando a função geral de otimização foram propostos os parâmetros preditos para as variáveis independentes (temperatura de entrada, concentração de adjuvante e fluxo de alimentação) e os valores

preditos para as variáveis dependentes (rendimento, umidade, atividade de água e teor dos marcadores umbeliferona e 1,2-benzopirona) com desejabilidade de 0,5698, conforme apresentado na Tabela 21.

Tabela 21 - Valores preditos para rendimento e dados de caracterização do extrato seco obtido das partes aéreas de *J. pectoralis* por aspersão (*spray drying*).

Variáveis independentes Otimizadas	Valores	R (%)	U (%)	AW	Teor UMB (%)	Teor BZP (%)
Temperatura entrada (°C)	140					
Fluxo alimentação (L/h)	0,60	72,26	7,65	0,385	0,367	1,650
Concentração adjuvante (%p/p)	48					

Legenda: R- rendimento; U- umidade; AW-atividade de água; UMB -umbeliferona; BZP-benzopirona.

Na avaliação da reprodutibilidade dos parâmetros otimizados no modelo Box Behnken (3³) foram realizadas três novas secagens utilizando os valores preditos: temperatura de entrada de 140 °C, fluxo de alimentação 0,60 L/h e concentração do adjuvante maltodextrina em 48 % (p/p). O processo foi avaliado pelo rendimento da secagem e os extratos caracterizados pelo teste de umidade, atividade de água e teor dos marcadores umbeliferona e 1,2-benzopirona. Os dados da triplicata são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Valores reais para rendimento e dados de caracterização do extrato seco.

Secagens	Rendimento (%)	Umidade (%)	AW	Teor UMB (%)	Teor BZP (%)
1	63,00	4,62	0,259	0,312	1,407
2	63,56	4,67	0,280	0,317	1,442
3	63,95	4,37	0,258	0,352	1,554
Média	63,50 ± 0,48	4,55 ± 0,16	0,266 ± 0,01	0,327 ± 0,02	1,468 ± 0,08
DPR	0,75	3,52	4,68	6,66	5,23
%*	87,88	60,23	69,00	88,86	88,97

Legenda: DPR: desvio padrão relativo; % *- porcentagem em relação ao valor predito pelo modelo; condições de secagem: diâmetro do bico de aspersão de 0,7 mm; fluxo do ar comprimido de 40 L/min.; pressão do ar comprimido de 4,0 kg/F; temperatura de entrada de 140°C; fluxo de alimentação 0,60 L/h; concentração do adjuvante maltodextrina de 48% (p/p).

O experimento mostrou valores com boa concordância aos resultados preditos para o rendimento e para o teor dos marcadores, demonstrando a adequabilidade do modelo escolhido em demonstrar a influência destes parâmetros na otimização das variáveis respostas para a secagem dos extratos obtidos das partes aéreas de *J. pectoralis*. Os resultados de umidade e atividade de água apresentaram melhores valores para a qualidade do extrato seco, sendo estes menores que os encontrados durante o experimento fatorial.

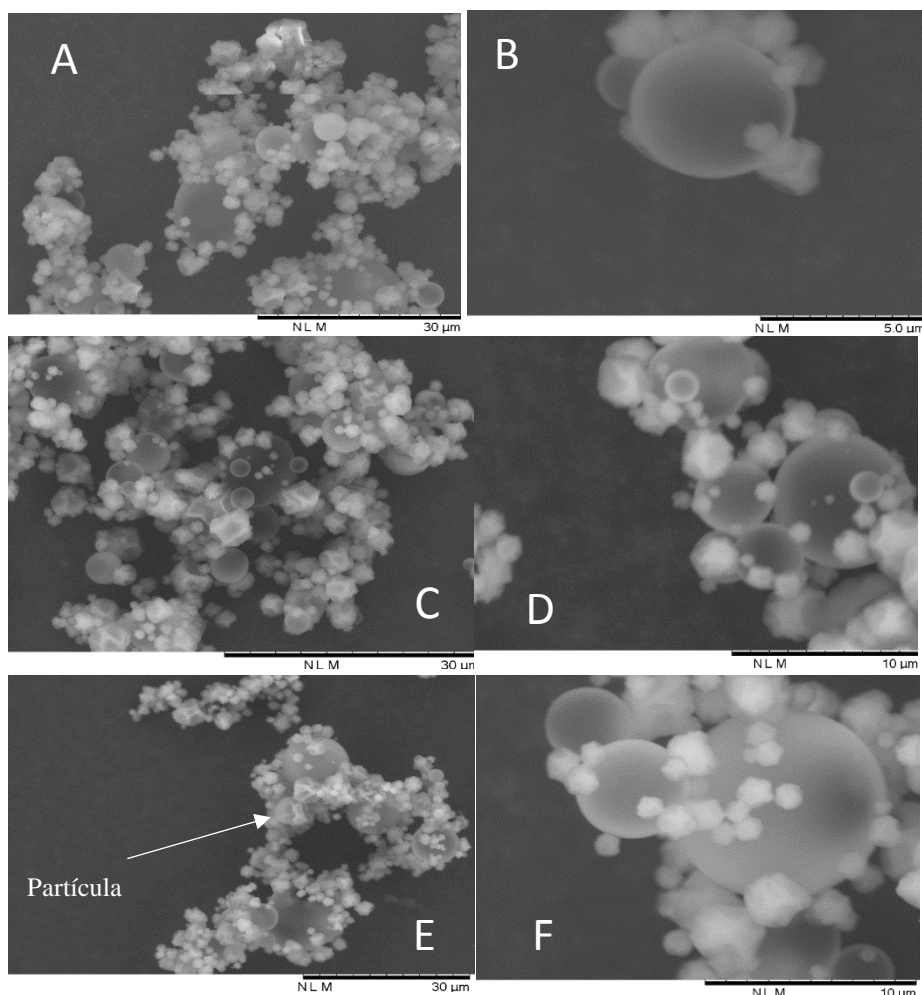
4.6.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação morfológica das partículas do extrato seco das partes aéreas de *J. pectoralis*, obtido nas condições otimizadas, revelou partículas com uma estrutura aglomerada composta por grãos individuais de material unidos por poeira submicrométrica (do mesmo material). Os grãos ou partículas primárias variam tanto em tamanho como em forma, de estruturas irregulares a regular com formato esférico a muito grandes com até 10 μm de diâmetro, conforme apresentado na Figura 31.

Características semelhantes foram relatadas por Sun-Waterhouse e Waterhouse (2015) na secagem por *spray drying* de suco de kiwi com a utilização de maltodextrina como adjuvante. Além de que pós derivados de extratos vegetais apresentam formação de partículas de pequeno tamanho devido às altas pressões de atomização utilizadas (CAL; SOLLOHUB, 2010)

Partículas irregulares de formato esférico também são características da secagem por *spray drying* de extratos vegetais (CAL; SOLLOHUB, 2010; CALISKAN; DIRIN, 2013; WALTON; MUMFORD, 1999). Em alguns casos, as partículas maiores se rompem (Figura 31E), pois a evaporação superficial das gotículas aspergidas promove a formação de uma camada de material seco externa, por meio da qual ocorre a saída do líquido do interior da gotícula e o rompimento da mesma (LIAN; HSIAO; CHOU, 2002; NEGRAO-MURAKAMI et al., 2017). Segundo Oliveira e Petrovick (2010), dependendo da elasticidade e permeabilidade da crosta, podem ser produzidos diversos materiais como esferas intactas, com superfície imperfeita ou fragmentada, sólidas ou ocas.

Figura 31 - Extrato seco de *J. pectoralis* visualizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A/B- fotomicrografias da 1ª replicata; C/D- fotomicrografias da 2ª replicata; G/H- fotomicrografias da 3ª replicata.



Fonte: Próprio autor.

4.6.6 Avaliação da fluidez do pó do extrato seco

Através da determinação da densidade aparente (ρ_a) e densidade compactada (ρ_c) do pó do extrato seco das partes aéreas de *J. pectoralis*, obtido nas condições otimizadas, foram calculados o fator de Hausner (FH) e o índice de compressibilidade de Carr (IC%). Ambos fornecem através da comparação entre a densidade aparente e densidade compactada, um resultado indireto da facilidade do pó em escoar, uma vez que, quanto mais arredondada é uma partícula, menores serão os espaços de ar dentro das misturas de pós, facilitando assim o seu rolamento e conseqüentemente seu escoamento (GARCIA; PEREIRA; DIAS, 2012). Os resultados são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 - Resultados da avaliação de fluxo dos pós obtidos nas 3 replicatas da secagem do extrato de *J. pectoralis* por *spray drying*.

Testes	1ªReplicata	2ªReplicata	3ªReplicata
Densidade aparente (g/cm ³)	0,182	0,181	0,181
Densidade compactada (g/cm ³)	0,385	0,384	0,384
Fator de Hausner	2,115	2,121	2,121
Índice de Carr (%)	52,72	52,86	52,86

Analisando os resultados obtidos para FH > 1,60 e IC >38% (USP, 2011), observa-se que o fluxo dos pós do extrato seco das partes aéreas de *J. pectoralis* pode ser classificado como extremamente baixo, uma vez que FH obtido foi de 2,12 e o IC de 52%. Estes dados demonstram que os pós avaliados possuem alta força de coesão entre as partículas. Tal resultado é esperado, uma vez que pós derivados de extratos vegetais, secos por *spray drying* tendem a possuir uma baixa fluidez devido ao pequeno tamanho das partículas geradas, devido às altas pressões de atomização utilizadas (CAL; SOLLOHUB, 2010).

4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *J. PECTORALIS* EM RATAS WISTAR

4.7.1 Toxicidade oral aguda e observação dos sinais de toxicidade (*screening hipocrático*)

Não houve mortes dos animais ao longo de todo o teste, incluindo as etapas com as doses de 300 mg/kg (teste e repetição) e as doses de 2000 mg/kg (teste e repetição), classificando o extrato seco padronizado em cumarinas obtido a partir das partes aéreas de *J. pectoralis* na categoria “5”, ou seja, de baixa toxicidade, conforme a OECD 403. Desta forma a DL₅₀ do referido extrato é estimada entre 2000 a 5000 mg/kg.

Nos testes comportamentais, evidenciados pelo *screening hipocrático*, observou-se que o grupo tratado com a dose de 2000 mg/kg apresentou durante as primeiras horas após a administração do extrato, um elevado grau de sonolência (hipnose) e redução da resposta a pressão da cauda, conforme demonstrado na Tabela 24. Estes sinais estão provavelmente relacionados à atividade sedativa e antinociceptiva da espécie *J. pectoralis*, conforme relatado em estudos de Chanfrau et al. (2008), Leal et al. (2000) e Lino (1995).

Segundo o Guia 423 (OECD, 2001), a amostra é considerada praticamente atóxica quando apresenta um valor de DL50 acima de 2000 mg/kg ou entre 2000 e 5000 mg/kg e não recomenda, neste caso, a realização do teste com a dose de 5000 mg/kg, como forma de proteção à vida dos animais utilizados nos experimentos e também devido as dificuldades de solubilização e administração das amostras.

Tabela 24 - Sinais clínicos apresentados por ratas *Wistar*, durante as primeiras 8 horas do teste de toxicidade oral aguda do extrato seco das partes aéreas de *J. pectoralis* padronizado em cumarinas.

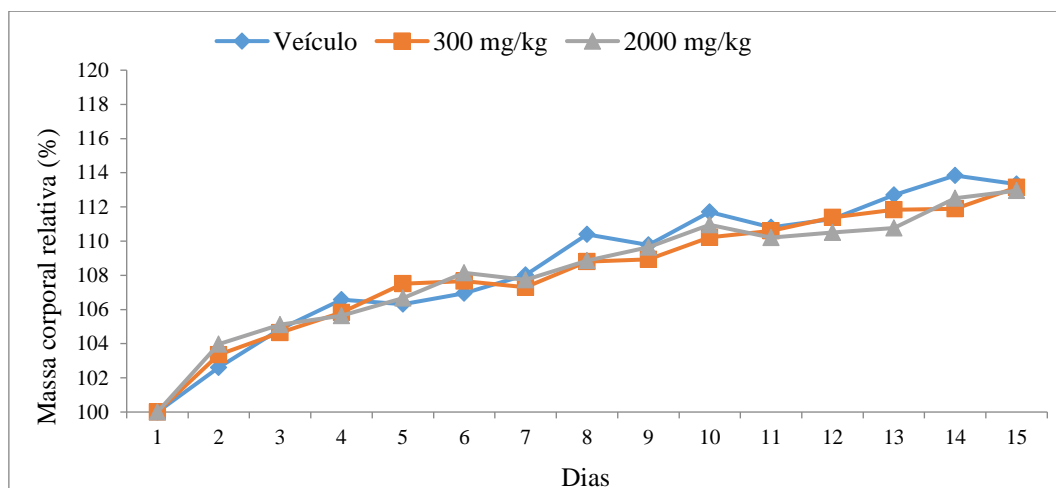
Dose (mg/kg)	Sexo	Morte/tratado	Sinais
300 (1) *	F	0/3	Nenhum
300 (2) *	F	0/3	Nenhum
2000 (1) *	F	0/3	Sonolência (hipnose) e redução da resposta de pressão da cauda.
2000 (2) *	F	0/3	Sonolência (hipnose) e redução da resposta de pressão da cauda.
Controle	F	0/3	Nenhum

*(1) primeira administração; * (2) repetição da dose.

4.7.2 Avaliação ponderal

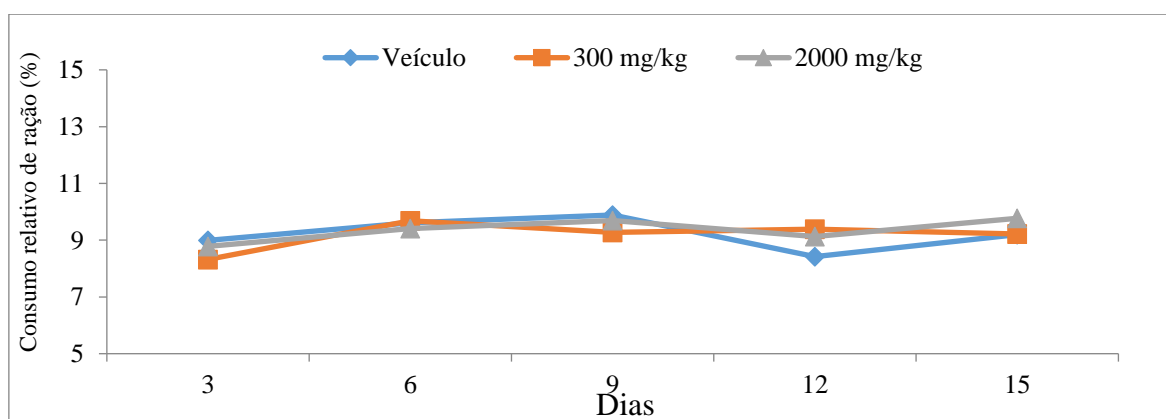
Em geral houve modificação da massa corpórea dos animais ao longo dos 14 dias de avaliação, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A análise da massa corporal relativa utilizando a ANOVA para medidas repetidas, não apontou efeito do tratamento ($F_{2,15} = 0,05$; $p > 0,05$) e nem interação entre dias e tratamento ($F_{26,195} = 0,75$; $p > 0,05$), demonstrando apenas efeito dos dias ($F_{13, 195} = 55,57$; $p < 0,001$), conforme Figura 32.

Figura 32 - Gráfico da massa corporal relativa das ratas *Wistar*, durante teste de toxicidade oral aguda do extrato seco das partes aéreas de *J. pectoralis* padronizado em cumarinas.



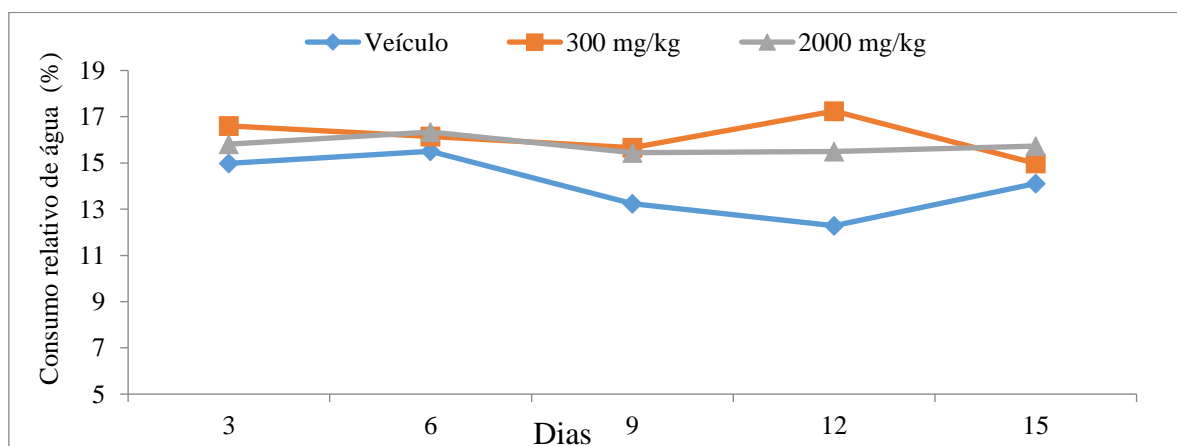
Para a análise do consumo relativo de ração a cada 3 dias, a ANOVA para medidas repetidas apontou efeito significativo ao longo dos dias ($F_{4,60} = 9,653$; $p < 0,001$) e interação entre dias e tratamento ($F_{8,60} = 2,29$; $p = 0,03$), porém não houve efeito significativo do fator tratamento ($F_{2,15} = 0,20$; $p > 0,05$), conforme mostrado na Figura 33. A análise *post hoc* utilizando o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, demonstrou diferença significativa no consumo relativo de ração, apenas intra-grupos e não entre os grupos.

Figura 33 - Gráfico do consumo relativo de ração das ratas *Wistar*, durante teste de toxicidade oral aguda do extrato seco das partes aéreas de *J. pectoralis*.



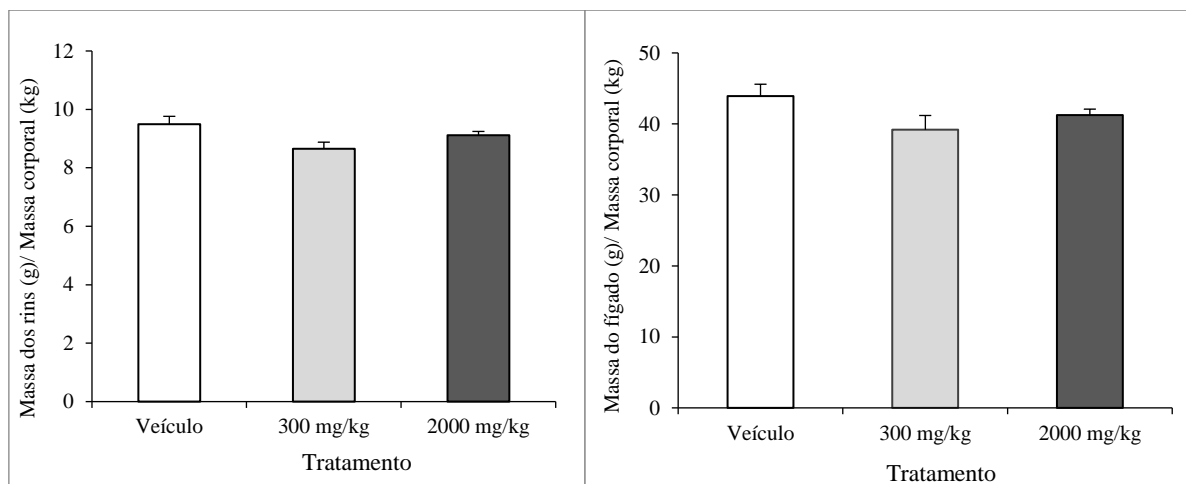
A Figura 34 ilustra a análise do consumo relativo de água a cada 3 dias. A ANOVA para medidas repetidas revelou efeito significativo apenas para o fator tratamento ($F_{2,15} = 4,07$; $p = 0,04$), entretanto não foi observado efeito significativo dos dias ($F_{4,60} = 1,42$; $p > 0,05$) e interação entre dias e tratamento ($F_{8,60} = 1,57$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de comparações múltiplas de Newman-Keuls demonstrou que os animais tratados com as doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg do extrato seco das partes aéreas de *J. pectoralis* apresentaram discreto aumento no consumo de água a cada 3 dias, quando comparados ao grupo controle.

Figura 34 - Gráfico do consumo relativo de água das ratas *Wistar*, durante teste de toxicidade oral aguda do extrato seco das partes aéreas de *J. pectoralis* padronizado em cumarinas.



A massa relativa dos órgãos (rins e fígado) dos animais controle e tratados com o extrato seco de *J. pectoralis* é ilustrada na Figura 35. A ANOVA unifatorial não apontou diferença significativa entre os grupos para a massa dos rins ($F_{2,15} = 3,79$; $p=0,05$) e fígado ($F_{2,15} = 2,24$; $p > 0,05$).

Figura 35- Gráfico da massa relativa dos rins (A) e do fígado (B), das ratas *Wistar*, ao término do teste de toxicidade oral aguda do extrato seco das partes aéreas de *J. pectoralis* padronizado em cumarinas.



Os resultados obtidos são coerentes com estudos anteriores e reforçam a baixa toxicidade da planta, como demonstrado por Parra et al. (2001), com a determinação da DL_{50} em camundongos do extrato hidroetanólico das partes aéreas de *J. pectoralis* (DL_{50} : 3531,11 mg/kg) e por Arcanjo et al. (2012), com a avaliação da bioatividade do extrato seco liofilizado das partes aéreas de *J. pectoralis* frente *Artemia salina* ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$). Além disso, outros estudos também demonstraram a ausência de genotoxicidade e citotoxicidade do extrato seco de *J. pectoralis* var. *pectoralis* obtido por *spray drying* em culturas de *Salmonella typhimurium* e em neutrófilos humanos, respectivamente (FONSECA, 2009; MONTERO; HURTDO; FERRE, 2008)

5 CONCLUSÃO

A partir dos dados da caracterização do material vegetal encontrados neste trabalho é possível concluir que o espécime estudado apresenta padrão morfoanatômico compatível ao descrito na literatura para a família Acanthaceae e para a espécie, com perfil cromatográfico característico à presença de cumarinas. Esses resultados indicam que a espécie cultivada no Estado de Goiás pode apresentar os mesmos potenciais medicinais da espécie cultivada em outras partes do Brasil e do mundo.

O método analítico desenvolvido e validado para a quantificação conjunta das cumarinas umbeliferona e 1,2-benzopirona, mostrou ser de fácil execução, seletivo, linear, sensível, preciso, exato e robusto, podendo ser empregado com sucesso na rotina do controle de qualidade e padronização dos extratos das partes aéreas de *J. pectoralis*.

O desenho experimental selecionado para o aprimoramento dos sistemas de EAU e secagem dos extratos por aspersão (*spray drying*) foi capaz de demonstrar o impacto das variáveis independentes frente às variáveis respostas e prever comportamentos.

O estudo de otimização do processo de extração, mostrou que todos os parâmetros estudados influenciam o rendimento da extração, sendo possível obter a seguinte condição ótima para o processo: teor alcoólico de 15% (p/p), tempo de extração de 34 (min.) e proporção droga:solvente de 1:10 (g/mL).

Na secagem dos extratos por aspersão (*spray drying*) a análise dos gráficos de superfície de resposta, em concordância com a função geral de otimização, indicou que a temperatura de entrada de 140 °C, o fluxo de alimentação de 0,60 L/h e a concentração de maltodextrina de 48% (p/p) em relação ao conteúdo de sólidos totais do extrato líquido foram as melhores condições para otimização do rendimento de secagem (%), umidade (%), atividade de água e teor dos marcadores dos extratos secos. O extrato seco resultante do processo otimizado de secagem demonstrou potencial tecnológico para a obtenção de formas farmacêuticas sólidas.

A toxicidade oral aguda do extrato seco obtido nas condições otimizadas foi avaliada em ratas *Wistar* e mostrou a baixa toxicidade do extrato com DL₅₀ estimada entre 2000 e 5000 mg/kg.

Os resultados apresentados servem como base para aquisição de parâmetros de qualidade na obtenção de extratos a partir das partes aéreas de *J. pectoralis* e na obtenção de matéria-prima para a produção de fitoterápicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.; HASAN, M. M. Standardization of crude drugs: precise review. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 155-174, 2015.

AOYAMA, E. M.; INDRIUNAS, A. Micromorfologia e anatomia foliar de duas espécies de *Justicia* L. (Acanthaceae) de uso medicinal. **Revista de Biologia Neotropical**, v.2, p. 97-106, 2014.

ARCANJO, D. D. R.; ALBUQUERQUE, A. C. M.; MELO-NETO, B.; SANTANA, L. C. L. R.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.

ASSUNÇÃO, P. I. D. **Desenvolvimento Tecnológico de Extratos Padronizados em Ácido Eláxico das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)**. 2016, 118f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis.

AZWANIDA, N. N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 4, p. 196, 2015.

BAKAR, J. S. C. E. E; HASHIM, D.M.; ADZAHAN, N; MUHAMMAD, K. Spray-drying optimization for red pitaya peel (*Hylocereus polyrhizus*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p.1332-1342, 2013.

BARA, M.T.F.; RIBEIRO, P.A.M.; ARANTES, M. C. B.; AMORIM, L. L. S.S.; PAULA, J. R. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.211-215, 2006.

BERTOLDI, F.C.; DESCHAMPS, F.C.; SILVA JUNIOR, A.A.; CORREA, A.F.; FRANCO, M.F., EBERLIN, M.N. Validação de um método analítico rápido por CLAE-UV para determinação de cumarina em guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) confirmado com espectrometria de massas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, p.316-325, 2016.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.

BHANDARI, B. R.; DATA, N.; HOWES, T. Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. **Drying Technology**, v.2, p. 671-684, 1997.

BOX, G.; WILSON, K. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**, v.13, p.1-45, 1951.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial União**, Brasília: Anvisa, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 88 de 16 de março de 2004. Lista de Referências Bibliográficas para Avaliação de Segurança e Eficácia de Fitoterápicos. **Diário Oficial União**, Brasília: Anvisa, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a.

BRASIL. Decreto n. 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 119, 23 de junho de 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. RENISUS - **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais**. Brasília, DF: MS, 2009. Disponível:<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf> Acesso: em 12 outubro, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **NOTA TÉCNICA DO COMITÊ NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS**. Brasília, DF: MS, outubro de 2009. Disponível:[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d37e2180474580a88c98dc3fbc4c6735/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+1+do+CNPMF_06+10+2010.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d37e2180474580a88c98dc3fbc4c673HYPERLINKhttp://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d37e2180474580a88c98dc3fbc4c6735/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+1+do+CNPMF_06+10+2010.pdf?MOD=AJPERES) Acesso: em 19 de outubro de 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 5.ed., v.1, p.192. Brasília, DF: ANVISA, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**, Brasília, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília: ANVISA, 2013.

BRASIL. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília. Capítulo I, Seção III, 2014.

CABRAL, A. G. S.; TENÓRIO-SOUZA, F. H.; MOURA, M. D.; MOTA, S. G. R.; LINS, A. C. S.; DIAS, C. S.; BARBOSA-FILHO J. M. B.; GIULIETTI, A. M.; SILVA, T. M. S.; SANTOS, C. F. *Phaeophytins* from *Thyrsacanthus ramosissimus* Moric. with inhibitory activity in human DNA topoisomerase II α . **Química Nova**, v. 35, p. 2222-2225, 2012.

CAL, K; SOLLOHUB, K. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p.575-586, 2010.

CALISKAN, G.; DIRIM, N. The effects of the diferente drying conditions and the amounts of maltodextran addition during spray drying of sumac extract. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 539-548, 2013.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. **Analyst**, v.126, p.1182-1193, 2001.

CAMPOS, A. M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hill. Aquifoliaceae (erva-mate)**. 1996. 149f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre.

CÁRCEL, J.A.; PÉREZ, J. V. G.; BENEDITO, J.; MULET, A. Food process innovation through new technologies: use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 200-207, 2012.

CARVALHO, E. L. S. **Desenvolvimento de produtos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek – Celastraceae (espineira-santa)**. 1997. 133f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 314-319, 2008.

CHANFRAU, R. J. E.; HERNÁNDEZ, O.D.L.; APAN, J.M.G. Método para la cuantificación de cumarina en extracto seco a partir de extractos de *Justicia pectoralis* Jacq. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.13, p. 1-7, 2008.

CHANFRAU, R. J. E.; ROCHE, A.; VEJA, R. Estudios preliminares de extractos fluidos 30% de *Justicia pectoralis* Jacq. Var. *stenophylla* Leonard. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.13, 2008. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000400012. Acesso em 02 julho 2017.

CHANFRAU, R. J. E.; APAN J. M. G. Dissolution Assay for Tilo® tablets prepared with dry extract of *Justicia pectoralis* Jacq. **Revista Cubana de Farmácia**, v.47, p.117-126, 2013.

CHANFRAU, R. J. E.; RODRÍGUEZ C. Harvest time influences on coumarin and umbelliferone contents in extracts of *Justicia pectoralis* Jacq. (Tilo). **Revista Cubana de Farmácia**. v.48, p.477-485; 2014.

CHANFRAU, R. J. E.; FIGUEREDO Y. N.; MORENO V. F. Stability of Tilo® tablets formulation obtained from dry extract of *Justice pectoralis* Jacq. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 193-202, 2015.

CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18 p. 813-835, 2011.

CORRÊA, G. M. **Estudo fitoquímico de *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae): caracterização química, avaliação biológica, contaminação fúngica e detecção de produtos radiolíticos**. 2013. 160 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciências-Química, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CORTÊS, A. L. A.; RAPINI, A. *Justicieae* (Acanthaceae) do Semiárido do Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v. 40, p. 253-292, 2013.

CORTÊS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Optimization of spray drying conditions for production of *Bidens pilosa* L. dried extract. **Chemical Engineering Research and Desing**, v. 93, p.366-376, 2015.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**, 3. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 3, 2001.

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

EZCURRA, C. El género *Justicia* (Acanthaceae) en Sudamérica Austral. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.89, p. 225-280, 2002.

FONSECA, F. N. **Desenvolvimento Tecnológico de Fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis* – Chambá: obtenção do extrato do extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica**. 2009. 131f. Dissertação (Mestrado). Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

FONSECA, F.N.; SILVA, A. H.; LEAL, L. K. A. M. *Justicia pectoralis* Jacq. Acanthaceae: preparation and characterisation of the plant drug including chromatographic analysis by HPLC-PDA. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 871-877, 2010.

GARCIA, A.Q.R.; PEREIRA, T. C.B.; DIAS, I. L. T. Estudo das propriedades de fluxo no desenvolvimento de paracetamol pó veiculado em sachê. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.93, p. 469-475, 2012.

GAN, C.; LATIFF, A. A. Optimization of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1277-1283, 2011.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P.; FONSECA, M. J. V. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. **Food Science and Tehcnology**, v. 41, p. 1521-1527, 2008.

GHOSH, U.; HAQ, M. A. B.; CHAKRABORTY, S. Application of systematic technologies for the extraction of novel phytoconstituents from pharmacologically important plants. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v. 2, p. 1153-1158, 2011.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology—ICH Harmonized Tripartite Guideline**, Geneve, 2005.

ILBAY, Z.; SAHIN, S.; KIRBASLAR, S. I. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of rosehip (*Rosa canina* L.) with response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 2804-2809, 2013.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicadas**, v. 29, p. 81-96, 2008.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; MELLO, C. P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). **Talanta**, v. 88, p. 502-506, 2012.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997.

LAZAR, I.; TALMACIU, A. I.; VOLF, I.; POPA, V. Kinetic modeling of the ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Picea abies* bark. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 32, p. 191-197, 2016.

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.

LI, H.; CHEN, B.; YAO, S. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). **Ultrasonic Sonochemistry**, v. 12, n. 4, p. 295-300, 2005.

LIAN, W. C.; HSIAO, H. C.; CHOU, C. C. Survival of bifidobacteria after spray drying. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 79-86, 2002.

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

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

MARTÍN-VIAÑA, N. P.; CHANFRAU, J. R.; HERNÁNDEZ, O. D. L.; SANABIA, M. L. G. APAN, J. M. G.; MORENO, V. M. F.; MENDOZAI, A. N. Technological development of a sedative medicine of natural origin from *Justicia pectoralis* Jacq. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.16, p. 227-235, 2011.

MATHEW, L.; BABU, S. Phytotherapy in India: transition of tradition to technology. **Current Botany**, v. 2, p. 26-30, 2011.

MATOS, J.M.D.; MATOS, M.E. **Farmacognosia**. Fortaleza: UFC, 1989.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 2009.

MCDADE, L.A., DANIEL, T.F; KIEL, C.A. Toward a comprehensive understanding of phylogenetic relationships among lineages of Acanthaceae s.l. (Lamiales). **American Journal of Botany**, v. 95, p.1136-1152, 2008.

MONTERO, A. C. R.; HURTDO, Y. V.; FERRE, J. P. Genotoxicity of *Justicia pectoralis* Jacq. (tilo). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 13, 2008. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es. Acesso em: 02/07/2017.

MUSHTAQ, M. Y.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; WILSON, E. G. Extraction for metabolomics: access to the metabolome. **Phytochemical Analysis**, v. 25, p. 291-306, 2014.

NEGRAO-MURAKAMI, A. N.; NUNES, G. L.; PINTO, S. S.; MURAKAMI, F. S.; AMANTE, E. R.; PETRUS, J. C. C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C. Influence of DE-value of maltodextrin on the physicochemical properties, antioxidant activity, and storage stability of spray dried concentrated mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **LWT - Food Science and Technology**, v.79, p. 561-567, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v.79, p. 629-661, 2016.

NOBRE, M. E. P.; LEITE, G. L.; BARBOSA, M. A. C. SOUSA, L. RL; SOLÓN, 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, p. 4-10, 2006.

NOLLA, D.; SEVERO, B. M. A. **Plantas Mediciniais**. 2. ed. Passo Fundo: Editora Universitária UPF, v. 72, 2005.

OECD's - Guideline for the Testing of Chemicals – nº 423: “**Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**”. (Adopted: 17 December 2001). Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948370.pdf>>. Acesso em: 4 mar. 2013.

O'KENNEDY, R.; DOUGLAS, R.T. **Coumarins. Biology, Applications and Mode of Action**. London: Wiley, 1997.

OLIVEIRA, A. F. M.; XAVIER H.; SILVA N. H.; ANDRADE L. H. C. Screening cromatográfico de Acanthaceae Mediciniais *Justicia pectoralis* Jacq e *Justicia gendarussa* Burm. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 3, p. 37-41, 2000.

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

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2014.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, p. 641-650, 2010.

OMS. **Organização Mundial da Saúde**. WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023. Geneva, 2013.

Disponível:http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098_spa.pdf
Acesso em 12 novembro, 2016.

OWITI, A. O. **Desenvolvimento de um método para caracterização do extrato hidroetanólico de folhas de *Mikania lindleyana* DC. por cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)**. 2011. 106f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; 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, p. 395-400, 2001.

PATIL, A. M.; PATIL, D. A. Petiolar anatomy of some hitherto unstudied Acanthaceae. **Journal of Experimental Sciences**, v.3, p. 5-10, 2012.

PATIST, A.; BATES, D. Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.9, p.147-154, 2008.

PAULA, J. A. M.; BRITO, L.F.; CAETANO, K. L. F. N.; RODRIGUES, M. C. M.; BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C. Ultrasound-assisted extraction of azadirachtin from dried entire fruits of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) and its determination by a validated HPLC-PDA method. **Talanta**, v. 149, p.77-84, 2016.

PRADAL, D.; VAUCHEL P.; DECOSSIN S.; DHULSTER P.; DIMITROV K. Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 32, p. 137-146, 2016.

PROFICE; KAMEYAMA, S.R; CÔRTEZ, C; BRAZ, A. L.A.; INDRIUNAS, D. M.; VILAR, A.; PESSOA, T.; EZCURRA, C.; WASSHAUSEN, D. C. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB33>.
Acesso: em 10.02.2017.

RENAME. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais RENAME 2014. 9. ed. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2015.

Disponível:<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/30/Rename-2014-v2.pdf>
Acesso em: 12. 11.2016.

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

RITSCHER, W.; HOFFMAN, K. Pilot study on bioavailability of coumarin and 7 hydroxycoumarin upon peroral administration of coumarin in a sustained release dosage form. **Journal Clinical Pharmacology**, v. 21, p.294-300, 1981.

RIGHETTO, A. M.; NETTO, F. M. Effect of encapsulating materials on water sorption, glass transition and stability of juice from immature acerola. **International Journal of Food Properties**, v. 2, p. 337-346, 2005.

SAÉNZ, C.; TAPIA, S.; CHÁVEZ, J.; ROBERT, P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). **Food Chemistry**, v. 114, p. 616-622, 2009.

SAHIN, S.; AYBASTIER, O.; ISIK, E. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1361-1368, 2013.

SAID, K. A. M.; AMIN, M. A. M. Overview on the Response Surface Methodology (RSM) in Extraction Processes. **Journal of Applied Science & Process Engineering**, v. 2, p. 8-17, 2015.

SANTIN, R. D. **O gênero *Justicia* L. (Acanthaceae) no estado de Goiás**. 2015. 135f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo, São Paulo.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Colômbia: CAB e CYTED, 2000.

SHARIFI, S.; LOTTERER, E.; MICHAELIS, H.; BERCHER, J. Pharmacokinetics of coumarin and its metabolites. Preliminary results in three healthy volunteers. **Journal of the College of Physicians and Surgeons**, v. 22, p. 29-32, 1992.

SHUKLA, S.S; SARAF, S.; SARAF, S. Approaches towards standardization and quality assessment of herbals. **The Journal of Research and Education in Indian Medicine**, v.15, p. 25-32, 2009.

SILVA, R. L.; COSTA, L. L.; CASTRO, L. E. Agrotecnología para el Cultivo de Tilo O Curía. In: MARTÍNEZ, J.V.; BERNAL, H.Y.; CÁCERES, A. **Fundamentos de Agrotecnología de Cultivos de Plantas Medicinales Iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Quebecor-Impreandes, 2000. p. 217-28.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL E.P.; MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGH, A.; MOOTER, G. V. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2015. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.010>. Acesso em: 30.05.2017

SOARES, L. A. L.; FARIAS, M. R. Qualidade de insumos farmacêuticos ativos de origem natural. In: SIMÕES C. M. O.; SCHENKEL, E.P; MELLO J.C.P; MENTZ L. A; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SOUKOULIS, C.; BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; YONEKURA, L.; PARMENTER, C.; FISK, I. Impact of milk protein type on the viability and storage stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 using spray drying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 1255-1268, 2014.

SOUZA, K. C. B. **Desenvolvimento de metodologia analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* forma *flavicarpa***. 1997, 141f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 12. 2010.

SUN-WATERHOUSE, D.; WADHWA, S. S.; WATERHOUSE, G. I. N. Spray-drying microencapsulation of polyphenol bioactives: a comparative study using different natural fibre polymers as encapsulants. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 2376-2388, 2013.

SUN-WATERHOUSE, D.; WATERHOUSE, G. I. N. Spray-Drying of Green or Gold Kiwifruit Juice–Milk Mixtures; Novel Formulations and Processes to Retain Natural Fruit Colour and Antioxidants. **Food Bioprocess Technology**, v. 8, p.191-207, 2015.

TOMSIK, A.; PAVLIC, B.; VLADIC, J.; RAMIC, M.; BRINDZA, J.; VIDOVIC, S. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 502-511, 2016.

TRUEBA, G. P.; MARTINEZ, R. R.; RUIZ, Z. P.; CHANFRAU, J. R. Evaluación de la Actividad Antioxidante de *Justicia pectoralis* JACQ. **Revista Cubana Invest Biomed**, v.20, p. 30-3, 2001.

USP. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 34. ed. Rockville: Pharmacopeial Convention, <699>, 2011.

VARGEM, D. S. **Morfoanatomia, prospecção fitoquímica e caracterização do óleo essencial das folhas de *Justicia pectoralis* Jacq. (ACANTHACEAE) ocorrente em Brasília, DF**. 2015. 96f. Dissertação (Mestrado). Curso de Pós-graduação em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente, Faculdade Unievangélica, Anápolis.

VARÓN, E. Y.; OSPINA, F. S.; MURILLO, E.; MÉNDÉZ, J. J. Tamizaje fitoquímico y actividad antioxidante de extractos acuoso y orgânicos de *Justicia pectoralis* Jacq. (Amansa toros) y de volátiles y no volátiles de *Lippia alba* Mill. (Pronto alivio) cultivadas em diferentes pisos térmicos. **Revista Scientia et Technica Año XIII**, v. 33, p. 349-350, 2007.

VENÂNCIO, E. T.; ROCHA, N. F. M.; RIOS, E. R. V.; FEITOSA, M. L.; LINHARES, M. I.; MELO, F. H. C.; MATIAS, M. S.; FONSECA, F. N.; SOUSA, F. C. F; LEAL, L. K. A. M.; FONTELES M. M. F. Anxiolytic-like effects of standardized extract of *Justicia pectoralis* (SEJP) in mice: involvement of GABA/benzodiazepine in receptor. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 444-450, 2011.

VIANA, G. S. B.; LEAL, L. K. A. M.; VASCONCELOS, S. M. M. **Plantas medicinais da Caatinga: atividades biológicas e potencial terapêutico**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2013.

VILLACREZ, J. L.; CARRIAZO, J. G.; OSORIO, C. Microencapsulation of Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) aqueous extract by spray drying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 1445-1456, 2014.

VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound-assisted extraction in the food industry-A review. **Innovative Food Science Emerging Technologies**, v. 9, p. 161-169, 2008.

WALTON, D. E.; MUMFORD C. J. Spray dried products characterization of particle morphology. **Institution of Chemical Engineers (ICHEM)**, v.77, p. 21-38, 1999.

WANG, X.; WU, Y.; CHEN, G.; YUE, W.; LIANG, Q.; WU, Q. Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 846-854, 2013.

WONG PAZ, J. E.; MÁRQUEZ, D. B. M.; ÁVILA, G. C. G. M.; CERDA, R. E. B.; AGUILAR, C. N. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 474-481, 2015

YOLMEH, M.; NAJAFI, M. B. H.; REZA F. Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v. 155, p. 319-324, 2014.

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

ZHOU, X.; CHOI, P. S.; YANG, JIA-MING; OR, P. M. Y.; HOI, P. M.; LEE, S. M. Y.; LEUNG, G. P. H; NAGAI, S. M.; KONG. S. K.; HO, H. P.; WONG, M. Y. M.; CHAN, S. W.; YEUNG J. H. K.; KWAN, Y. W. Chemical and pharmacological evaluations on the extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi (Huang-Qin) prepared by various extraction methods. **SpringerPlus**, v. 5, p.1438, 2016.

ZOU, T. B.; JIA, Q.; LI, H. W.; WANG, C. X.; WU, H.F. Response Surface Methodology for Ultrasound-Assisted Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Marine Drugs**, v.11, p. 1644-1655, 2013.

ANEXO I

ESTADO
DE GOIÁS

Anápolis, 12 de Setembro de 2016.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO
DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO Nº. 002/2016**

I - Identificação:

- 1. Título do projeto:** Desenvolvimento tecnológico de extratos de *Justicia pectoralis* cultivada no Estado de Goiás, Brasil e avaliação de sua toxicidade
- 2. Pesquisador Responsável:** Joelma Abadia Marciano de Paula
- 3. Unidade/Órgão do pesquisador:** UEG Ciências Exatas e Tecnológicas- CCET Anápolis
- 4. Pesquisadores Participantes:** Vanessa Cristiane de Santana Amaral; Alessandra Ribeiro Sartor Lima; Luan Augusto Cândido Lôbo.
- 5. Unidade onde será realizado o projeto:**
Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas CCET
- 6. Data de apresentação a CEUA:** 25/05/2016
- 7. Data de Atendimento das Pendências:** 12/09/2016

II - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Estadual de Goiás, após análise das adequações solicitadas, considerou **APROVADO**, o projeto acima referido, o qual foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes, smj dessa Comissão.

O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UEG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) após sua conclusão. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PrP-UEG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para **conclusão em 30 de JULHO de 2017.**

VI - Data da reunião: 12/09/2016

Prof. Dr. Walter Dias Júnior
Coordenador da CEUA/UEG