



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Tese de Doutorado

***Peperomia pellucida* L. (H.B.K.): OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE
FORMAS FARMACÊUTICAS**

Rosali Maria Ferreira da Silva

RECIFE
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Tese de Doutorado

***Peperomia pellucida* L. (H.B.K.): OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE
FORMAS FARMACÊUTICAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas na Área de Concentração: Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Co-Orientadores: Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa e Prof. Dr. José Otávio Carréra Silva Júnior

Rosali Maria Ferreira da Silva

RECIFE
2010

Silva, Rosali Maria Ferreira da
Peperomia pellucida L.(H.B.K.): obtenção tecnológica
de formas farmacêuticas / Rosali Maria Ferreira da Silva.
– Recife : O Autor, 2010.
xix + 186 folhas ; Il., fig.; 31 cm.

Orientador: Pedro José Rolim Neto.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. *Peperomia pellucida*. 2. Flavonóides. 3.
Maceração. 4. Secagem por *spray dryer*. 5. Cápsulas.
I. Rolim Neto, Pedro José. I. Título.

615.323

CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2011-05



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Recife, 16 de dezembro de 2010.

Defesa de Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 16 de dezembro de 2010 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

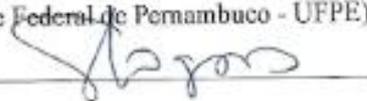
PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto
 (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: 

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Miracy Muniz de Albuquerque
 (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: 

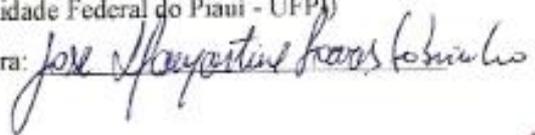
TERCEIRO EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Simone Sette Lopes
 (Deptº de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: 

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Profª. Drª. Evani de Lemos Araújo
 (Faculdade Pernambucana de Saúde)

Assinatura: 

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. José Lamartine Soares sobrinho
 (Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Piauí - UFPI)

Assinatura: 

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondani

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

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

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

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

Prof^a Dr^a Beate Seagesser Santos

Dedico esta tese à minha filha Maria Fernanda:
“Filha, o seu nascimento me deu mais forças
para enfrentar as dificuldades apresentadas no
decorrer deste trabalho.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por iluminar meu caminho nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto, pela confiança em mim depositada.

Aos meus pais, Lúcia e Ivandir, e ao meu irmão Luciano, pela dedicação e apoio concedidos durante este período.

Ao meu marido Davi James, pelo incentivo e apoio durante este período.

À UFPA, em especial aos Professores Mara Arruda, Alberto Arruda e Milton Nascimento, e ao mestrando Manolo Freitas, pelas análises realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Ao Prof. José Maria, pela realização das análises da atividade antimicrobiana. Aos Professores Wagner Barbosa e José Otávio pela co-orientação.

À UFPB, ao Prof. Fábio Souza e ao doutorando Wemerson, pela realização dos ensaios de secagem por *spray dryer*. Ao Prof. Isac Medeiros e a José George, pela investigação da atividade cardiovascular. Ao Prof. Marcelo Sobral e a Raimundo Nonato, pela disponibilidade do liofilizador.

Ao Departamento de Antibióticos, à Prof^a. Maria do Carmo, pela disponibilidade do liofilizador.

À UFCG, à Prof^a Odelsia e a Osvaldo Silva, pelos testes de secagem utilizando o leite de jorro.

Ao CETENE, a Deivid Costa, pela realização da técnica de micropropagação e, à Adriana Campos, pelos testes de área superficial específica, porosidade e tamanho de partícula.

Ao Departamento de Química Fundamental da UFPE, ao Prof. Eduardo Falcão, pelos ensaios de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Prof. Almir Wanderley, pelos testes de toxicidade aguda.

À todos que fazem parte do Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, pelo apoio, incentivo e boa vontade, em especial à Keyla, Thays, Larissa, Lourenço, Pablo, Monize e Salvana que participaram mais intensamente neste projeto.

Ao Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, à Prof^a. Miracy, pela permissão para a utilização da estufa e da mufla, e a Ruth Strattman, pela contribuição nas discussões técnicas.

Ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Não imponha limites a si mesmo.
Muitas pessoas se limitam naquilo que elas pensam que conseguem fazer.
Você pode ir tão longe quanto sua mente deixar.
O que você acredita, você pode realizar!”

Mary Kay Ash

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

v.o.	Via Oral
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFPA	Universidade Federal do Pará
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
mL	Mililitro (s)
L	Litro (s)
s	Segundos (s)
mg	Miligramas(s)
kg	Quilograma (s)
min	Minutos
% v/v	Percentual volume/volume

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.). Fonte: arquivo pessoal.....	8
Figura 2. Pellucidina A, encontrada na <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.).....	9
Figura 3. Dilapiol, encontrado na <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.)	10
Figura 4. Estrutura geral dos flavonóides.....	11
Figura 5. Percentual das citações abordando o uso da erva-de-jabuti	16
Figura 6. Cromatograma do Extrato etanólico bruto da <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.) dissolvido em metanol, filtrada sobre gel de sílica reversa (ERP).	18
Figura 7. Cromatograma da Fração do extrato da <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.) com acetato de etila cujos flavonóides foram precipitados com acetona e redissolvido em metanol (amostra PPT).....	18
Figura 8. Espectro, expresso em absorvância x comprimento de onda (cm), de UV do pico de tempo de retenção (TR) 15,04 do ERP da <i>Peperomia pellucida</i> (L.) H.B.K., apresentando uma pureza de 0,9998.	19
Figura 9. Espectro, expresso em absorvância x comprimento de onda (cm), de UV do pico de tempo de retenção (TR) 14,85 da amostra PPT da <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.), apresentando uma pureza de 0,9999.....	19

Capítulo II

Figura 1. A : Vista geral da face adaxial; B : Detalhe das paredes das células da face adaxial; C : Vista geral do mesofilo; D : Vista geral da face abaxial; E : Vista geral da nervura central; F : Detalhe do feixe vascular. ab : abaxial; ad : adaxial; ct : crista; ds : ducto secretor; et : estômato; f : floema; fv : feixe vascular; nc : nervura central; pl : parênquima lacunoso; pp : parênquima paliçádico; tc : tricoma.....	32
Figura 2. A : Detalhe do estômato em vista frontal; B : Detalhe do estômato em corte transversal; Figuras C-F : Detalhe do tricoma; C e D : Vista frontal; C : Face abaxial, sobre nervura central; D : Face abaxial; E e F : Detalhe de tricomas em corte transversal; E : Face adaxial; F : Face abaxial; G : Vista geral destacando a distribuição dos cristais de oxalato de cálcio; H : Detalhe dos cristais de formato rômbo. cs : Câmara subestomática; et : Estômato.	33
Figura 3. A-B : Pecíolo; A : Vista geral do pecíolo em corte transversal; B : Destaque para ocorrência de tricoma; C : Detalhe do tricoma glandular. tc : tricoma.	34

Figura 4. **A-F:** Teste microquímico das folhas de *P. pellucida*; A e B: Alcalóides; C e D: Flavonóides; E e F: Amido. 35

Capítulo III

Figura 1. Determinação granulométrica do pó de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)..... 53

Figura 2. Espectro de varredura de 200 a 800 nm, do extrato seco, fração flavonoídica, e padrões de rutina e de quercetina. 56

Figura 3. Placa de Cromatografia em Camada Delgada da solução com concentração de 4,2 mg mL⁻¹ (fração flavonoídica/metanol) de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.), utilizando como eluente MeOH/CHOOH 90:10. 57

Figura 4. (—) Extrato seco da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.); (-.-) Fração flavonoídica da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) utilizando um gradiente exploratório de 5 a 100% de MeCN em 60 min, varredura de 200 a 400 nm, injeção de 20 µL..... 58

Figura 5. (—) Padrão de quercetina; (....) Padrão de rutina; (---) Padrão de epicatequina; (-.-) Padrão de catequina - gradiente exploratório de 5 a 100% de MeCN em 60 min, varredura de 200 a 400 nm, injeção de 20 µL. 59

Capítulo IV

Figura 1. Curvas termogravimétricas das amostras SMG e CSA, destacando os eventos analisados (perda por dessecação e teor de cinzas) 71

Capítulo V

Figura 1. Cromatograma para a amostra de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) coletada no distrito de Icoaraci, em 30 de março de 2010. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresentou um tempo de retenção em 15,35 min. 81

Figura 2. Cromatograma para a amostra de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) coletada no distrito de Icoaraci, em 31 de maio de 2010. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresentou um tempo de retenção em 15,27 min. 81

Figura 3. Cromatograma para a amostra de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) coletada no distrito de Icoaraci, em 30 de julho de 2010. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresentou um tempo de retenção em 15,36 min. 82

Figura 4. Cromatograma para o extrato de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) obtido por maceração, com a concentração de 50% de álcool etílico. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresenta um tempo de retenção em 15,27 min..... 83

Figura 5. Cromatograma para o extrato de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) obtido por maceração, com a concentração de 70% de álcool etílico. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresenta um tempo de retenção em 15,26 min..... 83

- Figura 6. Cromatograma para o extrato de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) obtido por maceração, com a concentração de 90% de álcool etílico. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresenta um tempo de retenção em 15,25 min..... 84
- Figura 7. Cromatograma para o extrato de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) obtido por percolação, com a concentração de 70% de álcool etílico. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresenta um tempo de retenção em 15,34 min..... 84

Capítulo VII

- Figura 1. Efeito vasorrelaxante induzido por extrato aquoso de *P. pellucida* ($\mu\text{g/mL}$). Curva concentração-resposta em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem endotélio e pré-contraído com Fenilefrina 10 μM 107
- Figura 2. Efeito vasorrelaxante induzido por extrato etanólico de *P. pellucida* ($\mu\text{g/mL}$). Curva concentração-resposta em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem endotélio e pré-contraído com Fenilefrina 10 μM 108
- Figura 3: Efeito vasorrelaxante induzido por extrato aquoso (EAPP) ou extrato etanólico (EAPP) de *P. pellucida* ($\mu\text{g/mL}$). Curva concentração-resposta em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem endotélio e pré-contraído com KCl 60 mM. 109
- Figura 4 Efeitos do extrato aquoso de *P. pellucida* (EAPP) sobre (a) a pressão arterial média (PAM, mmHg) e (b) frequência cardíaca (FC, bpm) em ratos normotensos não-anestesiados (n=5). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. 110
- Figura 5 Efeitos do extrato etanólico de *P. pellucida* (EAPP) sobre (a) a pressão arterial média (PAM, mmHg) e (b) frequência cardíaca (FC, bpm) em ratos normotensos não-anestesiados (n=4). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. 111
- Figura 6. Massa corporal de ratos Wistar (n=5/grupo) tratados com dose única de *P. pellucida* (5,0 g/kg) e água (controle)..... 113
- Figura 7. Consumo diário de água (A) e ração (B) de ratos Wistar (n=5/grupo) tratados com dose única de *P. pellucida* (5,0 g/kg) e água (controle) 114

Capítulo VIII

- Figura 1. Plantas de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) em casa de vegetação (A). Explantes de 1 cm prontos para inoculação (B) 121
- Figura 2. Plântulas de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) *in vitro*, após 70 dias em meio básico MS. 122

Figura 3. Gráfico mostrando o tamanho médio (em cm) das plantas nos tratamentos. Médias com diferentes letras diferem estatisticamente entre si, conforme Teste de Tukey a 5%.....	125
Figura 4. Cromatograma de uma das replicatas da matriz original de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.)	128
Figura 5. Cromatograma de uma das replicatas do clone de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.).....	128
Figura 6. Cromatograma da curva de calibração de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.) na concentração de 40 ppm. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresentou um tempo de retenção em 15,32 min.	129

Capítulo IX

Figura 1. Curva DSC e TG do material vegetal pulverizado da <i>P. pellucida</i> obtida na razão de aquecimento de 10° C.min ⁻¹ , utilizando fluxo de nitrogênio de 50 mL.min ⁻¹	138
Figura 2. Curva DSC e TG do extrato da <i>P. pellucida</i> seco por evaporação rotativa, obtida na razão de aquecimento de 10° C.min ⁻¹ , utilizando fluxo de nitrogênio de 50 mL.min ⁻¹	139
Figura 3. Curva DSC e TG do extrato da <i>P. pellucida</i> seco por liofilização, obtida na razão de aquecimento de 10°C.min ⁻¹ , utilizando fluxo de nitrogênio de 50 mL.min ⁻¹ . 140	
Figura 4. Curvas DSC e TG do extrato da <i>P. pellucida</i> seco por leito de jorro, obtida na razão de aquecimento de 10°C.min ⁻¹ , utilizando fluxo de nitrogênio de 50 mL.min ⁻¹ . 141	
Figura 5. Curva DSC e TG do extrato da <i>P. pellucida</i> seco por <i>spray dryer</i> , obtida na razão de aquecimento de 10°C.min ⁻¹ , utilizando fluxo de nitrogênio de 50 mL.min ⁻¹ . 142	
Figura 6. Curva DSC e TG do aerosil [®] obtida na razão de aquecimento de 10°C.min ⁻¹ , utilizando fluxo de nitrogênio de 50 mL.min ⁻¹	143
Figura 7. Fotomicrografia do material pulverizado de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.). Barras de escala nas figuras equivalem a 200 µm, com aumento de 50x (à esquerda) e 20 µm, com aumento de 500x (à direita).	143
Figura 8. Fotomicrografia do extrato seco por evaporação rotativa de <i>Peperomia pellucida</i> L.(H.B.K.). Barras de escala nas figuras equivalem a 100 µm, com aumento de 100x (à esquerda) e 5 µm, com aumento de 4500x (à direita).....	144
Figura 9. Fotomicrografia do extrato seco por liofilização de <i>Peperomia pellucida</i> L.(H.B.K.). Barras de escala nas figuras equivalem a 100 µm, com aumento de 100x (à esquerda) e 5 µm, com aumento de 4500x (à direita).....	144

Figura 10. Fotomicrografia do aerosil [®] . Barras de escala nas figuras equivalem a 100 μm , com aumento de 100x (à esquerda) e 20 μm , com aumento de 500x (à direita)...	145
Figura 11. Fotomicrografia do extrato seco por leito de jorro de <i>Peperomia pellucida</i> L.(H.B.K.). Barras de escala nas figuras equivalem a 20 μm , com aumento de 500x (à esquerda) e 10 μm , com aumento de 1500x (à direita).....	145
Figura 12. Fotomicrografia do extrato seco por <i>spray dryer</i> de <i>Peperomia pellucida</i> L.(H.B.K.). Barras de escala nas figuras equivalem a 20 μm , com aumento de 500x (à esquerda) e 5 μm , com aumento de 4500x (à direita).....	146

Capítulo X

Figura 1. Curva TG/DTA do extrato seco por <i>spray dryer</i> de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.) obtida na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, utilizando fluxo de nitrogênio de $50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$, utilizando as temperaturas de atomização 140, 160 e 180°C	158
Figura 2. Distribuição do tamanho de partículas para as amostras dos extratos secos de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.) obtidos por <i>spray dryer</i> com a temperatura de atomização de 160°C e 30% de aerosil [®]	160
Figura 3. Cromatograma da curva de calibração de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.) na concentração de 40 ppm. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresentou um tempo de retenção em 15,29 min.	161
Figura 4. Cromatograma da amostra de extrato seco de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.) na temperatura de atomização 160°C . A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresentou um tempo de retenção em 15,29 min.	161

Capítulo XI

Figura 1. Fotomicrografia do Lote de bancada I. As barras de escala nas figuras equivalem a 20 μm , com aumento de 500x (à esquerda) e 10 μm , com aumento de 1500x (à direita).....	173
Figura 2. Fotomicrografia do Lote de bancada II. As barras de escala nas figuras equivalem a 20 μm , com aumento de 500x (à esquerda e à direita).....	174
Figura 3. Fotomicrografia do Lote de bancada III. As barras de escala nas figuras equivalem a 20 μm , com aumento de 500x (à esquerda) e 10 μm , com aumento de 1500x (à direita).....	174
Figura 4. Fotomicrografia do Lote de bancada IV. As barras de escala nas figuras equivalem a 20 μm , com aumento de 500x (à esquerda) e 10 μm , com aumento de 1500x (à direita).....	175

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 01. Efeito antimicrobiano de extratos de <i>Peperomia pellucida</i> ^a	14
Tabela 02. Teor de Cátions da fração (extrato aquoso) of <i>P. pellucida</i> L.(H.B.K.).....	15
Tabela 03. Gradiente de Concentração da Fase Móvel Utilizada na Detecção de Flavonóides da <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.).....	17

Capítulo II

Tabela 1. Testes Microquímicos das folhas de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.).....	30
Tabela 2. Produtos do metabolismo secundário da <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.), observados através dos testes microquímicos	34

Capítulo III

Tabela 1. Eluentes utilizados na análise utilizando cromatografia em camada delgada de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.).....	50
--	----

Capítulo IV

Tabela 1. Determinação de perda por dessecação e cinzas totais segundo a Farmacopéia Brasileira IV ed. e método termogravimétrico	71
---	----

Capítulo V

Tabela 01. Valores do teor de 3',4',7-tri-O-metoxiflavona e dos índices pluviométricos (precipitação) em cada mês de coleta	82
Tabela 02. Valores do teor de 3',4',7-tri-O-metoxiflavona nas diferentes concentrações de álcool etílico na maceração de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.)	85
Tabela 03. Valores do teor de 3',4',7-tri-O-metoxiflavona na maceração e na percolação de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.), utilizando 70% de álcool etílico	85

Capítulo VI

Tabela 1. Critérios para aceitação da atividade antimicrobiana de extratos brutos de plantas segundo Holetz <i>et al</i> , 2002.	95
---	----

Capítulo VIII

Tabela 1. Combinação (em mg.L ⁻¹) entre os reguladores de crescimento utilizados nos tratamentos.	122
Tabela 2. Efeito dos tratamentos no número de folhas e no peso fresco e seco da biomassa das parte aérea. Médias com diferentes letras diferem estatisticamente entre si, conforme Teste de Tukey a 5%.	126

Tabela 3. Efeito dos tratamentos no percentual de plantas enraizadas e no peso fresco e seco da biomassa das raízes. Médias com diferentes letras diferem estatisticamente entre si, conforme Teste de Tukey a 5%..... 127

Capítulo X

Tabela 01: Rendimentos obtidos com os extratos secos por *spray drying* da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) 156

Capítulo XI

Tabela 1. Porcentagem de extrato etanólico seco de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K) e dos excipientes utilizados na formulação de cápsulas relativas aos Lotes de Bancada (I a IV)..... 169

Tabela 2. Resultados de área superficial e porosidade das amostras dos Lotes de Bancadas I a IV..... 175

Tabela 3. Valores relativos aos ensaios físico-químicos efetuados nos lotes de bancada (I a IV)..... 176

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo Geral.....	5
2.2. Objetivos Específicos	5
Capítulo I	6
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	6
3.1 <i>Peperomia pellucida</i> : química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica	7
Capítulo II	27
4. ANATOMIA E MICROQUÍMICA	47
4.1. Caracterização anatômica e microquímica de <i>Peperomia pellucida</i> (L) H.B.K. (Piperaceae)	28
Capítulo III	38
5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	38
5.1. Caracterização físico-química e análises por espectrofotometria e cromatografia em camada delgada e à líquido de alta eficiência de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H. B. K.).....	39
Capítulo IV	66
6. DETERMINAÇÃO DE CINZAS E PERDA POR DESSECAÇÃO	66
6.1. Determinação dos teores de umidade e cinzas totais em amostras de <i>Peperomia pellucida</i> utilizando os métodos convencional e termogravimetria.....	67
Capítulo V	76
7. SAZONALIDADE E PROCESSO DE EXTRAÇÃO	76
7.1. Influência da Sazonalidade e do Processo de Extração na Concentração de Flavonóide em <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.)	77
Capítulo VI	88
8. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	88
8.1. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de <i>Peperomia pellucida</i> e <i>Portulaca pilosa</i>	89
Capítulo VII	99

9. ATIVIDADE CARDIOVASCULAR E TOXICIDADE AGUDA	99
9.1. Atividade Cardiovascular e Toxicidade Aguda de Extratos de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.)	100
Capítulo VIII	118
10. CLONAGEM	118
10.1. Micropropagação <i>in vitro</i> de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.)	119
Capítulo IX	131
11. AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES PROCESSOS DE SECAGEM	131
11.1. Avaliação de diferentes processos de secagem de extratos de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.) utilizando Análise Térmica e Microscopia Eletrônica de Varredura.....	132
Capítulo X	149
12. EXTRATO SECO POR <i>SPRAY DRYER</i>	149
12.1. Otimização do Processo de Obtenção e Caracterização Físico-química do Extrato Nebulizado de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.).....	150
Capítulo XI	165
13. DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO	165
13.1. Desenvolvimento Tecnológico para a Forma Farmacêutica Cápsula à base de <i>Peperomia pellucida</i> L. (H.B.K.).....	166
14. CONCLUSÃO	181
15. PERSPECTIVAS	183
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	185
ANEXOS	186

RESUMO

Peperomia pellucida L. (H.B.K.) é conhecida popularmente como erva-de-jabuti e é usada como antimicrobiano, anti-hipertensivo e anti-inflamatório. Este trabalho teve por finalidade desenvolver tecnologicamente formas farmacêuticas à base de *P. pellucida* para o tratamento antimicrobiano e cardiovascular, realizando análises anatômica e microquímica das folhas, caracterização físico-química para o pó e para a solução extrativa da planta inteira, análises por espectrofotometria e cromatografia das frações flavonoídica e do extrato bruto, avaliação da sazonalidade e do processo de extração, a avaliação das atividades antimicrobiana e cardiovascular do extrato etanólico, clonagem, avaliação dos diferentes processos de secagem utilizando microscopia eletrônica de varredura e análise térmica, otimização do processo e caracterização físico-química do extrato seco por *spray dryer* e o desenvolvimento de cápsulas utilizando extrato seco por aspensão de *P. pellucida*. As características anatômicas e microquímicas foram fundamentais na identificação e caracterização da espécie. A avaliação da sazonalidade indicou que não há influência dos valores de precipitação das chuvas sobre o teor do marcador utilizado para *P. pellucida*, a 3',4',7-tri-O-metoxiflavona, nas amostras coletadas nos meses março, maio e julho de 2010. Na variação da concentração do solvente da maceração (50, 70 e 90%), o marcador apresentou um maior valor de teor na concentração de 70% de álcool etílico. O extrato etanólico demonstrou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A micropropagação de *P. pellucida* foi possível utilizando-se gemas axilares jovens. O extrato seco obtido por *spray dryer* apresentou menor aderência ao equipamento utilizado e partículas esféricas, possibilitando uma melhor fluidez durante o desenvolvimento farmacotécnico-industrial de formas farmacêuticas sólidas. Os estudos de pré-formulação conduziram à definição da forma farmacêutica cápsula. Os resultados obtidos contribuem para a determinação de especificações de uma futura monografia farmacopeica e fornecerão parâmetros para que empreendedores da indústria farmacêutica baseiem-se para a produção de insumos, bem como para o controle de qualidade de intermediários e do produto acabado à base de *P. pellucida*.

Palavras-chave: *Peperomia pellucida*, flavonóides, maceração, secagem por *spray dryer*, cápsulas.

ABSTRACT

Peperomia pellucida L. (HBK) is popularly known as erva-de-jabuti and is used as antimicrobial, antihypertensive and anti-inflammatory. This study aimed to develop technology-based dosage forms of *P. pellucida* to antimicrobial treatment and cardiovascular disease, making analysis of anatomical and microchemistry leaves, physicochemical characterization for powder and for the solution mining of the whole plant analysis by spectrophotometry and chromatography fractions of flavonoids and the crude extract, assessment of seasonal extraction process, the antimicrobial activity and cardiovascular activity of ethanol extract, cloning, evaluation of different drying processes using scanning electron microscopy and thermal analysis, process optimization and physicochemical characterization of solids by spray drying and the development of capsules using the extract dry sprinkler *P. pellucida*. The anatomical features and microchemistry were instrumental in the identification and characterization of the species. The assessment indicated that there is no seasonal influence of the values of precipitation from rain over the content of the marker used for *P. pellucida*, 3',4',7-tri-O-methoxyflavone in samples collected during the months March, May and July 2010. The variation of solvent concentration of maceration (50, 70 and 90%), the marker showed a higher value content in a concentration of 70% ethyl alcohol. The ethanol extract showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The micropropagation of *P. pellucida* was possible using young axillary buds. The solids obtained by spray drying showed lower adherence to the equipment used and spherical particles, allowing a better flow during the pharmaceutical development of industrial solid dosage forms. The pre-formulation studies led to the definition of capsules. The results help determine the specifications of a future pharmacopoeia monograph and provide parameters for entrepreneurs based pharmaceutical industry to the production of inputs, as well as for quality control of intermediate and finished product based on *P. pellucida*.

Keywords: *Peperomia pellucida*, flavonoids, soaking, drying by spray drying, capsules.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais constituem uma fonte importante de produtos com atividades biológicas, muitos dos quais fornecem estruturas químicas para a síntese de um grande número de compostos bioativos. Pesquisas indicam que o Brasil é líder mundial em diversidade vegetal, com cerca de 55 mil espécies catalogadas e de 350 a 550 mil estimadas. Dentre as catalogadas, 10 mil podem ser medicinais, aromáticas ou apresentar outras utilidades (Borges *et al.*, 2003).

O uso de plantas medicinais no Brasil vem se consolidando nos últimos tempos em especial com a promulgação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Brasil, 2006).

Segundo a Associação Brasileira de Empresas do Setor Fitoterápico (ABIFISA), o mercado mundial de fitoterápicos envolve hoje cerca de US\$ 44 bilhões, enquanto que não existem dados oficiais sobre o tamanho desse mercado no Brasil. As estimativas variam entre US\$ 350 milhões e US\$ 550 milhões. Embora existam dados controversos acerca do faturamento de fitoterápicos é consenso, por muitos, que o mercado é crescente, tanto no Mundo quanto no Brasil (Mito, 2010).

A expansão da fitoterapia pode ser atribuída a diversos fatores, tais como, aos efeitos adversos de fármacos sintéticos, à preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”, à validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, ao desenvolvimento de novos métodos analíticos colocados à disposição do controle de qualidade, ao desenvolvimento de novas formas de preparações e administrações de produtos fitoterápicos, ao melhor conhecimento químico, farmacológico e clínico das drogas vegetais e dos derivados, além do menor custo se comparado com os fármacos sintéticos (Cañigüeral *et al.*, 2003; Vieira, 2001). Entretanto, a principal justificativa para o uso desta categoria de produtos se refere ao menor custo do desenvolvimento e

ao fato de que a grande maioria não se encontra sob proteção patentária, tornando-a alternativa terapêutica bastante promissora para países como o Brasil, em vista de possuir um terço da flora mundial (Alves *et al.*, 2008). Matérias primas vegetais como plantas, farmacógenos ou derivados (extratos, tinturas, óleos essenciais ou produtos secos) têm sido largamente empregados em farmácias de manipulação e indústrias farmacêuticas. O que mais preocupa a comunidade científica é o uso de novas espécies vegetais como medicamentos, sem dados comprovados acerca de sua ação biológica, não-toxicidade (avaliada na espécie humana), efeitos colaterais, segurança, eficácia e outros. Apesar dos fitoterápicos possuírem constituintes ativos naturais, eles devem ser avaliados como medicamentos e, portanto, submetidos a rígidos controles em cada fase da idealização, avaliação e obtenção dos mesmos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver tecnologicamente formas farmacêuticas à base de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) para o tratamento antimicrobiano e cardiovascular.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análises anatômica e microquímica das folhas de *P. pellucida*;
- Caracterização físico-química para o pó e para a solução extrativa da planta inteira e análises por espectrofotometria e cromatografia das frações flavonoídicas e do extrato bruto de *P. pellucida*;
- Comparação entre as metodologias convencional e análise térmica para a determinação de cinzas e perda por dessecação do material pulverizado de *P. pellucida*;
- Avaliação da sazonalidade e do processo de extração de *P. pellucida*;
- Avaliação das atividades antimicrobiana e cardiovascular do extrato etanólico de *P. pellucida*;
- Obtenção de clones de *P. pellucida*, utilizando a técnica da micropropagação;
- Avaliação dos diferentes processos de secagem de *P. pellucida*, utilizando microscopia eletrônica de varredura e análise térmica;
- Otimização do processo e caracterização físico-química do extrato seco por *spray dryer*;
- Desenvolvimento tecnológico de cápsulas utilizando extrato seco por aspersão de *P. pellucida*, para o tratamento antimicrobiano e cardiovascular.

Capítulo I

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1. Peperomia pellucida: química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica

Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas

3.1 *Peperomia pellucida*: química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica

Rosali M.F. Silva^{1,2}, José O.C. Silva Junior², Wagner L.R. Barbosa³, Thays C. B. L.

Gomes¹, Keyla E. R. Silva¹, Almir G. Wanderley⁴, Pedro J. Rolim Neto^{*1}

¹Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil; ²Laboratório de Pesquisa & Desenvolvimento Farmacotécnico, Universidade Federal do Pará, Brasil; ³Laboratório de Fitoquímica, Universidade Federal do Pará, Brasil; ⁴Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

RESUMO

A *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) é usada na Amazônia para combater a tosse ou a dor de garganta, arritmias cardíacas, sendo ainda antipruriginosa e diurética, utilizada sob a forma de chá ou infusão preparados com as raízes e a planta inteira. Experimentos realizados pelos próprios autores divulgam e publicam estudos sobre a abordagem etnofarmacêutica e a fitoquímica da *P. pellucida*. Atividades anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e anti-hipertensiva também são relatadas para esta erva. A tecnologia de obtenção de formas farmacêuticas sólidas à base de extrato nebulizado de *P. pellucida* que será utilizado como antimicrobiano, está sendo objetivo de trabalhos destes autores, bem como, o estudo de desenvolvimento de métodos analíticos para o produto acabado.

Palavras-chave: *Peperomia pellucida*, fitoquímica, abordagem etnofarmacêutica.

1. INTRODUÇÃO

Este *paper*, além do caráter *review*, também visa divulgar e publicar os experimentos realizados pelos próprios autores utilizando a *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.), obtidos através de uma abordagem etnofarmacêutica e estudos fitoquímicos.

P. pellucida é uma Piperaceae de ocorrência na América do Sul, Central (Antilhas) e América do Norte. No México, *P. pellucida* é uma planta de alta importância médica (Heinrich *et al.*, 1998). No Brasil, ocorre desde o Amazonas até o Paraná, com representantes em locais úmidos, principalmente em paredes e muito frequente em jardins.

É uma erva terrestre, suculenta, com pontuações translúcidas; caule ereto, ramificado. Folhas alternas, longo-pecioladas; lâmina ovada, 1,5-2,5 x 1-2 cm, base cordada, ápice agudo, membranácea (Fig. 1). Espigas terminais, axilares ou opositifólias, até 5 cm de comprimento; pedúnculo 5 mm comprimento; bractéolas arredondado-peltadas; flores esparsamente dispostas. Drupa elipsóide, não estipitada, longitudinalmente estriada (Guimarães e Giodarno, 2004).

No Brasil, em Santa Catarina, é conhecida como comida-de-jabuti ou erva-de-jabuti, erva-de-vidro, língua-de-sapo (Guimarães, 1984; Martins, 1989; Rodrigues *et al.*, 1989; Vieira, 1992; Santos *et al.*, 1994); outros nomes populares são atribuídos a esta planta, como “corazon de hombre” e “yerba de la planta” em Cuba, “herbe a la cresse” nas Antilhas Francesas (Roig y Mesa, 1988).

É popularmente usada na Amazônia para combater a tosse ou a dor de garganta, para o tratamento de arritmias cardíacas, é indicada como antipruriginosa, diurética e anti-hipertensiva. Utilizada sob a forma de chá ou infusão preparados com as raízes ou com toda a planta, não raro, é consumida como salada (Perry, 1980; Silva Teixeira, 1981; May, 1982; Van den Berg, 1993; Pimentel, 1994). Também é usada para tratar abscessos, furúnculos e sinuosidades da pele, e inflamações oculares (conjutivites). Dados da literatura confirmaram o efeito antimicrobiano desta espécie (Bojo, 1994). Outras propriedades medicinais, atribuídas à *P. pellucida*, variam dependendo da região, para abaixar o nível de colesterol sanguíneo (no nordeste do Brasil) e contra proteinúria (May, 1982).



Figura. 1. *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.). Fonte: arquivo pessoal

2. MANEJO E CULTURA

Pelo fato de apresentar ciclos curtos de germinação e ser de fácil disseminação, facilitada por fatores naturais como ventos e chuvas, o vegetal germina e cresce com facilidade em áreas úmidas, abundantes em matéria orgânica e ao abrigo da luz solar, o que muitas vezes a faz ser considerada como uma praga em monoculturas (Pereira *et al.*, 2000). Para o desenvolvimento de um fitoterápico à base de *P. pellucida*, isso pode ser uma vantagem para o manejo do vegetal, e contribuir para o desenvolvimento sustentável de uma comunidade (Araújo, 2006).

3. FITOQUÍMICA

Investigações químicas prévias da *P. pellucida* estabeleceram a ocorrência de apiol, 2,4,5-trimetóxiestireno, flavonas, flavonóis e fitoesteróis (Aquil *et al.*, 1993; Heinrich, 1998). Um estudo químico do extrato metanólico das partes aéreas conduziu ao isolamento de um novo composto ArC₂ dimérico denominado pellucidina A (Fig. 2), juntamente com o dilapiol já isolado (Fig.03), os quais são componentes de óleos essenciais (Manalo *et al.*, 1983; Bayma *et al.*, 2000; Paiva *et al.*, 2003).

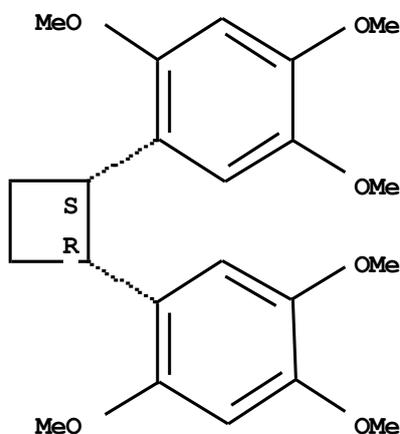


Figura 2. Pellucidina A, encontrada na *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

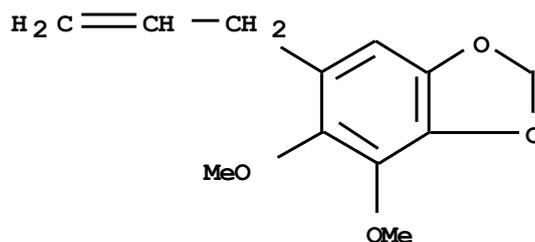


Figura 3. Dilapiol, encontrado na *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

Xu *et al.*, 2006, isolaram da *P. pellucida* cinco novos compostos, incluindo duas secolignanas, duas tetrahidrofuranolignanas e uma dihidronaftolenona altamente metoxilada.

Aziba *et al.*, 2001, relatam a presença de glicosídeos, antraquinonas, além de flavonóides, saponinas, esteróides e triterpenóides, alcalóides, açúcares redutores, carotenóides, depsídeos e depsidonas, proteínas e aminoácidos, saponina espumídica, fenóis e taninos, e derivados da cumarina (Muhammad *et al.*, 1994; Amador & Remédios, 2002; Paiva *et al.*, 2003; Araújo, 2006).

3.1. Flavonóides

Dentre as variadas classes de metabólitos, os flavonóides (Fig. 4) apresentam propriedades químicas e farmacológicas interessantes. Obtidos de chiquimídeos e policetídeos, podem se apresentar na natureza na forma glicosídica, ligada a açúcares ou livres, como agliconas. As formas glicosídicas são as mais comuns, sendo que uma variedade de açúcares pode estar ligada às agliconas. Quando observados por espectrofotometria no ultravioleta, apresentam espectro com dois máximos de absorção, um que ocorre na faixa de 220-285 nm (banda II) e outro que ocorre na faixa de 300-400 nm (banda I). A Banda II pode ser considerada como sendo de origem do sistema do anel A Benzoi, e a banda I pode ser originada do sistema do anel B cinamoil (Markham & Mabry, 1975).

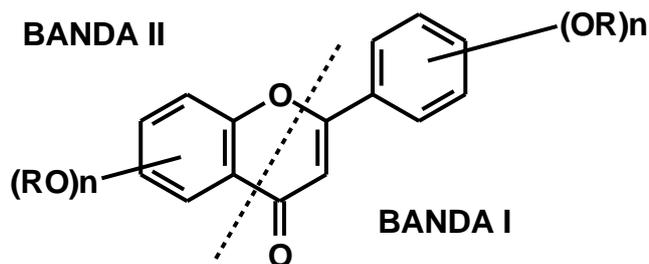


Figura 4. Estrutura geral dos flavonóides

Tem-se atribuído aos flavonóides a capacidade de reduzir a permeabilidade e a fragilidade capilar, e capacidade anticoagulante, bem como propriedades anti-hepatotóxica, anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, estrogênica e espamolítica, ainda que essas atividades não estejam completamente e inequivocamente estudadas (Capasso, 2003). Assim, a presença de flavonóides pode ser responsável pela atividade anti-hipertensiva de *P. pellucida* (Araújo, 2006).

É relatada a atividade de flavonóides como inibidores da proteína responsável pela resistência dos tumores do câncer de mama a fármacos citotóxicos. Os flavonóides atuam como inibidores dessa proteína transportadora, fazendo com que a concentração do fármaco citotóxico (Mitoxantrona) dentro da célula permaneça tempo suficiente para inibir sua proliferação, podendo até, dependendo do flavonóide reduzir concentração usual de inibição do fármaco. Há também especulações de que a biodisponibilidade dos fármacos utilizados possa aumentar por interações farmacocinéticas com flavonóides (Zhang *et al.*, 2004).

3.2. Taninos

Os taninos apresentam atividade farmacológica variável, agem como anti-séptico e antimicrobiano (devido à capacidade de lesionar as moléculas da parede celular de protozoários, fungos e bactérias), apresentam ação anti-hemorrágica (precipitam proteínas do plasma, ativam os fatores de coagulação sanguínea e são vasoconstrictores), anti-diarréica (reduz a atividade peristáltica do intestino), além de apresentarem poder cicatrizante, inclusive nos casos de queimadura tanto na pele, quanto nas mucosas, devido à formação de película protetora na região lesionada, possibilitando sua reepitelização (Rates & Simões, 2000).

3.3. Saponinas

Medicinalmente, as saponinas apresentam atividade mucolítica, expectorante, diurética, anti-séptica, laxativa, antimicrobiana e anti-inflamatória (Rates & Simões, 2000).

4. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

O edema de pata induzido por carragenina e ácido araquidônico é um método extremamente utilizado para distinguir respectivamente entre os inibidores ciclo-oxigenase e 5-lipo-oxigenase (Griswold *et al.*, 1987). Uma vez que o edema de pata induzido por ácido araquidônico é sensivelmente reduzido por inibidores do metabolismo do ácido araquidônico e por corticosteróides e é insensível a inibidores seletivos de ciclo-oxigenases (Dimartino *et al.*, 1987).

O extrato aquoso bruto das partes aéreas de *P. pellucida* (100, 200 e 400 mg/kg) por via oral foi avaliado quanto à sua atividade anti-inflamatória nesses modelos de inflamação aguda em ratos *Wistar*. Os resultados mostraram uma inibição apenas no edema produzido pela carragenina e de forma dose-dependente (18 a 51%) (Arrigoni-Blank *et al.*, 2004). Por outro lado, o extrato aquoso de *P. pellucida* quando administrado intraperitonealmente não impediu a formação do edema induzido pelo ácido araquidônico, mas esse foi inibido por ácido noridroguariacético (NDGA). Baseando-se nestes resultados, foi proposto que o extrato aquoso de *P. pellucida* tem uma ação anti-inflamatória relacionada com a síntese de prostaglandinas (Winter, 1962; Vinegar *et al.*, 1987; Arrigoni-Blank *et al.*, 2004).

5. ATIVIDADE ANALGÉSICA

A atividade analgésica do extrato aquoso foi avaliada pelo teste de contorção abdominal, usando como agente álgico o ácido acético (Koster, 1959), e pelo teste de placa-quente em camundongos (Arrigoni-Blank, 2004).

No teste de contorção, apenas a maior dose do extrato de *P. pellucida* (400 mg/kg, v.o.) demonstrou atividade analgésica (inibição de cerca de 51% das contorções abdominais).

Usando o modelo de contorções abdominais, Aziba e colaboradores, 2001, investigando o efeito analgésico do extrato metanólico de *P. pellucida* (210 mg/kg)

obtiveram uma inibição de 78,3%. Estas diferenças podem ser explicadas pelo uso de extratos diferentes e condições climáticas para origem e desenvolvimento da planta (Aziba, 2001).

Enquanto que, no teste de placa-quente, o extrato aquoso nas doses de 100 e 200 mg/kg produziram uma inibição de, respectivamente, 53,4 e 48,2 % (Arrigoni-blank *et al.*, 2004). Este resultado sugere que o efeito analgésico de *P. pellucida* está relacionado com o mecanismo de síntese das prostaglandinas, da mesma forma que o processo anti-inflamatório induzido por carragenina, indicando a presença de um processo de dor de origem inflamatória bem como está relacionado ao processo de neurogênica (Duarte, 1988).

6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Alguns autores demonstram que *P. pellucida* apresenta atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, atividade antimutagênica e atividade antifúngica contra fungos em plantas (De Padua *et al.*, 1999).

Em estudo realizado com extratos metanólicos brutos de *P. pellucida* e fracionados em petróleo, acetato de etila e butanol, foi demonstrado amplo espectro de atividade antibacteriana (Tabela 1). As frações demonstraram ser mais ativas do que os extratos brutos, sendo a fração mais potente obtida com butanol. Neste estudo, os microorganismos testados foram bactérias, protozoários e fungos (*Aspergillus niger*, *A. rubrum*, *A. versicolor*, *A. vitis*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Cladospodium cladosporioides*, *Penicillium notatum*, *Trychophyton mentagrophytes*, *T. tronsurum*). Nenhuma atividade foi observada para os testes em fungos (Khan & Omoloso, 2002).

Por outro lado, num estudo realizado com frações voláteis de folhas de 131 espécies de plantas contra *Helminthosporium oryzae*, a *P. pellucida* exibiu uma forte fungitoxicidade. O constituinte fungitóxico volátil isolado da *P. pellucida* foi um óleo essencial. A mínima concentração inibitória do óleo foi 2000 ppm o qual mostrou atividade fungicida, amplo alcance de toxicidade e rápida atividade mortal. O óleo foi termoestável e permaneceu tóxico durante pelo menos 150 dias (Singh, 1983).

Tabela 1. Efeito antimicrobiano de extratos de *Peperomia pellucida*^a

Micro-organismos		C	P	D	E	B	Ref. Chl ^b
<i>Bacillus cereus</i>	G +	8	12	10	12	18	16
<i>B. coagulans</i>	G +	8	14	8	14	20	18
<i>B. megatarium</i>	G +	10	16	14	14	18	16
<i>B. subtilis</i>	G +	8	18	16	12	18	16
<i>Lactobacillus casei</i>	G +	10	14	12	12	18	18
<i>Micrococcus luteus</i>	G +	8	14	14	10	18	16
<i>M. roseus</i>	G +	8	12	14	12	20	6
<i>Staphylococcus albus</i>	G +	12	16	10	14	16	16
<i>S. aureus</i>	G +	8	16	12	12	18	18
<i>S. epidermidis</i>	G +	10	18	14	12	18	0
<i>Streptococcus faecalis</i>	G +	12	12	12	10	20	0
<i>St. Pneumoniae</i>	G +	8	14	12	8	18	18
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	G -	10	14	10	12	16	12
<i>Citrobacter freundii</i>	G -	10	14	12	12	18	16
<i>Enterobacter aerogenes</i>	G -	8	16	12	14	18	18
<i>Escherichia coli</i>	G -	12	16	14	14	20	18
<i>Klebsiella pneumonia</i>	G -	10	14	12	12	18	0
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	G -	8	18	12	10	16	18
<i>Proteus mirabilis</i>	G -	10	12	10	12	16	16
<i>P. vulgaris</i>	G -	8	16	12	10	16	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G -	10	18	14	8	20	24
<i>Salmonella typhi</i>	G -	10	14	16	12	18	16
<i>Sa. Typhymurium</i>	G -	8	14	12	12	18	16
<i>Serratia marcescens</i>	G -	8	16	12	10	16	0
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Pz	12	16	14	12	18	16

^aOs valores estão na zona de inibição (mm) e na média da triplicata. **C**, extrato metanólico não-fracionado; **P**, fração de petróleo (60-80°C); **D**, fração de diclorometano; **E**, fração de acetato de etila;

^bChl, Cloranfenicol (10 µg disco Oxoid B42960) Fonte: Khan & Omoloso, 2002.

7. ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA

Segundo Hermes *et al.* (1981), a *P. pellucida* apresenta potente ação anti-hipertensiva em 100% dos casos humanos estudados e 79% em cães.

A administração inicial foi do extrato total da erva (Le Coint, 1947; Fieser & Fieser, 1959; Barnes & Gilbert, 1960).

Foram obtidos efeitos imediatos, com duração de mais de 10 minutos, chegando, em alguns casos, até a 30 min, com uma queda tensional de 12 para 7 cm/Hg (Hermes *et al.*, 1981).

É bem conhecido que as plantas medicinais que são utilizadas como diuréticos têm muitas vezes um elevado teor de K⁺ (por exemplo, *Betula* spp. ou *Orthosiphon aristatus* com 3% K) e são conhecidos como saluréticos (Heinrich *et al.*, 1998).

A Tabela 2 descreve o teor de cátions da fração de *P. pellucida* eluída com água. Os teores de Na, K, Ca e Mg representam cerca de 25% da fração aquosa ou 13% do extrato bruto. Há um alto teor de K (7,7% do extrato bruto), combinado com um baixo teor de Na (0,5%) (Heinrich *et al.*, 1998).

Tabela 2. Teor de cátions da fração (extrato aquoso) de *Peperomia pellucida* L.(H.B.K.)

Cátions	Determinação por coluna cromatográfica
	(%)
Na	0,95
K	15,10
Ca	3,81
Mg	5,05

Fonte: Heinrich *et al.*, 1998.

8. TOXICOLOGIA

Um estudo experimental foi realizado para determinar o efeito tóxico da decocção da *P. pellucida*. Num estudo utilizando o *Acute Toxicity Classes Method* (ATC), alguns autores pré-estabeleceram doses de 25, 200 e 2000 mg/Kg de peso corporal (Huerta, 2003).

Os animais usados foram ratos da linhagem *Wistar*, com um peso corporal entre 150 e 200 g. Em alguns dos animais tratados com dose de 2000 mg/Kg de peso corporal

não houve morte, e os resultados não demonstraram sinais de toxicidade. A decocção de *P. pellucida* foi classificada como não-tóxica (Huerta, 2003).

A toxicidade aguda também foi testada em camundongos Swiss (n=10) de ambos os sexos de acordo com o método de Brito, 1994 (Brito, 1994). Os animais receberam um extrato aquoso de *P. pellucida* (5000 mg/Kg), pela rota oral e a taxa de mortalidade foi observada por 48 h, seguido de um controle de peso diário durante 14 dias (Arrigoni-Blank *et al.*, 2004).

Os resultados não demonstraram mudanças no comportamento ou peso, indicando baixa toxicidade do extrato. Segundo Lorke (1983), as substâncias são consideradas de baixa toxicidade quando a DL₅₀ atinge níveis acima de 5000 mg/kg (Lorke, 1983; Arrigoni-Blank *et al.*, 2004).

9. ESTADO-DA-ARTE

Uma abordagem etnofarmacêutica realizada em Belém, em 2002, aponta que 86,7% da população conhece e utiliza freqüentemente a erva-de-jabuti (Amador & Remédios, 2002).

Outra abordagem aponta o uso da *P. pellucida* como anti-hipertensivo e diurético na cidade de Igarapé-Miri do Estado do Pará. Nesta abordagem, realizada com 1220 pessoas, houve 22 citações de uso da erva-de-jabuti. Apesar do baixo percentual de citações (cerca de 2%), 91% delas relacionam o uso desta erva para a solução de problemas cardiovasculares, o que pode ser visualizado na Fig. 5 (Barbosa, 2001).

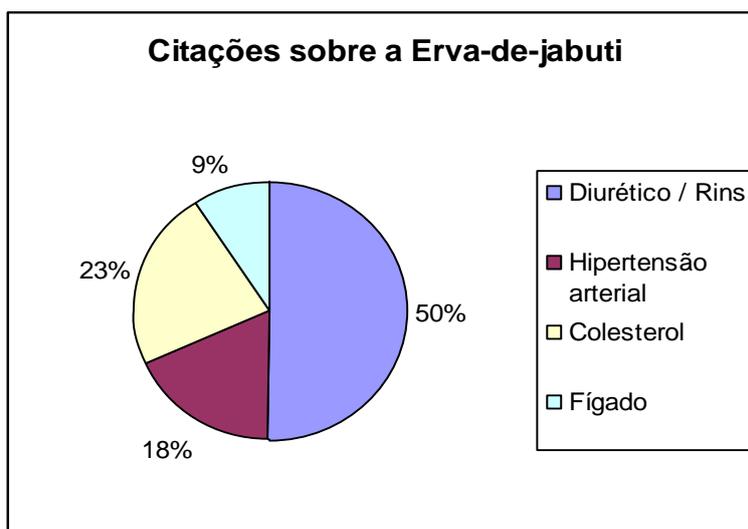


Figura 5. Percentual das citações abordando o uso da erva-de-jabuti

Fonte: Barbosa, 2001.

Os testes para as classes de flavonóides mostraram reação positiva para flavonas e flavonóis (Araújo, 2006).

Estudos recentes, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acoplada ao detector de arranjos de diodo, confirmaram a presença de flavonóides em extrato fluido da *P. pellucida*. O cromatógrafo utilizado foi um Merck Hitachi® Modelo LaChrom-7000. Os parâmetros utilizados foram uma coluna LiChroCART125-4 ODS®, fluxo de 0,7 mL/min, temperatura do forno de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e a faixa de detecção utilizada foi de 220 a 400 nm. A fase móvel foi composta por metanol, acetonitrila e água, em diferentes concentrações, seguindo a programação descrita na Tabela 3 (Araújo, 2006).

Tabela 3. Gradiente de concentração da fase móvel utilizada na detecção de flavonóides da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

Tempo (min)	Metanol (% v/v)	Acetonitrila (% v/v)	Água (% v/v)
0	0	10	90
5	0	10	90
5,1	0	13	87
25	0	13	87
25,1	40	0	60
60	50	0	50

A amostra analisada foi o extrato etanólico bruto dissolvido em metanol de forma a se ter a concentração de 10 mg/mL. A amostra foi filtrada sobre gel de sílica de fase reversa, obtendo assim a amostra ERP. Também foi analisada uma fração com acetato de etila cujos flavonóides foram precipitados com acetona. Este precipitado foi redissolvido em metanol na mesma concentração do extrato etanólico, fornecendo a amostra PPT (Araújo, 2006). Este método foi descrito por Bianco & Santos (2003).

No cromatograma do ERP (Fig. 06), os picos com tempo de retenção (TR) 1,44; 1,84; 2,45; 10,91; 12,96; 15,04; 16,83; 19,6 e 22,04 apresentaram espectros no ultravioleta característicos de flavonóides. Do mesmo modo, no cromatograma do PPT (Fig. 07), os picos de TR 1,28; 1,92; 12,77; 14,83; 16,45; 18,43; 19,23; 22,93; 28,91 e 31,73, também apresentaram espectros relacionados a flavonóides.

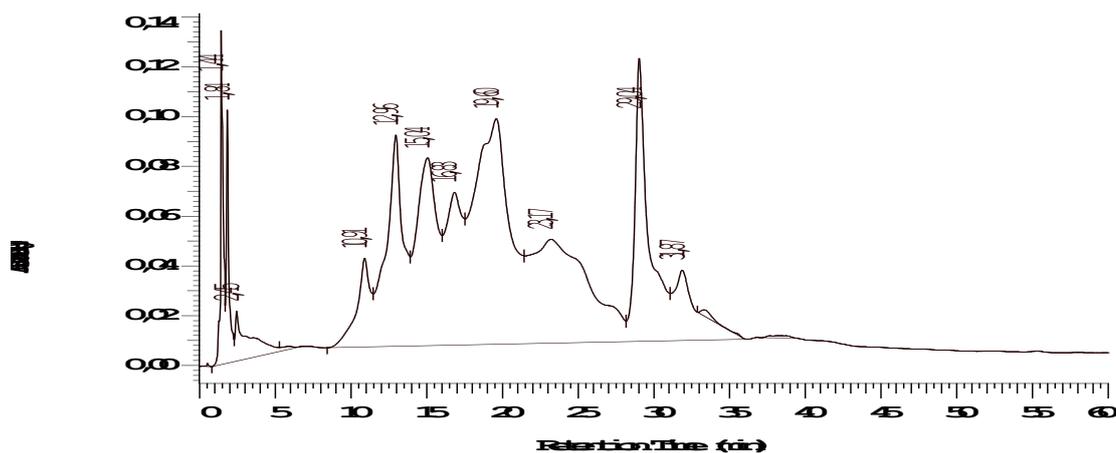


Figura 6. Cromatograma do Extrato etanólico bruto da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) dissolvido em metanol, filtrada sobre gel de sílica reversa (ERP).

Fonte: Araújo, 2006.

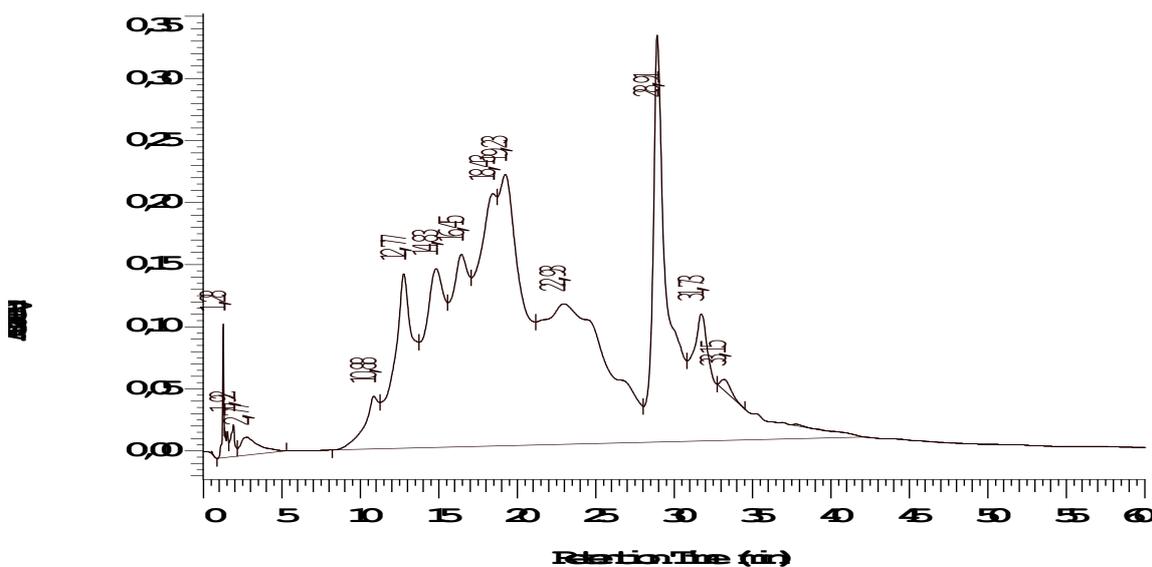


Figura 7. Cromatograma da Fração do extrato da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) com acetato de etila cujos flavonóides foram precipitados com acetona e redissolvido em metanol (amostra PPT)

Fonte: Araújo, 2006.

Após análise dos espectros dos picos de referência escolhidos (Fig. 8 e 9), foi observado que a banda II apresentou um máximo de absorção em 344 nm, tanto no pico de referência do extrato bruto como no pico de referência do precipitado o que, segundo Markhan & Mabry, 1975, é indicativo de se tratar de flavonas, fato que corrobora com o

achado no teste de flavonóides por classes. Na análise da banda II, o fato de a mesma ter absorção de 271 nm no espectro do pico de referência do extrato bruto, e de 270 nm no espectro do pico de referência precipitado, concluiu-se que se tratava de flavonóides dihidroxilados no anel A (Molnár-Perl and Füzfai, 2005; Araújo, 2006).

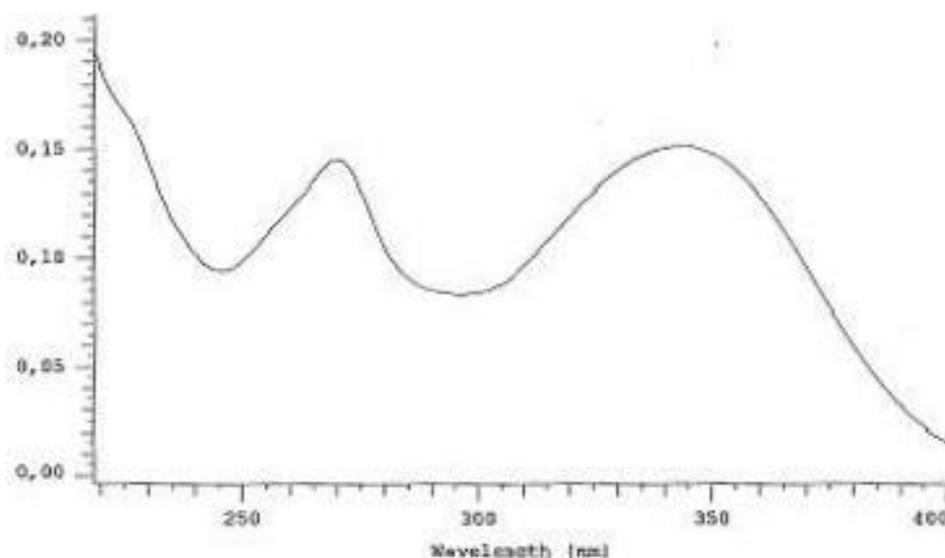


Figura 8. Espectro, expresso em absorvância x comprimento de onda (nm), de UV do pico de tempo de retenção (TR) 15,04 do ERP da *Peperomia pellucida* (L.) H.B.K., apresentando uma pureza de 0,9998.

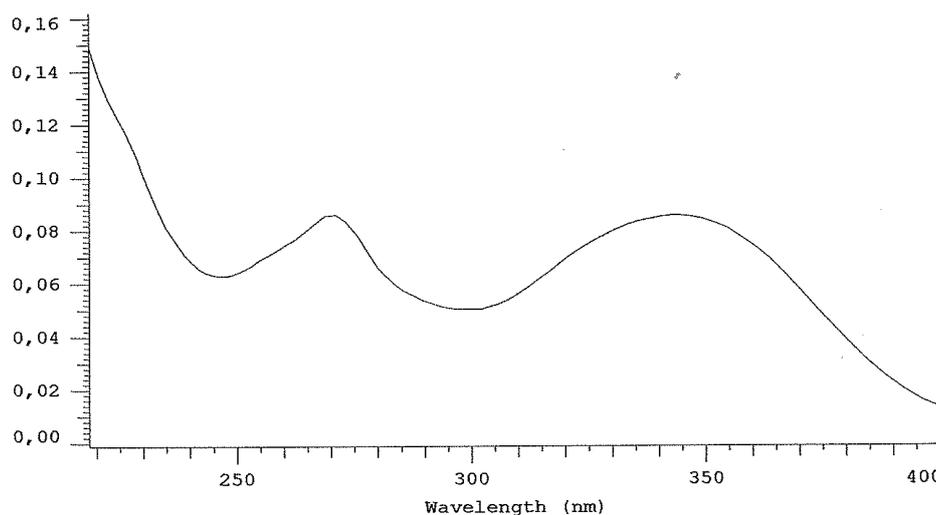


Figura 9. Espectro, expresso em absorvância x comprimento de onda (nm), de UV do pico de tempo de retenção (TR) 14,85 da amostra PPT da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.), apresentando uma pureza de 0,9999.

Fonte: Araújo, 2006.

10. CONCLUSÃO

A *P. pellucida* possui ampla variedade de atividades creditadas ao uso popular, algumas delas só cientificamente comprovadas. Dentre elas, a atividade anti-hipertensiva só foi clinicamente observada e pode estar relacionada à presença de flavonóides no extrato fluido de *P. pellucida* (Araújo, 2006).

A tecnologia de obtenção de formas farmacêuticas sólidas à base de extrato nebulizado de *P. pellucida* que será utilizado como antimicrobiano e cardiovascular, está sendo objetivo de trabalhos de nosso grupo, bem como, estudo de desenvolvimento de métodos analíticos para o produto acabado.

11. AGRADECIMENTOS

Esta revisão foi realizada através de uma parceria entre a Universidade Federal do Pará e Universidade Federal de Pernambuco.

12. REFERÊNCIAS

AQUIL, M.; KHAN, I.Z.; AHMAD, M.B., 1993. Sci. Phys. Sci. 5, 213.

AMADOR, E. C. C.; REMÉDIOS, A.G.M., 2002. Abordagem Fitoquímica da Erva-de-Jabutí (*Peperomia pellucida*). Trabalho de Conclusão de Curso do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Pará, Belém, 28 p.

ARAÚJO, S.C., 2006. Utilização de LC-DAD na Detecção e Caracterização de Flavonóides do Extrato Etanólico de *Peperomia pellucida* (L.) H.B.K; Trabalho de Conclusão de Curso do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Pará, Belém, 39 p.

ARRIGONI-BLANK, M.F.; DMITRIEVA, E.G.; FRANZOTTI, E.M.; ANTONIOLLI, A.R.; ANDRADE, M.R. MARCHIORO, M., 2004. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) H.B.K (Piperaceae). Journal of Ethnopharmacology; 91, 215-218.

AZIBA, P.I.; ADEDEJI, A.; EKOR, M.; ADEYEMI, O., 2001. Analgesic activity of *Peperomia pellucida* aerial parts in mice. Fitoterapia; 72, 57-58.

BARBOSA, W.L.R., 2001. Levantamento etnofarmacêutico da fitoterapia tradicional em Igarapé-Miri-Pará; VII Reunião Especial da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. CD-Rom. VII RE – SBPC: Manaus, SBPC. V.1, p 0 – 0.

BARBOSA, W. 1998. Aproveitamento farmacêutico da flora como instrumento de preservação cultural e ambiental. *Poematropic*: v.1, n.1, jan/jun., p. 43-45.

BARBOSA, W.L.R.; Barros, W.; Soler, O., 1996. Etnofarmacêutica: uma abordagem de plantas medicinais pela perspectiva das Ciências Farmacêuticas. *Rev. Bras Farm*; 77 (3), p. 82-84.

BARNES, A.R. & GILBERT, M.E., 1960. Presença de alcalóides, saponinas e substâncias; Rio de Janeiro, s.e..

BAYMA, J.C.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H.; ARRUDA, A.C.; CANTO, W.C., 2000. A dimeric ArC₂ compound from *Peperomia pellucida*. *Phytochemistry*; 55 779 – 782.

BIANCO, E. M.; SANTOS, C. A. M., 2003. Substâncias isoladas das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpiniaceae); *Revista Brasileira de Farmacognosia*. V. 13, n. 2, p. 93-99.

BOJO, A.C.; ALBANO-GARCIA, E.; POCSÍDIO, G.N., 1994. The antibacterial activity of *Peperomia pellucida* (L.) H.B.K. (Piperaceae); *Ásia Life Sciences*: 3, p. 35-44.

BRITO, A.S., 1994. Manual de Ensaio Toxicológicos *in vivo*. UNICAMP Press: Campinas.

CAPASSO, F., 2003. *Phytotherapy, A Quick Reference to Herbal Medicine*; Springer-Verlag: New York, 1ª ed., p. 35-36.

DE PADUA, L.S.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; LEMMES, R.H.M.J., 1999. Plant resources of south-east Ásia no 12(1), Medicinal and poisonous plants 1. Leiden, the Netherlands: Backhuya Publishers.

DIMARTINO, M.J.; CAMPBELL Jr., G.K., WOLF, C.E.; HANNA, N., 1987. The pharmacology of arachidonic acid-induced rat paw oedema; *Agents and Actions*, 21, 303-305.

DUARTE, I.D.G.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H., 1988. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Brasilian Journal of Medicine and Biological Research*; 21, p. 341 – 343.

FIESER, L.F. & FIESER, M., 1959. *Steroides*, Reinhold Pub: New York.

GRISWOLD, D.E.; MARSHALL, P.L.; WEBB, E.F.; GODFREY, R.; NEWTON Jr., J.; DIMARTINO, M.J.; SARAU, H.M.; GLEASON, J.G.; POSTE, G.; HANNA, N., 1987. SK&F 86002: a structurally novel anti-inflammatory agent that inhibits lipoxygenase and cicloxygenase mediated metabolism of arachidonic acid. *Biochemical Pharmacology*; 36, 3463-3470.

GUIMARÃES, E.F., 1984. Notas em Piperaceae II. Considerações sobre o gênero *Ottonia* Sprengel no Brasil; *Bol. Mus. Bot. Kuhlmann*: 7(3), 61-84.

GUIMARÃES, E.F.; GIODARNO, L.C.S., 2004. Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará. *Rodriguésia*; 55 (84), 21-46.

HEINRICH, M. Ethnopharmacy and natural product research – Multidisciplinary opportunities for research in the metabolomic age. *Phytochemistry Letters*, 2007, I, 1-5.

HEINRICH, M.; KOEHLER, I.; RIMPLER, H.; BAUER, R., 1998. Bioactive compounds from the Mixe Indian medicinal plant *Peperomia pellucida*. *Revista de la Sociedad Quimica de México*. Institute for Pharmaceutical Biology. Albert-Ludwigs-University, Freiburg, Germany. ISSN: 0583-7693, 42(6), 245-248.

HERMES, A.G.; HERMES, E. G.; CAVALCANTE, F.L.M.; LUNA, M.S.; LEAL, R.A.; Cuoco, V.; Lins, A.F.A.; Soriano, S., 1981. Ações Anti-hipertensivas da *Peperomia pellucida* (L.) em Cães e na Espécie Humana. Cl. Bio. Cl. Saúde; Raízes: Belém, jul, 1(1): 47-52.

HUERTA, E.I.; RODRÍGUEZ, J.E.T.; RAMÍREZ, D.F.; MARTÍNEZ, R.M.; PADILLA, M.C.L., 2003. Toxicología Aguda Oral de la decocción la *Peperomia pellucida* (L.) H.B.K. (Corazón de hombre); Toxicologia Clínica, Sertox. Disponível em: <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>. Acesso em 20 abr. 2004.

KHAN, M.R.; OMOLOSO, A.D., 2002. Antibacterial activity of *Hygrophila stricta* and *Peperomia pellucida*. *Fitoterapia*. 73, 251-254.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J., 1959. Acetic acid for analgesic screening; *Federation Proceedings*: 18, p. 412-416.

LABADIE, R.P., 1986. Problems and possibilities in the use of traditional drugs. *Journal of ethnopharmacology*; v.3, nº 15, p. 221-230.

LE COINT, P., 1947. Árvores e plantas úteis (indígenas e aclimadas). *Amazônia brasileira III*; Nacional: São Paulo, 2ª ed.

LORKE, D., 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*: 54, 275-287.

MANALO, J.B.; HAN, B.H.; HAN, Y.N.; PARK, M.H.; ANZALDO, F.E., 1983. Studies on ether-soluble neutral compounds of *Peperomia pellucida*. *Nat. Prod. Res. Inst., Seoul Natl. Univ. Univ., Seoul, S. Korea. Archives of Pharmacal Research*. ISSN: 0253-6269. 6(2), 133-6.

MARKHAM, K.R.; MABRY, T.J., 1975. *The Flavonoids*. Academic press: New York, p. 46 - 90.

MARTINS, J.E.C., 1989. *Plantas medicinais de uso na Amazônia*; Cultural CEJUP: Belém, 2ª ed., p. 36.

MAY, A.F., 1982. *Surinaams kruidenboek*; Vaco Press: Paramaribo, 80 p.

MOLNÁR-PERL, I.; FÜZFAI, Z., 2005. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A*; Science direct: 1073, p. 201-227.

MUHAMMAD, A.; RAHMAN, F.A.; AHMAD, M.B., 1994. A new flavonol glycoside from *Peperomia pellucida*. *Scientist of Physical Sciences. Department Chemistry, University Maiduguri, Borno, Nigeria, ISSN: 0970-9150, 6(1), 141-3.*

PAIVA, J.S.; LAMEIRA, O.A.; OLIVEIRA, E.C.P., 2003. Fenologia de Plantas Medicinais e Análise Fitoquímica da Embaúba (*Cecropia obtusa*), Erva-de-jabuti (*Peperomia pellucida* (L.) H.B.K.), Cipó d'alho (*Adenocalymna alliaceum* Miers.) e Ginja (*Eugenia uniflora* L.); Embrapa Amazônia Oriental. Disponível em: http://www.cpatu.embrapa.br/memoria_tecnica/fenologia_de_plantas_medicinais_e_analise_fitoquimica.doc, em 01 de março de 2007.

PEREIRA, R.C.A.; MARINHO, J. T. S.; SALES, F.; AZEVEDO, K. S., 2000. Manejo e controle de plantas invasoras na cultura do café no Acre. *Instruções Técnicas*; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa: Acre, ISSN 0104-9038, nº 30, p. 1 - 3.

PERRY, L.M., 1980. *Medicinal plants of east and southeast Asia: attributed properties and uses*; The MIT Press: Cambridge, Massachusetts, and London.

PIMENTEL, A.A.M.P., 1994. Cultivo de plantas medicinais na Amazônia. Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP); Serviço de Documentação e Informação: Belém, p. 51-52.

RATES, S.M.K.; SIMÕES, C.M.O., 2000. *Farmacognosia da planta ao medicamento*; Eds: Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Universidade Federal de Santa Catarina, 820 p.

RODRIGUES, A.C.S.; NEVES, J.; CRIDDLE, D.N.; SANTOS, C.F.; LEAL-CARDOSO, J.H.; MONTE, F.J.Q.; COELHO-DE-SOUZA, A.N., 1989. Efeito do

Benzil-eugenol e Benzil-isoeugenol em óleo de rato; XIV Reunião Anual de Federação da Sociedade de Biologia Experimental (FESBE). CD-Rom: Caxambu-MG, p 0-0.

ROIG y MESA, J.T., 1988. Dicionario Botânico de nombre vulgares Cubanos; Ed. Científico-tecnica: La Habana, vol. 1, (A-L), 599 p.; vol. 2 (Li-Z), 1142 p.

SANTOS, R.V.H; LEÔNCIO, M.P.; ANJOS, F.B.R.; FALTAY, P.; COSTA, C.P.; AFIATPOUR, P., 1994. Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Peperomia pellucida* sobre a função renal de ratos acordados, Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE). Caxambu-MG, p. 209.

SINGH, A.K.; DIKSHIT, A.; DIXIT, S.N., 1983. Antifungal studies of *Peperomia pellucida*. Beitrage zur Biologie der Pflanzen. Berlin [BEITR. BIOL. PFLANZ.], Vol. 58, p. 357-368.

VAN DEN BERG, M.E., 1993. Piperaceae. In: Van Den Berg, M.E. Plantas Mediciniais na Amazônia – contribuição ao seu conhecimento sistemático; Editora Supercorres, PR/MCT/CNPq: Belém, p. 55-66.

VIEIRA, L.S., 1992. Fitoterapia da Amazônia: Manual de Plantas Mediciniais (A Farmácia de Deus); Agronômica Ceres: São Paulo, 2ª ed, 347 p.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; JOHNSTON, P.R.; VENABLE, A.L.; MCKENZIE, K.K., 1987. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat; Federation Proceedings: 46, 118-126.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat an assay for anti-inflammatory drugs. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine; 111, 544-547.

XU, S.; LI, N.; NING, M. ZHOU, C. YANG, Q.; WANG, M., 2006. Bioactive Compounds from *Peperomia pellucida*. J. Nat. Prod., Vol. 69, p. 247 – 250.

ZHANG, S.; YANG, X.; MORRIS, M.E., 2004. Flavonoids are Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)-Mediated Transport. *Molecular Pharmacology*; V.65, n° 5, 2004, p. 1208-1216.

Capítulo II

4. ANATOMIA E MICROQUÍMICA

4.1. Caracterização anatômica e microquímica de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) (Piperaceae)

Artigo a ser submetido para a Revista Brasileira de Farmacognosia

4.1. Caracterização anatômica e microquímica de *Peperomia pellucida* (L) H.B.K. (Piperaceae)

^{1,3}Silva, R.M.F., ²Freitas, M.C.C., ³Silva Júnior, J.O.C., ⁴Vieira, J.G.P.; ³Barbosa, W.L.R., ¹Rolim Neto, P.J.

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco;
²Departamento de Química, Universidade Federal do Pará; ³Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará; ⁴Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

RESUMO

Peperomia pellucida L. (H.B.K.) é uma espécie de ocorrência nas matas de vegetação secundária da Amazônia. O presente trabalho teve como objetivo realizar análise anatômica por microscopia de luz e análise microquímica da folha e pecíolo de *P. pellucida*. Observou-se que as células da face adaxial são justapostas com formato irregular e heterodimensionais com paredes retas e a face abaxial é formada por células justapostas de formato irregular com paredes sinuosas e heterodimensionais. Os testes microquímicos demonstraram a presença de produtos do metabolismo secundário, principalmente, no tecido paliçádico dentre estas substância verificou-se a ocorrência de alcalóides, flavonóides e amido. Tais características anatômicas e microquímicas são fundamentais na caracterização da espécie.

Palavras-chave: *Peperomia pellucida*, anatomia, microquímica.

1. INTRODUÇÃO

Na família Piperaceae estão incluídos cerca de dez gêneros, sendo *Piper* e *Peperomia* os principais da flora brasileira (Agarez *et al.*, 1994), e aproximadamente mil e quatrocentas espécies. Esta família apresenta uma distribuição pantropical cujos representantes são de hábito predominantemente herbáceo.

As espécies da família Piperaceae sempre foram de interesse ornamental por sua folhagem vistosa. Além de interesse ornamental, as espécies desse gênero também despertam curiosidade por apresentarem características tanto de Magnoliopsida quanto

de Liliopsida (Takemori, Bona, Alquini, 2003), como os estômatos do tipo tetracítico (Amaral & Mello-Silva, 2008; Mundo & Duarte, 2009) e caule com sistema vascular de organização monostélica (Takemori, Bona, Alquini, 2003). Várias espécies do gênero *Peperomia* que representam mais da metade da família, apresentam folhas providas de tecido especializado em reserva de água, com um elevado grau de suculência, o que muda consideravelmente a morfologia foliar (Callado *et al.*, 2006). É um tecido que também funciona como filtro de luz (Cushman & Borland, 2002), transmitindo para o mesófilo apenas 70% da luz que incide na folha (Mathieu, 2007). Por ser uma espécie de hábito epifítico, possuem a capacidade de armazenar água (Costa, 2001; Bataghin, 2009). A espécie *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) é uma planta herbácea encontrada em muitos países sul-americanos e asiáticos. Ocorre na cidade de Belém-Pará, sendo utilizada na medicina popular. Entretanto, informações sobre a anatomia de órgãos vegetativos da espécie são escassas. De acordo com a legislação vigente, a obtenção de qualquer derivado de planta medicinal, podendo ser ele um medicamento fitoterápico; o controle de qualidade é exigido desde o cultivo, manejo e coleta das espécies vegetais, passando-se pela fabricação do produto intermediário até a obtenção da formulação (Brasil, 2010). Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo o estudo anatômico e microquímico dos órgãos vegetativos de *P. pellucida*, visando estabelecer características marcantes para auxiliar estudos farmacobotânicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e identificação botânica do material vegetal

O material vegetal foi adquirido junto à Associação dos vendedores de ervas do mercado do Ver-o-Peso (Ver-as-Ervas), procedente da região metropolitana de Belém-Pará, distrito de Icoaraci. A identificação da espécie foi realizada pela curadoria do Herbário Museu Paraense Emílio Goeldi, onde uma exsicata encontra-se depositada sob o número de registro MG: 191457.

2.2 Microscopia de Luz

O material vegetal foi fixado em FAA₇₀ (formol a 40%, 5 mL; álcool a 70%, 90 mL e ácido acético glacial, 5 mL) (Budel & Duarte, 2010) por quarenta e oito horas e conservado em álcool 70^o GL. Para as secções, processou-se bateria de hidratação com gradual redução da concentração de álcool (70, 50, 30%) e água destilada em intervalos

de trinta minutos, totalizando duas horas. Os cortes foram corados com fucsina básica e Astrablau (Machado *et al.*, 1988). Secções de 8 µm de espessura foram feitas em micrótomo de rotação Jung, para a confecção das lâminas permanentes. Para a obtenção das imagens das estruturas do material usou-se fotomicroscópio modelo XSZ-150Ai (Medlux®).

2.3 Testes microquímicos

Para os testes microquímicos foram feitos cortes transversais a mão-livre da lâmina foliar para teste de ocorrência de substâncias a partir do uso dos reagentes descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Testes Microquímicos das folhas de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

SUBSTÂNCIAS	REAGENTES	AUTORES
Compostos fenólicos	Cloreto férrico a 10%	Johansen, 1940
Alcalóides	Dragendorff	Costa, 1982
Açúcares redutores	Fehling	Purvis, 1964
Flavonóides/ Antraquinonas	Hidróxido de potássio a 5%	Costa, 1982
Amido	Lugol	Kraus & Arduin, 1997

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em vista frontal, as células da face adaxial são justapostas com formato irregular e heterodimensionais com paredes retas, nesta vista as células não se dividem em costais e intercostais, exceto a nervura central (Figura 1: A e B). Em corte transversal, a epiderme é uniestratificada com células heterodimensionais de formato quadrangular com paredes periclinais retas e anticlinais levemente sinuosas (Figura 1: C). A face abaxial é formada por células justapostas de formato irregular com paredes sinuosas e heterodimensionais estão divididas em zonas costais e intercostais. As células

intercostais são justapostas de formato retangular, em corte transversal observa-se epiderme uniestratificada heterodimensionais e células de formato irregular, sendo as paredes lisas (Figura 1: C e D).

O mesófilo possui uma camada de tecido paliçádico formado por células justapostas de formato ovalado e tamanho uniforme, enquanto que o tecido esponjoso é formado por duas a três camadas de células heterodimensionais de formato irregular com paredes levemente sinuosas, ocorre volumosos espaços intercelulares (Figura 1: C).

A nervura central apresenta-se cristada abaxialmente, esta é composta por células colenquimáticas. A epiderme nesta face é constituída por um conjunto de células colenquimáticas de formato circular seguido por duas a três camadas de células parenquimáticas de parede lisa com diminutos espaços intercelulares. O tecido vascular é do tipo colateral com floema voltado para face abaxial e xilema para face adaxial, verificou-se a ocorrência de ductos secretores entre o tecido floemático (Figura 1: E e F).

As folhas são hipoestômáticas com estômatos distribuídos homoganeamente no limbo nas zonas intercostais e sobre a nervura central, o complexo estomático é do tipo anomocítico com três a quatro células subsidiárias, as células guardas posicionam-se em nível superior às demais células do limbo (Figura 2: A e B). Presença de tricomas glandulares de formato perolado formado por uma célula, unicelulares, e estes estão uniformemente distribuídos na face adaxial e na face abaxial e sobre as zonas costais e intercostais, ocorrendo em maior número na face abaxial (Figura 2: C-F). Densos grupos de cristais de oxalato de cálcio com formato rômboide ocorrem nas nervuras primária, secundárias e terciárias (Figura 2: G e H).

O pecíolo é semiplano-convexo com duas cristas de células colenquimáticas, o córtex é formado, da região convexa ao tecido vascular, por quatro a cinco camadas de células colenquimatosas de formato rombóide com paredes lisas, heterodimensionais e reduzidos espaços intercelulares. Do tecido vascular ao semiplano, o córtex é formado por células parenquimáticas justapostas, rombóides, heterodimensionais de paredes lisas (Figura 3: A), ocorrem, geralmente, na região convexa tricomas glandulares semelhantes aos descritos no limbo foliar (Figura 3: B e C).

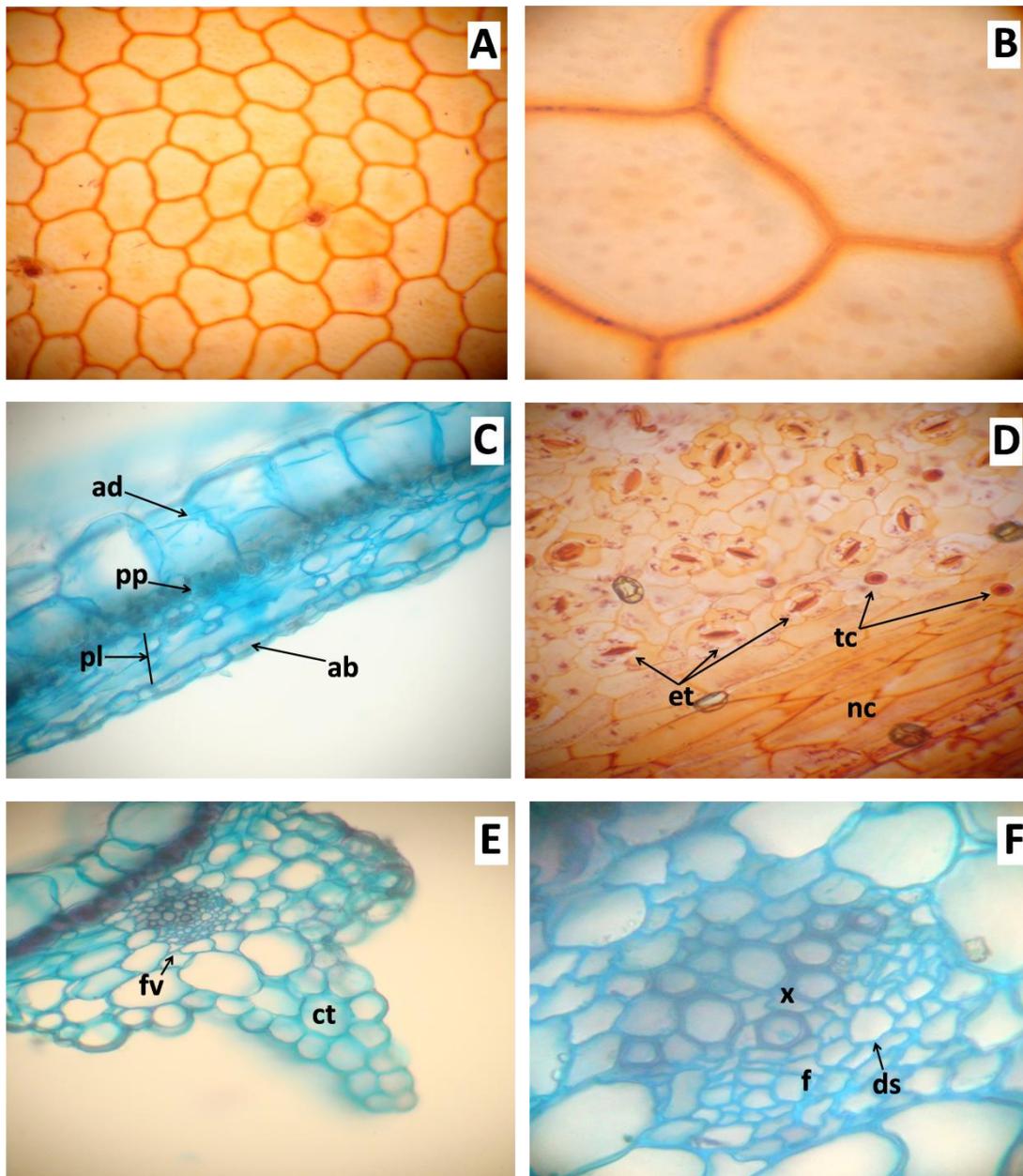


Figura 1: **A:** Vista geral da face adaxial; **B:** Detalhe das paredes das células da face adaxial; **C:** Vista geral do mesofilo; **D:** Vista geral da face abaxial; **E:** Vista geral da nervura central; **F:** Detalhe do feixe vascular. **ab:** abaxial; **ad:** adaxial; **ct:** crista; **ds:** ducto secretor; **et:** estômato; **f:** floema; **fv:** feixe vascular; **nc:** nervura central; **pl:** parênquima lacunoso; **pp:** parênquima paliçádico; **tc:** tricoma.

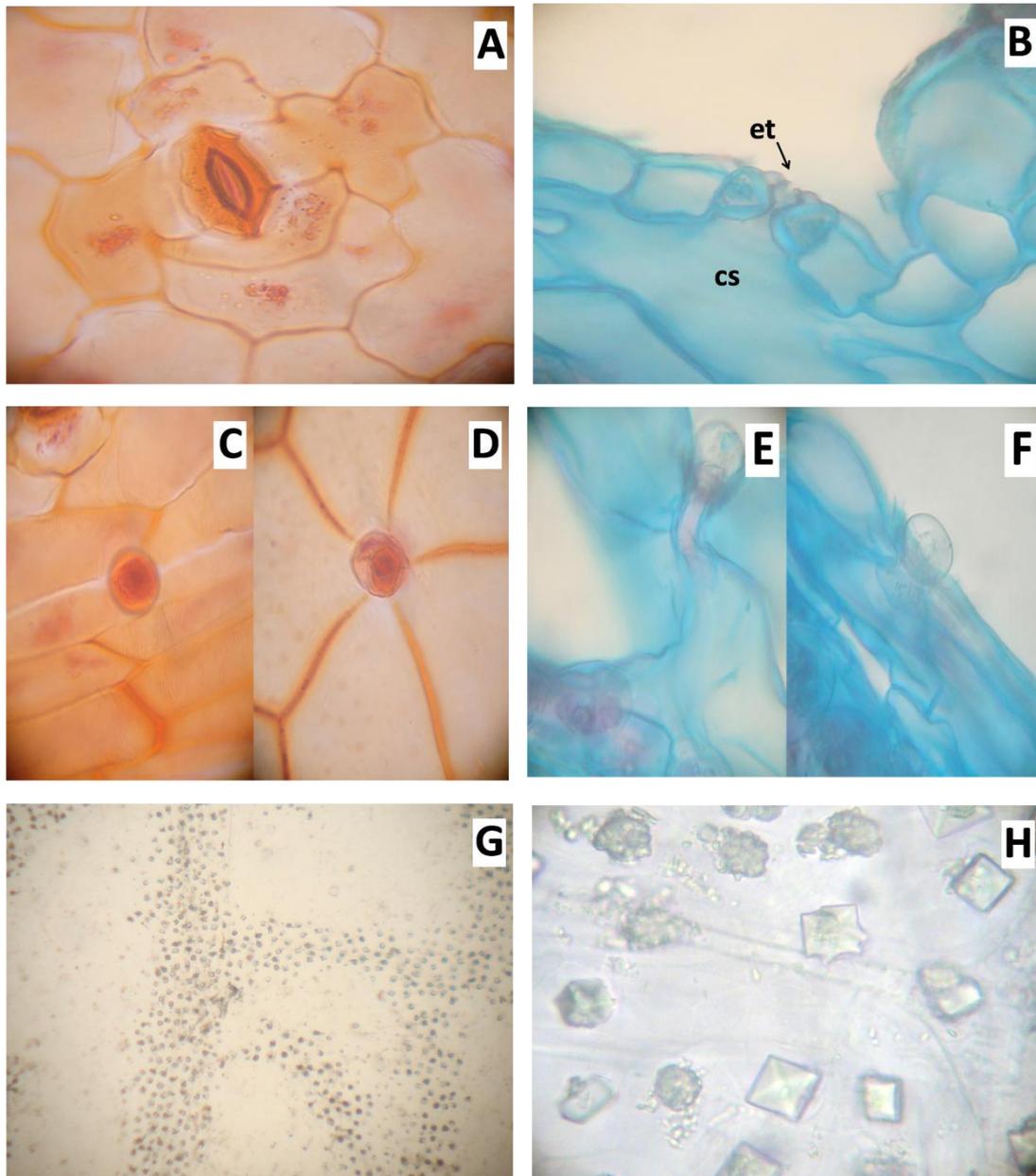


Figura 2: **A:** Detalhe do estômato em vista frontal; **B:** Detalhe do estômato em corte transversal; Figuras **C-F:** Detalhe do tricoma; **C e D:** Vista frontal; **C:** Face abaxial, sobre nervura central; **D:** Face abaxial; **E e F:** Detalhe de tricomas em corte transversal; **E:** Face adaxial; **F:** Face abaxial; **G:** Vista geral destacando a distribuição dos cristais de oxalato de cálcio; **H:** Detalhe dos cristais de formato rômbo. **cs:** Câmara subestomática; **et:** Estômato.

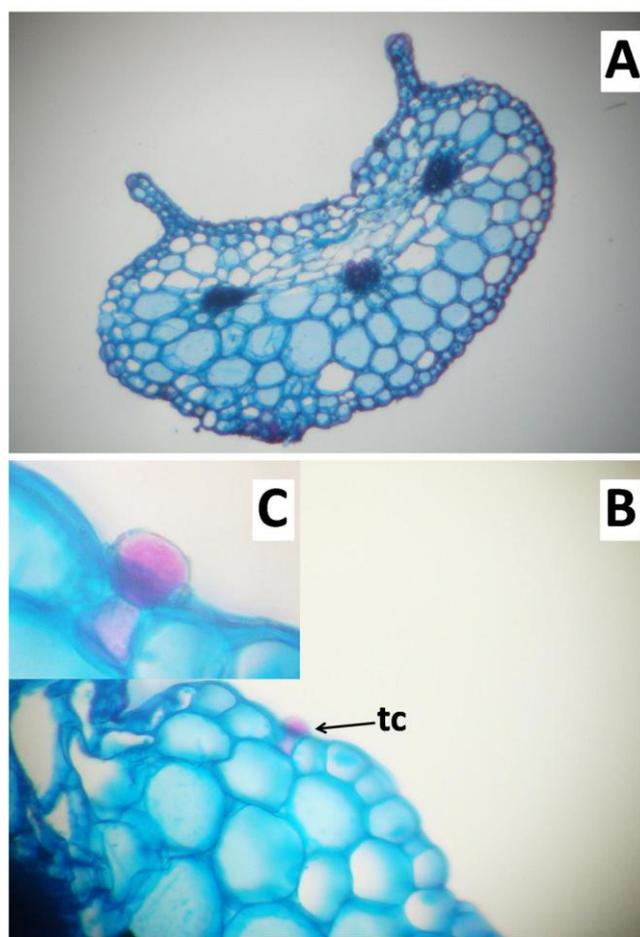


Figura 3: A-B: Pecíolo; **A:** Vista geral do pecíolo em corte transversal; **B:** Destaque para ocorrência de tricoma; **C:** Detalhe do tricoma glandular. **tc:** tricoma.

Os testes microquímicos demonstraram a presença produtos do metabolismo secundário presentes, principalmente, no tecido paliçádico dentre estas substância verificou-se a ocorrência de alcalóides, flavonóides e amido (Tabela 2 e Figura 4: A-F)

Tabela 2. Produtos do metabolismo secundário da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.), observados através dos testes microquímicos

Reagentes	Substâncias	Condições
Cloreto Férrico a 10%	Compostos fenólicos	Ausente
Dragendorff	Alcalóides	Presente
Fehling	Açucars redutores	Ausente
KOH a 5%	Flavonóides	Presente
	Antraquinonas	Ausente
Lugol	Amido	Presente

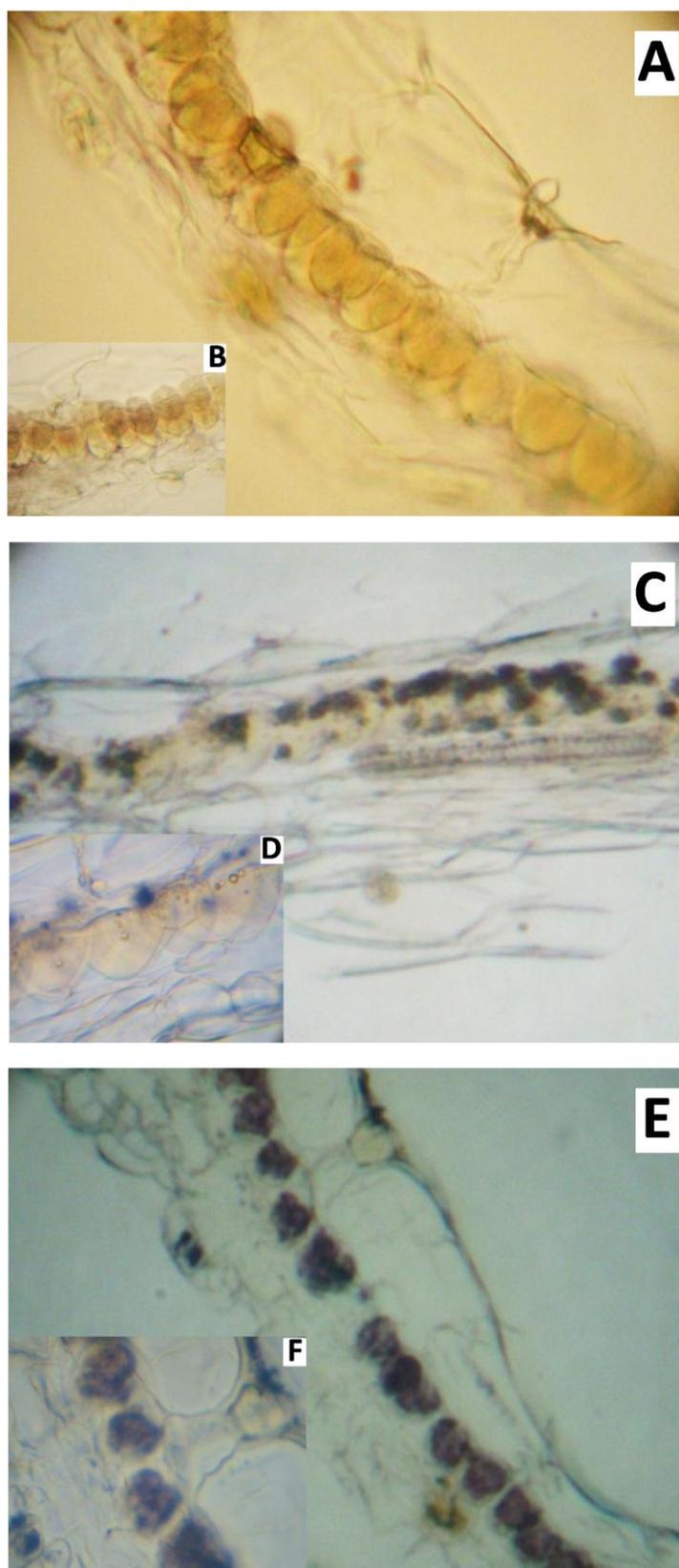


Figura 4: A-F: Teste microquímico das folhas de *P. pellucida*; A e B: Alcalóides; C e D: Flavonóides; E e F: Amido.

4. CONCLUSÃO

As características anatômicas da folha e do pecíolo de *P. pellucida* são relevantes na determinação da autenticidade do material vegetal desta espécie. Microscopicamente, a presença das diferentes formações estruturais na folha de *P. pellucida* são caracteres que, quando analisados em conjunto, auxiliam no controle botânico de qualidade da planta em questão como insumo farmacêutico. Por outro lado, os estudos microquímicos poderão orientar os estudos fitoquímicos mais detalhados.

5. REFERÊNCIAS

AGAREZ, F.V.; RIZZINI, C.M. & PEREIRA, C. **Botânica:** taxonomia, morfologia e reprodução dos angiospermae: chaves para determinação das famílias. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1994. p.: 198-199.

AMARAL, M.M.; MELLO-SILVA, R. Ontogenesis of stomata in Velloziaceae: paracytic versus tetracytic? Revista Brasileira de Botânica. 31 (3) São Paulo, 529-536, 2008.

BATAGHIN, F.A. 2009. Distribuição da comunidade de epífitos vasculares em diferentes sítios na Floresta Nacional de Ipanema, Iperó, SP, Brasil. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos. 99p.

BRASIL, 2010. Resolução-RDC nº14, de 31 de março de 2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União nº 63, de 5 de abril de 2010.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R. Macro and microscopic characters of the aerial vegetative organs of Carqueja: *Baccharis usterii* Heering. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2010, vol. 53, n.1, p. 123-131.

CALLADO, C.H.; FREITAS, M.H.V.; LIMA, H.R.P.; COSTA, C.G.C. Diferenciação da epiderme múltipla da lâmina foliar de *Mollinedia oligantha* Perkins. Floresta & Ambiente. v.12, n.2, p. 75 - 78, 2006.

COSTA, A.F. Farmacognosia. 2^a ed. Vol. III. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.

COSTA, A.R. 2001. As Relações Hídricas das Plantas Vasculares. Disponível em: <http://www.angelfire.com/ar3/alexcosta0/RelHid/Rhw5.htm>. Acesso em: 19/11/10.

Cushman, J.C.; Borland, A.M. Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant, Cell & Environment*. 25(2), 295-310, 2002.

JOHANSEN, D.A. *Plant Microtechnique*. 1940. New York: McGraw- Hill. 523p.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: EDUR. 1997. 198p.

MACHADO, R.D.; COSTA, C.G.; Fontenelle, G.B. *Acta Botânica Brasílica*, Supl., v.1, n.2, p. 275-285, 1988.

MATHIEU, G. New digital taxonomic tools and their use in managing herbarium names (nomina herbariorum) in the genus *Peperomia* (Piperaceae). Volume I. PhD Thesis. Ghent University. Department Biology. Research Group Spermatophytes. 2007. 233 p.

MUNDO, S.R.; DUARTE, M.R. Caracteres morfoanatômicos de folha e caule de *Cupania vernalis* Cambess., Sapindaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19 (2b), 509-606, 2009.

PURVIS, M.; COLLIER, D.; WALLS, D. *Laboratory techniques in botany*. London: Butterworths. 1964.

TAKEMORI, N.K., BONA, C., ALQUINI, Y. Anatomia comparada das folhas de espécies de *Peperomia* (Piperaceae) - I. Ontogênese do tecido aquífero e dos estômatos. *Acta Botanica Brasílica* 17(3): 387-394. 2003.

Capítulo III

5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

5.1. Caracterização físico-química e análises por espectrofotometria e cromatografia em camada delgada e à líquido de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.)

Artigo submetido à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

5.1. Caracterização físico-química e análises por espectrofotometria e cromatografia em camada delgada e à líquido de alta eficiência de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.)

Silva, R.M.F.^{1,2}; Ribeiro, J.F.A.²; Pamplona, S.G.S.R.²; Silva, M.N.²; Arruda, A.C.²; Silva Júnior, J.O.C.²; Barbosa, W.L.R.²; Rolim Neto, P.J.¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco – Recife- PE – CEP: 50740-521; ² Universidade Federal do Pará –Belém – PA - CEP: 66.075-110.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização físico-química do pó e da tintura, análise espectrofotométrica e cromatográfica por cromatografia em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato seco de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.). As metodologias seguiram a Farmacopéia Brasileira IV ed., com exceção da prospecção química, da obtenção do perfil cromatográfico através de CCD e à líquido e espectrofotométrica do extrato seco, e determinação do resíduo seco. A prospecção química revelou a presença de saponinas espumídicas; açúcares redutores; proteínas e aminoácidos; fenóis; taninos; flavonóides; esteróides e triterpenóides; depsídeos e depsídonas. Na análise por CCD, o melhor perfil da fração flavonoídica foi obtido com MeOH/CHOOH (90:10). Os resultados obtidos contribuem para a determinação de especificações de uma futura monografia em Farmacopéias da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.).

Palavras-chave: *Peperomia pellucida*, caracterização, espectrofotometria, cromatografia em camada delgada, cromatografia à líquida de alta eficiência

1. INTRODUÇÃO

A *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) é planta silvestre, da família Piperaceae. Encontra-se em países da Ásia, América do Norte, Central (Antilhas) e América do Sul. No Brasil, vai desde a Amazônia até o Paraná. Encontrada em locais úmidos, a *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) é conhecida popularmente como erva-de-jabuti, coraçãozinho, língua-de-sapo, entre outros (Arrigoni-Blank, 2004).

A erva-de-jabuti é usada na Amazônia para combater a tosse ou a dor de garganta, arritmias cardíacas, indicada como antipruriginosa e diurética, utilizada sob a forma de chá ou infusão preparada com as raízes ou com toda a planta (Estrela, 1994; Vieira, 1992). Experimentos realizados por alguns autores divulgam e publicam estudos sobre a abordagem etnofarmacêutica e a fitoquímica da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) (Araújo, 2006; Barbosa, 2001; Barbosa, 2009, Lameira *et al.*, 2003). Atividades anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e antihipertensiva também são relatadas para esta erva (Arrigoni-Blank, 2002; Khan, 2002; Khan, 2007; Khan, 2008; Huerta & Rodriguez, 2003).

Pelo fato de apresentar ciclos curtos de germinação e ser de fácil disseminação, facilitada por fatores naturais como ventos e chuvas, o vegetal germina e cresce com facilidade em áreas úmidas, abundantes em matéria orgânica e ao abrigo da luz solar, o que muitas vezes a faz ser considerada como uma praga em monoculturas (Pereira *et al.*, 2000).

Investigações químicas prévias da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) estabeleceram a ocorrência de apiol, 2,4,5-trimetóxiestireno, flavonas, flavonóis e fitoesteróis (Aquil *et al.*, 1993; Aquil *et al.*, 1994; Manalo *et al.*, 1983). Um estudo químico do extrato metanólico das partes aéreas conduziu ao isolamento de um novo composto ArC₂ dimérico, o qual foi denominado pellucidina A, juntamente com o conhecido dilapiol,

esta última substância pertencente à classe dos fenilpropanóides, e constituinte dos óleos essenciais (Bayma *et al.*, 2000; Manalo *et al.*, 1983).

Alguns pesquisadores isolaram da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) cinco novos compostos, incluindo duas secolignanas, duas tetrahidrofuranolignanas e uma dihidronaftolenona altamente metoxilada (Xu *et al.*, 2006).

Outros estudos relatam a presença de glicosídeos, antraquinonas (Aziba *et al.*, 2001), além de flavonóides, saponinas, esteróides e triterpenóides, alcalóides, açúcares redutores, carotenóides, depsídeos e depsidonas, proteínas e aminoácidos, saponina espumídica, fenóis e taninos, e derivados da cumarina (Amador & Remédios, 2002; Araújo, 2006; Khan & Omoloso, 2002; Muhammad *et al.*, 1994; Lameira *et al.*, 2003). Flavonóides isolados da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) incluem apigenina, acacetina e isovitexina (Aquil *et al.*, 1993).

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização físico-química do pó e da tintura, e análise espectrofotométrica e cromatográfica por cromatografia em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência do extrato seco de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.).

2. MATERIAL E MÉTODO

Matéria Prima Vegetal

O material botânico, foi coletado em julho de 2007, no distrito de Icoaraci, através da Associação Ver-as-ervas[®], situada na cidade de Belém, Pará – Brasil. Uma exsicata da espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Milton Hélio Lima da Silva, do Museu Emilio Goeldi – Pará, e foi registrada com o nº MG.191457.

Método

Obtenção e caracterização físico-química do pó da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

Processamento da Amostra

Após a coleta, o material vegetal fresco (planta inteira) foi lavado com água e aspergido com álcool etílico a 70%. Em seguida, o material foi seco à temperatura ambiente, durante 2 dias. *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) foi colocada em estufa de ar circulante, durante sete dias, à temperatura mantida entre 42 e 45°C (Oliveira *et al.*, 1991). Após a retirada do material vegetal da estufa, este foi triturado em moinho de facas, obtendo-se pó seco.

Determinação da distribuição granulométrica do pó

A repartição granulométrica foi realizada, segundo a Farmacopéia Brasileira IV ed.. Os tamises foram utilizados com as seguintes malhas: 10, 24, 42, 60, 80 e 115 mesh, equivalentes a 1,70 mm, 710 µm, 355 µm, 250 µm, 180 µm e 125µm, respectivamente.

Determinações de perda por dessecação e de cinzas totais

A determinação da perda por dessecação e a quantificação do resíduo não volátil (cinzas totais) do pó de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.) foram realizadas de acordo com o que preconiza a Farmacopéia Brasileira IV ed. Os testes foram realizados em triplicata.

Obtenção e caracterização Físico-química da Solução Extrativa de *Peperomia pellucida* L. (H.B. K.)

Obtenção da tintura de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

O método escolhido para a obtenção da tintura de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K) foi a maceração. Foi preparada tintura na proporção 1:10 (material vegetal/álcool a 70%). Em um reator de aço inoxidável, a droga vegetal ficou em contato com o solvente por 7 dias, com agitação ocasional (Santos, 2000).

Determinação da densidade e do pH

Foram determinados de acordo com o que preconiza a Farmacopéia Brasileira IV ed.

Determinação da porcentagem de resíduo seco total

Exatamente 1 mL de cada tintura foi pipetado e transferido para cápsulas de porcelana previamente taradas. As cápsulas foram colocadas em banho-maria até secar e, em seguida, levadas à estufa a 110°C, até obter peso constante. Após resfriarem em dessecador, as cápsulas foram pesadas, sendo a porcentagem de resíduo seco calculada (Maciel *et al.*, 2006).

Obtenção do extrato seco

Para a obtenção do extrato seco da planta, a tintura foi concentrada em evaporador rotativo. Após a evaporação do álcool, foi observada a presença de extrato solúvel em água. Para a retirada total da água, foram adicionadas alíquotas de butanol até a total retirada da água e, em seguida, o extrato foi levado à estufa, em temperatura média de 40°C, até a total evaporação de resíduos de solvente.

Obtenção da fração flavonoídica

A fração flavonoídica foi preparada através de extração sólido-líquido. Partindo de 1,015g do extrato bruto seco, foram adicionados 10 mL de hexano P.A e, para facilitar a dissolução, a amostra foi colocada no aparelho de ultra-som durante três minutos e, em seguida, levado à centrifuga por 10 min. Ao retirar a solução da centrífuga, separou-se o sobrenadante do resíduo em béqueres diferentes, deixou-se o sobrenadante à parte e ao resíduo adicionaram-se 10 mL de hexano; levou-se ao ultra-som e à centrífuga da mesma forma que foi realizado anteriormente. Repetiu-se este processo mais 6 vezes, sempre juntando os sobrenadantes, até que o sobrenadante se tornasse bem claro. Em seguida, iniciou-se a próxima fase a partir do resíduo, mas desta vez com o clorofórmio repetindo-se o mesmo procedimento, diferindo apenas pelo fato de o sobrenadante do clorofórmio ser armazenado separadamente ao do hexano. Nesta segunda fase, foram adicionados 70 mL de clorofórmio em alíquotas de 10 mL. Ao resíduo desta segunda fase, determinou-se como sendo a fração flavonoídica. Com esta fração flavonoídica, foi determinado o perfil cromatográfico utilizando cromatografia em camada delgada cujo método está descrito a seguir.

Prospecção química do extrato seco

Na prospecção química foram pesquisados saponinas, açúcares redutores, polissacarídeos, proteínas e aminoácidos, fenóis e taninos, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, catequinas, derivados benzaquinonas, naftoquinonas, fenantraquinonas, serquiterpenolactonas e outras lactonas, esteróides, triterpenóides e azulenos.

A prospecção química seguiu a metodologia descrita no Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais (Barbosa, 2004).

Saponinas espumídicas

Foram dissolvidos 50,00 miligramas do extrato seco em 5 mL de água destilada. Em seguida, diluiu-se para 15 mL e agitou-se vigorosamente durante 2 min em tubo fechado. O resultado é considerado positivo para saponina espumídica caso a camada de espuma permaneça estável por mais de meia hora.

Açúcares Redutores

Foram dissolvidos cerca de 50,00 miligramas do extrato seco em 5 mL de água destilada. Filtrou-se. Adicionou-se 2 mL do reativo de Fehling A e 2 mL do reativo de Fehling B. Aqueceu-se em banho-maria em ebulição durante 5 min. O aparecimento de um precipitado vermelho-tijolo indica presença de açúcares redutores.

Polissacarídeos

Foram dissolvidos 50,00 miligramas do extrato seco em 5 mL de água destilada. Filtrou-se. Adicionaram-se duas gotas de lugol. O aparecimento de coloração azul indica resultado positivo.

Proteínas e Aminoácidos

Foram dissolvidos 30,00 miligramas do extrato alcoólico em 3 mL de água destilada. Filtrou-se. Adicionou-se 0,5 mL de solução aquosa de ninhidrina a 1% e aqueceu-se até a ebulição. O aparecimento de coloração violeta persistente indica reação positiva.

Fenóis e Taninos

Dissolveram-se 50,00 miligramas de extrato seco em 5 mL de água destilada, filtrou-se e adicionou-se de uma a duas gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 1%. Qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado é indicativo de reação positiva, quando comparado com o teste em branco (água + Solução de FeCl_3). Coloração inicial entre o azul e o vermelho é indicativo da presença de fenóis, quando o teste em branco for negativo. Precipitado escuro de tonalidade azul indica presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, presença de taninos catéquicos.

Flavonóides

Dissolveram-se 100,00 miligramas do extrato seco em 10 mL de metanol. Filtrou-se. Adicionaram-se cinco gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

Alcalóides

Dissolveram-se 50,00 miligramas do extrato seco em 5 mL de solução de HCl a 5%. Filtrou-se. Separou-se quatro porções de 1 mL em tubos de ensaio, e adicionaram-se gotas dos reativos abaixo:

- a) Reativo de Bouchardat: Aparecimento de precipitado laranja-avermelhado.
- b) Reativo de Dragendorff: Aparecimento de precipitado vermelho-tijolo.
- c) Reativo de Mayer: Aparecimento de precipitado branco.

Glicosídeos

Dissolveram-se 50,00 miligramas do extrato seco em 5 mL de metanol. Filtrou-se. Separou-se em duas porções de 2 mL. Na primeira porção, adicionaram-se gotas do

reativo de Keede. Coloração azul ou violeta indica reação positiva. Na segunda porção, adicionaram-se 3 gotas de solução recém-preparada de nitroprussiato de sódio e 3 gotas de solução de hidróxido de sódio 2N. Coloração roxa intensa indica reação positiva.

Catequinas

Dissolveram-se 30,00 miligramas do extrato seco em 3 mL de metanol. Filtrou-se. Adicionou-se 1 mL de solução aquosa de vanilina a 1% e 1 mL de HCl concentrado. O surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positiva.

Derivados Benzaquinonas, Naftoquinonas e Fenantraquinonas

Dissolveram-se 30,00 miligramas do extrato seco em 3 mL de metanol. Filtrou-se. Adicionaram-se 2 gotas de Na_2CO_3 a 25%, 2 gotas de formaldeído a 4% e 2 gotas de o-dinitrobenzeno a 5%. Aqueceu-se a mistura em banho-maria. Coloração violeta indica reação positiva.

Sesquiterpenolactonas e outras lactonas

Dissolveram-se 30,00 miligramas do extrato em 3 mL de metanol. Filtrou-se. Adicionaram-se 12 gotas de solução alcoólica de cloridrato de hidroxilamina a 10% e duas gotas de solução metanólica de KOH a 10%. Aqueceu-se suavemente em banho-maria durante 2min. Em seguida, esfriou-se e acidificou-se com solução de HCl a 1N. Adicionou-se 1 gota de FeCl_3 a 1%. O aparecimento de coloração violeta indica reação positiva.

Esteróides e Triterpenóides

Dissolveram-se 100,00 miligramas do extrato seco em 10 mL de clorofórmio. Filtrou-se sobre carvão ativado. Transferiu-se o filtrado para um tubo de ensaio completamente seco. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Em seguida, adicionaram-se, cuidadosamente, 3 gotas de H₂SO₄ concentrado. Agitou-se suavemente.

Se houver rápido desenvolvimento de cores, que vão do azul evanescente ao verde persistente, indicam resultado positivo.

Azulenos

Dissolveram-se 20,00 miligramas do extrato seco em 2 mL de clorofórmio. Filtrou-se. Concentrou-se até 0,5 mL em banho-maria e adicionaram-se 2,5 mL da solução de p-dimetilaminobenzaldeído. Aqueceu-se em banho-maria durante 5min. Após esfriar, em um funil de decantação, agitou-se com 10 mL de éter de petróleo. Quando as duas fases estiverem distintas, observe a fase aquosa. Quando há presença de proazulenos, a fase aquosa adquire coloração azul, porém quando estes estão em pequena quantidade, a coloração observada é esverdeada.

Espectrofotometria de absorção UV/Visível

Foram preparadas soluções do extrato bruto (0,033 mg mL⁻¹), da fração flavonoídica (0,014 mg mL⁻¹), e dos padrões de rutina hidratada Sigma-Aldrichi[®] mín. 95% lote 128H0176 (0,01 mg mL⁻¹) e de quercetina dihidratada mín. 98% Sigma-Aldrichi[®] mín. 95% lote 035X0720 (0,005 mg mL⁻¹), utilizando como solventes água purificada e metanol. Foi feita varredura entre 200 e 800 nm, utilizando um espectrofotômetro de absorção UV-visível Shimadzu[®].

Determinação do Perfil Cromatográfico da Fração Flavonoídica de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.) por Cromatografia em Camada Delgada

Para a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), primeiramente foram utilizadas placas de sílica de fase normal, confeccionadas no próprio laboratório, e ativadas a 105°C por cerca de 15 min, para a análise da amostra em diversos eluentes, verificando-se em qual deles a amostra apresentaria melhor separação em bandas. Para a análise em cromatografia em fase reversa, foram utilizadas placas padrões, pré-fabricadas, RP-18 Merck® (Lopes, 2007). Para a visualização das substâncias, foi utilizada a radiação ultravioleta em 254 ou 365 nm e como revelador o cloreto férrico a 5% (p/v) ou difenilborato de aminoetanol (NP-PEG) (Carvalho *et al.*, 2006; Dourado & Ladeira, 2008; Wagner & Bladt, 2001; Verlag, 1981). Os eluentes utilizados na cromatografia estão descritos a seguir (Tabela 1).

A solução da amostra aplicada nas placas foi preparada com concentração de 4,2 mg mL⁻¹ (fração flavonoídica/metanol).

TABELA 1. Eluentes utilizados na análise utilizando cromatografia em camada delgada de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.).

ELUENTE	CCD	CCD
	Fase Normal	Fase Reversa
CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 70:25:5	X	
MeOH/H ₂ O 90:10	X	
CHCl ₃ /MeOH 90:10	X	
AcOEt/CHOOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O 67,57:7,43:8,78:16,22	X	
ButOH/C ₂ H ₄ O ₂ /H ₂ O 40:10:50	X	
AcOEt/ CH ₂ O ₂ / H ₂ O 65:15:20	X	
AcOEt/ CHOOH /H ₂ O 67:7:26		X
CHCl ₃ /Acetona/CHOOH 75:16,5:8,5		X
CH ₃ CN/H ₂ O 95:5		X
CH ₃ CN/H ₂ O 85:15		X
AcOEt/ CHOOH.2M/HCl 85:6:9	X	
MeOH/H ₂ O 90:10		X
MeOH/H ₂ O 95:5		X
ACN/H ₂ O 95:5		X
ACN/H ₂ O 85:15		X
ACN/H ₂ O* 85:15		X
MeOH/ H ₂ O* 95:5		X
MeOH/H ₂ O* 99:1		X
MeOH/ CHOOH 90:10		X

* As amostras aplicadas estavam acidificadas. CCD – Cromatografia em Camada Delgada.

Determinação do Perfil Cromatográfico da Fração Flavonoídica de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.) por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

Preparação das Amostras

Foram preparadas soluções de amostras da fração flavonoídica e do extrato seco da *P. pellucida* L. (H.B.K.) com concentrações de 8,40 mg/mL, cada uma, utilizando como solventes água purificada e metanol.

Preparação dos Padrões

Foram preparadas soluções de padrões de quercetina dihidratada, rutina hidratada, epicatequina e catequina, utilizando a mesma concentração e os mesmos solventes das amostras. Todos os padrões foram obtidos do fabricante Sigma-Aldrich[®].

Equipamento e Parâmetros Cromatográficos

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu[®], composto por duas bombas, modelo LC-10AD, detector com único sinal de absorvância na região do ultravioleta, operando com comprimento de onda em 270 e 320 nm modelo SPD-10AV, degaseificador de membrana, modelo DGU-14A, injetor de amostras Rheodyne 7752i, com alça de amostragem de 20 µL, interface de comunicação Shimadzu[®], modelo CBM-10A acoplado a microcomputador Pentium II com software de integração Class LC-10A.

Os parâmetros cromatográficos utilizados foram fluxo de 1,0 mL/min, uma coluna Gemini[®] C18, 250 X 4,6mm, 5µm, um volume de injeção de 20 µL e fase móvel gradiente de ácido fórmico a 1% em acetonitrila. Foi preparada uma solução de ácido

fórmico a 1% em água, e aumentou-se a proporção de ácido fórmico a 1% em acetonitrila, de 5 a 100%, durante 60 minutos.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Obtenção e Caracterização físico-química do pó de *Peperomia pellucida* L.

(H.B.K.)

Processamento da Amostra

Como foram coletados 7 kg de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) fresca, após a secagem na estufa e a moagem, obtiveram-se 280 g do pó da planta seca. O que significa um rendimento de 4% de planta seca em relação à planta fresca.

Determinação da Granulometria do Pó

Na granulometria do pó de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.), ao comparar os resultados com a classificação da Farmacopéia Brasileira IV ed., concluiu-se que o pó desta planta como sendo um pó grosso (Figura 1).

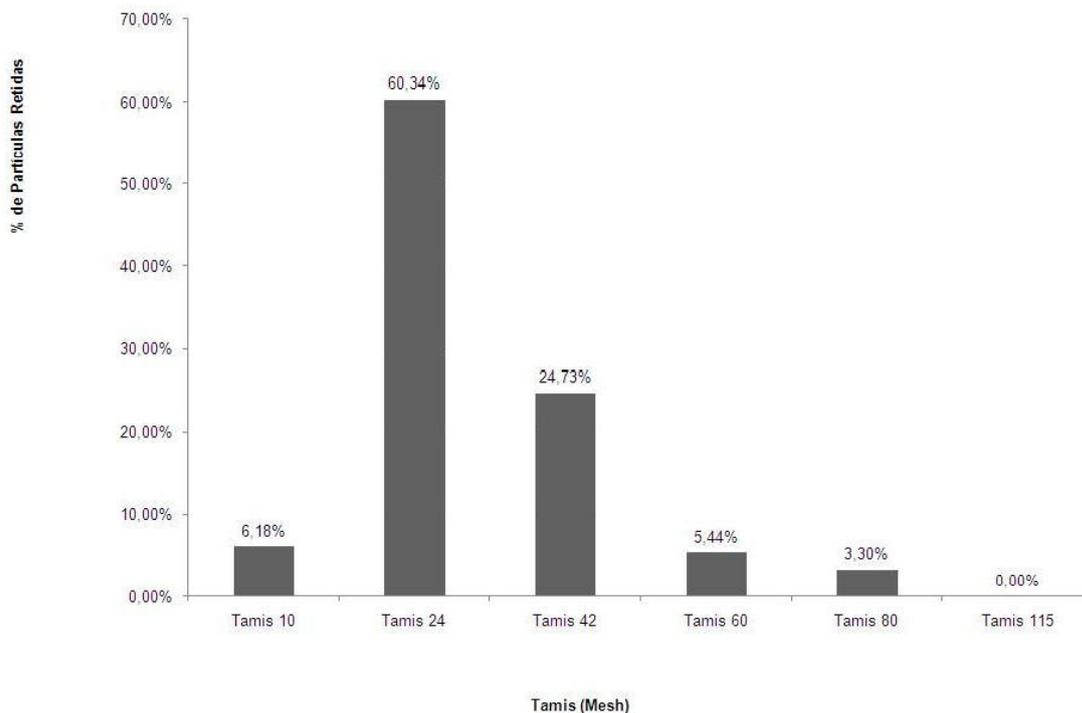


FIGURA 1. Determinação granulométrica do pó de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.).

A distribuição granulométrica de drogas vegetais determina a superfície de contato disponível para interação com o solvente utilizado na obtenção do derivado vegetal. É um parâmetro preliminar importante para a escolha do processo extrativo e do solvente adequado, já que influencia diretamente na eficiência do processo extrativo (Santos, 2000; Migliato *et al.*, 2007).

Determinação de Perda por Dessecação

A média do valor obtido da perda por dessecação de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K) foi de 9,5%, apresentando-se de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV ed., na qual este resultado pode variar de 8 a 14%. Esta determinação é importante para o controle microbiológico, pois, excesso de água na droga vegetal favorece o crescimento

de fungos e bactérias, podendo também levar à hidrólise dos constituintes (Sharapin, 2000).

Determinação de Cinzas Totais

Teor de cinzas totais é o valor que determina o teor de sílica, principalmente areia e terra silícea presente na droga (Sharapin, 2000).

Após a calcinação das amostras, a média do valor obtido foi de 38,57%.

O valor aceitável no teor de cinzas totais da *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.) ainda não foi estabelecido em nenhuma monografia.

Obtenção e caracterização físico-química da solução extrativa de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

Obtenção da Tintura

Foram obtidos 1800 mL de tintura de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.).

Determinação da densidade

O valor obtido para a densidade da tintura da *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.) foi 0,8660 g mL⁻¹.

Determinação do pH

O valor obtido para o pH foi 6,57.

Determinação da porcentagem de resíduo seco total

Foram obtidos 1,39% de resíduo seco total.

Os valores aceitáveis para a densidade, pH e porcentagem de resíduo total seco para a tintura da *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.) ainda não foram estabelecidos em nenhuma monografia.

Obtenção do Extrato Seco

O extrato seco obtido a partir da concentração da tintura de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K) foi de 28,87 g. O que representa um rendimento de 11,5% em relação à planta seca e de 0,41% em relação à planta fresca.

Na obtenção do extrato seco, verificou-se que a planta apresenta baixo rendimento. E se os estudos farmacológicos e tecnológicos viabilizarem *Peperomia pellucida* L. (H. B. K) para a produção de medicamentos fitoterápicos, necessitar-se-ia de produção da mesma em grande escala. Como é planta na qual a eficácia terapêutica está ligada com o estágio de desenvolvimento e estação do ano, é necessária a pesquisa de método de cultivo que minimize as diferenças entre as quantidades dos constituintes.

Obtenção da fração flavonoídica

A quantidade total obtida de fração flavonoídica a partir de 1,015 g de extrato seco foi 0,8584 g, ou seja, 84,62% do extrato seco.

Prospecção Química do extrato seco

Na análise fitoquímica da droga, foi identificada a presença de saponina espumídica; açúcares redutores; proteínas e aminoácidos; fenóis e taninos; flavonóides; esteróides e triterpenóides; depsídeo e depsidonas.

Espectrofotometria de Absorção UV/Visível

Conforme o espectro apresentado após a varredura das amostras (Figura 2), a banda I apresentou absorção máxima em 332 nm, e a banda II apresentou absorção máxima nas faixas de comprimento de onda entre 270 e 272 nm.

A espectrofotometria mostrou que a fração flavonoídica e o extrato seco apresentaram comportamentos semelhantes no espectro, divergindo do comportamento

dos padrões utilizados, rutina e quercetina; logo, é provável que esta fração se trate de uma mistura de flavonóides e, se a rutina e a quercetina estiverem presentes, estas devem estar em pequenas quantidades.

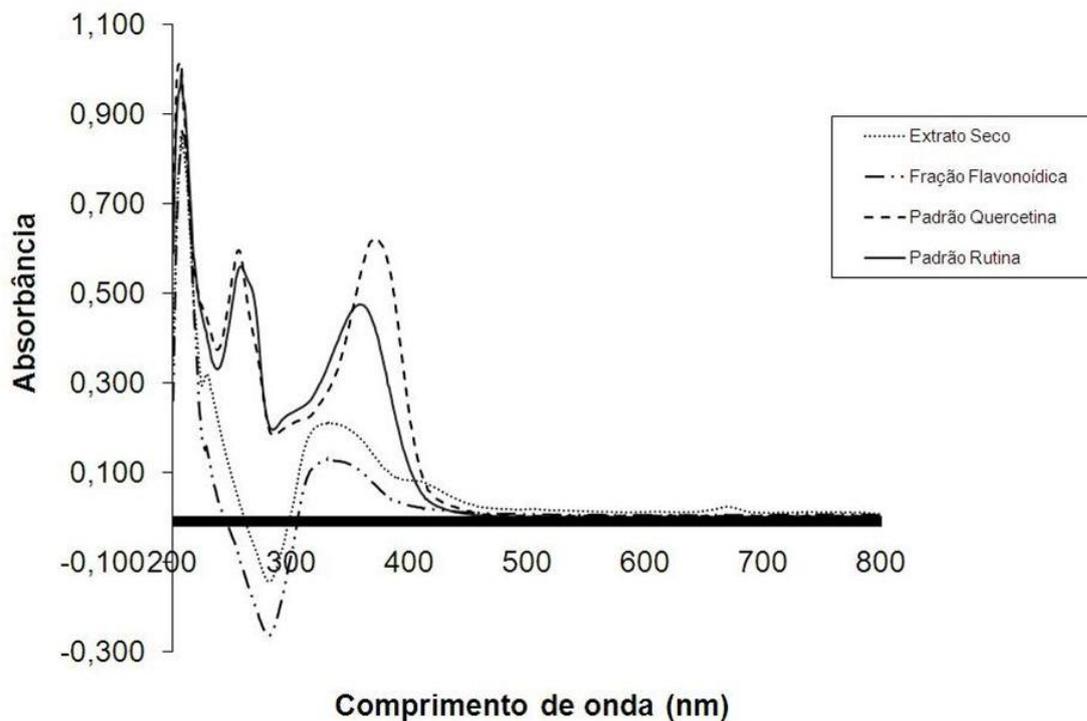


FIGURA 2. Espectro de varredura de 200 a 800 nm, do extrato seco, fração flavonoídica, e padrões de rutina e de quercetina.

Determinação do Perfil Cromatográfico da Fração Flavonoídica de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.) por Cromatografia em Camada Delgada

Na análise por CCD, o eluente que apresentou melhor separação da mistura foi o MeOH/CHOOH 90:10, sobre cromatoplas de gel de sílica de fase reversa, usando cloreto férrico a 5% como revelador, apresentando duas manchas com Rf 0,63 e 0,75

(Figura 3). Porém as bandas não ficaram bem definidas, dificultando sua comparação com padrões de flavonóides.

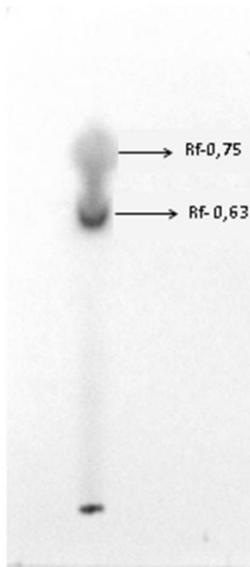


FIGURA 3. Placa de Cromatografia em Camada Delgada da solução com concentração de $4,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (fração flavonoídica/metanol) de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.), utilizando como eluente MeOH/CHOOH 90:10.

Determinação do Perfil Cromatográfico da Fração Flavonoídica de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os resultados estão apresentados nas Figuras 4 e 5.

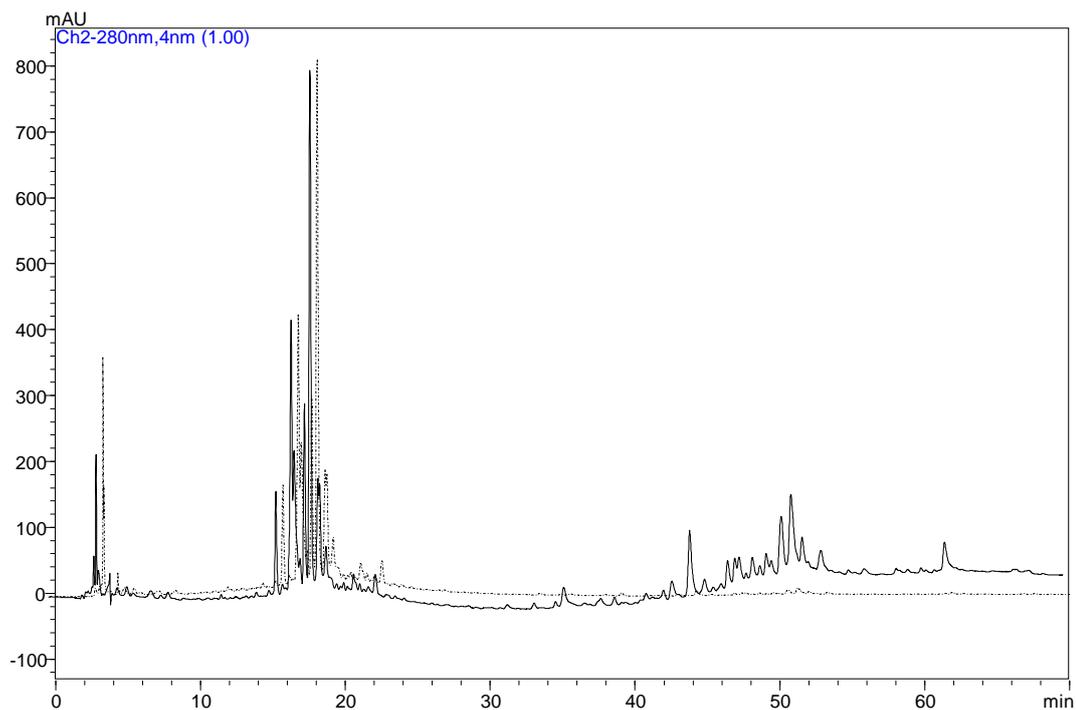


FIGURA 4. (—) Extrato seco da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.); (-.-) Fração flavonoídica da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) utilizando um gradiente exploratório de 5 a 100% de MeCN em 60 min, varredura de 200 a 400 nm, injeção de 20 μ L.

Comparando-se os tempos de retenção do extrato seco e da fração flavonoídica, verifica-se a presença de flavonóides em torno de 20 minutos já que ambos os cromatogramas foram feitos no mesmo sistema cromatográfico.

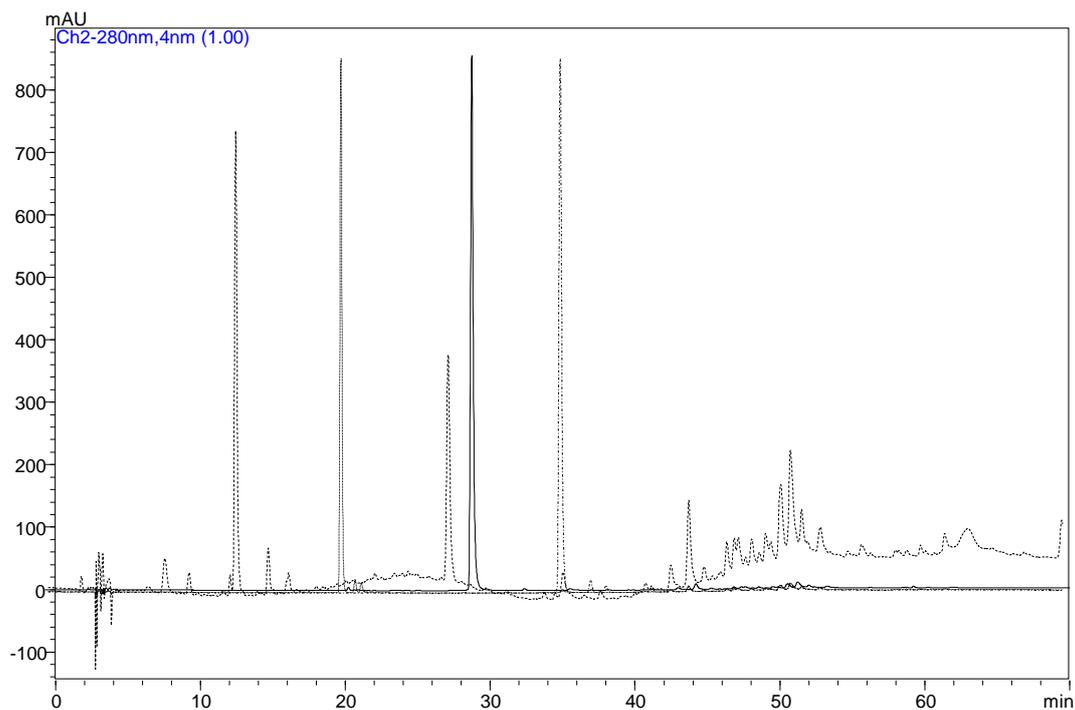


FIGURA 5. (—) Padrão de quercetina; (.....) Padrão de rutina; (---) Padrão de epicatequina; (-.-) Padrão de catequina - gradiente exploratório de 5 a 100% de MeCN em 60 min, varredura de 200 a 400 nm, injeção de 20 μ L.

Pelo tempo de retenção e comparando-se com os obtidos no extrato seco e na fração flavonoídica pode-se inferir que exista alguns flavonóides conhecidos neles, já que tanto as amostras quanto os padrões foram feitos nas mesmas condições cromatográficas e que precisam ser isoladas e identificados através de IV, RMN e espectro de massa.

4. Conclusão

No presente trabalho foi possível concluir que o material vegetal apresenta baixo rendimento. Na espectrofotometria, determinou-se que os flavonóides presentes no material vegetal provavelmente não se tratam de quercetina ou rutina. Contudo, de acordo com a cromatografia líquida de alta eficiência, é evidente que a fração

flavonoídica da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) trata-se de uma mistura de flavonóides os quais precisam ser isolados e identificados através de métodos espectrométricos, para caracterizar um possível marcador.

Os resultados obtidos com a perda por dessecação, determinação de cinzas totais, determinação de pH, densidade e porcentagem de resíduo seco total contribuem para a determinação de especificações de uma futura monografia farmacopeica de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.), resultando em insumos vegetais de maior uniformidade, garantindo uma maior qualidade e padronização para o desenvolvimento e produção de fitoterápicos seguros e eficazes.

5. REFERÊNCIA

AMADOR, E.C.C.; REMÉDIOS, A.G.M.. **Abordagem Fitoquímica da Erva-de-Jabutí (*Peperomia pellucida*)**. 2002, 28p.Trabalho de Conclusão de Curso do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Pará, Belém.

AQUIL, M.; KHAN, I.Z.; AHMAD, M. B. Flavonoids from *Peperomia pellucida*. **Sci Phys Sci**. 5; p. 213-215, 1993.

AQUIL, M.; RAHMAN, F.A.; AHMAD, M.B. A new flavonol glycoside from *Peperomia pellucida*. **Sci. Phys. Sci.** 6, p.141-143, 1994.

ARAÚJO, S.C. **Utilização de LC-DAD na Detecção e Caracterização de Flavonóides do Extrato Etanólico de *Peperomia pellucida* (L.) H.B.K.** 2006. 39p. Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém.

ARRIGONI-BLANK, M. F. Seed germination, phenology, and antiedematogenic activity of *Peperomia pellucida* (L.) H. B. K. 2002. **BMC Farmacologia**. Disponível em: www.biomedcentral.com/1471-2210/2/12 . Acesso em: 12 abril 2008.

ARRIGONI-BLANK, M.F. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 91, p. 215-218, 2004.

AZIBA, P.I.; ADEDEJI, A.; EKOR, M.; ADEYEMI, O.; Analgesic activity of *Peperomia pellucida* aerial parts in mice. **Fitoterapia**. 72, p. 57-58, 2001.

BARBOSA, W.L.R. Aspectos da Etnofarmácia baseados na Assistência Farmacêutica aplicados à Fitoterapia Popular. In Barbosa, WLR (org.) **Etnofarmácia: Fitoterapia Popular e Ciência Farmacêutica**. Belém: NUMA-UFPA, 2009. 169p.

BARBOSA, W.L.R. 2004. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais, Belém – Pa: **Revista Científica da UFPA**, vol. 4, 2001. Disponível em <http://www.ufpa.br/rcientifica>. Acesso em: 12 de abril de 2007.

BARBOSA, W.L.R. Levantamento etnofarmacêutico da fitoterapia tradicional em Igarapé-Miri-Pará. CD-Rom. In: VII REUNIÃO ESPECIAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA. VII RE – SBPC. V.1. , 2001, Manaus. **CD-Rom**.

BAYMA, J.C.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H.; ARRUDA, A.C.; CANTO, W.C.; A dimeric ArC₂ compound from *Peperomia pellucida*. **Phytochemistry**, 55, p. 779 – 782, 2000.

DOURADO, R.S. & LADEIRA, A.M. Identificação de flavonóides em *Hypericum cordatum* (Vell.) N. Robson (Clusiaceae). **Revista Brasil. Bot.**, v.31, n.4, p. 611-620, 2008.

CARVALHO, C.M.G.; PRUDENTE, L.R.; PEREIRA, A.C.; DE PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Avaliação da Qualidade de Extratos Vegetais. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 3 (2), p. 53-62, 2006.

ESTRELA, e. **Plantas Medicinales Amazonicas: Realidad y Perspectivas**. Quito: Programa de Las Nacionales Unidas para el Desarrollo (PNVD), 1994. p.265.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. IV ed. Parte I. São Paulo: Atheneu, 1988. p.V2.14. – V2.14.4; V2.17.-V2.17.3.

HUERTA, E.I.; RODÍGUEZ, J.E.T. Toxicología Aguda Oral de la decocción la *Peperomia pellucida* (L.) H.B.K. (Corazón de hombre). **Toxicologia Clínica, Sertox**. 2003. Disponível em: <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>. Acesso em 20 ago 2007.

KHAN, M.R. Antibacterial activity of *Hygrophila stricta* and *Peperomia pellucida*. **Fitoterapia**, 73, 251-254, 2002.

KHAN, M.R.; OMOLOSO, A.D. Antibacterial activity of *Hygrophila stricta* and *Peperomia pellucida*. **Fitoterapia**. 73, p. 251-254, 2002.

KHAN, M.R. Antipyretic Activity of *Peperomia pellucida* Leaves in Rabbit, **Turk Journal of Biology**, 32, 37-41, 2007.

KHAN, A. Neuropharmacological effects of *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) leaves in mice. **DARU**. 16, 35-40, 2008.

LAMEIRA, O.A.; PAIVA, J.S.; OLIVEIRA, E.C.P; PINTO, J.E.P. Fenologia e Análise Fitoquímica de Plantas Mediciniais de Ocorrência na Amazônia. 2003. p. 1-6. Disponível em:

http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/44_701.pdf.

Acesso em : 21 set. 2010.

LOPES, J.L.C. Cromatografia em Camada Delgada. In: Collins, C.H; Braga, G.L; Bonato, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**; São Paulo: Ed. UNICAMP, 2007. p. 67-85.

MACIEL, R.L., MOREIRA-CAMPOS, L.M., SILVA, B.C., BRANDÃO, M.G.L. Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de arnica *Lychnophora* em comparação com *Arnica Montana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Jan/Mar, 16(1), 99-104, 2006.

MANALO, J.B.; HAN, B.H.; HAN, Y.N.; PARK, M.H.; ANZALDO, F.E. Studies on ether-soluble neutral compounds of *Peperomia pellucida*. **Nat. Prod. Res. Inst.**, Seoul Natl. Univ. Univ., Seoul, S. Korea. Archives of Pharmacal Research. ISSN: 0253-6269, 6(2), p. 133-6, 1983.

MIGLIATO, K.F.; MOREIRA, R.R.D.; MELLO, J.C.P.; Sacramento, L.V.S.; Corrêa, M. A.; Salgado, H.R.N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(1), p. 94-101, 2007.

MUHAMMAD, A.; RAHMAN, F.A.; AHMAD, M.B. A new flavonol glycoside from *Peperomia pellucida*. **Scientist of Physical Sciences**. Department Chemistry, University Maiduguri, Borno, Nigeria. ISSN: 0970-9150, 1994, 6(1), p. 141-3, 1994.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1991. p.16-18.

PEREIRA, R.C.A.; MARINHO, J. T. S.; SALES, F.; AZEVEDO, K. S. **Manejo e controle de plantas invasoras na cultura do café no Acre**. Instruções Técnicas. Acre: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, ISSN 0104-9038, nº 30, set/2000, p. 1- 3.

SANTOS, E.V.M. Extração de matérias-primas vegetais. In: Sharapin, N. **Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Santafé de Bogotá: Cytel. 2000. p. 27-60.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Santafé de Bogotá: Cytel, 2000. p 145-157.

WAGNER, H. & BLADT, S. **Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas**. Photographs by V. Rickl. Springer, Second Edition, 2001. p. 196.

VERLAG, G.F. **Pharmazeutische Biologie. 4-Drogenanalyse II: Inhaltsstoffe und Isolierungen**. New York: Stuttgart, 1981, p. 117 a 128.

VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia. Manual das Plantas Medicinais (A Farmácia de Deus)**. 2ª ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1992. p. 126-127.

XU, S.; LI, N.; NING, M. ZHOU, C. YANG, Q.; WANG, M. Bioactive Compounds from *Peperomia pellucida*. **J. Nat. Prod.** vol. 69, p. 247 – 250, 2006.

Capítulo IV

6. DETERMINAÇÃO DE CINZAS E PERDA POR DESSECAÇÃO

**6.1. Determinação dos teores de umidade e cinzas totais em amostras de *Peperomia
pellucida* utilizando os métodos convencional e termogravimetria**

Artigo submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas

6.1. Determinação dos teores de umidade e cinzas totais em amostras de *Peperomia pellucida* utilizando os métodos convencional e termogravimetria

Silva, R.M.F.^{1,2}; Gomes, T.C.B.L.¹; Freitas Neto, J.L.¹; Strattmann, R.R.¹; Rolim, L.A.¹; Silva, K.E.R.¹; Soares Sobrinho, J.L.³; Araújo, A.A.S.⁴; Albuquerque, M.M.¹; Rolim Neto, P.J.^{1,*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará. ³Universidade Federal do Piauí.

⁴Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe.

RESUMO

Peperomia pellucida, pertencente à família Piperaceae é utilizada na medicina popular para várias enfermidades. O objetivo deste trabalho foi realizar a determinação dos teores de umidade e cinzas totais de *P. pellucida*, utilizando os métodos convencional e termogravimetria. Foram realizadas, em triplicata, a perda por dessecação e a determinação de cinzas totais, seguindo as metodologias preconizadas na Farmacopéia Brasileira IV ed. e termogravimetria (TG). A curva termogravimétrica foi realizada utilizando uma termobalança modelo TGA 60 Shimadzu[®], sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL/min), razão de aquecimento 10°C/min e cadinho de platina contendo massa de amostra de 5 mg, na faixa de temperatura entre 27 e 600°C. Diferentes resultados foram obtidos comparando-se as técnicas de determinação de perda por dessecação e cinzas totais analisados. Estas diferenças podem estar relacionadas à quantidade e uniformidade da amostra analisada e à sensibilidade da técnica empregada, exigindo uma interpretação criteriosa dos valores gerados. Os resultados obtidos contribuem para o ajuste de valores previamente definidos, resultando em derivados vegetais de maior uniformidade, importante na produção de medicamentos seguros e eficazes.

Palavras-chave: *Peperomia pellucida*, determinação de umidade, determinação de cinzas, termogravimetria.

1. INTRODUÇÃO

Peperomia pellucida L. (H.B.K.) é uma Piperaceae de ocorrência na América do Sul, Central (Antilhas), América do Norte e Ásia. No Brasil, ocorre desde o Amazonas até o Paraná, com representantes em locais úmidos, principalmente em paredões e jardins. No Brasil, é conhecida como comida-de-jabuti, erva-de-jabuti, erva-de-vidro, língua-de-sapo, coraçãozinho (Guimarães, 1984; Vieira, 1992; Martins, 1989; Rodrigues *et al.*, 1989); outros nomes populares são atribuídos a esta planta, como “corazon de hombre” e “yerba de la planta” em Cuba, “herbe a la curesse” nas Antilhas Francesas, “luchi pata” em países asiáticos (Roig y Mesa, 1988; Khan *et al.*, 2008).

É popularmente usada na Amazônia para combater a tosse ou a dor de garganta, arritmias cardíacas, sendo usada ainda como anti-pruriginosa e diurética, utilizada sob a forma de chá ou infusão preparados com as raízes e toda a planta, não raro, é consumida como excelente salada (Van den Berg, 1993; Pimentel, 1994; Perry, 1980). Também é usada para tratar abscessos, furúnculos e sinuosidades da pele e inflamações oculares (conjutivites). Dados da literatura confirmaram o efeito antimicrobiano e antipirético desta espécie (Bojo *et al.*, 1994; Khan *et al.*, 2008). Outras propriedades medicinais, atribuídas à *P. pellucida*, variam dependendo da região, para baixar o nível de colesterol sanguíneo (no nordeste do Brasil) e contra proteinúria e como diurético (na Guiana) (Arrigoni-Blank *et al.*, 2004).

Como ainda não existe uma monografia para *P. pellucida* na Farmacopéia Brasileira, pretende-se fazer com que o produto oferecido como substância medicamentosa satisfaça um padrão de qualidade, quando analisado pelos métodos gerais preconizados pela Farmacopéia.

Contudo, considerando o aporte crescente de plantas medicinais e de medicamentos de origem vegetal no arsenal terapêutico, cresce a necessidade de efetuar o controle de qualidade e validar os métodos analíticos utilizando técnicas modernas e eficientes (Sharapin, 2000).

O objetivo deste trabalho foi realizar a determinação dos teores de umidade e cinzas totais de *P. pellucida*, utilizando os métodos descritos na Farmacopéia Brasileira IV ed. e termogravimetria.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matéria prima vegetal

Foram selecionadas duas amostras de *P. pellucida*, coletadas em São Miguel do Guamá (SMG), Pará e em Cabo de Santo Agostinho (CSA), Pernambuco. A amostra SMG foi identificada pelo Prof. Dr. Milton Hélio Lima da Silva, do Museu Emilio Goeldi – PA, e foi registrada com o nº MG.181632. A amostra CSA foi identificada pela Dr^a Rita de Cássia Pereira, do Instituto Agronômico de Pernambuco – PE, e foi registrada com o nº 84031.

2.2. Processamento da amostra

Após a coleta, o material vegetal fresco (toda a planta, incluindo folhas, caules e raízes) foi lavado com água e álcool etílico a 70% e, em seguida, seco à temperatura ambiente, durante 2 dias. *P. pellucida* foi colocada em uma estufa de ar circulante, durante sete dias, a uma temperatura entre 42 e 45°C. Após a retirada do material vegetal da estufa, este foi triturado em moinho de facas e tamis de 30 mesh, obtendo-se pó seco.

2.3. Determinação dos teores de umidade e cinzas totais

A determinação dos teores de umidade (perda por dessecação) e cinzas foi realizada para as duas amostras coletadas. As análises utilizando o método convencional foram realizadas em triplicata, seguindo os métodos preconizados na Farmacopéia Brasileira IV ed., perda por dessecação em estufa a 105°C e calcinação em mufla a 450°C, respectivamente.

O método por análise termogravimétrica foi realizado utilizando uma termobalança modelo TGA 60 Shimadzu[®], na faixa de temperatura entre 27 e 600°C, sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL/min), razão de aquecimento 10°C/min e cadinho de platina contendo massa de amostra de 5 mg. A calibração do instrumento foi verificada antes dos ensaios empregando-se um padrão de oxalato de cálcio monoidratado, conforme norma ASTM E1582-93 (The American Society for Testing and Materials, 1993) (Araújo *et al.*, 2006; Storpirts *et al.*, 2009, Klancnik *et al.*, 2010).

No método termogravimétrico, as percentagens de umidade e cinzas foram determinadas considerando os valores percentuais extraídos diretamente das curvas

termogravimétricas. Os teores de umidade foram obtidos a partir da primeira etapa de perda de massa entre 27 e 105°C, com isoterma a 105°C durante 1 hora. Os teores de cinzas foram obtidos diretamente da percentagem do produto de decomposição térmica na faixa de temperatura entre 27 e 450°C, com isoterma a 450°C, durante 1 hora.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo os métodos gerais da Farmacopéia Brasileira IV ed.(1988), o teor de umidade e de cinzas totais é realizado através da perda por dessecação em estufa e calcinação em mufla, respectivamente.

A análise térmica abrange um grupo de técnicas, a partir das quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida em função do tempo ou da temperatura enquanto essa substância é submetida a uma programação controlada de temperatura e sob uma atmosfera especificada. A TG é uma técnica termoanalítica na qual a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura (Silva, de Paola e Matos, 2007, Storpirtis *et al.*, 2009).

As curvas TG geradas fornecem informações sobre a estabilidade térmica da amostra, sua composição e a estabilidade dos compostos intermediários e do produto final. A TG é um dos métodos mais eficientes para determinação quantitativa de umidade e outros voláteis ou do fármaco em uma formulação farmacêutica. De maneira geral, a liberação de umidade ou de água superficial é evidenciada nas curvas TG como uma perda de massa gradativa que ocorre desde a temperatura ambiente até próximo a 100°C (Storpirtis *et al.*, 2009).

Seguindo o método convencional, os valores obtidos para a perda por dessecação e cinzas totais de *P. pellucida* estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Determinação de perda por dessecação e cinzas totais segundo a Farmacopéia Brasileira IV ed. e método termogravimétrico

Amostra	Perda por Dessecação (%)		Cinzas Totais (%)	
	Convencional	Termogravimetria	Convencional	Termogravimetria
SMG	8,91±0,070	6,39±0,480	20,25±1,554	45,02±4,204
CSA	7,35±0,332	5,62±0,265	38,66±5,382	46,13±1,394

SMG: amostra coletada em São Miguel do Guamá; CSA: amostra coletada no Cabo de Santo Agostinho

Os resultados para a perda por dessecação e cinzas totais para as amostras SMG e CSA (Tabela 1) estão confirmados na curva termogravimétrica (Figura 1).

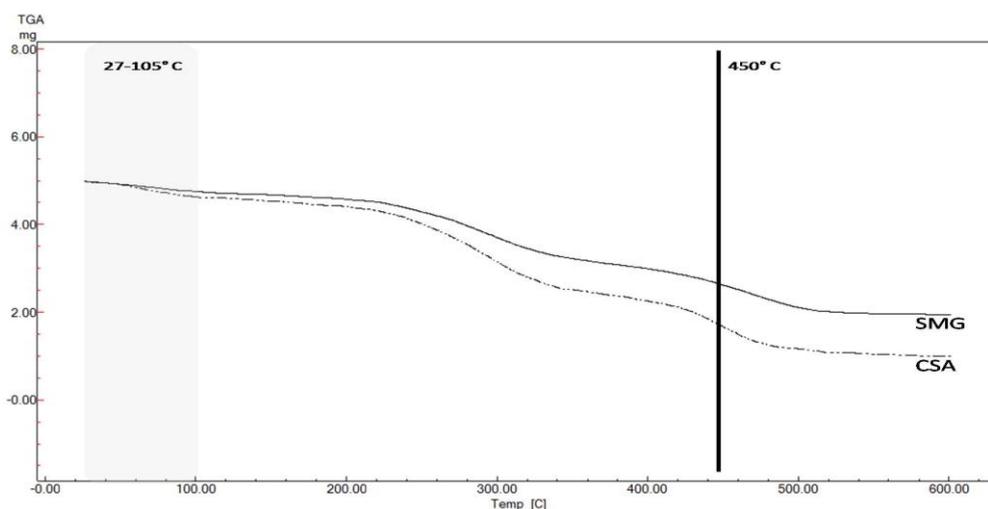


Figura 1. Curvas termogravimétricas das amostras SMG e CSA, destacando os eventos analisados (perda por dessecação e teor de cinzas)

A perda por dessecação visa determinar a quantidade de substância(s) volátil(eis) de qualquer natureza eliminada a 105°C, podendo este resultado variar de 8 a 14% (Farmacopéia Brasileira, 1988). Esta determinação é importante para o controle microbiológico, pois, um excesso de água na droga vegetal favorece o crescimento de fungos e bactérias, podendo também levar à hidrólise de seus constituintes (Sharapin, 2000).

A determinação de cinzas totais destina-se a estabelecer a quantidade de substâncias residuais não-voláteis. As cinzas totais incluem as derivadas de tecido vegetal (cinzas fisiológicas) e de materiais estranhos especificamente areia e terra aderente à superfície da droga (cinzas não-fisiológicas) (Farmacopéia Brasileira, 1988). Teor de cinzas totais

é o valor que determina o teor de sílica, principalmente areia e terra silícea presente na droga (Sharapin, 2000).

O valor aceitável no teor de cinzas totais de *P. pellucida* ainda não foi estabelecido em nenhuma monografia.

A diferença nos valores obtidos das cinzas podem estar relacionadas à presença da raiz no material coletado e à diferente composição do solo em cada local de coleta. A amostra SMG foi coletada em uma área ribeirinha, já a amostra CSA em um sítio com solo de provável origem vulcânica.

As diferenças encontradas nos resultados entre as amostras analisadas nos ensaios realizados seguindo as recomendações farmacopéicas foram também percebidas utilizando a termogravimetria, porém ampliando ainda mais tais discrepâncias entre as amostras SMG e CSA. Pode-se observar na figura 1, nos dois eventos analisados, diferenças entre SMG e CSA.

Estas diferenças podem estar relacionadas à quantidade e uniformidade da amostra analisada e à sensibilidade da técnica empregada, exigindo uma interpretação criteriosa dos valores gerados.

Devido ao aquecimento e resfriamento rápido, o método termogravimétrico apresenta menor tempo de medidas. Além disso, este método requer menor consumo de amostras, obtém simultaneamente o teor de umidade e cinzas e possibilita a visualização do seu perfil termoanalítico (Araújo *et al.*, 2006).

4. CONCLUSÃO

Este trabalho estimula a ampliação dos estudos, objetivando a detecção e análise dos voláteis libertados empregando-se técnicas simultâneas acopladas.

A caracterização de materiais de origem vegetal possui diversos interferentes como já discutido anteriormente, exigindo o emprego de diversas técnicas, muitas vezes complementares com intuito de obter informações das amostras analisadas. Tal fato é ratificado nos diferentes resultados obtidos, utilizando técnicas diversas para avaliação dos parâmetros de perda por dessecação e teor de cinzas.

Apesar do custo mais elevado de uma análise termogravimétrica, quando comparado a um método convencional, o método termogravimétrico apresenta maior eficácia e apreciável potencial na obtenção de parâmetros tecnológicos e controle de qualidade como comprovado estatisticamente nos resultados apresentados (Araújo *et al.*, 2006; Hojo *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos contribuem para o ajuste de valores previamente definidos, resultando em derivados vegetais de maior uniformidade, importante na produção de medicamentos seguros e eficazes.

5. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A.A.S.; MERCURI, L.P.; SEIXAS, S.R.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R.. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 42, nº 2, 2006, p. 269-277.

ARRIGONI-BLANK, M.F.; DMITRIEVA, E.G.; FRANZOTTI, E.M.; ANTONIOLLI, A.R.; ANDRADE, M.R.; MARCHIORO, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 91, 2004, p. 215–218.

BOJO, A.C.; ALBANO-GARCIA, E.; POCSÍDIO, G.N. The antibacterial activity of *Peperomia pellucida* (L.) H.B.K. (Piperaceae). **Ásia Life Sciences** 3, 1994. p. 35-44.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. IV ed. Parte I. São Paulo: Atheneu, 1988. p.V2.14. – V2.14.4; V2.17.-V2.17.3.

GUIMARÃES, E.F. Notas em Piperaceae II. Considerações sobre o gênero *Ottonia* Sprengel no Brasil. **Bol. Mus. Bot. Kuhlmann** 7(3): 61-84, 1984.

HOJO, O.; ERNESTO, V.A.R.T.; RIBEIRO, C.A.; FISCARELLI, P.; FERTONANI, F.L. Comparação metodológica entre mufla convencional e automática para análise de umidade e cinzas em bagaço de cana. ENQUALAB-2008 – Congresso da Qualidade em Metrologia. Rede Metrológica do Estado de São Paulo – REMESP. 09 a 12 de junho de 2008, São Paulo.

KHAN, A.; RAHMAN, M.; ISLAM S. Antipyretic Activity of *Peperomia pellucida* Leaves in Rabbit. **Turk J Biol**. 32 (2008) 37-41.

KLANCNIK, G.; MEDVED, J.; MRVAR, P. Differential thermal analysis (DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) as a method of material investigation. *RMZ – Materials and Geoenvironment*, vol. 57, No. 1, pp. 127–142, 2010.

MARTINS, J.E.C. **Plantas medicinais de uso na Amazônia**. 2ª ed. Belém, Cultural CEJUP, 1989, p. 36.

PERRY, L.M. **Medicinal plants of east and southeast Asia: attributed properties and uses**. Cambridge, Massachusetts, and London: The MIT Press, 1980.

PIMENTEL, A.A.M.P. **Cultivo de plantas medicinais na Amazônia. Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP)**. Serviço de Documentação e Informação. Belém, 1994, p. 51-52.

RODRIGUES, A.C.S.; NEVES, J.; CRIDDLE, D.N.; SANTOS, C.F.; LEAL-CARDOSO, J.H.; MONTE, F.J.Q.; COELHO-DE-SOUZA, A.N. Efeito do Benzil-eugenol e Benzil-isoeugenol em íleo de rato. **XIV Reunião Anual de Federação da Sociedade de Biologia Experimental (Fesbe)**. CD-Rom. Caxambu-MG, 1989, p 0-0.

ROIG Y MESA, J.T. **Dicionario Botânico de nombre vulgares Cubanos**. La Habana, Ed. Científico-tecnica, vol. 1, 1988, (A-L), 599 p.; vol. 2 (Li-Z), 1142 p.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Santafé de Bogotá: Cytel, 2000. p 145-157.

SILVA, E.C.; DE PAOLA, M.V.R.V.; MATOS, J.R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 43, n. 3, jul./set., 2007, p. 347-356.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. 2009. p. 32-65.

VAN DEN BERG, M.E. PIPERACEAE. In: **Van Den Berg, M.E. Plantas Mediciniais na Amazônia – contribuição ao seu conhecimento sistemático.** Belém, PR/MCT/CNPq, editora Supercores, 1993, p. 55-66.

VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia: Manual de Plantas Mediciniais (A Farmácia de Deus).** 2ª ed., São Paulo, Agronômica Ceres, 1992, 347 p.

Capítulo V

7. SAZONALIDADE E PROCESSO DE EXTRAÇÃO

7.1. Influência da Sazonalidade e do Processo de Extração na Concentração de Flavonóide em *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

Artigo submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia

7.1. Influência da Sazonalidade e do Processo de Extração na Concentração de Flavonóide em *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

^{1,2}Silva, R.M.F.; ¹Gomes, T.C.B.L.; ¹Peixoto, M.S.; ¹Pina, E.M.L.; ¹Silva, K.E.R.; ²Freitas, M.C.C.; ²Pamplona, S.G.S.R.; ²Silva, M.N.; ²Arruda, M.S.P.; ^{1,*}Rolim Neto, P.J.

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará.

RESUMO

Na obtenção de fitoterápicos, a padronização das matérias primas vegetais é assegurada pela qualidade das drogas vegetais, pelas condições de extração, seguidas da determinação do teor de um ou mais componentes ou de compostos mais representativos de sua composição, os quais são ajustados a valores previamente definidos, resultando em derivados vegetais de maior uniformidade, importante na produção de medicamentos seguros e eficazes. Este trabalho teve como objetivo analisar o teor do marcador de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) em três épocas de coleta, a fim de avaliar a sazonalidade, e em diferentes processos de extração (maceração e percolação), com diferentes concentrações do solvente. A maior incidência de chuvas durante um determinado período não influencia na quantidade de marcador presente na amostra. A maceração, utilizando 70% de álcool etílico, apresentou o maior valor de teor do marcador utilizado, a 3',4',7-tri-O-metoxiflavona.

Palavras-chave: *Peperomia pellucida*, sazonalidade, processo de extração.

1. INTRODUÇÃO

A obtenção de fitoterápicos padronizados depende da qualidade e uniformidade das matérias primas vegetais. Em relação às drogas vegetais, a padronização está sujeita ao adequado controle das condições de plantio, de secagem e de manuseio posterior. Para os extratos, responsáveis por grande parte do mercado de matérias primas vegetais, no Brasil e no mundo, a padronização é assegurada pela qualidade das drogas vegetais, pelas condições de extração, seguidas da determinação do teor de um ou mais componentes ou de compostos mais representativos de sua composição, os quais são

ajustados a valores previamente definidos, resultando em derivados vegetais de maior uniformidade, importante na produção de medicamentos seguros e eficazes (Gil, 2007).

A época em que uma droga é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos, não é constante durante o ano.

São relatadas, por exemplo, para determinadas espécies, variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonóides, cumarinas, saponinas, alcalóides, taninos, graxas epicuticulares, iridóides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos (Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Corrêa Júnior *et al.*, 2008).

Este trabalho teve como objetivo analisar o teor do marcador 3',4',7-tri-O-metoxiflavona em *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) em três épocas de coleta, a fim de avaliar a sazonalidade, e em diferentes processos de extração (maceração e percolação), com diferentes concentrações do solvente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matéria prima vegetal

O material vegetal foi coletado no distrito de Icoaraci, através da Associação Ver-as-ervas[®], situada na cidade de Belém, Pará – Brasil. Uma exsicata da espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Milton Hélio Lima da Silva, do Museu Emilio Goeldi – Pará, e foi registrada com o nº MG.191457.

2.2. Avaliação da Sazonalidade

Foram realizadas coletas de *P. pellucida* em 30 de março, 31 de maio e 30 de julho de 2010, pesquisados os índices pluviométricos (precipitação) em cada época de coleta.

O teor foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência. Foi preparada uma curva de calibração, nas concentrações de 2, 10, 20, 40 e 100 ppm, utilizando como solvente a acetonitrila e como marcador 3',4',7-tri-O-metoxiflavona, que foi isolado e identificado por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (Silva, 2010).

As análises foram realizadas em triplicata, pesando-se 30 mg de cada amostra. A massa foi transferida para um tubo de ensaio, adicionados 3 mL de acetona e, em seguida, foi sonicada durante 10 min., utilizando um banho ultrassônico Branson[®] mod. 2510. Posteriormente, a solução obtida foi transferida para frascos de vidro, com o

auxílio de pipeta *Pasteur* e um pedaço de algodão utilizado como filtro. Esta solução foi denominada como primeiro volume da extração. À massa retida no tubo de ensaio, foram adicionados mais 3 mL de acetona e transferida ao banho ultrassônico para sonicação durante 10 min. Após o término da sonicação, a solução foi pipetada, filtrada, e adicionada ao primeiro volume da extração. Homogeneizou-se. A solução obtida foi transferida para uma capela a fim de que todo o solvente fosse evaporado. Após a secagem, a massa proveniente da extração foi tratada por extração em fase sólida (SPE), para reter os interferentes, principalmente clorofila. Solubilizou-se a massa em 500 µL de acetonitrila, com o auxílio do banho ultrassônico por 1 min. Foram adicionados 500 µL de água ultra-pura e a solução foi sonicada por mais 1 min. Em seguida, a solução foi transferida para um cartucho SPE Strata Phenomenex[®] C18E 100 mg/mL, previamente condicionado com 1 mL de acetonitrila e 1 mL de água ultra-pura. A solução coletada nesta extração (V1) foi desprezada, ficando o analito retido no cartucho. A este cartucho, passou-se 0,5 mL de uma solução acetonitrila:água (1:1), e a solução coletada (V2) foi separada em um frasco de vidro. Em seguida, passou-se por este cartucho mais 2 mL de uma solução acetonitrila:água (7:3). A solução coletada (V3) foi adicionada à obtida anteriormente (V2), totalizando um volume de 2,5 mL, e transferida para a capela para evaporar o solvente. A massa residual foi ressuspensa em 200 µL de acetonitrila, filtrada utilizando um filtro de seringa de nylon de 13 mm e 0,45 µm e analisada por cromatografia a líquido de alta eficiência, utilizando um método isocrático com 54% de acetonitrila.

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu[®], composto por duas bombas, modelo LC-10AD, detector com único sinal de absorvância na região do ultravioleta, operando com comprimento de onda em 270 e 400 nm modelo SPD-10AV, degaseificador de membrana, modelo DGU-14A, injetor de amostras Rheodyne 7752i, com alça de amostragem de 20 µL, interface de comunicação Shimadzu[®], modelo CBM-10A acoplado a microcomputador Pentium II com software de integração Class LC-10A.

Os parâmetros cromatográficos utilizados foram coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm, 110Å), pré-coluna Phenomenex[®] C18 (4,0 x 3,0 mm, 5 µm), fase móvel acetonitrila:água (54:46), fluxo de 1 mL/min., volume de injeção 20 µL e comprimento de onda 342 nm.

2.3. Avaliação do Processo de Extração

2.3.1. Processamento da Amostra

Após a coleta, o material vegetal fresco (planta inteira) foi lavado com água e aspergido com álcool etílico a 70%. Em seguida, o material foi seco à temperatura ambiente, durante 2 dias. *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) foi colocada em estufa de ar circulante, durante sete dias, a temperatura entre 42 e 45°C (Oliveira *et al.*, 1991). Após a retirada do material vegetal da estufa, este foi triturado em moinho de facas, obtendo-se pó seco.

2.3.2. Obtenção da tintura de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

Foram preparadas tinturas de *P. pellucida* utilizando como métodos de extração a maceração e a percolação, à temperatura ambiente (27°C).

Para a maceração, foram preparadas três tinturas na proporção 1:10 (material vegetal/solvente), apenas modificando a concentração do álcool etílico (50, 70 e 90%). Em um reator de aço inoxidável, a droga vegetal ficou em contato com o solvente por 7 dias (Santos, 2000; Simões *et al.*, 2007).

Para a percolação, foi preparada uma tintura na proporção 1:10 (material vegetal/álcool etílico a 70%). Em um percolador, a droga vegetal ficou em contato com o solvente por 7 dias.

O teor foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando os mesmos parâmetros cromatográficos descritos acima para a avaliação da sazonalidade. As análises foram realizadas em triplicata, pesando-se 20 mg de cada amostra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da Sazonalidade

As amostras foram coletadas em meses pré-definidos em virtude de, nos meses março e maio, ocorrer uma maior frequência de *P. pellucida* no distrito de Icoaraci, devido a uma maior incidência de chuvas na região e, no mês de julho, torna-se mais difícil a coleta deste material, em virtude do índice pluviométrico diminuir.

Os cromatogramas obtidos com uma das replicatas das amostras coletadas e da curva de calibração (na concentração de 40 ppm) estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3.

A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona, utilizada como marcador, apresenta um tempo de retenção de aproximadamente 15 min.

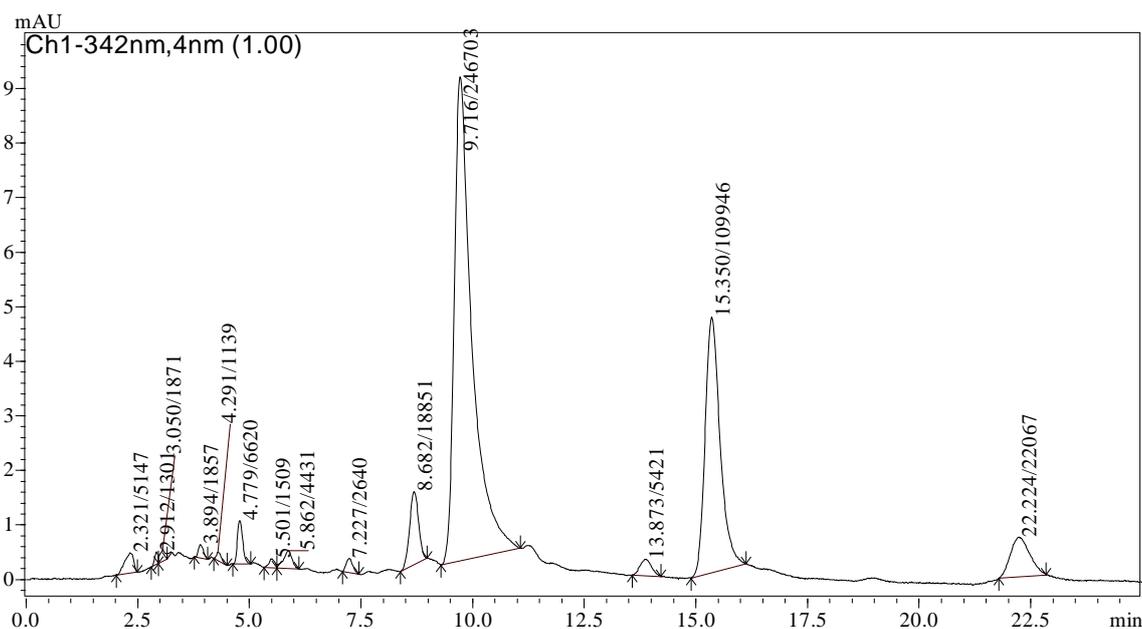


Figura 1. Cromatograma para a amostra de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) coletada no distrito de Icoaraci, em 30 de março de 2010. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresentou um tempo de retenção em 15,35 min.

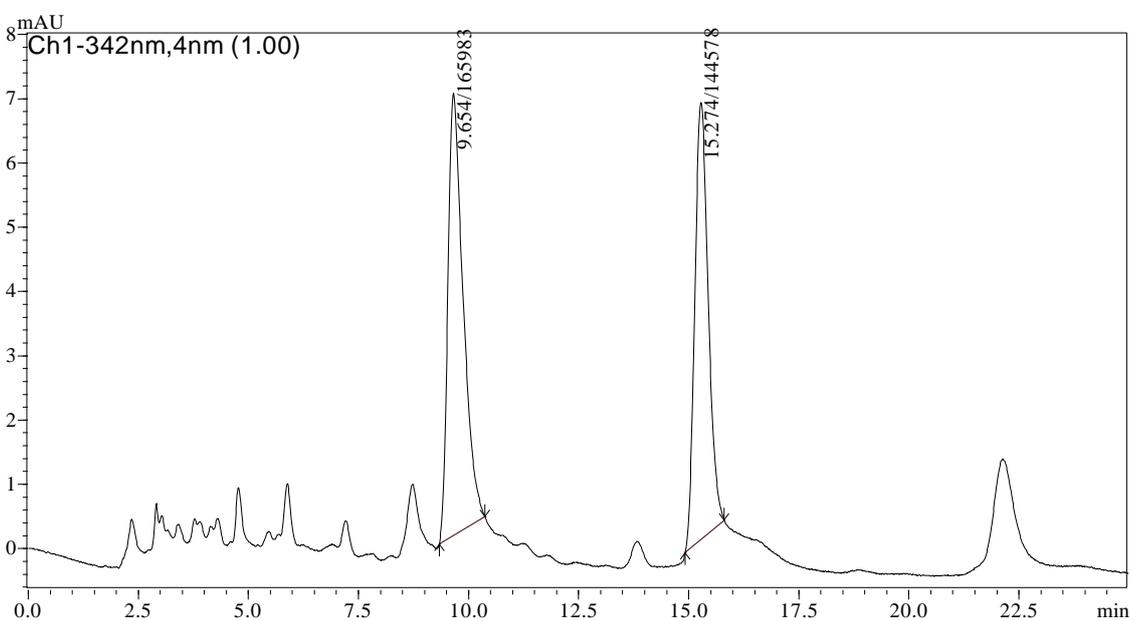


Figura 2. Cromatograma para a amostra de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) coletada no distrito de Icoaraci, em 31 de maio de 2010. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresentou um tempo de retenção em 15,27 min.

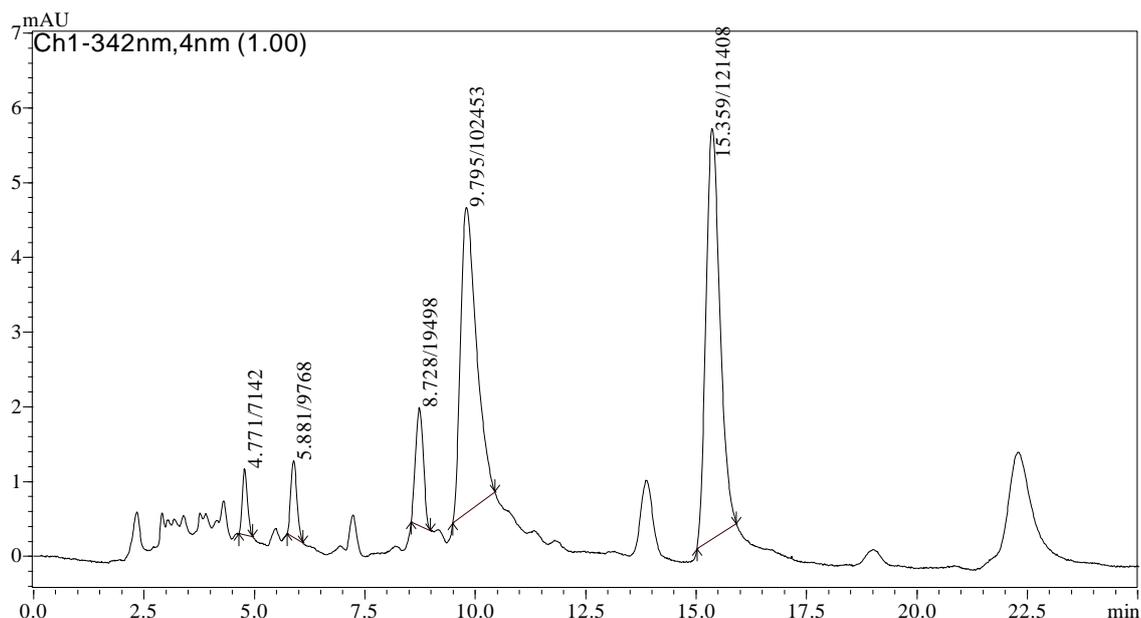


Figura 3. Cromatograma para a amostra de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) coletada no distrito de Icoaraci, em 30 de julho de 2010. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresentou um tempo de retenção em 15,36 min.

A tabela 01 apresenta os valores obtidos do teor de 3',4',7-tri-O-metoxiflavona e os correlaciona com os valores da precipitação de chuvas obtidos no distrito de Icoaraci, situado na cidade de Belém, nos respectivos meses de coleta. Os valores obtidos não apresentam diferenças significativas. A maior incidência de chuvas durante um determinado período não influencia na quantidade de marcador presente nas amostras.

Tabela 01. Valores do teor de 3',4',7-tri-O-metoxiflavona e dos índices pluviométricos (precipitação) em cada mês de coleta

Mês de coleta	Valores do teor (mg) de 3',4',7-tri-O-metoxiflavona em cada 100 g da amostra	Média de Precipitação (mm ³) ^a
Março	1,63 ± 0,081	9,54
Mai	1,88 ± 0,063	Valores indisponíveis
Julho	1,71 ± 0,097	4,37

^aOs valores foram fornecidos pelo Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos (CPTEC) e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) (CPTEC; INPE, 2010).

3.2. Avaliação do processo de extração

Os cromatogramas obtidos com uma das replicatas das amostras estão apresentados nas Figuras 4, 5, 6 e 7.

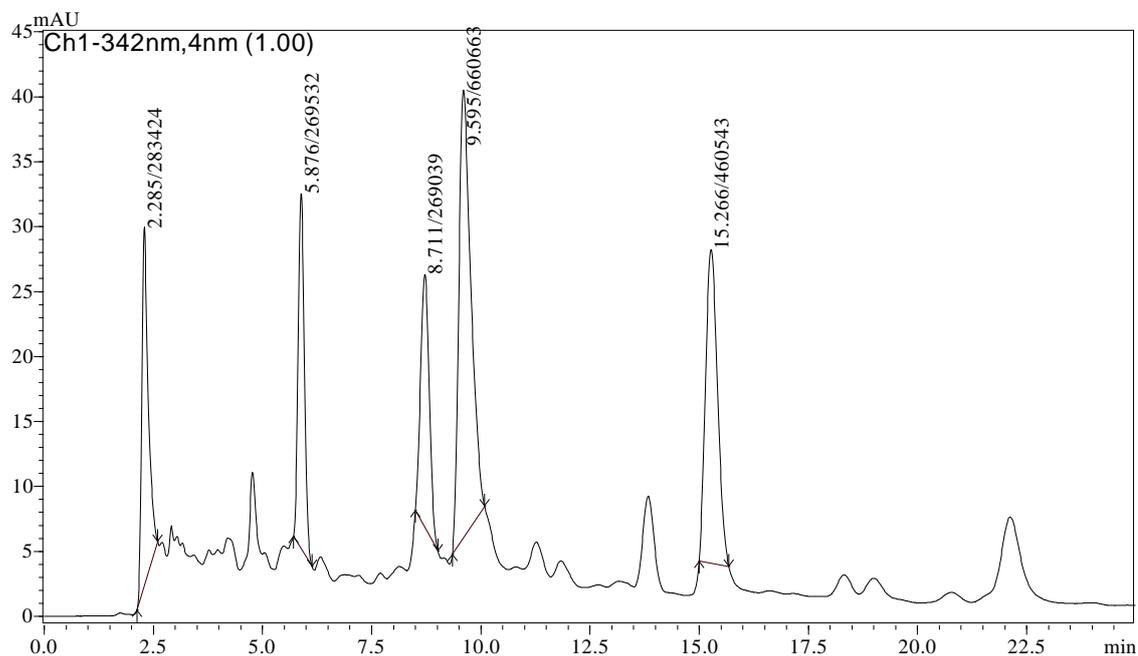


Figura 4. Cromatograma para o extrato de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) obtido por maceração, com a concentração de 50% de álcool etílico. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresenta um tempo de retenção em 15,27 min.

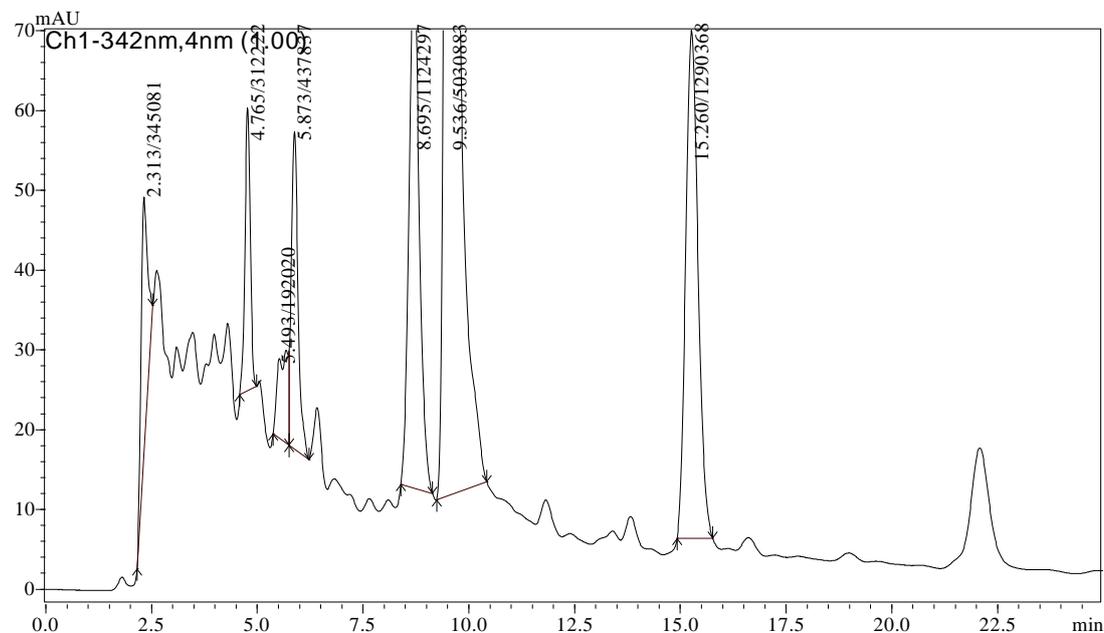


Figura 5. Cromatograma para o extrato de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) obtido por maceração, com a concentração de 70% de álcool etílico. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresenta um tempo de retenção em 15,26 min.

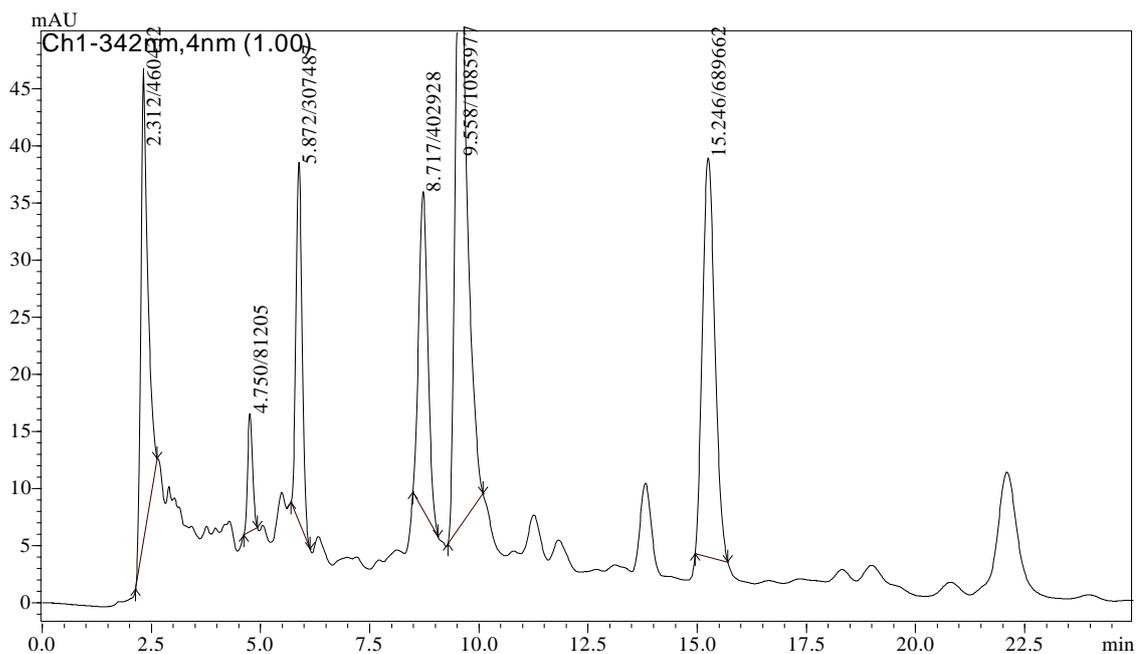


Figura 6. Cromatograma para o extrato de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) obtido por maceração, com a concentração de 90% de álcool etílico. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresenta um tempo de retenção em 15,25 min.

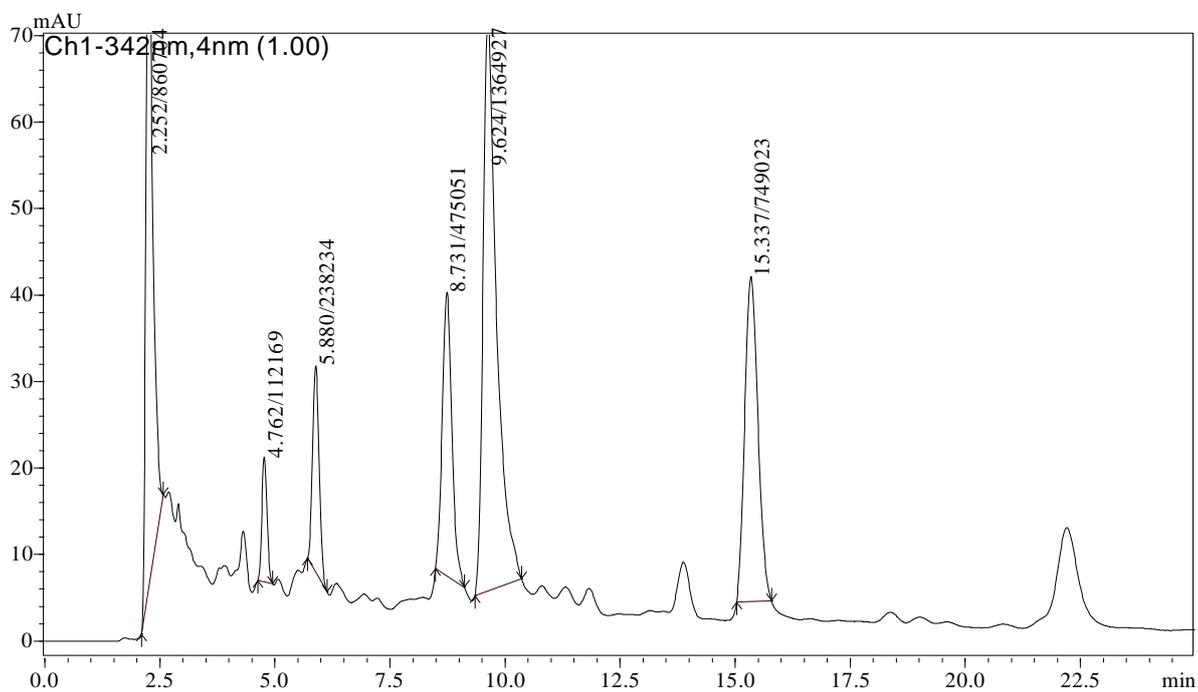


Figura 7. Cromatograma para o extrato de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) obtido por percolação, com a concentração de 70% de álcool etílico. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresenta um tempo de retenção em 15,34 min.

Os valores obtidos para o teor de 3',4',7-tri-O-metoxiflavona em cada 100 g da amostra na maceração, com diferentes concentrações do solvente, estão descritos na tabela 02. Uma comparação entre os valores obtidos do marcador na maceração e na percolação, utilizando 70% de álcool etílico, está descrita na tabela 03. Os melhores resultados foram obtidos com a maceração a 70%.

Tabela 02. Valores do teor de 3',4',7-tri-O-metoxiflavona nas diferentes concentrações de álcool etílico na maceração de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

Concentração (%) do álcool etílico na maceração	Valores do teor (mg) de 3',4',7-tri-O-metoxiflavona em cada 100 g da amostra
50	7,26 ± 0,211
70	17,66 ± 0,726
90	10,26 ± 0,440

Tabela 03. Valores do teor de 3',4',7-tri-O-metoxiflavona na maceração e na percolação de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.), utilizando 70% de álcool etílico

Processo de extração	Valores do teor (mg) de 3',4',7-tri-O-metoxiflavona em cada 100 g da amostra
Maceração	17,66 ± 0,726
Percolação	11,58 ± 0,548

A maceração e a percolação utilizadas foram realizadas utilizando a mesma proporção material vegetal/solvente (1:10), o mesmo tempo de processamento, sem agitação ocasional, apenas diferenciando no tipo de equipamento utilizado na extração. Na maceração, foi utilizado um reator e, na percolação, um percolador, ambos de aço inoxidável.

A técnica proposta e utilizada na percolação é bastante eficiente, utilizada a nível mundial, simples e versátil, permitindo a fácil utilização dessa técnica em processamentos em pequena, média e grande escala industrial.

A geometria do equipamento foi crucial na escolha do melhor processo de extração, obtendo-se melhores resultados quando se utilizou o reator, como pode ser observado na tabela 03. Houve diferença significativa quando se variou o equipamento.

4. CONCLUSÃO

A avaliação da sazonalidade indicou que não há influência dos valores de precipitação das chuvas sobre o teor do marcador utilizado para *P. pellucida*, a 3',4',7-tri-O-metoxiflavona, nas amostras coletadas nos meses março, maio e julho.

A técnica proposta para a percolação apresenta inúmeras vantagens no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos porém, na extração de *P. pellucida* com álcool etílico a 70%, a maceração se mostrou mais eficiente que a percolação.

Na variação da concentração do solvente da maceração (50, 70 e 90%), o marcador apresentou um maior valor de teor na concentração de 70% de álcool etílico.

5. REFERÊNCIAS

CORRÊA JÚNIOR C; MING LC; CORTEZ DAG. Sazonalidade na produção de raízes e teor de β -ecdisona em acessos de fáfia. *Horticultura Brasileira*.26: 393-397, 2008.

CPTEC; INPE, 2010. Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos (CPTEC) e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). Disponível em: <http://bancodedados.cptec.inpe.br/climatologia/Controller> . Acesso em: 25/11/10.

GIL, E.S. Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos. 2ª edição. São Paulo, Pharmabooks, 2007, p. 320.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, vol. 30, no. 2, 374-381, 2007.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1991. p.16-18.

SANTOS, E.V.M. Extração de matérias-primas vegetais. In: Sharapin, N. Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos. Santafé de Bogotá: Cytel. 2000. p. 27-60.

SILVA, R.M.M. Flavonóides de *Peperomia pellucida*. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará. Belém. 2010. 48p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia. Da planta ao medicamento. 6ª edição. UFRGS. Porto Alegre. p. 314-319. 2007.

Capítulo VI

8. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

8.1. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*

Artigo aceito pela Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

8.1. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*

Lorena Paula Mercês Mendes¹; Karen Marinho Maciel¹; Andrex Augusto Silva da Veiga¹; Antonia Benedita Rodrigues Vieira²; Lúcia Carla Vasconcelos Mendonça¹; Rosali Maria Ferreira da Silva^{1,3}; Pedro José Rolim Neto³, Wagner Luiz Ramos Barbosa¹, José Maria dos Santos Vieira¹

¹Faculdade de Farmácia/Instituto de Ciências da Saúde/Universidade Federal do Pará;

²Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal do Pará; ³Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

As plantas utilizadas na medicina tradicional estão sendo cada vez mais estudadas por serem possíveis fontes de substâncias com atividades antimicrobianas. Dentre elas, destacando-se *Peperomia pellucida* (erva-de-jabutí) e *Portulaca pilosa* (amor-crescido), utilizadas comumente na Amazônia. *P. pellucida* é utilizada, popularmente, em casos de hemorragia, como curativo para feridas, dores abdominais, abscessos, acne, furúnculos, cólicas, problemas renais, hipertensão e colesterol, enquanto *P. pilosa* é utilizada como hepato-protetor, antidiarréico, diurético, para queimaduras, erisipelas e ferimentos. Neste trabalho, foram realizadas a abordagem fitoquímica e a atividade antimicrobiana *in vitro* desses dois materiais vegetais. A prospecção fitoquímica revelou a presença de açúcares redutores, fenóis e taninos, esteróides e triterpenóides, glicosídeos cardíacos e carotenóides no extrato etanólico seco (EES) de *P. pilosa*, e a presença de proteínas e aminoácidos, fenóis e taninos, flavonóides, esteróides e triterpenóides, azulenos, carotenóides, depsídeos e depsidonas no EES de *P. pellucida*. Para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos brutos, foi empregado o método de disco difusão em ágar, nas concentrações de 500; 250; 125 e 62,5 µg/mL. Os extratos testados que apresentaram atividade antimicrobiana na avaliação preliminar foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo. O extrato de *P. pellucida* possui atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*, e o de *P. pilosa* contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, *Peperomia pellucida*, *Portulaca pilosa*, erva de jabuti, amor-crescido.

1. INTRODUÇÃO

O surgimento e a disseminação de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado têm sido relatados há décadas, incentivando a busca de novas fontes de substâncias com atividades antimicrobianas, como as plantas utilizadas na medicina tradicional.

O conhecimento e a pesquisa dos benefícios das espécies vegetais foram realizados por várias civilizações em todos os continentes. Embora de modo empírico ou intuitivo, baseando-se em descobertas ao acaso, as sociedades antigas utilizavam as plantas para fins terapêuticos e, mais tarde, elas serviram de base para a Botânica, Química e Medicina. Observa-se, atualmente, uma tendência de retorno à fitoterapia, atitude recomendada pela OMS – Organização Mundial de Saúde. O referido órgão apoiou o estudo e o uso de plantas medicinais regionais como forma de baixar os custos dos programas de saúde pública, principalmente nos países subdesenvolvidos ou ainda em desenvolvimento, como o Brasil (Martins, 1995)

Os trabalhos de pesquisa com espécies vegetais com propriedades terapêuticas originam medicamentos em menor tempo, de custo inferior e, conseqüentemente, mais acessíveis à população, que, em sua maioria, encontra-se sem quaisquer condições financeiras de arcar com os custos elevados da aquisição de medicamentos que possam ser utilizados como parte de atendimento das necessidades primárias de saúde (Furlam, 1998).

No Brasil, encontram-se cerca de 20% das 250 mil espécies medicinais catalogadas pela *United Nations Educational Scientific and Cultural Organization* (UNESCO), facilitando o aproveitamento do potencial curativo dos vegetais para o tratamento de doenças no país (Drumond *et al*, 2004). O ecossistema amazônico, detentor de uma das regiões de maior biodiversidade do planeta, apresenta inúmeras espécies vegetais com propriedades medicinais relatadas e outras em que seus efeitos terapêuticos são desconhecidos. Dentre as utilizadas popularmente na medicina popular, destacam-se a erva-de-jabuti (*Peperomia pellucida* (L.) H.B.K.), também conhecida como língua-de-sapo, e o amor-crescido (*Portulaca pilosa* L.) (Pimentel, 1994).

A família Piperaceae, descrita por Paul Dietrich Giseke, compreende, aproximadamente, três mil espécies distribuídas em oito gêneros, dentre os quais se destacam os gêneros *Piper*, *Peperomia* e *Pothomorphe*. Geralmente, as plantas desses gêneros são arbustos, lianas, epífitas, ervas e pequenas árvores. A família é muito importante como fonte de substâncias, pois apresenta atividade farmacológica. Pela ampla ocorrência e abundância no Brasil, várias espécies dessa família foram referidas como medicinais (Mabberley, 1997). *P. pellucida* é utilizada popularmente em casos de hemorragia, como curativo para feridas, dores abdominais, abscessos, acne, furúnculos, cólicas, problemas renais, hipertensão e colesterol. (Arrigoni-Blank *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2009).

O composto isolado de *P. pellucida*, com atividade antibacteriana, apresenta cristais incolores na forma de agulhas e fórmula molecular $C_{42}N_{23}OH$ (Bojo *et al.*, 1994). Estudos demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *P. pellucida* apresentou atividades diurética (Santos *et al.*, 2007), hipotensora (Siqueira, 1997), antibacteriana, analgésica e antiedematogênica (Aziba *et al.*, 2001; Kham & Omiloso, 2002; Arrigoni-Blank *et al.*, 2004).

Portulaca pilosa L. é uma planta herbácea com folhas carnosas e flores vermelhas em cachos terminais, sendo comum nas Américas. Como uso popular, a infusão das folhas, em descanso noturno, é indicada como hepato-protetor, antidiarréico e diurético, ao passo que as folhas contusas, em emplastro, são empregadas para queimaduras, erisipelas e ferimentos. Possui a ação inibidora sobre a tirosinase (Baurin *et al.*, 2002) e provoca aumento da excreção de K^+ na urina de ratos sem aumento da diurese (Rocha *et al.*, 1994). Segundo Di Stasi & Hurama-Lima (2002), a planta possui potencialidade de ser importante antibiótico de largo espectro.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* realizando, concomitantemente, a abordagem fitoquímica dos extratos etanólicos de *P. pellucida* e de *P. pilosa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS:

Coleta e Identificação:

Os materiais vegetais *P. pellucida* e *P. pilosa* foram coletados no município de Icoaraci, na cidade de Belém (PA). A amostra de *P. pellucida* foi identificada pelo Prof. Dr. Milton Hélio Lima da Silva e foi registrada, com o nº MG.181632, no Herbário João Murçapires do Museu Emilio Goeldi (PA). Já a amostra de *P. pilosa* foi identificada

pelo Prof. Dr. Luiz Carlos Batista Lobato e registrada, com o nº MG. 161921, nesse mesmo herbário.

Preparação dos extratos:

Para a obtenção do extrato etanólico seco (EES) de *P. pilosa*, as folhas frescas, após a limpeza, foram deixadas seis dias secando à temperatura ambiente e levadas, para finalização da secagem, em estufa de fluxo de ar contínuo (45-48°C). Foi obtida uma massa de 71,07 g de folhas secas. Estas foram, então, trituradas e submersas em solvente etanol a 70%, seguindo-se a extração por maceração. A amostra foi filtrada em funil de Büchner (à vácuo) e armazenada em frasco de vidro.

O filtrado resultante foi concentrado à baixa pressão a 50°C, em evaporador rotativo, até a evaporação total do solvente. O concentrado foi seco em estufa por 24h a 50°C e, posteriormente, pesado, obtendo-se a massa de 7,015 g do material vegetal.

Para a obtenção do EES de *P. pellucida*, a planta inteira (folhas, caules e raízes), após a limpeza, foram deixadas quatro dias secando à temperatura ambiente e, após esse tempo, levadas, para finalização da secagem, em estufa de fluxo de ar contínuo (45-48°C), obtendo-se a massa de 13,64 g. Foi seguido o mesmo procedimento utilizado na extração da *P. pilosa* até o fim da primeira extração. Os macerados obtidos foram, então, filtrados em papel-filtro. Fez-se a evaporação do solvente do filtrado e a secagem do concentrado na estufa, obtendo-se a massa de 4,02g.

Abordagem Fitoquímica dos materiais vegetais:

Foi realizada a prospecção fitoquímica dos materiais através de técnicas utilizadas pelo Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará (BARBOSA, 2004).

Micro-organismos:

Foram testadas cepas padrão (*American Type Collection Culture* - ATCC) da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), das Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) e do

fungo leveduriforme *Candida albicans* (ATCC 10231), recomendadas para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (CLSI, 2003a).

Preparação do inóculo:

Os inóculos foram preparados tomando-se de três a quatro colônias da cepa isolada em ágar Muller-Hinton e diluídas em solução salina a 0,85% até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac-Farland (CLSI, 2003a).

Avaliação Preliminar da atividade antimicrobiana:

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos secos, foi empregado o método de disco difusão em ágar. Cada suspensão de micro-organismo foi semeada (em duplicata), com auxílio de um *swab* descartável, em toda a superfície de meio ágar Muller Hinton. Em seguida, foram adicionados discos de papel-filtro (Whatman – tipo 3), de 6 mm de diâmetro, impregnados com 10 μL de cada extrato das plantas nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$, dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). Após incubação das placas a 35°C por 24h, foi realizada a leitura dos resultados medindo-se o halo formado ao redor dos discos contendo os extratos. Foi considerado, como resultado final de cada extrato, a média das duas medidas e, como suscetível halo, uma dimensão igual ou superior a 8 mm de diâmetro (Parekh & Chanda, 2007; Santos *et al.*, 2007).

Determinação da concentração inibitória mínima:

Os extratos testados que apresentaram atividade antimicrobiana na avaliação preliminar foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo (Lima *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007).

Os testes foram realizados em caldo Muller Hinton contidos em placa “Sensitive microtiter” de 96 poços, esterilizada e utilizada em análises de ELISA. Uma alíquota de 10 μL de cada extrato nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ foi depositada em cada poço da placa contendo caldo Muller Hinton e suspensão de micro-organismos para um volume final de 200 μL em cada poço. Foi realizado controle de extrato, no caldo Muller Hinton, das suspensões de micro-organismos.

As placas foram cobertas com parafilme e incubadas a 35°C por 24 horas. A leitura foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 650 nm (Lima *et*

al., 2006). Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano.

3. RESULTADOS

A abordagem fitoquímica revelou a presença de açúcares redutores, fenóis e taninos, esteróides e triterpenóides, glicosídeos e carotenóides no EES de *P. pilosa*. A presença de proteínas e aminoácidos, fenóis e taninos, flavonóides, esteróides e triterpenóides, azulenos, carotenóides, depsídeos e depsidonas no EES de *P. pellucida* também foi verificada.

Na verificação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de *P. pilosa*, observou-se atividade antibacteriana apenas contra *P. aeruginosa*. Já o EES de *P. pellucida* apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

O extrato de *P. pilosa* frente a *P. aeruginosa* apresentou halo de 25 mm de diâmetro na concentração de 500 µg/mL e 20 mm na concentração de 250 µg/mL, que foram testadas no método de difusão em ágar. O extrato de *P. pellucida* apresentou, frente a *P. aeruginosa*, o halo de 9 mm e, frente a *S. aureus*, o de 11 mm, ambos na concentração de 62,5 µg/mL.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo mostrou que o extrato etanólico bruto de *P. pellucida* frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa* teve uma CIM de 62,5 µg/mL. *P. pilosa* apresentou CIM igual a 250µg/mL frente a *P. aeruginosa*.

4. DISCUSSÃO

Segundo alguns autores, a presença de taninos e flavonóides pode conferir atividade antimicrobiana a um extrato (Scalbert, 1991; Harbone, 2000; Veluri *et al* 2004; Bylka *et al*, 2004). Dessa maneira, a presença desses compostos no extrato de *P. pellucida*, bem como de fenóis e taninos em *P. pilosa*, leva à expectativa de uma atividade antimicrobiana nesses extratos.

Não existe um consenso sobre o nível aceitável para extratos de materiais vegetais quando comparados com antibióticos padrões. Alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos conhecidos desde que se trabalhe com

uma fração já determinada (Aligianis *et al.*, 2001). Entretanto, como trabalhamos com extrato bruto dos materiais vegetais, seguimos o critério sugerido por Holetz *et al.* (2002) (Tabela 1). A maior concentração de extrato empregado no presente estudo foi de 500 µg/mL, uma vez que, em concentrações mais altas, as soluções dos extratos não permitiram uma absorção total nos discos, além da intensa coloração, que prejudicava a leitura dos resultados. Para Holetz *et al.* (2002), extratos vegetais que apresentam atividade antimicrobiana em concentrações acima de 500 µg/mL possuem fraca atividade, sendo de difícil aproveitamento farmacêutico no tratamento de infecções bacterianas ou fúngicas.

Tabela 1. Critérios para aceitação da atividade antimicrobiana de extratos brutos de plantas segundo Holetz *et al.*, 2002.

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO BRUTO	RESULTADO
Abaixo de 100 µg/mL	Boa atividade antimicrobiana
Entre 100 e 500 µg/mL	Moderada atividade antimicrobiana
Entre 500 e 1000 µg/mL	Fraca atividade antimicrobiana
Acima de 1000 µg/mL	Inativo

Considerando os critérios sugeridos por Holetz *et al.* (2002), os melhores resultados foram contra *P. aeruginosa*, tanto para *P. pilosa* quanto para *P. pellucida*. Esses resultados revelaram que esses extratos possuem entre moderada e boa atividade antimicrobiana. Portanto, têm potencial para serem usados na produção de fitoterápicos contra infecções causadas por micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos.

A determinação da CIM do extrato frente ao micro-organismo foi realizada pela técnica de microdiluição em placas, método mais recomendável para essa determinação.

Os resultados obtidos demonstram as propriedades antibacterianas dessas plantas medicinais, revelando a potencialidade de seus extratos etanólicos.

Com base nos resultados, confirma-se o conhecimento empírico das comunidades tradicionais do Estado do Pará em relação às propriedades medicinais

antibacterianas desses vegetais. Esse fato contribui, também, de forma a ampliar as informações científicas dessas plantas constituintes do bioma amazônico com características terapêuticas, confirmando-se seu potencial farmacológico.

Devido à presença de metabólitos que podem apresentar atividade antimicrobiana, é recomendável a continuação do estudo fitoquímico e microbiológico. É importante também isolar e identificar as substâncias responsáveis pela atividade e determinar as frações ativas.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa concedida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem.** 2001; 49: 4168-4170.

ARRIGONI-BLANK, M.; DMITRIEVA E.G.; FRANZOTTI E.M.; ANTONIOLLI, A.R.; ANDRADE M.R.; MARCHIORO, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). **J Ethnopharmacol.** 2004; 91: 215-8.

AZIBA, P. I. ADEDEJI, A.; EKOR, M.; ADEYEMI, O. Analgesic activity of *Peperomia pellucida* aerial parts in mice. *Fitoterapia.* 2001; 72 (1): 57-8.

BARBOSA, W.L.R. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais.** 2ª. edição revisada. Revista Científica da UFPA [Internet] 2004 [citado 2010 mai 10]. 4. Disponível em: <http://www.ufpa.br/rcientifica>.

BARBOSA, W.L.R; PINTO, L.N.; SILVA, W.B; FERNANDES, J.G.S; SOLER, O. **Etnofarmácia – Fitoterapia Popular e Ciência Farmacêutica**, 1ª edição, Belém: NUMA; 2009. 114p.

BAURIN, N.; ARNOULT, E.; SCIOR, T; DO, Q. T.; BERNARD, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. **J Ethnopharmacol.** 2002; 82(2-3):155-8.

BOJO, A. C; GARCIA, E.A; POCSIDIO, G.N. **Asia life Sciences**, 1994; 3(1):35-4.

BYLKA, W.; MATLAWSKA, I.; PILEWSKI, N.A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **J. Am. Nutraceutical Assoc.** 2004; 7:24-31.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. CLSI. 2003a.

DI STASI, L.C., HURAMA-LIMA, C.A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**, 2ª ed. São Paulo: Editora UNESP; 2002.

DRUMOND, M.R.S. ; CASTRO, R.D. ; ALMEIDA, R.V.D. ; PEREIRA, M.S.V. ; PADILHA, W.W.N. Estudo comparativo *in vitro* da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, 2004; 4(1):33-38.

FURLAM, M.R.. **Cultivo de Plantas Medicinais**. Coleção Agroindústria, 15ª. ed. Cuiabá: SEBRAE; 1998. 137p.

HARBONE, J.B. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**. 2000; 55:481-504.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2002; 97(7):1027-1031.

KHAM, M.R. & OMILOSO, AD. **Fitoterapia**, 2002; 73:251-254.

LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **J Ethnopharmacol.** 2006; 105:137-14.

MABBERLEY, D.J. **The plant book. A portable dictionary of the vascular plants.** 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1997. 858p.

MARTINS, E.R. **Plantas Mediciniais.** Viçosa: Edição Imprensa Universitária – UFV; 1995.

PAREKH, J.; CHANDA, S.V. **In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants.** Turk J. Biol. 2007; 31:53-58.

PIMENTEL, A.A.M.P. **Cultivo de Plantas Mediciniais da Amazônia.** Belém: Faculdade de Ciências Agrárias do Pará; 1994. p.51-52m.

ROCHA, M.J.; FULGENCIO, S.F.; RABETTI, A.C.; NICOLAU, M. POLI A.; SIMÕES, C.M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Effects of hydroalcoholic extracts of *Portulaca pilosa* and *Achyrocline satureioides* on urinary sodium and potassium excretion. **J Ethnopharmacol.** 1994; 43(3):179-83.

SANTOS, S.C.; FERREIRA, F.S.; ROSSI-ALVA, J.C.; FERNANDEZ, L.G. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** 2007; 17(2):215-219.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry,** 1991; 30:3875-3883.

SIQUEIRA, J.M. **Anais da XII reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia experimental (FESBE).** Caxambú; 1997. 278p.

VELURI, R.; WEIR, T.L.; BAIS, H.P.; STERMITZ, F.R.; VIVANCO, J.M. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. **J. Agric. Food Chem.** 2004; 52:1077-1082.

Capítulo VII

9. ATIVIDADE CARDIOVASCULAR E TOXICIDADE AGUDA

9.1. Atividade Cardiovascular e Toxicidade Aguda de Extratos de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

Artigo a ser submetido à Fitoterapia

9.1. Atividade Cardiovascular e Toxicidade Aguda de Extratos de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

Silva, R.M.F.^{1,4}; Gomes, T.C.B.L.¹; Albuquerque, J.G.F.²; Ribeiro, T.P.²; Medeiros, I.A.²; Lopes, S.S.³; Wanderley, A.G.³; Rolim Neto, P.J.^{1,*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco;

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba;

³Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco;

⁴Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade induzida pelos extratos etanólico e aquoso liofilizados de *Peperomia pellucida* (L.) H.B.K. sobre o sistema cardiovascular de ratos, analisando *in vivo* as atividades tensionais e cardíacas induzidas pelos extratos citados através da medida direta da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados e, *in vitro*, o efeito dos extratos etanólico e aquoso de *P. pellucida* em artéria mesentérica superior isolada de rato através da medida de tensão isométrica. Além disso, foi analisada a toxicidade aguda do extrato etanólico seco por aspersão. Este estudo demonstrou que os extratos etanólico e aquoso de *P. pellucida* apresentaram atividade vasorrelaxante sobre anéis mesentéricos e também efeitos sobre o sistema cardiovasculares quando administrados na sua maior concentração (75 mg/Kg) sobre animais normotensos. O extrato etanólico seco de *P. pellucida*, por via oral, não apresenta toxicidade aguda em ratos Wistar.

Palavras-chave: *Peperomia pellucida*, atividade cardiovascular, toxicidade aguda

1. INTRODUÇÃO

Peperomia pellucida (L.) H.B.K. é uma Piperaceae de ocorrência na América do Sul, Central (Antilhas) e América do Norte. No Brasil, ocorre desde o Amazonas até o Paraná, com representantes em locais úmidos, principalmente em paredes e muito freqüente em jardins. No Brasil, em Santa Catarina, é conhecida como comida-de-jabuti ou erva-de-jabuti, erva-de-vidro (Guimarães, 1984; Vieira, 1992; Martins, 1989; Rodrigues *et al.*, 1989); outros nomes populares são atribuídos a esta planta, como “corazon de hombre” e “yerba de la planta” em Cuba, “herbe a la curesse” nas Antilhas Francesas (Roig y Mesa, 1988).

É popularmente usada na Amazônia para combater a tosse ou a dor de garganta, arritmias cardíacas, é ainda indicada como antipruriginosa e diurética, utilizada sob a forma de chá ou infusão preparados com as raízes e toda a planta. Não raramente, é consumida como excelente salada (Van den Berg, 1993; Pimentel, 1994; May, 1982; Perry, 1980).

Segundo Hermes *et al.* (1981), a *P. pellucida* apresenta potente ação anti-hipertensiva em 100% dos casos humanos estudados e 79% em cães. A administração inicial foi do extrato total da erva. Foram obtidos efeitos imediatos, com duração de mais de 10 minutos, chegando em alguns casos até a 30 min, com uma queda tensional de 12 para 7 cm/Hg.

O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade induzida pelos extratos etanólico e aquoso liofilizados de *Peperomia pellucida* (L.) H.B.K. sobre o sistema cardiovascular de ratos, analisando *in vivo* as atividades tensionais e cardíacas induzidas pelos extratos citados através da medida direta da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados e, *in vitro*, o efeito dos extratos etanólico e aquoso de *P. pellucida* em artéria mesentérica superior isolada de rato através da medida de tensão isométrica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Atividade Cardiovascular

2.1.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 250-350 gramas, com idade entre 10 a 14 semanas e mantidos em caixas de plástico sob ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, tendo livre acesso à alimentação (ração

Purina[®] para roedores) e água, conforme recomendações internacionais (Wolfensohn; Lloyd, 2003), estes foram provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) após aprovação do comitê de ética e pesquisa animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica.

2.1.2. Drogas

Foram testados os extratos etanólico e aquoso liofilizados de *P. pellucida* representados respectivamente pela siglas EEPP e EAPP.

O material botânico *P. pellucida* foi coletado no município de Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco. A amostra foi identificada pela Dr^a Rita de Cássia Pereira, do Instituto Agrônomo de Pernambuco – PE, e foi registrada com o nº 84031.

Para o extrato aquoso, foi preparada uma infusão, conforme uso popular, adicionando 0,5 L de água quente sobre 3 galhos da planta inteira.

Para o extrato etanólico, após a coleta, o material vegetal fresco (toda a planta, incluindo folhas, caules e raízes) foi lavado com água e álcool etílico a 70% e, em seguida, seco à temperatura ambiente, durante 2 dias. *P. pellucida* foi colocada em uma estufa de ar circulante, durante sete dias, a uma temperatura entre 42 e 45°C. Após a retirada do material vegetal da estufa, este foi triturado em moinho de facas e tamis de 30 mesh, obtendo-se pó seco. O método escolhido para a obtenção da solução extrativa de *P. pellucida* foi a maceração (Santos, 2000). Foi preparada uma tintura na proporção 1:10 (material vegetal/álcool a 70%).

Os extratos aquoso e etanólico foram secos utilizando um liofilizador Terroni[®] – LC3000, com uma temperatura de -6°C e vácuo de -50 mmHg. Para o extrato etanólico foi utilizado, antes da liofilização, um evaporador rotativo, para a retirada do solvente orgânico.

Durante a realização dos experimentos farmacológicos, foram utilizadas as seguintes drogas: tiopental sódico (Cristália[®]), sal sódico de heparina (Roche[®]), nitroprussiato de sódio (Sigma[®]), cloridrato de L (-) fenilefrina (Sigma[®]) e cloridrato de acetilcolina (Sigma[®]).

2.1.3. Preparo das soluções dos extratos

Os extratos foram inicialmente pesados em balança analítica e, em seguida, foram triturados em cápsula de porcelana com ajuda de um pistilo e solubilizados em água destilada para obtenção de uma solução com aspecto homogêneo. A partir desta solução-mãe, foram obtidas outras soluções de concentrações menores por meio de diluições em água destilada. Nos experimentos realizados *in vivo* as soluções foram diluídas em solução salina a 0,9%.

2.1.4. Catéteres Vasculares

Na confecção dos catéteres, utilizados nos protocolos *in vivo*, foram utilizados tubos de polietileno PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 - 0,61 mm, respectivamente) de 4 cm para o cateter arterial e 2,5 cm para o cateter venoso, soldados por aquecimento a tubos de polietileno PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 - 0,96 mm, respectivamente) de 22 cm. Antes da canulação, os catéteres foram preenchidos com solução salina (0,9%) + 500 UI de heparina e a extremidade PE-50 de cada cateter foi obstruída com pino de metal.

2.1.5. Soluções Nutritivas

Nos protocolos *in vitro* foram utilizadas soluções nutritivas (pH=7,4) aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantidas a 37°C.

Para a preparação das soluções nutritivas foram utilizados os sais da Sigma e da Aldrich[®] com a seguinte composição. Solução de Tyrode (mM): NaCl 158,3; KCl 4,0; CaCl₂.2H₂O 2,0; MgCl₂.6H₂O 1,05; C₆H₁₂O₆ 5,6; NaHCO₃ 10,0; NaH₂PO₄.H₂O 0,42. Na preparação da solução despolarizantes de Tyrode, o KCl foi elevado para 60 mM e o NaCl foi isosmoticamente alterado para 62,5 mM.

2.1.6. Ensaio *in vivo*

2.1.6.1. Medida direta de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados

Os ensaios *in vivo* foram realizados para obtenção de medidas de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em animais não anestesiados e com livre movimentação após administração de doses randômicas de maneira intravenosa da droga em estudo.

Inicialmente, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/Kg, i.p.) e submetidos a um procedimento cirúrgico para implantação de catéteres de polietileno (PE), segmentos de PE-10 fixados a um segmento de PE-50, foram implantados na aorta abdominal e na veia cava caudal, via artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente. Após a fixação, os catéteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (*scapulae*).

A PA e a FC foram medidas 24 h após o procedimento cirúrgico pela conexão do caráter arterial a um transdutor de pressão (Statham® P23 ID) acoplado a um amplificador (Modelo TBM-4M, WPI, Sarasota®), conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital (CIO-DAS16/JR, Computer Boards®) contendo o programa CVMS (WPI, Sarasota®). A frequência usada para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calcula a pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), e o intervalo de pulso, referido como FC. O cateter venoso foi implantado para a administração de drogas.

2.1.6.2. Protocolo experimental utilizado nos estudos *in vivo*

Para a obtenção de uma curva dose-resposta, os animais foram mantidos em aclimatação por um período de, no mínimo, 30 minutos, para estabilização dos parâmetros cardiovasculares e, em seguida, foi administrado nitroprussiato de sódio (NPS) (10 µg/Kg, i.v.), um clássico doador de óxido nítrico, para verificar a eficácia da implantação do cateter venoso. Após 15 min., doses crescentes (10, 25, 50 e 75 mg/Kg) dos extratos etanólico e aquoso de *P. pellucida*, foram administrados, em experimentos separados, de forma randômica com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores basais. Os valores de PAM e FC foram computados antes e após a administração da droga, e suas variações foram expressas como percentagem.

2.1.7. Ensaio Farmacológicos *in vitro*

2.1.7.1. Preparações com artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio funcional

Para realização dos estudos farmacológicos *in vitro* foi utilizado o modelo de banho de órgão isolado com artéria mesentérica superior isolada de rato para obtenção de medidas de tensão isométrica.

Para a realização dos experimentos, inicialmente os animais foram eutanasiados e, em seguida, foi realizada uma incisão em seu abdome para identificação e retirada do segmento de artéria mesentérica superior, posteriormente, foi retirado todo o tecido conectivo e adiposo e então seccionada em anéis com comprimento de 1 – 2 mm. Os anéis foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode, a 37°C e gaseificada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ (carbogênio) onde foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição (Miobath-4, WPI, Sarasota[®]) para o registro de tensões isométricas.

Antes da realização dos protocolos, as preparações foram mantidas a uma tensão de 0,75g por um período de estabilização de 1 hora, sendo a solução nutritiva trocada a cada 15 minutos para retirada de qualquer metabólito interferente.

A presença do endotélio funcional foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de acetilcolina (ACh, 10 µM). Foram considerados com endotélio, os anéis com relaxamento superior a 90% sobre pré-contração com fenilefrina (FEN, 10 µM). Já para realização dos experimentos na ausência do endotélio funcional, os anéis foram submetidos a um leve atrito mecânico entre as paredes internas do vaso e uma haste de metal, e seus relaxamentos induzidos por ACh (10 µM) em anéis pré-contraídos com FEN (10 µM) deveriam ser inferiores a 10%. Anéis com relaxamentos entre 10 e 90% tiveram seu endotélio removido e confirmado como acima descrito.

2.1.7.2. Protocolos experimentais realizados com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

2.1.7.2.1. Efeito dos extratos etanólico e aquoso de *P. pellucida* em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com fenilefrina (10 µM)

Inicialmente, foi avaliada sua atividade vasorelaxante frente contrações induzidas por FEN. O experimento teve início após um período de estabilização de 50 minutos das preparações. Concentrações crescentes do extrato de *P. pellucida*, tanto para o etanólico quanto para o aquoso, foram adicionados cumulativamente aos anéis pré-contraídos com FEN (10 µM). O possível efeito vasorelaxante induzido pelos diferentes extratos foi avaliado em anéis com endotélio funcional intacto e anéis com endotélio mecanicamente removido. Em ambas as preparações, a concentração de FEN (10 µM) foi ajustada para obter contrações de magnitude semelhante.

2.1.7.2.3. Avaliação da atividade dos extratos etanólico e aquoso de *P. pellucida* em anéis mesentéricos pré-contraídos com solução de elevado K⁺

Este protocolo foi desenvolvido para avaliar os efeitos induzidos, tanto pelo extrato etanólico quanto pelo extrato aquoso de *P. pellucida*, em anéis mesentéricos pré-contraídos com um agente contraturante diferente, cujo mecanismo de ação para gerar aumento de tensão difere do induzido por fenilefrina. Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, foi adicionado os diferentes extratos da droga cumulativamente, em experimentos separados, aos anéis pré-contraídos com solução de Tyrode KCl 60 mM. O aumento na concentração de potássio de 4 mM para 60 mM foi obtido junto com a redução na concentração milimolar de sódio afim de manter a equimolaridade. A percentagem de relaxamento induzida pela droga em estudo foi calculada pela comparação da resposta antes e após a adição dos extratos.

2.1.8. Toxicidade Aguda

A toxicidade aguda (DL₅₀) do extrato seco de *P. pellucida* foi avaliado usando o procedimento *up and down* adaptado (OECD, 2001). Para isso, dois grupos de ratos machos (n=5/grupo) foram privados de ração por 12 h e, em seguida, receberam por via oral o extrato seco de *P. pellucida* (5,0 g/kg) e água (controle). Após a administração, os ratos foram observados individualmente e continuamente durante os primeiros 30 minutos e, a cada hora, durante as primeiras 6 h e, diariamente, por um período de até 14 dias. O número de animais sobreviventes foi registrado diariamente. Foi observado diariamente o consumo de ração, água, alterações gerais de comportamento e sinais clínicos de toxicidade (Malone, 1977).

2.1.9. Análise Estatística

Os valores foram apresentados como média ± erro padrão da média (e.p.m). Foram utilizados, quando necessário, os testes *t* de Student e análise de variância “one way” (ANOVA) seguida de Bonferroni, onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Para estudar os efeitos vasorelaxante induzidos pelos extratos de *P. pellucida*, o parâmetro farmacológico E_{máx} (resposta máxima induzida pela substância) foi analisado. O programa que foi utilizado para análise dos dados foi o Graph Pad Prism[®] 4.02.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade cardiovascular

3.1.1. Experimentos *in vitro*

3.1.1.1. Efeito vasorelaxante induzido por extrato aquoso de *P. pellucida* em anéis mesentéricos estimulados com fenilefrina

O extrato aquoso de *P. pellucida* (EAPP) (1, 3, 10, 30, 100, 300, 500 $\mu\text{g/mL}$) induziu vasorelaxamento dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraído com fenilefrina 10 μM . A curva concentração-resposta para EAPP em anéis com endotélio funcional apresentou alterações nos valores de $E_{\text{max}} = 20,2 \pm 6,4$ (n=5) quando comparados aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN $E_{\text{max}} = 23,7 \pm 3,4$ (n=5) (Figura 1).

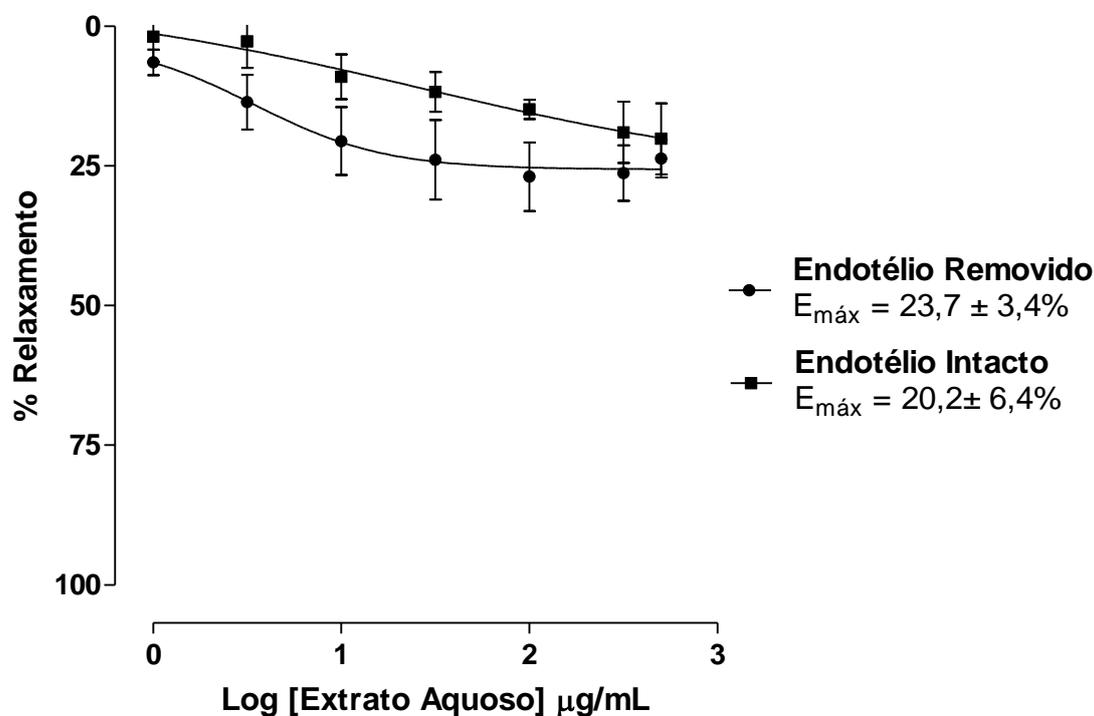


Figura 1: Efeito vasorelaxante induzido por extrato aquoso de *P. pellucida* ($\mu\text{g/mL}$). Curva concentração-resposta em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem endotélio e pré-contraído com Fenilefrina 10 μM .

3.1.1.2. Efeito vasorelaxante induzido por extrato etanólico de *P. pellucida* em anéis mesentéricos estimulados com fenilefrina

O extrato etanólico de *P. pellucida* (EEPP) (1, 3, 10, 30, 100, 300, 500 $\mu\text{g/mL}$) induziu vasorelaxamento dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraído com fenilefrina 10 μM . A curva concentração-resposta para EEPP em anéis com endotélio funcional, não apresentou alterações nos valores de $E_{\text{máx}} = 38 \pm 6,9$ (n=5) quando comparados aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN $E_{\text{máx}} = 20,3 \pm 13,7$ (n=6) (Figura 2).

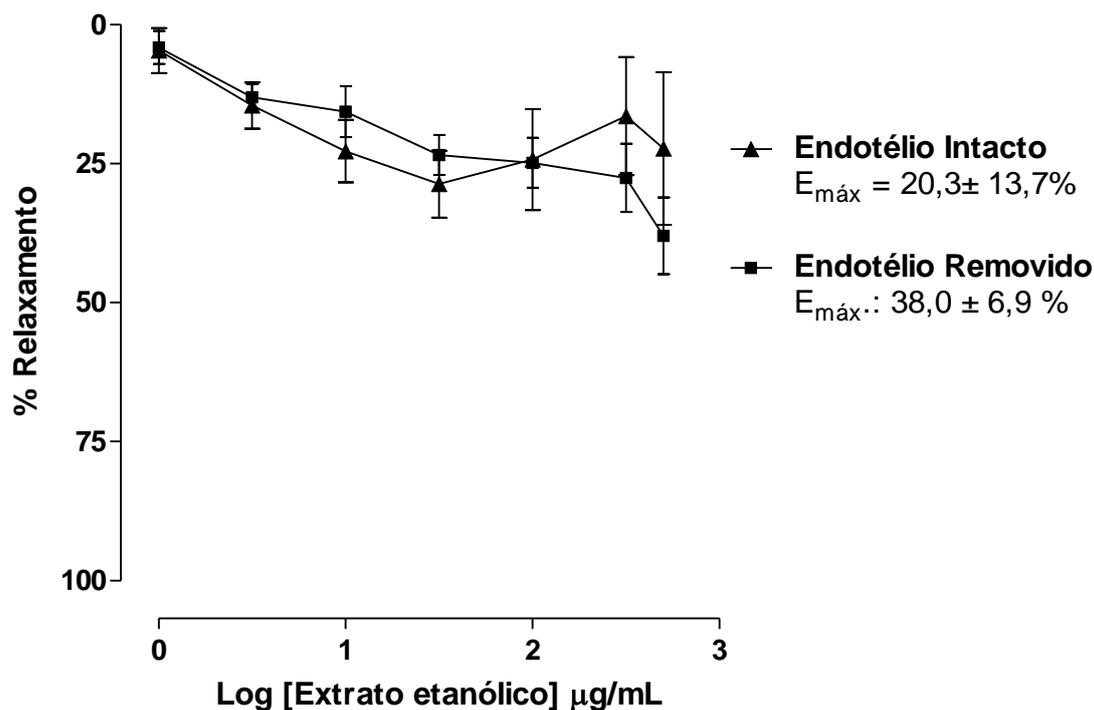


Figura 2: Efeito vasorrelaxante induzido por extrato etanólico de *P. pellucida* ($\mu\text{g/mL}$). Curva concentração-resposta em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem endotélio e pré-contraído com Fenilefrina 10 μM .

Efeito vasorelaxante induzido por extrato etanólico de *P. pellucida* em anéis mesentéricos estimulados com KCl 60mM

O extrato aquoso (EAPP) ou etanólico (EEPP) de *P. pellucida* nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300, 500 $\mu\text{g/mL}$ induziu vasorelaxamento dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraído KCl 60 mM. A curva concentração-resposta para EEPP em anéis com endotélio funcional apresentou maior valor de $E_{\text{max}} = 60,8 \pm 6,4$ (n=6) quando comparados aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com KCl 60 mM na presença do EAPP ($E_{\text{max}} = 25 \pm 6,4$) (n=6) (Figura 3).

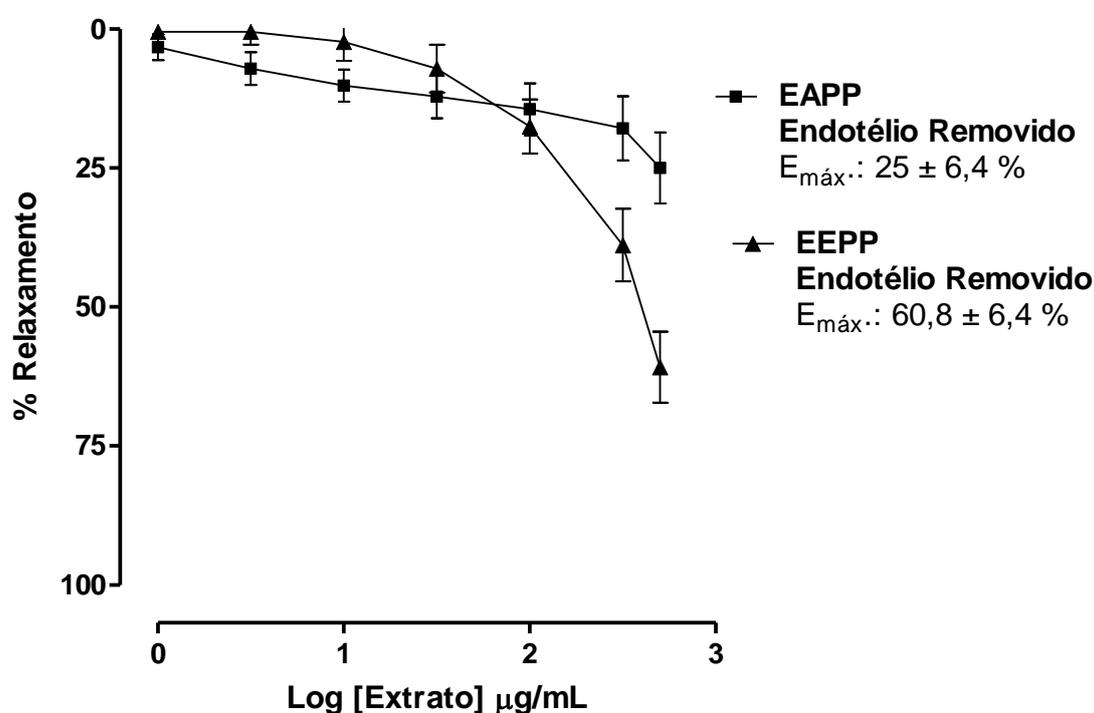


Figura 3: Efeito vasorrelaxante induzido por extrato aquoso (EAPP) ou extrato etanólico (EEPP) de *P. pellucida* ($\mu\text{g/mL}$). Curva concentração-resposta em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem endotélio e pré-contraído com KCl 60 mM.

3.1.2. Ensaios Farmacológicos *in vivo*

3.1.2.1. Efeito do extrato aquoso de *P. pellucida* (EAPP) sobre a pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em ratos normotensos não-anestesiados

Após um período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares de ratos normotensos não-anestesiados, a administração intravenosa de EAPP, nas doses de 10, 25 e 50 mg/Kg, apresentaram uma resposta pressora ($3,8 \pm 1,2$; $1,8 \pm 1,1$; $7 \pm 3,4$ mmHg, n=5) com diminuição da pressão arterial na dose de 75 mg/Kg ($-13,5 \pm 6,4$ mmHg, n=5) sem alteração da frequência cardíaca nas doses de 10 e 25 mg/Kg ($8,7 \pm 8,4$; $-6,2 \pm 11,1$ bpm, n=5), porém associado a bradicardia nas doses de 50 e 75 mg/Kg ($-61,2 \pm 87,6$; $-95,75 \pm 55,6$ bpm, n=5), conforme apresentado na figura 4.

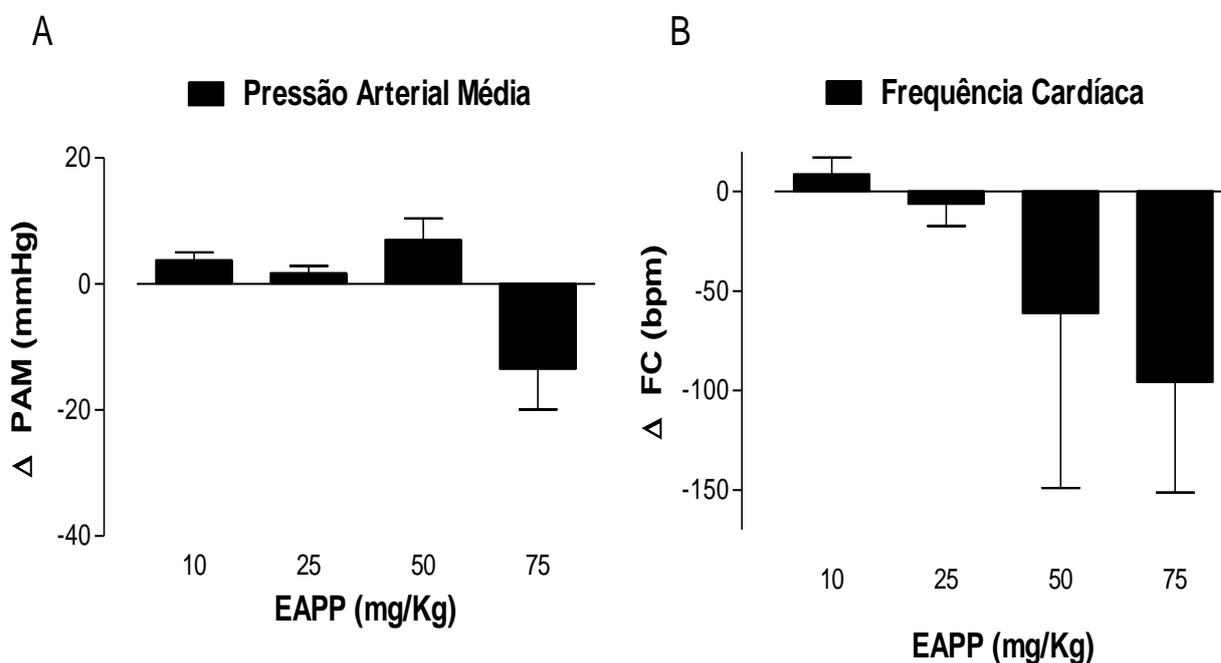


Figura 4 Efeitos do extrato aquoso de *P. pellucida* (EAPP) sobre (a) a pressão arterial média (PAM, mmHg) e (b) frequência cardíaca (FC, bpm) em ratos normotensos não-anestesiados (n=5). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m.

3.1.2.2. Efeito do o extrato etanólico de *P. pellucida* (EAPP) sobre a pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em ratos normotensos não-anestesiados

Após um período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares de ratos normotensos não-anestesiados, a administração intravenosa de EAPP, nas doses de 10, 25, 50 e 75 mg/Kg, apresentaram uma resposta pressora ($14,2 \pm 2,6$; $10,2 \pm 1,7$; $13,5 \pm 0,9$ e $35,2 \pm 8,9$ mmHg, n=4) com aumento da frequência cardíaca nas doses de 25 e 50 mg/Kg ($5,7 \pm 24,1$, $19,7 \pm 11,8$), porém associado a bradicardia nas doses de 10 e 75 mg/Kg ($-20,8 \pm 7,1$; $-160,2 \pm 55,4$; bpm, n=4) conforme apresentado na figura 5.

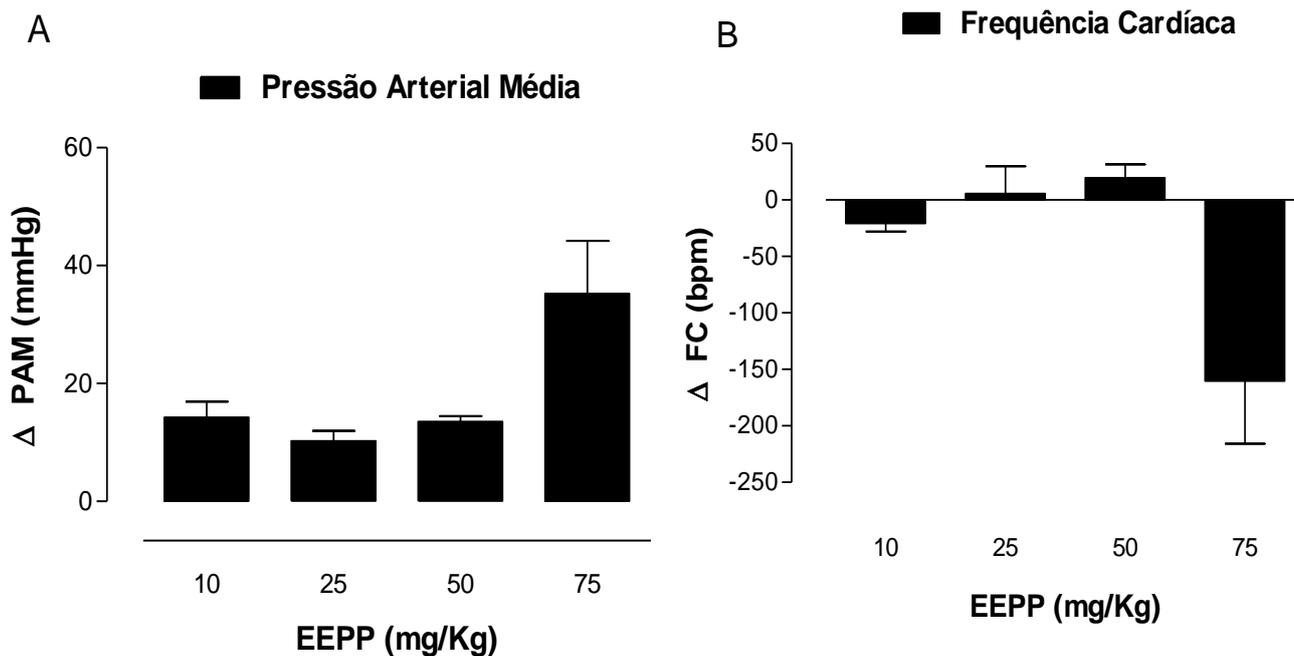


Figura 5 Efeitos do extrato etanólico de *P. pellucida* (EEPP) sobre (a) a pressão arterial média (PAM, mmHg) e (b) frequência cardíaca (FC, bpm) em ratos normotensos não-anestesiados (n=4). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m.

Este trabalho foi realizado tendo como motivação a caracterização do efeito vasorelaxante, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, e também de avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos pelos extratos etanólico e aquoso de *P. pellucida* em ratos normotensos.

Nos experimentos de reatividade vascular, foi observado efeito vasorrelaxante tanto para o extrato etanólico quanto para o extrato aquoso frente pré-contrações induzidas por FEN, este mesmo protocolo realizado em anéis após a remoção do endotélio vascular não alterou de forma significativa o vasorrelaxamento para ambas os extratos, estes resultados indicam que o endotélio vascular parece exercer pouca influência na atividade vasorrelaxante induzida pelos extratos.

Tendo em vista observar os efeitos vasorrelaxantes frente outro modelo de indução de contração vascular, utilizamos o agente despolarizante KCl (60 mM), esses experimentos foram realizados na ausência de endotélio vascular pois sua participação não foi significativamente importante para a promoção do relaxamento como demonstrado no protocolo experimental anterior.

Observamos em anéis de artéria mesentérica superior um efeito vasorrelaxante com eficácia muito superior comprovada pelos valores de $E_{máx}$ quando comparados com os resultados obtidos nos experimentos com FEN mais especificamente os efeitos relaxantes induzidos pelo extrato etanólico que foi significativamente maior do que o efeito relaxante induzido pelo extrato aquoso.

Já é bem descrito na literatura que contrações induzidas por altas concentrações de K^+ , nas células de músculo liso, são mediadas por uma despolarização de membrana e um aumento do influxo de Ca^{2+} através dos canais para cálcio voltagem dependentes (Ca_v) (Godfraind; Kaba, 1969; Somlyo; Somlyo, 1994). No entanto, a geração da contração por agonista de receptores acoplados a proteína Gq/11 (ex. FEN), em células de musculo liso, é resultado da mobilização de ambos Ca^{2+} intracelular e extracelular (Kitazawa; Masuo; Somlyo, 1991; Karaki *et al.*, 1997). Esse tônus induzido por solução despolarizante com alta concentração de K^+ é mediado inteiramente pelos canais Ca_v (Karaki *et al.*, 1997). Baseados nesses dados, a maior eficácia do extrato etanólico quando comparado com o extrato aquoso são indícios de uma maior capacidade em diminuir a concentração intracelular de Ca^{2+} possivelmente por atuar sobre os Ca_v . Os canais Ca_v desempenham papel central na regulação do tônus vascular. A hiperpolarização promove fechamento destes canais, levando à vasodilatação, já a despolarização induz a abertura dos mesmos, resultando em vasoconstrição (Jackson, 2000).

3.2. Toxicidade aguda

O extrato etanólico seco de *P. pellucida* na dose de até 5,0 g/kg administrado por via oral em ratos não produziu morte em nenhum dos animais por um período de 14 dias de observação, impossibilitando a realização do cálculo de DL_{50} . Não foi observado alterações na massa corporal dos animais (Figura 6), consumo de água (Figura 7A), consumo de ração (figura 7B) e comportamento dos animais quando comparado com o grupo controle. De forma similar não se registrou a presença de sinais clínicos de toxicidade. Dessa forma, pressupõe-se que a toxicidade aguda está acima de 5,0 g/kg, o que sugere que o extrato etanólico seco de *P. pellucida* por via oral não apresenta toxicidade aguda em ratos Wistar.

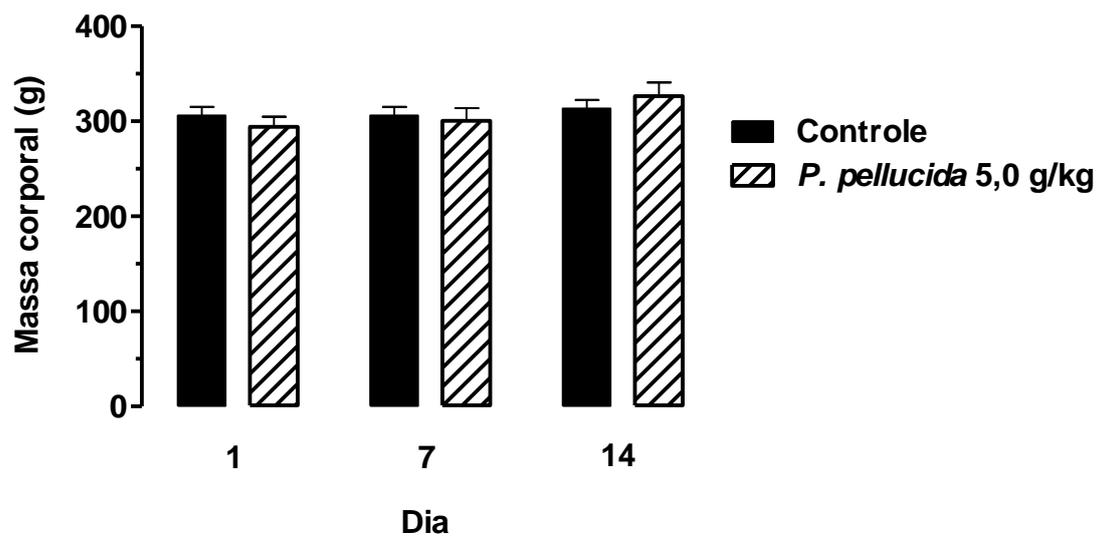


Figura 6. Massa corporal de ratos Wistar (n=5/grupo) tratados com dose única de *P. pellucida* (5,0 g/kg) e água (controle).

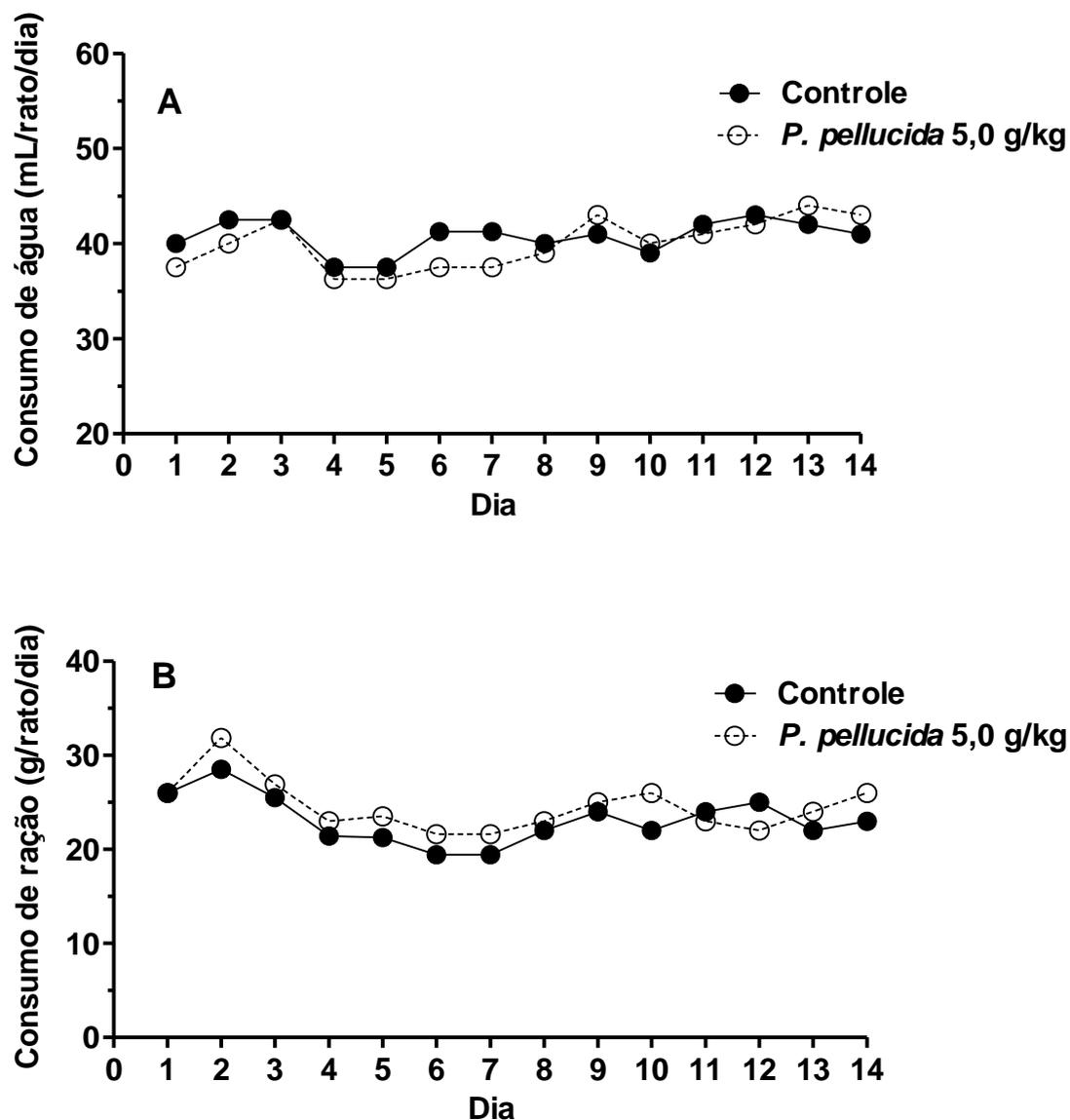


Figura 7. Consumo diário de água (A) e ração (B) de ratos Wistar (n=5/grupo) tratados com dose única de *P. pellucida* (5,0 g/kg) e água (controle)

4. CONCLUSÃO

Com base nessa relevante importância dos Ca_v na regulação do tônus vascular e pelo relaxamento apresentado pelos extratos, buscamos avaliar a sua atuação sobre o sistema cardiovascular em animais não anestesiados. Observamos para o extrato aquoso que

desencadeou queda na pressão arterial somente na sua maior dose com uma bradicardia associada, enquanto que o extrato etanólico causou aumento na pressão arterial de em todas as doses com bradicardia somente na última dose.

Este estudo demonstra que os extratos etanólico e aquoso de *P. pellucida* apresentam atividade vasorrelaxante sobre anéis mesentéricos e também efeitos sobre o sistema cardiovasculares quando administrados na sua maior concentração sobre animais normotensos.

O extrato etanólico seco de *P. pellucida*, por via oral, não apresenta toxicidade aguda em ratos Wistar.

5. REFERÊNCIAS

GUIMARÃES, E.F. Notas em Piperaceae II. Considerações sobre o gênero *Ottonia* Sprengel no Brasil. **Bol. Mus. Bot. Kuhlmann** 7(3): 61-84, 1984.

GODFRAIND, T.; KABA, A. Blockade or reversal of the contraction induced by calcium and adrenaline in depolarized arterial smooth muscle. **Br J Pharmacol**, v.36, p.549 - 560, 1969.

HERMES, A.G.; HERMES, E. G.; CAVALCANTE, F.L.M.; LUNA, M.S.; LEAL, R.A.; CUOCO, V.; LINS, A.F.A.; SORIANO, S. Ações Anti-hipertensivas da *Peperomia pellucida* (L.) em Cães e na Espécie Humana. Raízes; **Cl. Bio. Cl. Saúde**, Belém, 1981, 1(1): 47-52, jul.

JACKSON, W. F. Ion channel and vascular tone. **Hypertension**. v.35 [parte 2], p.173 - 178, 2000.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M. et. al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol. Rev.**, v.49, n.2, p.157 - 230, 1997.

KITAZAWA, T.; MASUO, M.; SOMLYO, A.P. G protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.88, n.20, p.9307 - 10, 1991.

MALONE, R. A. **Pharmacological Approach to Natural Products Screening and Evaluation**. In: Warner, H.; Wolf, P. *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutically Activity*. Springer – Verlag: Berlin, 1977.

MARTINS, J.E.C. **Plantas medicinais de uso na Amazônia**. 2ª ed. Belém, Cultural CEJUP, 1989, p. 36.

MAY, A.F. **Surinaams kruidenboek**. Vaco Press, Paramaribo, 1982, 80 p.

OECD (The Organization of Economic Co-operation Development), 2001. *The OECD Guideline for Testing of Chemical: 420 Acute Oral Toxicity*. OECD, Paris, pg. 1–14.

PERRY, L.M. **Medicinal plants of east and southeast Asia: attributed properties and uses**. Cambridge, Massachusetts, and London: The MIT Press, 1980.

PIMENTEL, A.A.M.P. **Cultivo de plantas medicinais na Amazônia**. Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP). Serviço de Documentação e Informação. Belém, 1994, p. 51-52.

RODRIGUES, A.C.S.; NEVES, J.; CRIDDLE, D.N.; SANTOS, C.F.; LEAL-CARDOSO, J.H.; MONTE, F.J.Q.; COELHO-DE-SOUZA, A.N. Efeito do Benzil-eugenol e Benzil-isoeugenol em óleo de rato. **XIV Reunião Anual de Federação da Sociedade de Biologia Experimental (Fesbe)**. CD-Rom. Caxambu-MG, 1989, p 0-0.

ROIG Y MESA, J.T. **Diccionario Botánico de nombre vulgares Cubanos. La Habana**, Ed. Científico-tecnica, vol. 1, 1988, (A-L), 599 p.; vol. 2 (Li-Z), 1142 p.

SANTOS, E.V.M. **Extração de matérias-primas vegetais**. In: Sharapin, N. *Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos*. Santafé de Bogotá: Cytel. 2000. p. 27-60.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v.372, n.6503, p. 231 - 236, 1994.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; TANAKA, H. et. al. Significant role of neuronal non-N- type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of the mesenteric. **Br J Pharmacol**, n.128, p.1602-1608, 1999.

VAN DEN BERG, M.E. **Piperaceae**. In: Van Den Berg, M.E. Plantas Mediciniais na Amazônia – contribuição ao seu conhecimento sistemático. Belém, PR/MCT/CNPq, editora Supercores, 1993, p. 55-66.

VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia: Manual de Plantas Mediciniais (A Farmácia de Deus)**. 2ª ed., São Paulo, Agronômica Ceres, 1992, 347 p.

WOLFENSOHN, S. e LLOYD, M. **Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare**. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Ltd. 2003. 427 p.

Capítulo VIII

10. CLONAGEM

10.1. Micropropagação *in vitro* de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

Artigo submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia

10.1. Micropropagação *in vitro* de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

^{1,3}Silva, R.M.F.; ¹Gomes, T.C.B.L.; ¹Rolim, L.A.; ¹Silva, K.E.R.; ²Costa, D. A.; ²Borrely, G.; ³Freitas, M.C.C.; ³Arruda, M.S.P.; ³Silva, M.N.; ^{*}¹Rolim Neto, P.J.

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco;
²Biofábrica, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste; ³Departamento de Química, Universidade Federal do Pará.

RESUMO

A micropropagação consiste da propagação vegetativa *in vitro* por meio de pequenos (ou micro) propágulos os quais geralmente são cultivados em frascos ou em biorreatores, onde os meios nutritivos e as condições ambientais do cultivo favorecem a formação e o desenvolvimento de tecidos, órgãos e plantas *in vitro*. Essa técnica apresenta diversas vantagens, como a multiplicação de grandes quantidades de plantas em espaço físico e tempo reduzidos, e a possibilidade de realizar limpeza clonal, gerando indivíduos livres de patógenos. Este trabalho teve como objetivo o estabelecimento de um protocolo para clonagem *in vitro* de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.), e a análise do teor do marcador por cromatografia a líquido de alta eficiência, nos períodos antes e após a clonagem. A micropropagação de *P. pellucida* foi possível utilizando-se gemas axilares jovens e o meio de cultura MS básico. A presença das concentrações utilizadas de benzilaminopurina (BAP) e/ou ácido giberélico (GA₃), no meio de cultura, reduz o crescimento e a produção de biomassa aérea e de raiz.

Palavras-chave: *Peperomia pellucida*, micropropagação, clonagem, cromatografia a líquido de alta eficiência.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Peperomia* compreende mais de 600 espécies. São ervas terrestres e aéreas que possuem folhas cordatas e suculentas. Algumas espécies são utilizadas na medicina popular. *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) apresenta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, com potencialidade de ser importante antibiótico de largo espectro (Khan & Omoloso, 2002).

Em algumas espécies de plantas medicinais, a produção de metabólitos secundários apresenta grande variabilidade quali-quantitativa dificultando a obtenção de uma droga padronizada. Para se atender a uma demanda constante e ininterrupta de material vegetal para produção de drogas, é importante que se tenha um cultivo sistematizado que garanta a produção em larga-escala.

A micropropagação consiste da propagação vegetativa *in vitro* por meio de pequenos (ou micro) propágulos os quais geralmente são cultivados em frascos ou em biorreatores, onde os meios nutritivos e as condições ambientais do cultivo favorecem a formação e o desenvolvimento de tecidos, órgãos e plantas *in vitro*. Essa técnica apresenta diversas vantagens, como a multiplicação de grandes quantidades de plantas em espaço físico e tempo reduzidos, e a possibilidade de realizar limpeza clonal, gerando indivíduos livres de patógenos.

O desenvolvimento *in vitro* de células e tecidos depende de diversos fatores, como o genótipo, tipo de explante, estágio de desenvolvimento e idade, estado fisiológico da planta matriz e condições ambientais externas que incluem composição do meio de cultura, luz e temperatura, entre outros (Gaj, 2004).

Este trabalho teve como objetivo o estabelecimento de um protocolo para clonagem *in vitro* de *P. pellucida*, e análise do teor do marcador por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), nos períodos antes e após a clonagem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matéria prima vegetal

Foi selecionada uma amostra de *P. pellucida* coletada em Cabo de Santo Agostinho (CSA), Pernambuco, identificada pela Dr^a Rita de Cássia Pereira, do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), e registrada com o nº 84031.

2.2. Protocolo para clonagem

Plantas oriundas da casa de vegetação (Figura 1a) foram utilizadas como fonte de explantes. Os quatro primeiros entrenós de ramos jovens foram retirados das plantas-mãe e submetidos ao processo de desinfestação.

A desinfestação foi realizada com uma lavagem dos explantes em água corrente, seguido de uma imersão sob 10 minutos de agitação em água destilada + detergente +

cloro a 0,05%. Posteriormente, os explantes foram lavados em água estéril, e em câmara de fluxo laminar, foram imersos sob agitação em solução de hipoclorito de sódio a 0,6% de cloro ativo durante 10 minutos. Após esse tempo, foram lavados 3 vezes com água destilada, cortados em pedaços de 1 cm contendo 1 gema axilar e inoculados (Figura 1b).

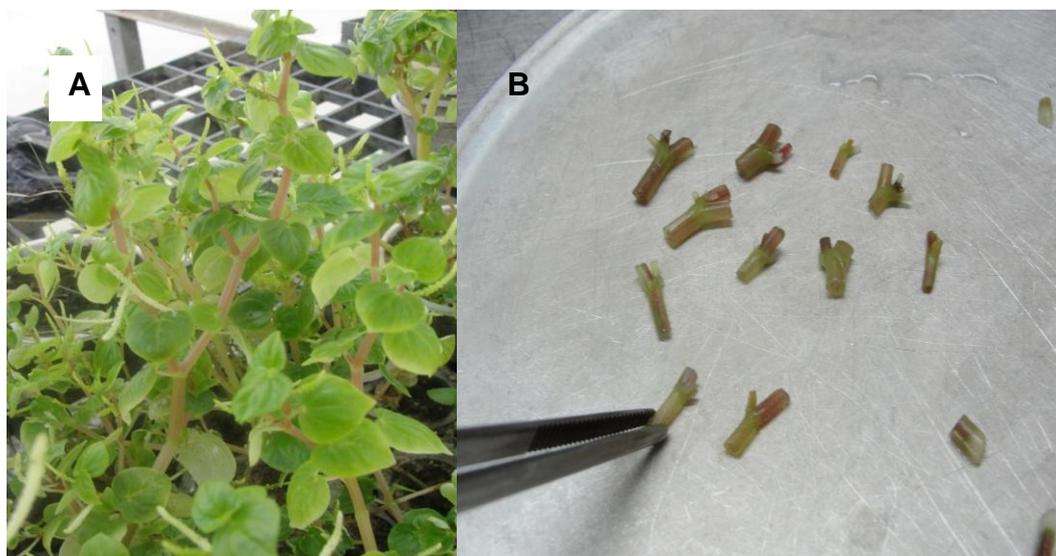


Figura 1. Plantas de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) em casa de vegetação (A). Explantes de 1 cm prontos para inoculação (B)

Os explantes foram inoculados em meio de cultura básico, composto por sais e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 6 g.L⁻¹ de ágar e 30 g.L⁻¹ de sacarose. O pH do meio foi ajustado para 5,6 antes de ser autoclavado. Os explantes permaneceram durante 70 dias sob iluminação de 30 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 26 ± 2°C. Após 70 dias de inoculação (figura 2), as plântulas formadas foram utilizadas como fonte de explantes. Foram utilizados explantes de 0,5 cm, contendo uma gema axilar e sem folha para o experimento de micropropagação que consistiu de nove tratamentos. Todos os tratamentos utilizaram o meio de cultura básico, ou combinado com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento BAP (Benzilaminopurina) e GA₃ (ácido giberélico) da seguinte forma: T0- Meio MS básico; T1- com 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃; T2- com 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃; T3- com 0,05 mg.L⁻¹ de BAP; T4- com 0,05 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃ ; T5- com 0,05 mg.L⁻¹ de BAP + 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃; T6- com 0,1

mg.L⁻¹ de BAP; T7- com 0,05 mg.L⁻¹ de BAP + 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃; T8- com 0,1 mg.L⁻¹ de BAP + 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃ (Tabela 1).



Figura 2. Plântulas de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) *in vitro*, após 70 dias em meio básico MS.

Tabela 1. Combinação (em mg.L⁻¹) entre os reguladores de crescimento utilizados nos tratamentos.

BAP	GA ₃	GA ₃	GA ₃
	0,0	0,5	1,0
0,0	0,0/0,0	0,5/0,0	1,0/0,0
0,05	0,0/0,5	0,5/0,05	1,0/0,05
0,1	0,0/0,1	0,5/0,1	1,0/0,1

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e contaram com 10 repetições por tratamento. As análises estatísticas dos dados foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foram realizadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Ao fim de 45 dias de cultivo *in vitro*, foram analisados os percentuais de enraizamento e os parâmetros biométricos: número de folhas; tamanho das plântulas; biomassa fresca e seca da parte aérea e raiz.

2.3. Análise do marcador por cromatografia líquida de alta eficiência

2.3.1. Preparação das amostras

Foram preparadas amostras para a comparação do clone e a matriz original. As análises foram realizadas em triplicata, pesando-se 50 mg de cada amostra. A massa foi transferida para um tubo de ensaio, adicionados 3 mL de acetona e, em seguida, foi sonicada durante 10 min., utilizando um banho ultrassônico Branson[®] mod. 2510. Posteriormente, a solução obtida foi transferida para frascos de vidro, com o auxílio de pipeta *Pasteur* e um pedaço de algodão utilizado como filtro. Esta solução foi denominada como primeiro volume da extração. A massa retida no tubo de ensaio, foram adicionados mais 3 mL de acetona e transferida ao banho ultrassônico para sonicação durante 10 min. Após o término da sonicação, a solução foi pipetada, filtrada, e adicionada ao primeiro volume da extração. Homogeneizou-se. A solução obtida foi transferida para uma capela a fim de que todo o solvente fosse evaporado. Após a secagem, a massa proveniente da extração foi tratada por extração em fase sólida (SPE), para reter os interferentes, principalmente clorofila. Solubilizou-se a massa em 500 µL de acetonitrila, com o auxílio do banho ultrassônico por 1 min. Foram adicionados 500 µL de água ultra-pura e a solução foi sonicada por mais 1 min. Em seguida, a solução foi transferida para um cartucho SPE Strata Phenomenex[®] C18-E 100 mg/mL, previamente condicionado com 1 mL de acetonitrila e 1 mL de água ultra-pura. A solução coletada nesta extração (V1) foi desprezada, ficando o analito retido no cartucho. A este cartucho, passou-se 0,5 mL de uma solução acetonitrila:água (1:1), e a solução coletada (V2) foi separada em um frasco de vidro. Em seguida, passou-se por este cartucho mais 2 mL de uma solução acetonitrila:água (7:3). A solução coletada (V3) foi adicionada à obtida anteriormente (V2), totalizando um volume de 2,5 mL, e transferida para a capela para evaporar o solvente. A massa residual foi ressuspensa em 200 µL de acetonitrila, filtrada utilizando um filtro de seringa de nylon de 13 mm e 0,45 µm e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um método isocrático com 54% de acetonitrila.

2.3.2. Preparação da curva de calibração

Foi preparada uma curva de calibração, nas concentrações de 2, 10, 20, 40 e 100 ppm, utilizando como solvente a acetonitrila e como marcador 3',4',7-tri-O-metoxiflavona, que foi isolado e identificado por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (Silva, 2010).

2.3.3. Equipamento e Parâmetros Cromatográficos

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu[®], composto por duas bombas, modelo LC-10AD, detector com único sinal de absorvância na região do ultravioleta, operando com comprimento de onda em 270 e 400 nm modelo SPD-10AV, degaseificador de membrana, modelo DGU-14A, injetor de amostras Rheodyne 7752i, com alça de amostragem de 20 µL, interface de comunicação Shimadzu[®], modelo CBM-10A acoplado a microcomputador Pentium II com software de integração Class LC-10A

Os parâmetros cromatográficos utilizados foram coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250 x 4,6mm, 5 µm, 110Å), pré-coluna Phenomenex[®] C18 (4,0 x 3,0 mm, 5 µm), fase móvel acetonitrila:água (54:46), fluxo de 1 mL/min., volume de injeção 20 µL e comprimento de onda 342nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Clonagem

Entre os tratamentos utilizados, o tratamento T0 apresentou a maior média com relação ao tamanho das plântulas que foi de 6,512 cm, e diferiu estatisticamente dos demais tratamentos como mostra na figura 3. A presença da citocinina BAP e da Giberelina GA3, influenciou no crescimento das plantas, reduzindo o seu tamanho. O ácido giberélico é conhecido, entre outros efeitos, por induzir alongamento nos entrenós das plantas (Srivastava, 2002).

Diversos trabalhos relatam o uso de giberelina para alongamento de plantas micropropagadas *in vitro* (Ye *et al.*, 2002; Alam *et al.*, 2010;Chinnamadasamy *et al.*, 2010), porém, a resposta das plantas às citocininas e giberelinas variam de acordo com as espécies e tecido vegetal. O uso de giberelina ou a combinação com BAP nas condições deste trabalho, não proporcionou aumento nos tamanho das plântulas *in vitro*.

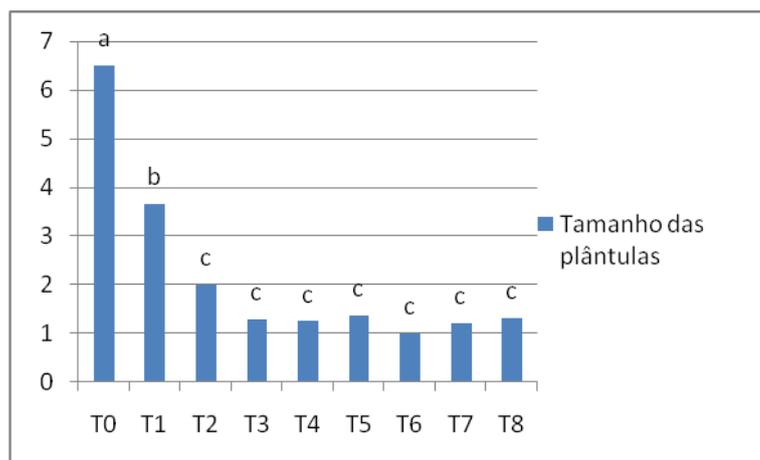


Figura 3. Gráfico mostrando o tamanho médio (em cm) das plantas nos tratamentos. Médias com diferentes letras diferem estatisticamente entre si, conforme Teste de Tukey a 5%.

Com relação ao número de folhas, os tratamentos T0, T1 e T2 apresentaram os maiores valores (5,25; 3,50 e 3,62 respectivamente), não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 2). O uso de BAP quebrou a dormência de várias gemas axilares, mas não houve alongamento significativo nem na presença de GA_3 , e ainda, a presença de BAP parece reduzir o tamanho das folhas formadas (dados não divulgados).

Os dados biométricos do peso fresco e seco da parte aérea, indicam que o tratamento sem reguladores de crescimento (T0) diferiu estatisticamente dos demais e apresentou os maiores valores de biomassa (Tabela 2). Esses resultados confirmam que a ausência dos reguladores de crescimento utilizados, resultam em plantas maiores. O tamanho das plantas e o número de folhas são fatores importantes na micropropagação, pois permite que os explantes contendo gemas axilares sejam extraídos com mais facilidade e com mais reserva energética, facilitando assim a regeneração.

Tabela 2. Efeito dos tratamentos no número de folhas e no peso fresco e seco da biomassa das parte aérea. Médias com diferentes letras diferem estatisticamente entre si, conforme Teste de Tukey a 5%.

Tratamentos	Numero de folhas	Peso fresco da parte aérea	Peso seco da parte aérea
T0 (Meio MS básico)	5,25 ^a	0,0217 ^a	0,0126 ^a
T1 (0,5 mg.L ⁻¹ GA ₃)	3,5 ^{ab}	0,0092 ^b	0,0069 ^b
T2 (1,0 mg.L ⁻¹ GA ₃)	3,62 ^a	0,0053 ^b	0,0044 ^b
T3 (0,05 mg.L ⁻¹ BAP)	1,62 ^c	0,0049 ^b	0,0038 ^b
T4 (0,05 mg.L ⁻¹ BAP + 0,5 mg.L ⁻¹ GA ₃)	1,37 ^c	0,0039 ^b	0,0029 ^b
T5 (0,05 mg.L ⁻¹ BAP + 1,0 mg.L ⁻¹ GA ₃)	1,75 ^{bc}	0,0058 ^b	0,0046 ^b
T6 (0,1 mg.L ⁻¹ BAP)	0,25 ^c	0,0049 ^b	0,0037 ^b
T7 (0,05 mg.L ⁻¹ BAP + 1,0 mg.L ⁻¹ GA ₃)	0,87 ^c	0,0046 ^b	0,0037 ^b
T8 (0,1 mg.L ⁻¹ BAP + 1,0 mg.L ⁻¹ GA ₃)	1,12 ^c	0,0058 ^b	0,0036 ^b

A formação de raízes também foi influenciada pela presença de reguladores de crescimento (Tabela 3), os maiores percentuais de enraizamento foram observados nos tratamentos T0 (80%) e T2 (70%). A presença de GA₃ e de concentrações de BAP maiores que 0,05 mg.L⁻¹ parecem influenciar negativamente a formação de raízes. É comum o uso de auxinas na formação de raízes, ou ainda o uso de meio de cultura sem reguladores de crescimento.

A biomassa fresca de raiz apresentou a maior média no tratamento T0, que diferiu estatisticamente dos demais. Já o peso seco mostrou-se maior em T0 e T2, que não diferiram entre si estatisticamente (Tabela 3). No tratamento T2, o percentual de 70% de enraizamento pode ter ocorrido devido a presença de altas concentrações de GA₃, que pode ter reduzido a produção endógena de BAP. Esse tipo de interação do GA₃ com BAP já foi relatada no trabalho de Heide (1969).

Tabela 3. Efeito dos tratamentos no percentual de plantas enraizadas e no peso fresco e seco da biomassa das raízes. Médias com diferentes letras diferem estatisticamente entre si, conforme Teste de Tukey a 5%.

Tratamentos	% de enraizamento	Peso fresco das raízes	Peso seco das raízes
T0 (Meio MS básico)	80	0,00280 ^a	0,00045 ^a
T1 (0,5 mg.L ⁻¹ GA ₃)	20	0,00031 ^b	0,0006 ^b
T2 (1,0 mg.L ⁻¹ GA ₃)	70	0,00052 ^b	0,00021 ^{ab}
T3 (0,05 mg.L ⁻¹ BAP)	20	0,00016 ^b	0,00001 ^b
T4 (0,05 mg.L ⁻¹ BAP + 0,5 mg.L ⁻¹ GA ₃)	0	0	0
T5 (0,05 mg.L ⁻¹ BAP + 1,0 mg.L ⁻¹ GA ₃)	10	0,0003 ^b	0,00001 ^b
T6 (0,1 mg.L ⁻¹ BAP)	0	0	0
T7 (0,05 mg.L ⁻¹ BAP + 1,0 mg.L ⁻¹ GA ₃)	0	0	0
T8 (0,1 mg.L ⁻¹ BAP + 1,0 mg.L ⁻¹ GA ₃)	0	0	0

3.2. Análise do marcador por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os cromatogramas obtidos com uma das replicatas da matriz original, do clone e da curva de calibração (na concentração de 40 ppm) estão apresentados nas Figuras 4, 5 e 6, respectivamente.

A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona, utilizada como marcador, apresenta um tempo de retenção de 15 min.

A matriz original apresentou cerca de 1,36 mg de 3',4',7-tri-O-metoxiflavona em cada 100 g de material pulverizado de *P. pellucida*, e o clone apresentou cerca de 0,94 mg do marcador em cada 100 g do pó, representando uma diminuição de 30,88% após a clonagem. Contudo, este experimento teve como objetivo desenvolver um protocolo para clonagem *in vitro* de *P. pellucida*. O fato da presença do flavonóide ter sido detectada em menores proporções nas plantas deste experimento, não diminui a importância deste protocolo. Isso porque é possível estimular a produção do flavonóide *in vitro* a partir da variação de condições físicas do cultivo (disponibilidade de água,

umidade do ar, quantidade de luz, temperatura etc.), alterando algum componente do meio de cultura (aumentando ou diminuindo a disponibilidade de sais como o nitrogênio, cálcio, ferro etc.) ou ainda adicionando algum precursor do flavonóide alvo, estimulando assim sua produção.

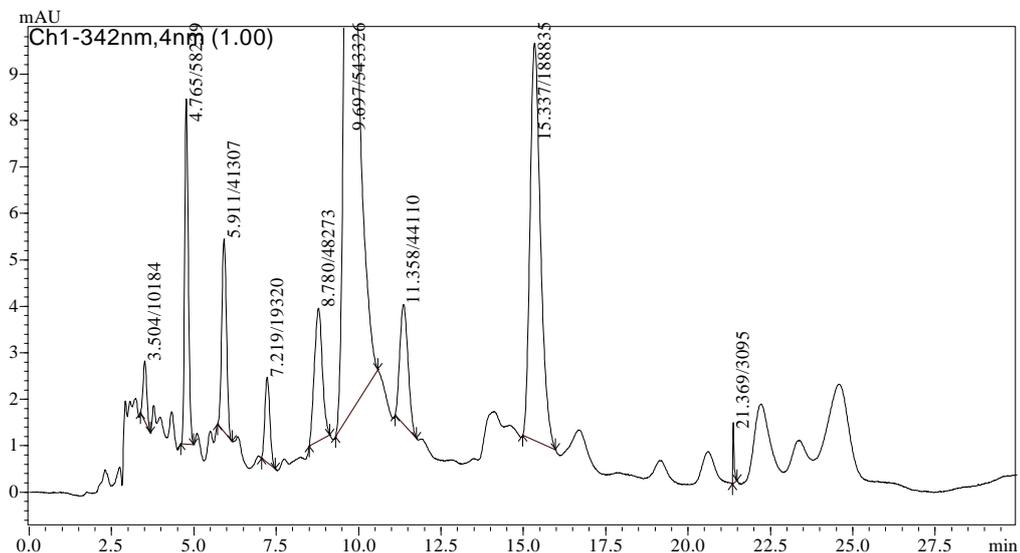


Figura 4. Cromatograma de uma das replicatas da matriz original de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

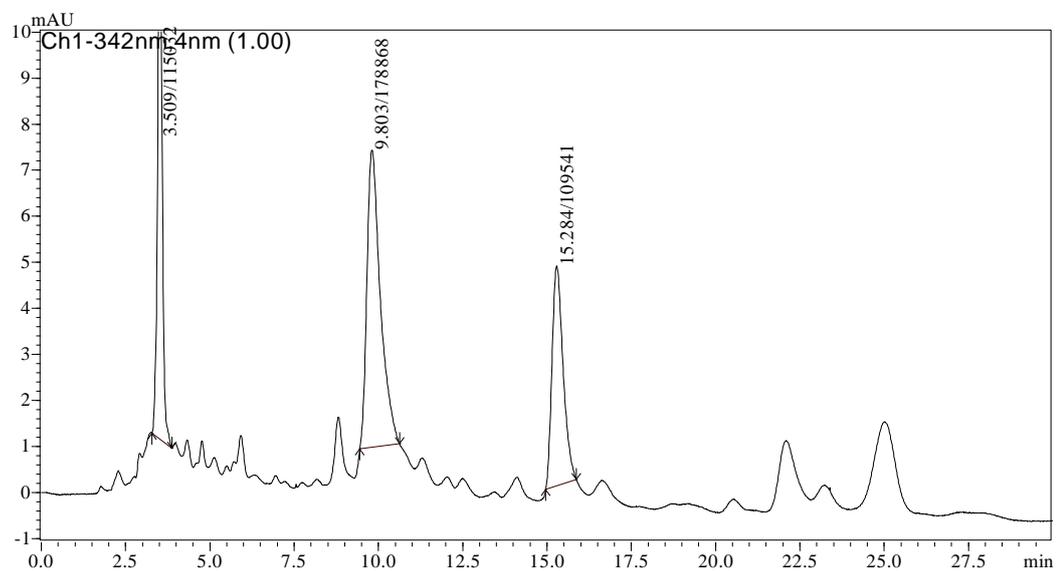


Figura 5. Cromatograma de uma das replicatas do clone de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

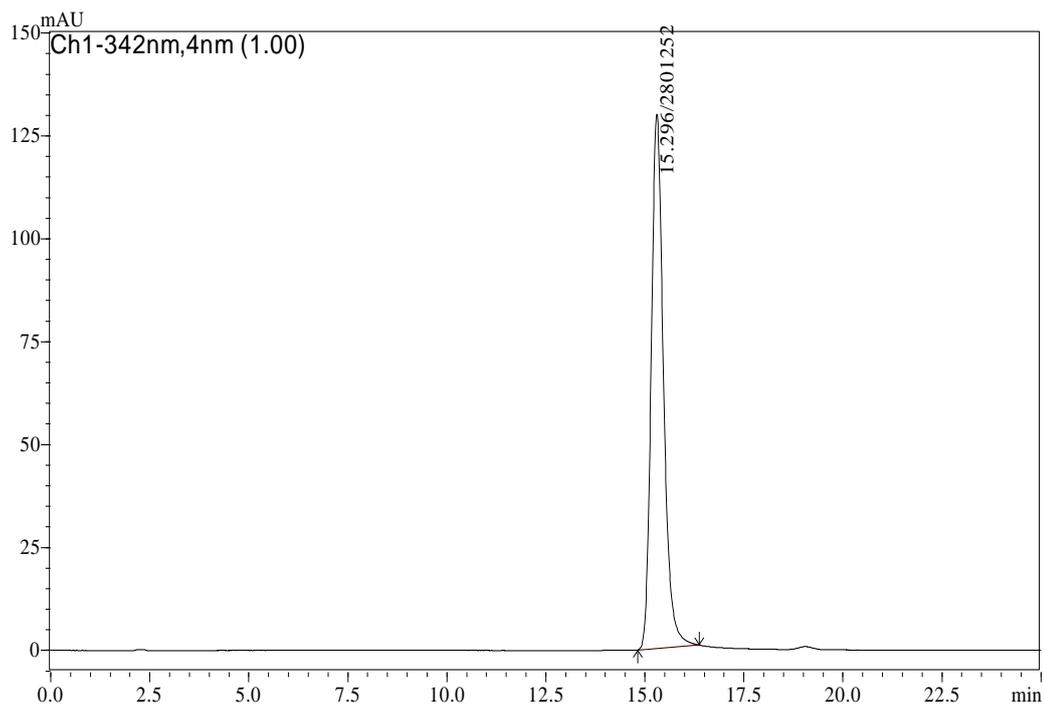


Figura 6. Cromatograma da curva de calibração de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) na concentração de 40 ppm. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresentou um tempo de retenção em 15,32 min.

4. CONCLUSÃO

A micropropagação de *P. pellucida* foi possível utilizando-se gemas axilares jovens e o meio de cultura MS básico. A presença das concentrações utilizadas de BAP e/ou GA₃, no meio de cultura, reduz o crescimento e a produção de biomassa aérea e de raiz.

Partindo do princípio que o cultivo *in vitro* permite o controle de condições físicas e químicas do microambiente em que a planta está sendo propagada, a partir deste protocolo, é possível obter grandes quantidades de plantas de *P. pellucida in vitro* e tentar agora, estimular a produção de flavonóides.

Por fim, ainda utilizando a ferramenta de cultivo *in vitro*, é possível se conseguir um cultivo de órgãos-alvo. Isto é, se um determinado flavonóide for produzido em maiores quantidades na raiz ou inflorescência das plantas (por exemplo), é possível estimular o desenvolvimento e crescimento destes órgãos e assim obter quantidades maiores do metabólito-alvo.

5. REFERÊNCIAS

ALAM, M. J.; ALAM, I.; SHARMIN, S. A.; RAHMAN, M. M.; ANISUZZAMAN, M.; ALAM, M. F. Micropropagation and antimicrobial activity of *Operculina turpethum* (syn. *Ipomoea turpethum*), an endangered medicinal plant. **Plant Omics Journal**. Vol. 3, p. 40-46, 2010.

CHINNAMADASAMY, K.; ARJUNAN, D.; RAMASAMY, M. V. Rapid Micropropagation of *Plumbago zeylanica* L. An Important Medicinal Plant. **Journal of American Science**. vol. 6, p. 1027-1031, 2010.

GAJ, M.D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, n.43, 27-47, 2004.

HEIDE, O. M. Non-Reversibility of gibberellin- Induced Inhibition of regeneration in *Begonia* Leaves. **Physiol Plant**, vol. 22, p. 671-679, 1969.

KHAN, M.R.; OMOLOSO, A.D. Antibacterial activity of *Hygrophila stricta* and *Peperomia pellucida*. *Fitoterapia* 73 (2002) 251-254.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant. Physiol.* 15: 473-479.

SILVA, R.M.M. Flavonóides de *Peperomia pellucida*. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará. Belém. 2010. 48p.

SRIVASTAVA, L.M. Plant growth and development: Hormones and the environment. 2002. Oxford: Academic Press. 2002, p. 772.

YE, G.; MCNEIL, D. L.; CONNER, A. J.; HILL, G. D. Multiple shoot formation in lentil (*Lens culinaris*) seeds. **New Zealand Journal of vrop and Horticultural Science**. Vol. 30, p. 1-8, 2002.

Capítulo IX

11. AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES PROCESSOS DE SECAGEM

11.1. Avaliação de diferentes processos de secagem de extratos de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) utilizando Análise Térmica e Microscopia Eletrônica de Varredura

Artigo a ser submetido à Química Nova

11.1. Avaliação de diferentes processos de secagem de extratos de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) utilizando Análise Térmica e Microscopia Eletrônica de Varredura

Silva, R.M.F.¹; Gomes, T.C.B.L.¹; Silva, K.E.R.¹; Freitas Neto, J.L.¹; Falcão, E.H.L.²;
Silva, O.S.³; Ferreira, P.A.¹; Araújo, A. A.S.⁴; Souza, F.S.⁵; Rolim Neto, P.J.¹

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco;

²Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco;

³Unidade Acadêmica de Engenharia Química, Universidade Federal de Campina

Grande; ⁴Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe; ⁵Laboratório de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Universidade Federal da Paraíba.

RESUMO

Na indústria farmacêutica de fitoterápicos, o extrato seco é aplicado na preparação de comprimidos, cápsulas, granulados, pomadas e outras formas farmacêuticas, como produto intermediário. Entre outras vantagens, apresentam maior estabilidade e distribuição granulométrica dos constituintes da preparação. Este trabalho teve como objetivo caracterizar os extratos secos de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) obtidos por evaporação rotativa, leito de jorro, *spray dryer* e liofilização, utilizando a análise térmica e microscopia eletrônica de varredura. Na preparação de extratos secos obtidos por *spray dryer* e leito de jorro, a adição de aerosil à solução extrativa melhorou o rendimento e as características farmacotécnicas do pó obtido durante a secagem. O extrato seco obtido por aspersão foi o que apresentou menor aderência ao equipamento utilizado, possibilitando uma melhor fluidez durante o desenvolvimento farmacotécnico-industrial de formas farmacêuticas sólidas.

Palavras-chave: *Peperomia pellucida*, extratos secos, análise térmica, microscopia eletrônica de varredura.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a produção de fitoterápicos tem explorado novas possibilidades tecnológicas para a obtenção de extratos secos. Isso decorre das vantagens apresentadas pelos extratos secos, quando comparados aos extratos fluidos. Os extratos secos vegetais são muito mais adaptados às necessidades da terapêutica moderna, devido à facilidade de padronização e de manuseio, o que contribui para a garantia da homogeneidade de preparações farmacêuticas (De Paula & Petrovick, 1997; Teixeira, 1997; Runha *et al.*, 2001).

Por definição, extratos secos são preparações sólidas, pulverulentas ou granuladas obtidas por evaporação de extratos de plantas medicinais adicionadas ou não de adjuvantes, apresentando o teor de substâncias ativas indicado na respectiva monografia (Farmacopéia Brasileira, 1988).

O extrato seco é considerado tecnologicamente viável para fins de produção em larga escala, devido à sua estabilidade física, química e microbiológica, além da facilidade de padronização dos princípios ativos. Na indústria farmacêutica de fitoterápicos, o extrato seco é aplicado na preparação de comprimidos, cápsulas, granulados, pomadas e outras formas farmacêuticas, como produto intermediário. Entre outras vantagens, apresentam maior estabilidade e distribuição granulométrica dos constituintes da preparação (Cordeiro, 2000).

Entre as técnicas de secagem empregadas com sucesso na preparação de extratos secos encontra-se a nebulização ou *spray dryer* (Masters, 1979; Bassani, 1990; Broadhed *et al.*, 1992; Teixeira, 1997, Souza, 2003), o leito de jorro (Souza, 2007), a liofilização e a evaporação rotativa (Sousa *et al.*, 2007; Dutra *et al.*, 2009), técnicas estas que serão descritas com destaque, para a sua aplicação na obtenção e padronização de extratos secos, para fins de utilização como insumo farmacêutico de interesse para a produção de fitoterápicos no Brasil.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar os extratos secos da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) obtidos por evaporação rotativa, leito de jorro, *spray dryer* e liofilização, utilizando a análise térmica e microscopia eletrônica de varredura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matéria Prima Vegetal

O material vegetal *P. pellucida* foi coletado no município de Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco. A amostra foi identificada pela Dr^a Rita de Cássia Pereira, do Instituto Agrônômico de Pernambuco – PE, e foi registrada com o nº 84031.

2.2. Processamento da Amostra

Após a coleta, o material vegetal fresco (toda a planta, incluindo folhas, caules e raiz) foi lavado com água e álcool etílico a 70% e, em seguida, seco à temperatura ambiente, durante 2 dias. A *P. pellucida* foi colocada em uma estufa de ar circulante, durante sete dias, a uma temperatura entre 42 e 45°C. Após a retirada do material vegetal da estufa, este foi triturado em moinho de facas e tamis de 30 mesh, obtendo-se pó seco.

2.3. Obtenção da tintura de *P. pellucida*

O método escolhido para a obtenção da tintura de *P. pellucida* foi a maceração (Santos, 2000). Foi preparada uma tintura na proporção 1:10 (material vegetal/álcool a 70%).

2.4. Obtenção do extrato seco

2.4.1. Evaporação rotativa

Para a obtenção do extrato seco da planta, a tintura foi concentrada em um evaporador rotativo Marconi[®] MA-120, com o auxílio de uma bomba de vácuo Marconi[®] MA – 057/1.

2.4.2. Liofilização

A tintura foi seca utilizando previamente um evaporador rotativo e, em seguida, um liofilizador Terroni[®] – LC3000, com uma temperatura de -6°C e vácuo de -50 mmHg.

2.4.3. Leito de jorro

Para auxiliar a secagem, foram adicionados à tintura 30% de aerosil[®], obtendo-se uma suspensão a qual foi seca utilizando um leito de jorro, constituído de uma base cônica de acrílico, com ângulo interno de 60°, acoplada a uma coluna cilíndrica também em acrílico, com diâmetro interno de 15 e 45 cm de altura e diâmetro do orifício de entrada de 3,0 cm.

O ar utilizado no sistema de atomização foi fornecido por um compressor Schultz[®] de 2 estágios modelo MSV 20/350 de 854 cilindradas com potência de 5 CV, deslocamento de 572 L/min e pressão máxima de 175 lbf/in². A linha possuía um diâmetro interno de 1/2 polegadas e pressão de atomização medida através de um manômetro de Bourdon em kg/cm² (bar).

A suspensão, localizada em um becker de 1 L, foi submetida à agitação magnética e bombeada até o bico atomizador por meio de uma bomba peristáltica Masterflex[®], modelo L/S 72200-20. A tintura foi conduzida ao bico por uma mangueira de silicone de diâmetro interno de 1,6 mm. A bomba foi ajustada para fornecer a vazão de tintura desejada.

O bico atomizador utilizado foi de duplo fluido, com jato redondo e mistura interna. O modelo escolhido foi SU12, adquirido da Spraying Systems[®], com capacidade de 5 a 61 mL/min e 69 a 400 kPa para vazão e pressão, calibrada para água, fornecendo a mais fina graduação de atomização para determinada vazão e pressão.

A pressão de atomização do ar comprimido e a vazão de atomização da dispersão foi 20 psi e 13,54 g/min, respectivamente. A vazão de ar que movimentava o leito de partículas foi de 85 m³/h numa tubulação de 2 polegadas.

2.4.4. *Spray dryer*

A tintura foi seca utilizando um equipamento LabPlan[®] *Spray dryer* SD-05, com uma temperatura de atomização 160°C. Foi necessário a adição de 30% de dióxido de silício coloidal (aerosil[®]) como adjuvante de secagem.

2.5. Análise Térmica

O material vegetal pulverizado, os extratos secos obtidos por evaporação rotativa, leito de jorro, *spray dryer* e liofilização, e o aerosil[®] foram analisados através de análise térmica, utilizando a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG).

As curvas DSC foram obtidas na faixa de temperatura entre 27 e 600°C, em célula calorimétrica modelo DSC 60 da marca Shimadzu[®], sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e utilizando cápsulas de alumínio parcialmente fechadas contendo aproximadamente 2 mg de amostra. A célula DSC foi calibrada antes dos ensaios no eixo de temperatura, utilizando padrões de índio (T_{fusão} = 156,6°C) e zinco (T_{fusão} = 419,5°C) metálicos com pureza de 99,99%.

A curva termogravimétrica foi realizada utilizando uma termobalança modelo TGA 60 Shimadzu[®], na faixa de temperatura entre 27 e 600°C, sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL. min⁻¹), razão de aquecimento 10°C.min⁻¹ e cadinho de platina contendo massa de amostra de 5 mg . A calibração do instrumento foi verificada antes dos ensaios empregando-se um padrão de oxalato de cálcio monoidratado, conforme norma ASTM E1582-93 (The American Society for Testing and Materials, 1993) (Araújo *et al.*, 2006; Storpirts *et al.*, 2009).

2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O material vegetal pulverizado, os extratos secos obtidos por evaporação rotativa, leito de jorro, *spray dryer* e liofilização, e o aerosil[®] também foram analisados através de MEV. Utilizou-se um instrumento Superscan SS-550 Shimadzu[®]. A voltagem de aceleração foi de 10 kV, a distância de trabalho foi de 10 a 15 mm, e o *spot size* foi de 3 ou 4. As amostras foram depositadas sobre fitas de carbono em *stubs* de alumínio e foram metalizadas com uma camada de ouro de ~20 nm. As amostras resinosas foram imersas em nitrogênio líquido e transferidas rapidamente para o *stub* para serem metalizadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Descrição dos extratos secos obtidos

Os extratos secos obtidos por evaporação rotativa e por liofilização apresentaram-se com um aspecto escuro e resinoso, dificultando a incorporação destes na obtenção de formas farmacêuticas.

O extrato primeiramente foi seco utilizando um evaporador rotativo, para retirar o álcool e, em seguida, foi liofilizado.

Entretanto, os extratos secos obtidos por *spray dryer* e por leito de jorro apresentaram-se na forma de pó, destacando-se o extrato seco obtido por aspensão por apresentar menor aderência ao equipamento utilizado, possibilitando uma melhor fluidez durante o desenvolvimento farmacotécnico-industrial de formas farmacêuticas sólidas.

Na preparação de extratos secos obtidos por *spray dryer* e leito de jorro, a adição de aerossil à solução extrativa melhorou o rendimento e as características farmacotécnicas do pó obtido durante a secagem (Teixeira, 1997).

3.2. Análise térmica

A curva TG do material vegetal pulverizado da *P. pellucida* (Figura 1) mostrou quatro eventos de perda de massa nas seguintes faixas de temperatura e percentuais de perda: 25-100°C ($\Delta m=6,68\%$); 100-240°C ($\Delta m=7,41\%$); 240-350°C ($\Delta m=33,07\%$) e 350-600°C ($\Delta m=29,42\%$). A curva DSC corrobora esses resultados mostrando três eventos com variação de entalpia, sendo o primeiro endotérmico (desidratação) e os dois seguintes exotérmicos (decomposição).

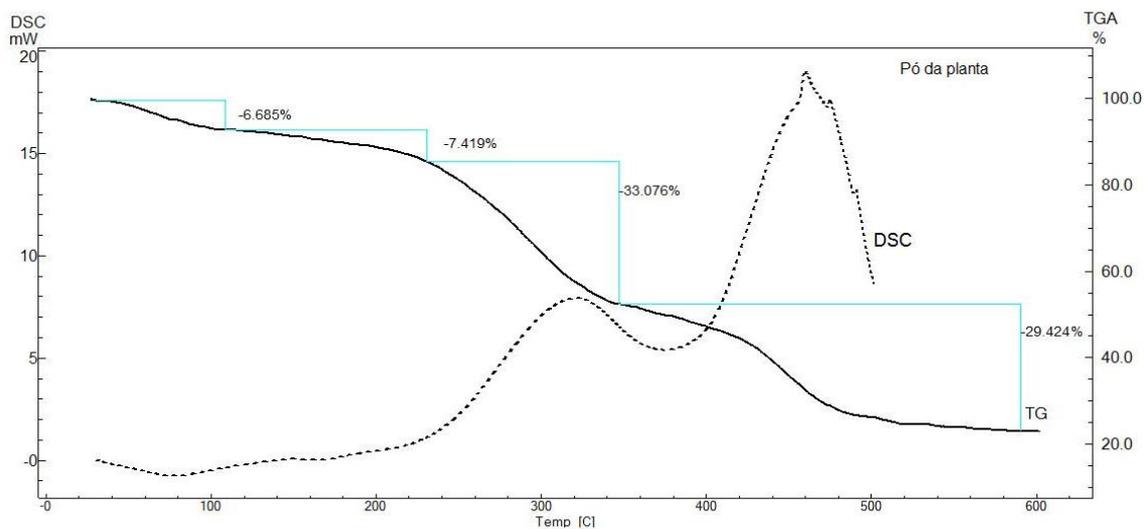


Figura 1. Curva DSC e TG do material vegetal pulverizado da *P. pellucida* obtida na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando fluxo de nitrogênio de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A Figura 2 mostra a curva TG do extrato seco da *P. pellucida* obtido por evaporação rotativa. A curva TG mostra quatro eventos de perda de massa nas seguintes faixas de temperatura e percentuais de perda: 25-100°C ($\Delta m=0,98\%$); 100-170°C ($\Delta m=11,37\%$); 170-290°C ($\Delta m=26,22\%$) e 290-520°C ($\Delta m=39,54\%$). A curva DSC corrobora com esses resultados mostrando três eventos com variação de entalpia, sendo o primeiro endotérmico (desidratação) e os dois seguintes exotérmicos (decomposição).

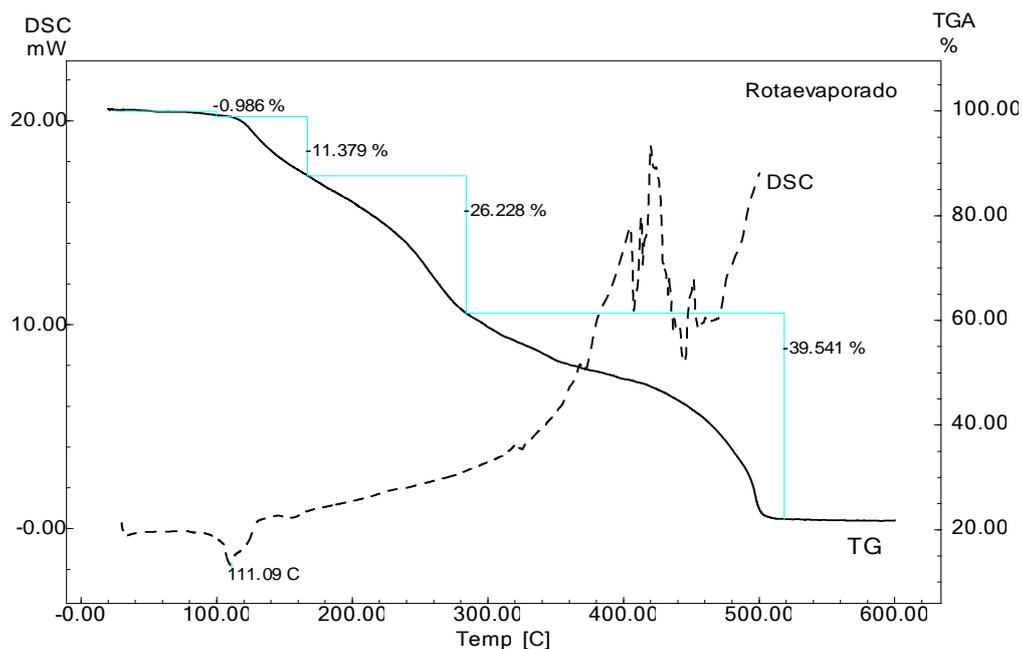


Figura 2. Curva DSC e TG do extrato da *P. pellucida* seco por evaporação rotativa, obtida na razão de aquecimento de $10^{\circ} \text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, utilizando fluxo de nitrogênio de $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

A curva TG do extrato seco da *P. pellucida* obtido por liofilização (Figura 3) mostrou um perfil diferenciado quando comparado as curvas termoanalíticas obtidas por *spray dryer* e leito de jorro. A curva TG mostra três eventos de perda de massa nas seguintes faixas de temperatura e percentuais de perda: $100\text{-}200^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m=13,02\%$); $200\text{-}360^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m=38,15\%$); e $360\text{-}600^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m=24,96\%$). A curva DSC corrobora com esses resultados mostrando três eventos com variação de entalpia, sendo o primeiro apresentado de forma aguda referente à decomposição.

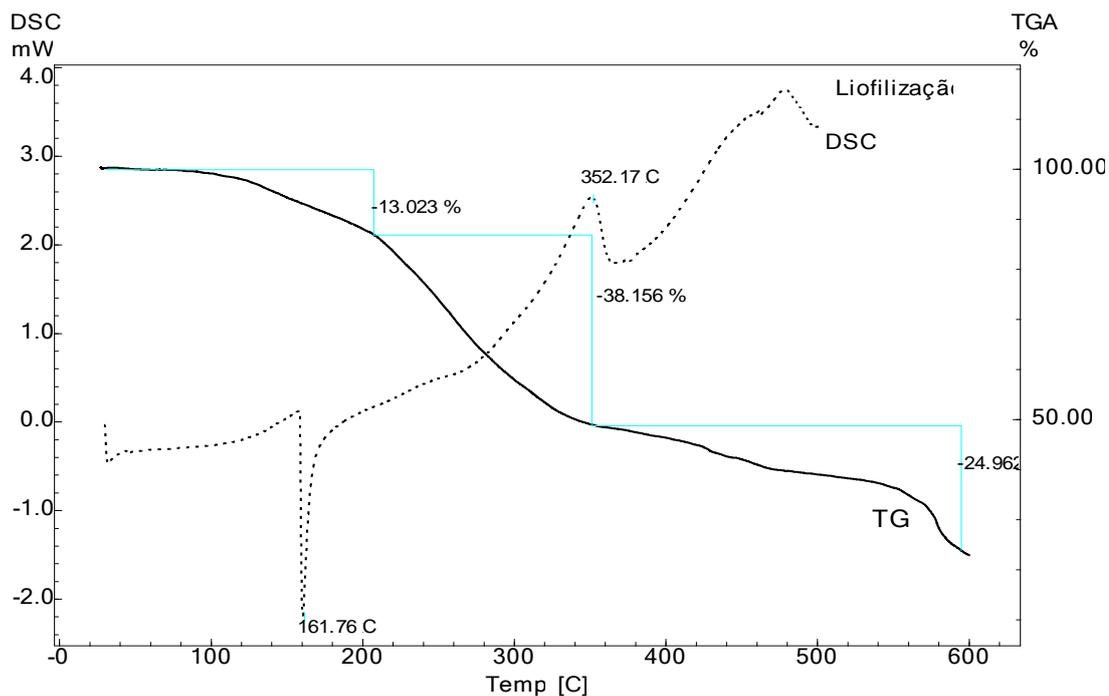


Figura 3. Curva DSC e TG do extrato da *P. pellucida* seco por liofilização, obtida na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando fluxo de nitrogênio de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A curva TG do extrato seco da *P. pellucida*, obtido por leite de jorro (Figura 4), mostrou três eventos de perda de massa nas seguintes faixas de temperatura e percentuais de perda: $25\text{-}100^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m=4,59\%$); $100\text{-}260^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m=15,01\%$); e $260\text{-}530^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m=30,10\%$). A curva DSC corrobora com esses resultados mostrando três eventos com variação de entalpia, sendo o primeiro endotérmico (desidratação) e os dois seguintes exotérmicos (decomposição).

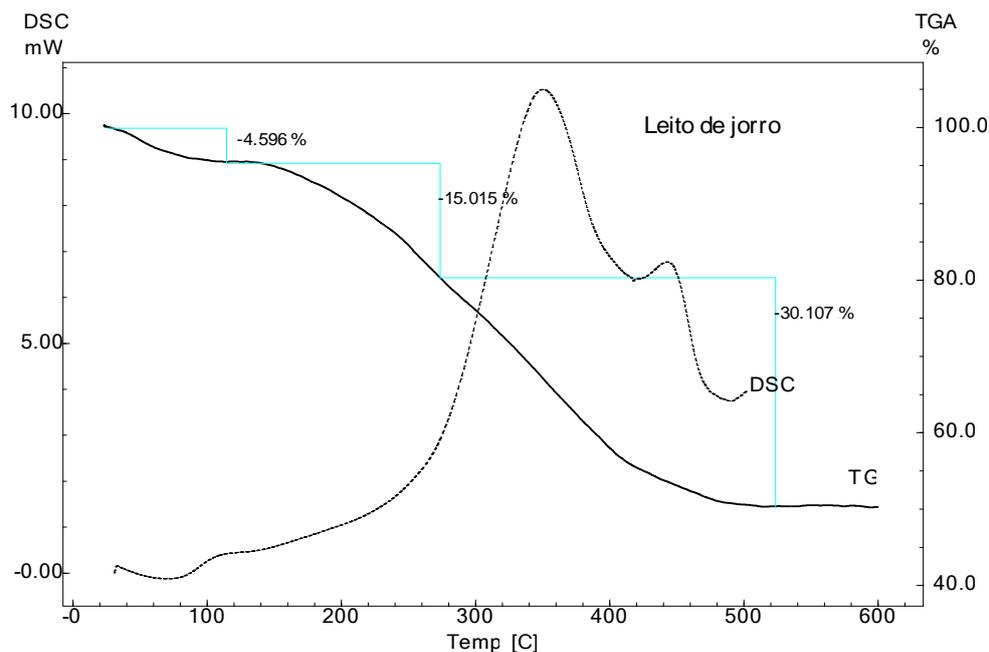


Figura 4. Curvas DSC e TG do extrato da *P. pellucida* seco por leito de jorro, obtida na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando fluxo de nitrogênio de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A curva TG do extrato seco da *P. pellucida*, obtido por spray dryer (Figura 5), mostrou três eventos de perda de massa nas seguintes faixas de temperatura e percentuais de perda: $25\text{-}100^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m=3,09\%$); $100\text{-}250^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m=8,77\%$); e $250\text{-}500^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m=23,18\%$). A curva DSC corrobora com esses resultados mostrando três eventos com variação de entalpia, sendo o primeiro endotérmico (desidratação) e os dois seguintes exotérmicos (decomposição).

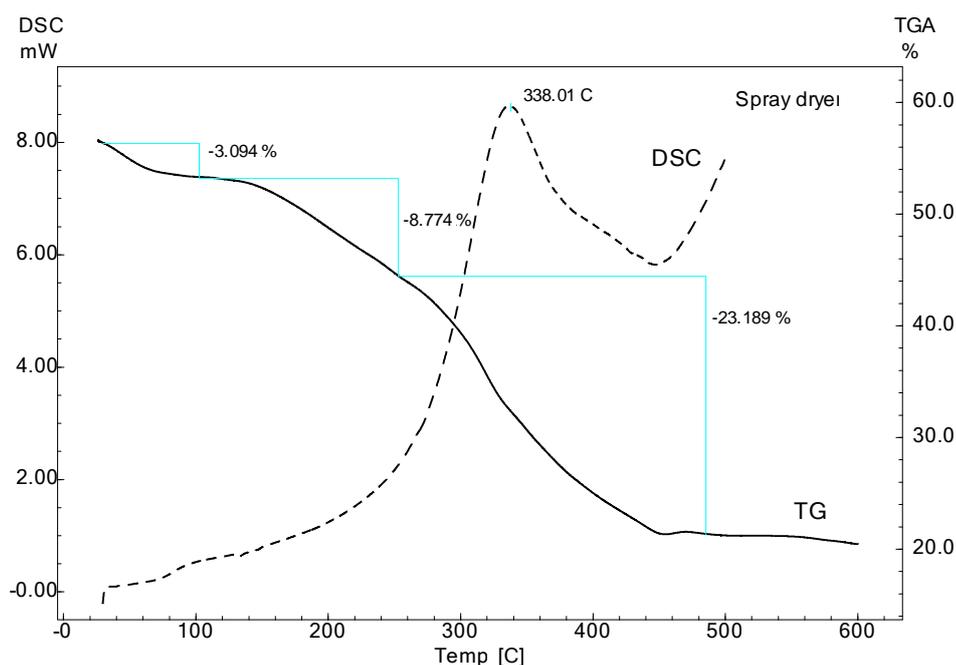


Figura 5. Curva DSC e TG do extrato da *P. pellucida* seco por *spray dryer*, obtida na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando fluxo de nitrogênio de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Ao comparar o primeiro evento endotérmico de perda de massa (25-100°C) dos extratos secos obtidos por *spray dryer* e leito de jorro, pode-se perceber que o extrato obtido por aspersão ($\Delta m=3,09\%$) apresenta uma menor perda de massa quando comparado ao extrato seco obtido por leito de jorro ($\Delta m=4,59\%$), sugerindo que o processo de secagem do *spray dryer* seja mais eficiente.

As curvas TG e DSC do aerosil[®] confirmam a estabilidade térmica deste adjuvante, não interferindo nas análises realizadas (Figura 6).

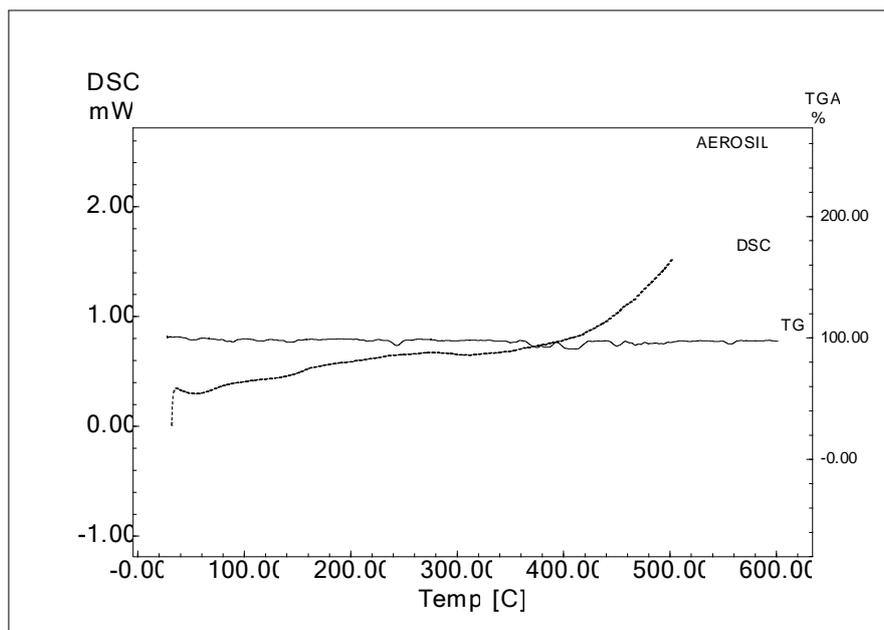


Figura 6. Curva DSC e TG do aerosil[®] obtida na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando fluxo de nitrogênio de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.3. Microscopia eletrônica de varredura

O material vegetal pulverizado (Figura 7) apresentou-se bastante irregular. Houve presença de diversos tamanhos de aglomerados de plaquetas e alguns aglomerados fibrosos.

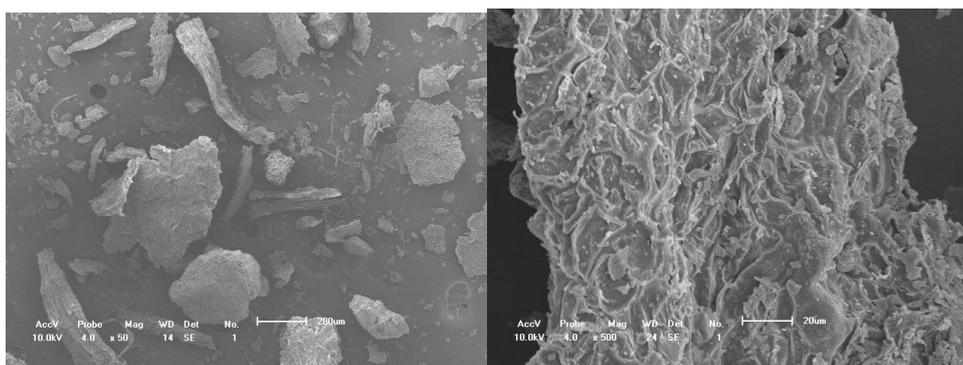


Figura 7. Fotomicrografia do material pulverizado de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.).

Barras de escala nas figuras equivalem a $200\ \mu\text{m}$, com aumento de 50x (à esquerda) e $20\ \mu\text{m}$, com aumento de 500x (à direita).

As amostras resinosas, obtidas através da secagem por evaporação rotativa e liofilização foram imersas em nitrogênio líquido para, além de expulsar o oxigênio

presente, congelar a amostra permitindo, assim, sua quebra sem deformação do material, o que tornaria as imagens inúteis.

Os extratos secos por evaporação rotativa e liofilização (Figuras 8 e 9, respectivamente) se apresentaram com aspectos resinosos e pastosos. Houve presença de aglomerados contínuos e irregulares e, aparentemente, ausência de porosidade ou partículas definidas.

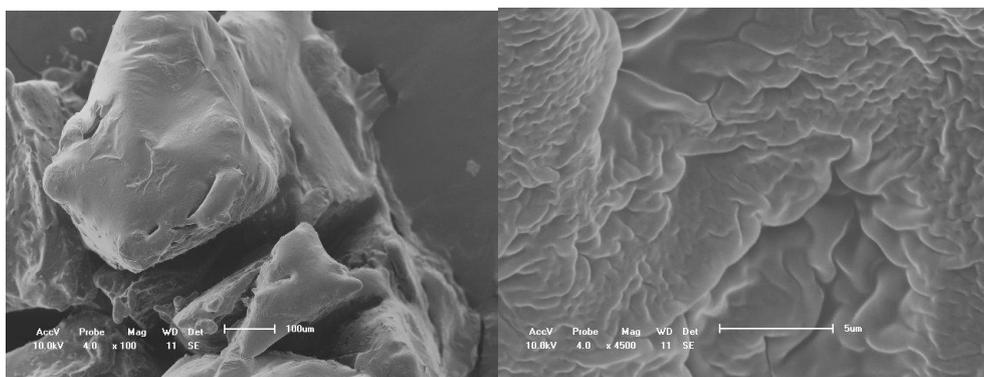


Figura 8. Fotomicrografia do extrato seco por evaporação rotativa de *Peperomia pellucida* L.(H.B.K.). Barras de escala nas figuras equivalem a 100 µm, com aumento de 100x (à esquerda) e 5 µm, com aumento de 4500x (à direita).

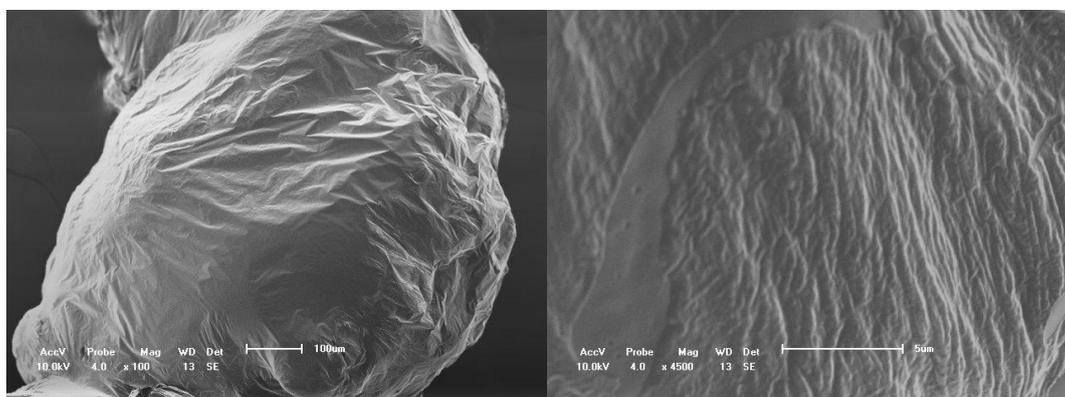


Figura 9. Fotomicrografia do extrato seco por liofilização de *Peperomia pellucida* L.(H.B.K.). Barras de escala nas figuras equivalem a 100 µm, com aumento de 100x (à esquerda) e 5 µm, com aumento de 4500x (à direita).

O aerosil[®], adjuvante de secagem utilizado no leito de jorro e no spray dryer, apresentou partículas esféricas e ovaladas, com tamanho variando entre 5 e 10 µm, como pode ser observado na Figura 10.

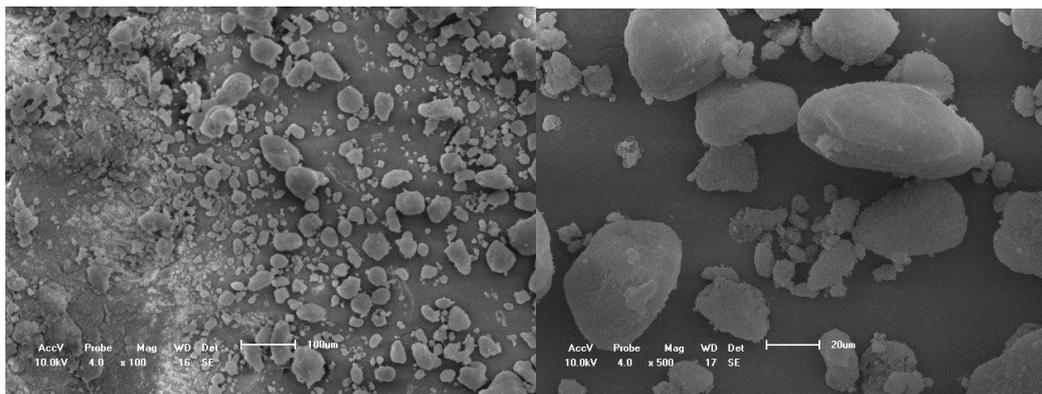


Figura 10. Fotomicrografia do aerosil[®]. Barras de escala nas figuras equivalem a 100 µm, com aumento de 100x (à esquerda) e 20 µm, com aumento de 500x (à direita).

O extrato seco por leito de jorro (Figura 11) apresentou aglomerados irregulares, possivelmente uma mistura do extrato sobre o aerosil[®].

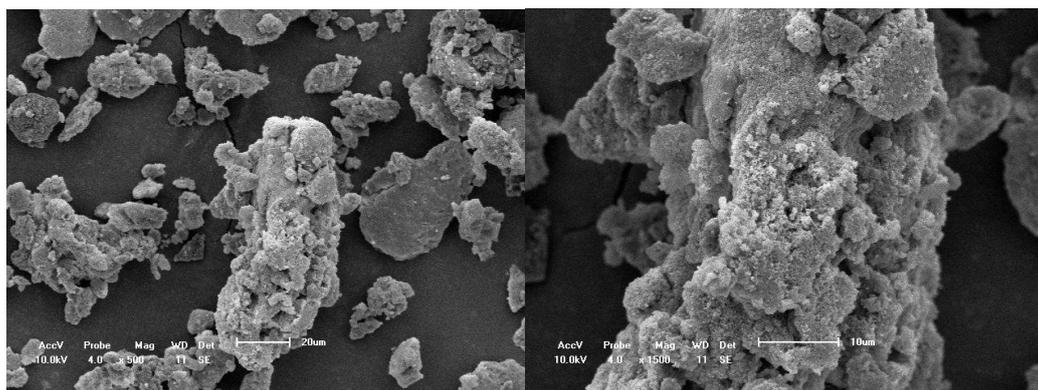


Figura 11. Fotomicrografia do extrato seco por leito de jorro de *Peperomia pellucida* L.(H.B.K.). Barras de escala nas figuras equivalem a 20 µm, com aumento de 500x (à esquerda) e 10 µm, com aumento de 1500x (à direita).

O extrato seco por spray dryer (Figura 12) apresentou partículas esféricas, com tamanhos entre 1 e 10 µm, que se aglomeram, e superfície irregular, possivelmente devido a alguma porosidade.

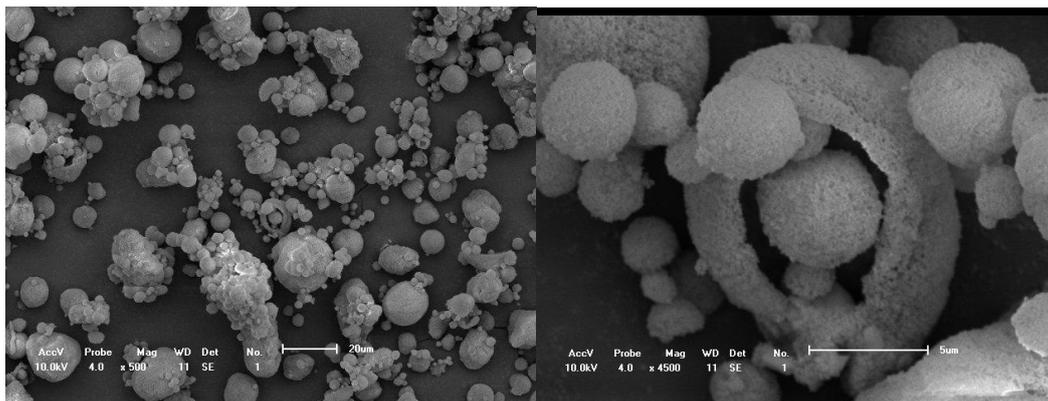


Figura 12. Fotomicrografia do extrato seco por *spray dryer* de *Peperomia pellucida* L.(H.B.K.). Barras de escala nas figuras equivalem a 20 μm , com aumento de 500x (à esquerda) e 5 μm , com aumento de 4500x (à direita).

4. CONCLUSÃO

Os extratos secos por evaporação rotativa e liofilização se apresentaram com aspectos resinosos e pastosos, dificultando a incorporação destes extratos nas formulações farmacêuticas. Na análise de microscopia eletrônica de varredura, foi observado que as amostras obtidas por esses processos de secagem não ficaram totalmente secas, havendo a necessidade de imergi-las previamente em nitrogênio líquido.

Houve uma significativa melhora no rendimento e nas características farmacotécnicas do pó obtido durante a secagem na preparação de extratos secos obtidos por *spray dryer* e leito de jorro devido à adição de aerosil[®] à solução extrativa.

Os resultados obtidos com a análise térmica sugerem que o processo de secagem por aspersão seja mais eficiente que o leito de jorro. Além disso, o extrato seco obtido por *spray dryer* apresentou menor aderência ao equipamento utilizado e partículas esféricas, possibilitando uma melhor fluidez durante o desenvolvimento farmacotécnico-industrial de formas farmacêuticas sólidas.

5. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A.A.S.; MERCURI, L.P.; SEIXAS, S.R.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R..
Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná

utilizando métodos convencionais e análise térmica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. vol. 42, nº 2, 2006, p. 269-277.

BASSANI, V.L. **Valorisation de Formes Galeniques Vegetales Desalcoolisation et Concentration de Solutions Extratives sur Membrane d'Osmose Inverse**, 1990. 261p. Tese. Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier, Montpellier.

BROADHEAD, J.; ROUAN, S.K.E.; RHODES, C.T. The Spray Drying of Pharmaceuticals, **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v.18 (11-12), p. 1169-1206, 1992.

CORDEIRO, D.S. **Produção de extrato seco de *Maytenus ilicifolia* Martius Ex Reiss pelo Processo Leito de Jorro**, 2000. 80p. Dissertação - PPG-FCFRP/USP, Ribeirão Preto.

DE PAULA, I.C.; PETROVICK, P.R. Desenvolvimento Tecnológico de Forma Farmacêutica Plástica Contendo Extrato Seco Nebulizado de *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. Compositae. **Caderno de Farmácia**. vol.13. n.2. p.143-145. 1997.

DUTRA, R.C.; PITTELLA, F.; FERREIRA, A.S.; LARCHER, P.; FARIAS, R.E.; BARBOSA, N.R. Efeito Cicatrizante das Sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel em Modelos de Úlceras Dérmicas Experimentais em Coelhos. **Latin American Journal of Pharmacy**, 28 (3):375-82 2009.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4 ed. São Paulo: Andrei, 1988. p. IV.7

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**, George Godwing, Ltd., London, 3rd., 1979. 687p.

RUNHA, F.P.; CORDEIRO, D.S.; PEREIRA, C.A.M.; VILEGAS, J.; OLIVEIRA, W.P. Production of Dry Extracts of Medicinal Brazilian Plants by Spouted Bed Process: Development of the Process and Evaluation of Thermal Degradation During Operation. **Trans IChemE**. v. 79, Part C, September, 2001.

SANTOS, E.V.M. Extração de matérias-primas vegetais. In: Sharapin, N. **Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Santafé de Bogotá: Cytel. 2000. p. 27-60.

SOUZA, C.R.F. **Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos spray-dryer e leito de jorro**. 2003. 208p. Dissertação - USP, Ribeirão Preto.

SOUZA, C.R.F. **Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras: estudo da viabilidade técnica e econômica do processo em leito de jorro**. 2007. 219f. Tese - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.

SOUZA, O.V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; ALMEIDA, B.H.; MIRANDA, M.A.; FIGUEIRAS, R.C.; CAMPOS, A.C.; SILVÉRIO, M.S. Efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato *Posoqueria acutifolia* Mart. (Rubiaceae) em roedores. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.28, n.1, p. 51-56, 2007.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. 2009. p. 32-65.

TEIXEIRA, H.F. Avaliação da Influência de Adjuvantes Farmacêuticos sobre as Características Físicas, Químicas, Tecnológicas e Farmacológicas de Extratos Secos Nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae – Marcela, **Caderno de Farmácia**. v. 13. n.2. p. 151-152. 1997.

Capítulo X

12. EXTRATO SECO POR SPRAY DRYER

12.1. Otimização do Processo de Obtenção e Caracterização Físico-química do Extrato Nebulizado de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

Artigo a ser submetido ao Journal Thermal Analysis and Calorimetry

12.1. Otimização do Processo de Obtenção e Caracterização Físico-química do Extrato Nebulizado de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

¹Silva, R.M.F.; ¹Gomes, T.C.B.L.; ²Campos, A.F.; ²Silva, J.L.A.; ³Matias, W.N.;
³Souza, F.S.; ⁴Freitas, M.C.C.; ⁴Arruda, M.S.P.; ⁴Silva, M.N.; ^{*1}Rolim Neto, P.J.

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco;
²Laboratório de Microscopia, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste;
³Laboratório de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Universidade Federal da Paraíba; ⁴Departamento de Química, Universidade Federal do Pará.

RESUMO

Os extratos secos por nebulização são preparações sólidas obtidas na forma de pó ou granulado após a eliminação do solvente de extração, o qual pode ser obtido na presença ou não de adjuvantes farmacêuticos. Este trabalho teve como objetivo caracterizar os extratos secos de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) obtidos por *spray dryer*, utilizando a análise térmica, área superficial específica, tamanho de partícula e cromatografia líquida de alta eficiência. Não houve diferenças significativas na análise térmica das amostras analisadas dos extratos secos por aspersão nas temperaturas de atomização 140, 160 e 180°C. Os resultados de área superficial específica variaram inversamente com o tamanho médio de partícula das amostras analisadas. À medida que a área superficial específica aumentou, o valor do tamanho médio de partícula diminuiu. Na análise do teor do marcador por cromatografia líquida de alta eficiência, não houve diferenças significativas entre as amostras dos extratos secos obtidas com as temperaturas de atomização 140, 160 e 180°C, embora o flavonóide tenha se apresentado mais estável quando utilizada a temperatura de atomização 160°C.

Palavras-chave: *Peperomia pellucida*, *spray dryer*, área superficial específica, tamanho de partícula, cromatografia líquida de alta eficiência.

1. INTRODUÇÃO

Os extratos secos por nebulização são preparações sólidas obtidas na forma de pó ou granulado após a eliminação do solvente de extração, o qual pode ser obtido na presença ou não de adjuvantes farmacêuticos (Farmacopéia Brasileira, 1988). A

declaração dos extratos secos deve conter, além da denominação da droga, a mistura extrativa que deu origem ao produto, a relação ponderal da droga para uma parte de extrato, a concentração da substância marcadora e os adjuvantes presentes (Mouette, 1988).

No desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, a técnica de secagem por nebulização (*spray drying*) tem sido bastante empregada com intuito de se obter produtos intermediários com maior concentração de constituintes químicos e com melhores características tecnológicas. Os produtos secos apresentam vantagens relacionadas com a homogeneidade de distribuição dos constituintes da preparação e maior estabilidade física (Casadebaig *et al.*, 1989; Moura *et al.*, 1994; Gonzáles; Schimidt, 1995; Senna *et al.*, 1997; Vasconcelos *et al.*, 2005).

A otimização das características físicas e químicas dos materiais utilizados nessa técnica envolve geralmente a comparação entre parâmetros de processo tais como aquecimento, volume de ar ou tipo de terminação do aplicador (Wendel & Celik, 1998).

Os secadores por nebulização atuam por aspersão ou atomização, diferindo dos outros tipos de secadores por usar materiais fluidos, soluções e suspensões. A secagem ocorre quando as gotículas aspergidas na câmara de secagem entram em contato com o calor, transmitindo por convecção, e sofrem um choque térmico atingindo rapidamente a temperatura do gás que às envolve (LIST & SCHIMIDT, 1989; LACHMAN *et al.*, 2001).

O líquido presente na superfície evapora e é substituído em seguida por uma camada sólida. O calor absorvido transforma-se em calor latente e o líquido interno começa a ser transferido para o exterior, por difusão, de forma mais lenta do que a taxa de transferência de calor da superfície para o interior da partícula, até que entrem em equilíbrio. A pressão interna no material durante essa transferência de energia faz com que as partículas aumentem de tamanho (COHEN & YANG, 1995; LACHMAN *et al.*, 2001). Para que esse processo seja eficiente, a mistura deve ser capaz de gerar uma certa elasticidade na superfície e permeabilidade, para que essa troca de energia ocorra sem danos à forma da partícula. Quando não apresentam elasticidade e/ou porosidade, as partículas se rompem, produzindo fragmento da esfera original e, desta forma, obtém-se um pó com características tecnológicas inadequadas (LIST & SCHIMIDT, 1989; MASTERS, 1985; COHEN & YANG, 1995).

Por isso, a solução ou suspensão a ser secada deve ser mantida sob agitação intensa durante o ciclo de secagem. A agitação mantém as partículas suspensas em solução e auxilia na aspersão das partículas em forma de gotículas, permitindo a obtenção de partículas com forma definida. Quando não são aspergidas em solução, elas secam disforme e coalescem (LACHMAN *et al*, 2001; MASTERS, 1985).

Este trabalho teve como objetivo caracterizar os extratos secos da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) obtidos por *spray dryer*, utilizando a análise térmica, área superficial específica, tamanho de partícula e cromatografia líquida de alta eficiência.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Matéria Prima Vegetal

O material vegetal *P. pellucida* foi coletado no município de Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco. A amostra foi identificada pela Dr^a Rita de Cássia Pereira, do Instituto Agrônomo de Pernambuco – PE, e foi registrada com o nº 84031.

Processamento da Amostra

Após a coleta, o material vegetal fresco (toda a planta, incluindo folhas, caules e raízes) foi lavado com água e álcool etílico a 70% e, em seguida, seco à temperatura ambiente, durante 2 dias. A *P. pellucida* foi colocada em uma estufa de ar circulante, durante sete dias, a uma temperatura entre 42 e 45°C. Após a retirada do material vegetal da estufa, este foi triturado em moinho de facas e tamis de 30 mesh, obtendo-se pó seco.

Obtenção da tintura de *P. pellucida*

O método escolhido para a obtenção da tintura de *P. pellucida* foi a maceração. Foi preparada uma tintura na proporção 1:10 (material vegetal/álcool a 70%). Em um reator de aço inoxidável, a droga vegetal ficou em contato com o solvente por 7 dias. (Santos, 2000).

Determinação da porcentagem de resíduo seco total

Exatamente 1 mL de cada tintura foi pipetado e transferido para cápsulas de porcelana previamente taradas. As cápsulas foram colocadas em banho-maria até secar e, em seguida, levadas à estufa a 110°C, até obter peso constante. Após resfriarem em dessecador, as cápsulas foram pesadas, sendo a porcentagem de resíduo seco calculada (Maciel *et al.*, 2006).

Obtenção do extrato seco por *spray dryer*

A tintura foi seca utilizando um equipamento LabPlan® *Spray dryer* SD-05.

Foi realizado um planejamento fatorial 2³, avaliando diferentes temperaturas de atomização (140, 160 e 180°C), percentuais de aerosil® (10 e 30%) e fluxos de ar médio (350 e 600 mL/h).

Foram observados os pesos obtidos por experimento, utilizando 300 mL de tintura em cada experimento.

Análise Térmica

Os extratos secos obtidos por *spray dryer* foram analisados através de Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA). As amostras analisadas foram obtidas com o mesmo percentual de aerosil (30%) e o mesmo fluxo de ar (350 mL/h), apenas se diferenciando na temperatura de atomização (140, 160 e 180°C).

As curvas TG/DTA foram realizadas utilizando uma termobalança modelo TGA 60 Shimadzu®, na faixa de temperatura entre 27 e 600°C, sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL/min), razão de aquecimento 10°C/min e cadinho de platina contendo massa de amostra de 5 mg. A calibração do instrumento foi verificada antes dos ensaios empregando-se um padrão de oxalato de cálcio monoidratado, conforme norma ASTM E1582-93 (The American Society for Testing and Materials, 1993) (Araújo *et al.*, 2006; Storpirts *et al.*, 2009).

Área superficial específica

Foram analisadas as amostras dos extratos secos com a temperatura de atomização de 160°C e 30% de aerosil®, diferenciando no fluxo de ar, uma amostra foi obtida com 350 mL/h e a outra com 600 mL/h.

A medida de área superficial específica foi obtida por adsorção física de nitrogênio sobre o material, pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET).

Para a realização deste ensaio, foi utilizado um analisador de área superficial ASAP 2440 micromeritics[®], munido de software para determinar a área superficial (S_{BET}). Foram pesados aproximadamente 200 mg das amostras as quais foram degaseificadas por 72h a 110°C para remover qualquer material adsorvido na superfície do material.

Tamanho de partícula

Foram analisadas as amostras dos extratos secos com a temperatura de atomização de 160°C e 30% de aerosil[®], diferenciando no fluxo de ar; uma amostra foi obtida com 350 mL/h e a outra com 600 mL/h. Foi utilizado um analisador de tamanho de partícula Microtac[®] S3500.

As amostras foram dispersas em álcool isopropílico na razão de 10 mg/20 mL. Esta dispersão foi agitada no banho ultrassônico Unique[®] mod. USC-1400^a, com potência ultrassônica 135 Watts, durante 3 minutos antes de ser analisada. Cada análise foi realizada em quintuplicata.

Análise do marcador por cromatografia líquida de alta eficiência

Preparação das amostras

As amostras dos extratos secos de *P. pellucida*, obtidas nas temperaturas de atomização 140, 160 e 180°C, foram analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência.

As análises foram realizadas em quintuplicata, pesando-se 20 mg de cada amostra. A massa foi transferida para um tubo de ensaio, adicionados 3 mL de acetona e, em seguida, foi sonicada durante 10 min., utilizando um banho ultrassônico Branson[®] mod. 2510. Posteriormente, a solução obtida foi transferida para frascos de vidro, com o auxílio de pipeta *Pasteur* e um pedaço de algodão utilizado como filtro. Esta solução foi denominada como primeiro volume da extração. A massa retida no tubo de ensaio, foram adicionados mais 3 mL de acetona e transferida ao banho ultrassônico para sonicação durante 10 min.. Após o término da sonicação, a solução foi pipetada, filtrada, e adicionada ao primeiro volume da extração. Homogeneizou-se. A solução

obtida foi filtrada, utilizando um filtro de seringa de nylon de 13 mm e 0,45 μm e, em seguida, foi transferida para uma capela a fim de que todo o solvente fosse evaporado. Após a secagem, a massa proveniente da extração foi tratada por extração em fase sólida (SPE), para reter os interferentes, principalmente clorofila. Solubilizou-se a massa em 900 μL de acetonitrila, com o auxílio do banho ultrassônico por 1 min. Foram adicionados 100 μL de água ultra-pura e a solução foi sonicada por mais 1 min. Em seguida, a solução foi transferida para um cartucho SPE Strata Phenomenex[®] C18E 100 mg/mL, previamente condicionado com 1 mL de acetonitrila e 1 mL de água ultra-pura. A solução coletada nesta extração (V1) foi desprezada, ficando o analito retido no cartucho. A este cartucho, passaram-se mais 2,0 mL da solução acetonitrila:água (9:1), e a solução coletada (V2) foi separada em um frasco de vidro e transferida para a capela para evaporar o solvente. A massa residual foi ressuspensa em 200 μL de acetonitrila e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um método isocrático com 54% de acetonitrila.

Preparação da curva de calibração

Foi preparada uma curva de calibração, nas concentrações de 2, 10, 20, 40 e 100 ppm, utilizando como solvente a acetonitrila e como marcador 3',4',7-tri-O-metoxiflavona, que foi isolado e identificado por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (Silva, 2010).

Equipamento e Parâmetros Cromatográficos

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu[®], composto por duas bombas, modelo LC-10AD, detector com único sinal de absorvância na região do ultravioleta, operando com comprimento de onda em 270 e 400 nm modelo SPD-10AV, degaseificador de membrana, modelo DGU-14A, injetor de amostras Rheodyne 7752i, com alça de amostragem de 20 μL , interface de comunicação Shimadzu[®], modelo CBM-10A acoplado a microcomputador Pentium II com software de integração Class LC-10A

Os parâmetros cromatográficos utilizados foram coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250 x 4,6mm, 5 μm , 110Å), pré-coluna Phenomenex[®] C18 (4,0 x 3,0 mm, 5 μm),

fase móvel acetonitrila:água (54:46), fluxo de 1 mL/min., volume de injeção 20µL e comprimento de onda 342nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação da porcentagem de resíduo seco total

Foram obtidos 1,72% de resíduo seco total.

Os valores aceitáveis para a porcentagem de resíduo total seco para a tintura de *P. pellucida* ainda não foram estabelecidos em nenhuma monografia.

Obtenção do extrato seco por *spray dryer*

Os resultados dos pesos obtidos por experimento com o planejamento fatorial estão apresentados na tabela 01. O dióxido de silício coloidal aumentou o rendimento do produto de acordo com sua concentração (Wendel & Celik, 1998).

Tabela 01: Rendimentos obtidos com os extratos secos por *spray drying* da *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

PLANEJAMENTO FATORIAL			
Temperatura (°C)	Concentração de aerosil® (%)	Fluxo de ar (mL/h)	Peso obtido por experimento (g)
160	10	350	1,00
180	10	350	0,80
160	30	350	2,00
180	30	350	2,00
160	10	600	0,34
180	10	600	0,08
160	30	600	1,19
180	30	600	1,08

Estudos relatam que a utilização de elevadas temperaturas proporcionam um reduzido tempo de exposição do material no processo de secagem (Wendel & Celik, 1998).

As condições experimentais utilizando a temperatura de 140°C apresentaram um baixo rendimento devido a uma maior retenção na câmara principal de secagem. Além disso, embora a temperatura de 140°C do ponto de vista da estabilidade dos componentes seja a mais recomendada em relação a qualquer processo de secagem que envolva calor, o comportamento térmico do extrato seco nesta temperatura, conforme descrito a seguir, não apresentou diferenças significativas, quando comparados com os dados de TG/DTA, em relação às temperaturas de 160 e 180°C.

Temperaturas inferiores de processo produzem grânulos com grande área superficial específica, aumentando a propriedade de aglutinação no comprimido, enquanto que o material obtido em temperaturas mais elevadas apresenta maior compressibilidade (Wendel & Celik, 1998).

Como os parâmetros 160°C/30% de aerosil[®]/350 mL/h e 180°C/30% de aerosil[®]/350 mL/h apresentaram os melhores rendimentos, resolveu-se trabalhar com a temperatura intermediária 160°C, visto que altas temperaturas produzem partículas com velocidade de dissolução menor. Foi escolhido o fluxo de 350 mL/h, ao invés de 600 mL/h, porque altas velocidades de aplicação podem produzir partículas mal formadas devido a uma atomização ineficiente (Wendel & Celik, 1998).

Na secagem de 4,5 L da tintura, utilizando a temperatura 160°C, 30% de aerosil[®] e um fluxo de ar de 350 mL/h, foram obtidos 21,00g de pó seco.

Análise térmica

As curvas TG para as amostras obtidas nas temperaturas de 140, 160 e 180°C apresentaram percentual de perda de massa, referente à água, entre 3,17 e 3,67, não havendo diferenças significativas.

As curvas DTA apresentaram um evento com temperatura inicial 242,91°C e final 473,52°C, com exceção do extrato seco obtido a 180°C que apresentou sua temperatura final em 514,77°C. De acordo com o intervalo referente à decomposição das amostras nas curvas DTA, realizou-se através da análise das curvas TG o percentual de perda de massa desse evento, onde observou-se valores de 23,94; 24,04 e 22,96 para as amostras de 140, 160 e 180°C.

As curvas TG mostram três etapas de perda de massa: a primeira etapa corresponde à perda de água; a segunda etapa corresponde à primeira etapa de decomposição térmica e a terceira etapa corresponde à segunda etapa de decomposição térmica. De acordo com as derivadas das curvas TG, não foram evidenciadas etapas referentes à degradação.

As curvas DTA evidenciaram a perda de água até 100°C com pico característico, colaborando com os resultados obtidos nas curvas TG e evento exotérmico referente à decomposição do material. Baseando-se nos resultados obtidos, as amostras apresentaram comportamentos térmicos semelhantes referentes ao percentual de água e decomposição, ficando evidente a integridade dos produtos nas três condições analisadas, conforme apresentado na Figura 1.

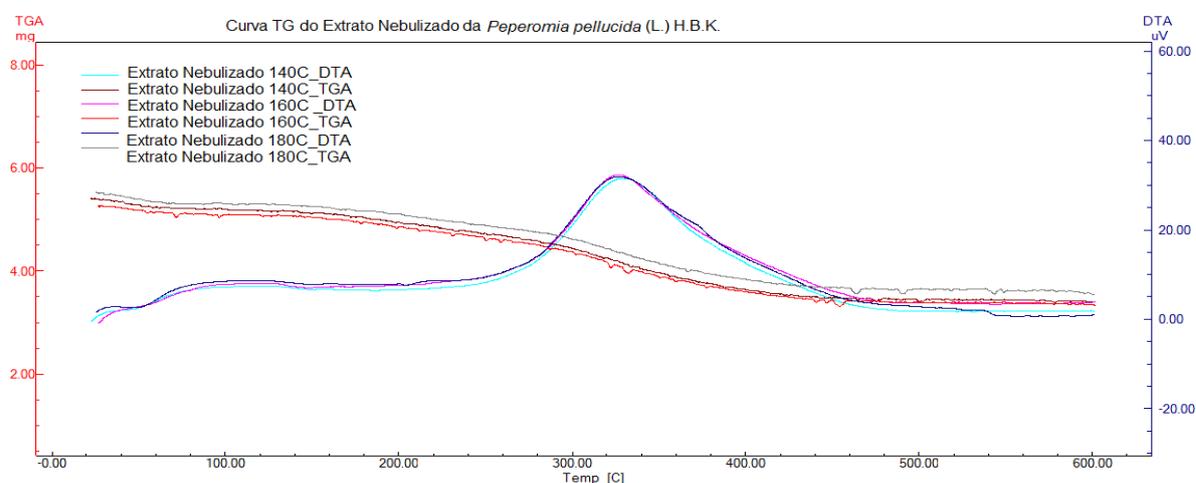


Figura 1. Curva TG/DTA do extrato seco por *spray dryer* de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) obtida na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando fluxo de nitrogênio de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando as temperaturas de atomização 140, 160 e 180°C.

Área superficial específica

Em uma mistura de partículas de vários tamanhos, ou seja, numa amostra polidispersa, duas propriedades são importantes: a textura e a área superficial das partículas individuais, e a variação do tamanho, número ou peso das partículas presentes (Lima, 2000).

A área superficial das partículas pode estar relacionada às propriedades físico-químicas e farmacológicas de um fármaco. Clinicamente, a área da partícula do fármaco pode interferir em sua liberação da forma farmacêutica. Na produção de comprimidos e cápsulas, por exemplo, o controle da área das partículas é essencial na obtenção de

propriedades de fluxo necessárias ao processo e de misturas homogêneas de grânulos e pós (Lima, 2000).

O método BET baseia-se na determinação do volume de N₂ adsorvido a diversas pressões relativas, na temperatura do nitrogênio líquido (77K).

Os resultados para a determinação da área superficial específica para as amostras dos extratos secos com a temperatura de atomização de 160°C e 30% de aerosil[®], com 350 mL/h e com 600 mL/h, foram 41,3311 m²/g e 16,5824 m²/g.

Em virtude da maior área superficial melhorar a solubilidade do extrato seco, a amostra obtida com a temperatura de atomização de 160°C e 30% de aerosil[®] e um fluxo de 350 mL/h apresenta uma melhor biodisponibilidade do que a amostra obtida com 600 mL/h.

Tamanho de partícula

A técnica utilizada se baseia em a luz ao interagir com a matéria particulada pode ser espalhada (mudança de direção) sem sofrer alteração de sua energia (espalhamento Rayleigh). Este espalhamento é função do tamanho da partícula. Portanto, a distribuição do tamanho de partículas pode ser determinada pela análise do espalhamento de luz produzido. O equipamento Microtrac[®] S3500 emprega um sistema de três lasers operando em conjunto com um arranjo de fotodeteção que varre ângulos de espalhamento unificado da luz (UST – Unified Scatter Technique).

Foram analisadas as amostras dos extratos secos com a temperatura de atomização de 160°C e 30% de aerosil[®], diferenciando no fluxo de ar; uma amostra foi obtida com 350 mL/h e a outra com 600 mL/h. As demais amostras obtidas através do planejamento fatorial, utilizando a temperatura de atomização 160°C, não foram analisadas por não apresentarem uma boa dispersão em diversos solventes testados.

Os dados das análises de distribuição de tamanho de partículas mostraram que a amostra obtida com 350 mL/h e com 600 mL/h apresentaram diâmetros médios das partículas em torno de 20,22 e 23,31, respectivamente. A figura 2 apresenta um gráfico típico para a distribuição de tamanho para as amostras analisadas.

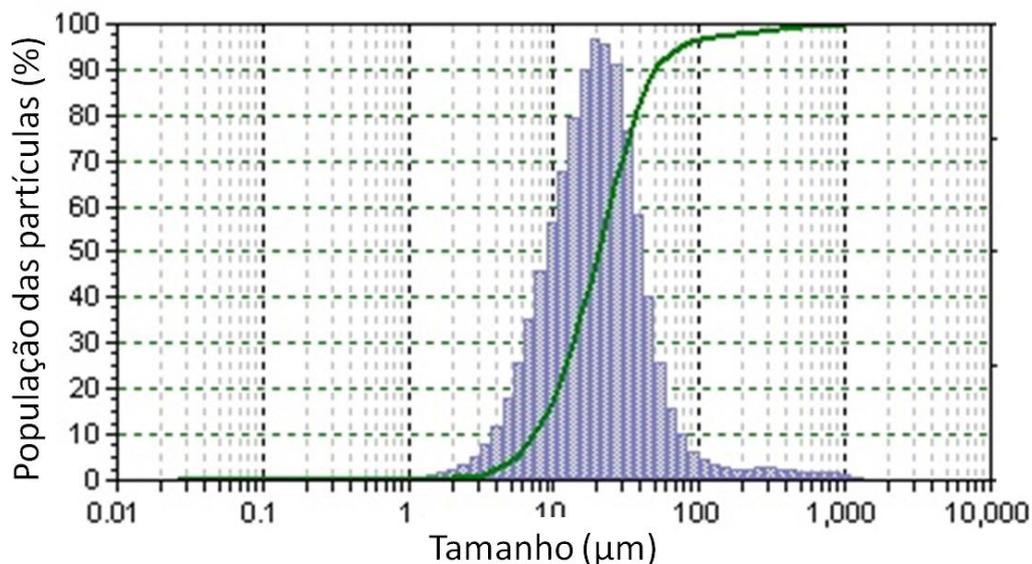


Figura 2. Distribuição do tamanho de partículas para as amostras dos extratos secos de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) obtidos por *spray dryer* com a temperatura de atomização de 160°C e 30% de aerosil®.

Em virtude do menor tamanho de partícula melhorar a solubilidade do extrato seco, a amostra obtida com a temperatura de atomização de 160°C e 30% de aerosil® um fluxo de 350 mL/h apresenta uma melhor biodisponibilidade do que a amostra obtida com 600 mL/h.

Análise do marcador por cromatografia líquida de alta eficiência

As amostras dos extratos secos de *P. pellucida*, obtidas nas temperaturas de atomização 140, 160 e 180°C apresentaram 0,87; 1,05 e 0,93mg de 3',4',7-tri-O-metoxiflavona em cada 100 g da amostra, respectivamente. Não houve diferenças significativas entre os valores obtidos com o teor do marcador nas diferentes temperaturas analisadas, embora na temperatura de 160°C, o flavonóide tenha se apresentado um pouco mais estável.

Os cromatogramas da curva de calibração de *P. pellucida*, na concentração de 40 ppm, e de uma das amostras do extrato seco obtida na temperatura de atomização 160°C estão apresentados nas Figuras 3 e 4.

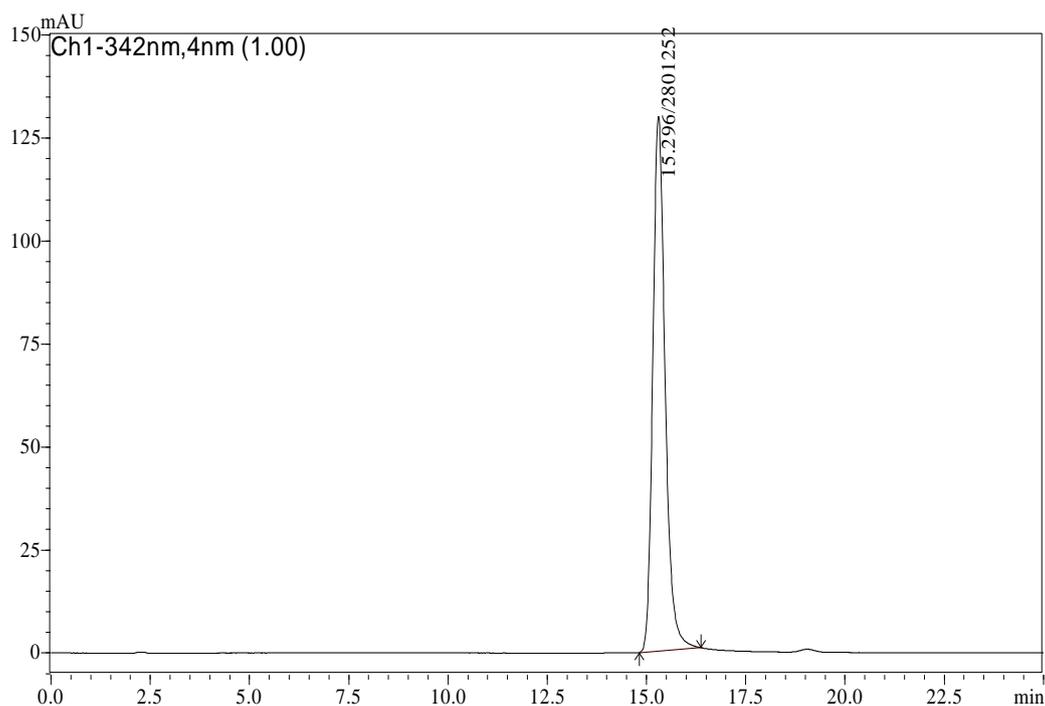


Figura 3. Cromatograma da curva de calibração de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) na concentração de 40 ppm. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresentou um tempo de retenção em 15,29 min.

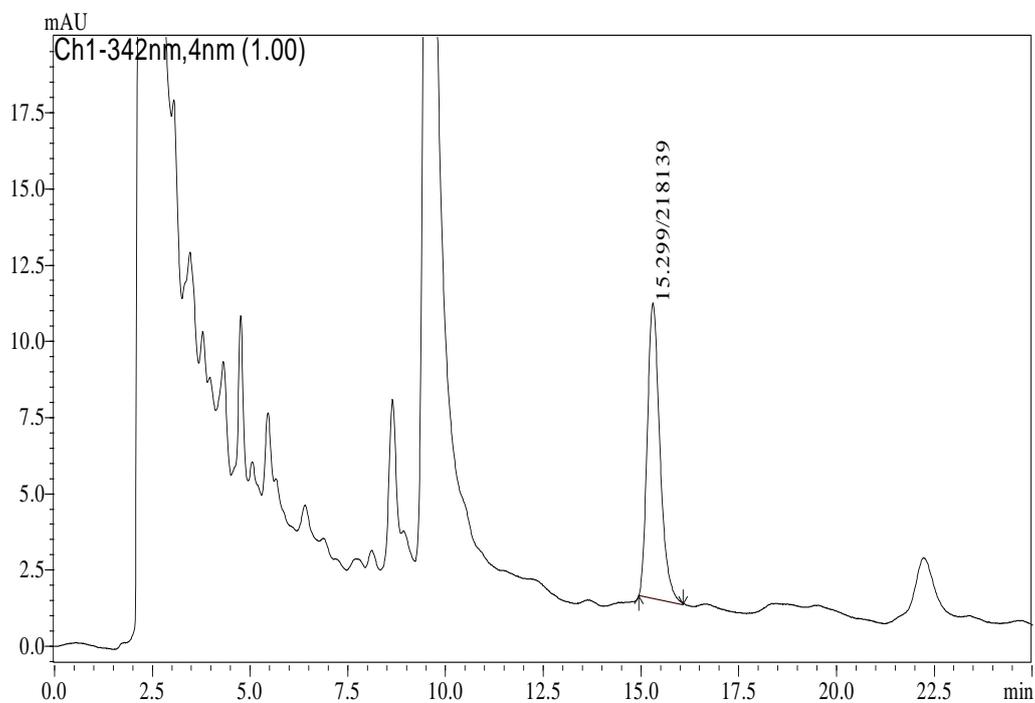


Figura 4. Cromatograma da amostra de extrato seco de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) na temperatura de atomização 160°C. A 3',4',7-tri-O-metoxiflavona apresentou um tempo de retenção em 15,29 min.

4. CONCLUSÃO

Não houve diferenças significativas na análise térmica das amostras analisadas dos extratos secos por aspersão nas temperaturas de atomização 140, 160 e 180°C.

Os valores de área superficial específica variaram inversamente com o tamanho médio de partícula das amostras analisadas. À medida que a área superficial específica aumentou, o valor do tamanho médio de partícula diminuiu (Nery *et al.*, 2008).

Na análise do teor do marcador por cromatografia líquida de alta eficiência, não houve diferenças significativas entre as amostras dos extratos secos obtidas com as temperaturas de atomização 140, 160 e 180°C. Contudo, o flavonóide se apresentou mais estável quando utilizada a temperatura de atomização 160°C.

Os resultados obtidos contribuíram para a seleção dos parâmetros 160°C de temperatura de atomização, 30% do adjuvante de secagem aerosil[®] e 350 mL/h de fluxo os quais poderão ser utilizados na obtenção de extrato seco por *spray dryer* no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas.

5. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A.A.S.; MERCURI, L.P.; SEIXAS, S.R.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R.. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. vol. 42, nº 2, 2006, p. 269-277.

CASADEBAIG, J; JACOB, M.; CASSANAS, G.; GAUDY, D.; BAYLAC, G.; PUECH, A. Physicochemical and pharmacological properties of spray drying powders from *Flaximus excelsior* lead extracts. Journal of Ethnopharmacology, v. 26, p. 211 – 216, 1989.

COHEN, J.S.; YANG, T.C.S. Progress in food dehydration, Trends Food Science Technology, v.6, 1995, p. 20-25.

GONZÁLES, G.O.; SCHIMIDT, P.C. Obtención de comprimidos conteniendo extractos atomizados de flor de la pasión (*Pásiflora incarnata* L.) Acta Farm. Bonaerense, v. 14, p. 173 – 180, 1995.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988, p. IV-7.

LACHMANN, L. LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001, v.2, cap. 27, p. 1357-1439.

LIMA, E.M. Propriedades Reológicas Aplicáveis á Tecnologia de Formas Farmacêuticas Sólidas. *Fármacos & Medicamentos*. Nº 04, Ano I, p. 20-30, 2000.

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. *Phytopharmaceutical Technology*. Boca Raton: CRC, 1989, p.19.

MACIEL, R.L., MOREIRA-CAMPOS, L.M., SILVA, B.C., BRANDÃO, M.G.L. Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de arnica *Lychnophora* em comparação com *Arnica Montana*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Jan/Mar, 16(1), 99-104, 2006.

MASTERS, K. *Spray drying handbook*. 4 ed. London: Godwin, 1985. 696 p.

MOUETTE, M.G. Correspondences entre lês formes galéniques dès drogues vegetales. *Lettre Phytoter. Pharm.*, supplement n. 4, p. 53-54, 1988.

MOURA, T.; GAUDY, D.; JACOB, M.; TEROL, A.; PAUVERT, B.; CHAUVET, A. Vitamina C spray drying solution. *Pharm. Acta Helv.* V. 69, p. 77 – 80, 1994.

NERY, C.G.C.; PIRES, M.A.S.; PIANETTI, G.A, VIANNA-SOARES, C.D. Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 44, n. 1, p. 61-73, 2008.

SANTOS, E.V.M. Extração de matérias-primas vegetais. In: Sharapin, N. *Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos*. Santafé de Bogotá: Cytel. 2000. p. 27-60.

SENNA, E.L.; PETROVICK, P.R.; ORTEGA, G.G.; BASSANI, V.L. Preparation and characterization of spray drying powders from *Achyrocline satureioides* (Lam.) de extracts. *Phyther Res.* V. 11, , 1997, p. 123-127.

SILVA, R.M.M. Flavonóides de *Peperomia pellucida*. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará. Belém. 2010. 48p.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. 2009. p. 32-65.

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

WENDEL, S.; CELIK, M. O uso da tecnologia de spray-drying. Pharmaceutical Technology. p. 31-41, 1998.

Capítulo XI

13. DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO

13.1 Desenvolvimento Tecnológico para a Forma Farmacêutica Cápsula à base de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

Artigo a ser submetido a Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas

13.1. Desenvolvimento Tecnológico para a Forma Farmacêutica Cápsula à base de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)

Silva, R.M.F.¹; Gomes, T.C.B.L.¹; Silva, K.E.R.¹; Peixoto, M.S.¹; Rolim, L.A.¹; Costa, S. P.M.¹; Falcão, E.H.L.²; Campos, A.F.³; Rolim Neto, P.J.^{1,*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco;

²Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco;

³Laboratório de Microscopia, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento da forma farmacêutica cápsula à base de extrato seco de *P. pellucida* para o tratamento antimicrobiano e avaliação dos lotes de bancada produzidos, utilizando as determinações do ângulo de repouso e tempo de escoamento, microscopia eletrônica de varredura, porosidade e controle de qualidade físico-químico. Foram manipulados quatro lotes de bancada (I a IV), através de uma planificação qualitativa de diluentes, utilizando como matérias primas flowlac[®], starch[®] 1500, celulose microcristalina 250 e cellactose[®] 80, respectivamente. Baseando-se nos valores obtidos, a fórmula LB I, contendo flowlac[®], foi selecionada entre as 4 propostas. Os resultados de controle de qualidade físico-químicos demonstraram que a formulação selecionada atende aos parâmetros pré-estabelecidos, mostrando-se economicamente viável. Contudo, as metodologias para determinação do teor e dissolução deverão ser otimizadas e validadas.

Palavras-chave: *Peperomia pellucida*, cápsulas, microscopia eletrônica de varredura, porosidade, controle de qualidade físico-químico.

1. INTRODUÇÃO

Peperomia pellucida L. (H.B.K.), planta conhecida na Amazônia, como erva-de-jabuti e, em Pernambuco, como língua-de-sapo, é uma planta utilizada na medicina tradicional indicada como antihipertensiva, antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória e anti-pirética (Hermes *et al.*, 1981; Singh *et al.*, 1983; Bojo *et al.*, 1994; Aziba *et al.*, 2001; Khan & Omoloso, 2002; Arrigoni-Blank *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2008).

.O extrato etanólico de *P. pellucida* possui atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomas aeruginosa*, apresentando uma concentração inibitória mínima de 62,5 µg/mL.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento da forma farmacêutica cápsula à base de extrato seco de *P. pellucida* para o tratamento antimicrobiano, e avaliação dos lotes de bancada produzidos, utilizando as determinações do ângulo de repouso e tempo de escoamento, microscopia eletrônica de varredura, porosidade e controle de qualidade físico-químico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Para o desenvolvimento farmacotécnico, foi realizada uma planificação qualitativa de diluentes (Alves, 2002; Silva *et al.*, 2007), utilizando como matérias primas o extrato etanólico seco por aspersão de *P. pellucida*; flowlac[®] 100 (Meggle[®]), starch[®] 1500 (Colorcon[®]); celulose microcristalina 250 (Blanver Farmoquímica Ltda[®]) e cellactose 80 (Meggle[®]), e utilizados como lubrificantes o estearato de magnésio (Ind. Química Anastácio S/A[®]) e talco (Ind. Química Anastácio S/A[®]). Os equipamentos de produção utilizados foram: balança semi-analítica Denver Instrument[®], misturador tubular e encapsuladeira manual (Multilabor[®]).

2.2. Obtenção do extrato seco por aspersão

2.2.1. Matéria Prima Vegetal

O material vegetal *P. pellucida* foi coletado no município de Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco. A amostra foi identificada pela Dr^a Rita de Cássia Pereira, do Instituto Agrônomo de Pernambuco – PE, e foi registrada com o nº 84031.

2.2.2. Processamento da Amostra

Após a coleta, o material vegetal fresco (toda a planta, incluindo folhas, caules e raízes) foi lavado com água e álcool etílico a 70% e, em seguida, seco à temperatura ambiente, durante 2 dias. *P. pellucida* foi colocada em uma estufa de ar circulante, durante sete dias, a uma temperatura entre 42 e 45°C. Após a retirada do material vegetal da estufa, este foi triturado em moinho de facas e tamis de 30 mesh, obtendo-se pó seco.

2.2.3. Obtenção da tintura de *P. pellucida*

O método escolhido para a obtenção da tintura de *P. pellucida* foi a maceração (Santos, 2000). Foi preparada uma tintura na proporção 1:10 (material vegetal/álcool a 70%).

2.2.4. Obtenção do extrato seco

A tintura foi seca utilizando um equipamento LabPlan[®] *Spray dryer* SD-05, com uma temperatura de atomização 160°C. Foi necessária a adição de 30% de dióxido de silício coloidal (aerosil[®]) como adjuvante de secagem.

2.3. Método de preparo das formulações

Foram manipulados quatro Lotes de Bancada (LB) de 60 cápsulas e massa de 10 g, com peso médio de conteúdo de 150 mg, apresentados na Tabela 1.

O processo foi realizado com duas etapas de mistura, utilizando um misturador tubular. Na primeira etapa, foram homogeneizados o extrato seco de *P. pellucida* e o diluente, durante cinco minutos. Em seguida, foram adicionados e homogeneizados por dois minutos o estearato de magnésio e o talco. O produto foi encapsulado em invólucro “2” branco e verde (Capsugel[®]) e acondicionado em recipiente de polietileno hermeticamente fechado (Nigro & Carazzatto, 1999).

Tabela 1. Porcentagem de extrato etanólico seco de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K) e dos excipientes utilizados na formulação de cápsulas relativas aos Lotes de Bancada (I a IV)

Componentes	LB I (%)	LB II (%)	LB III (%)	LB IV (%)
Extrato etanólico seco de <i>P. pellucida</i>	66,67	66,67	66,67	66,67
Aerosil®	20,00	20,00	20,00	20,00
Flowlac® 100	12,33	-	-	-
Starch® 1500	-	12,33	-	-
Celulose microcristalina 250	-	-	12,33	-
Cellactose 80®	-	-	-	12,33
Estearato de Magnésio	0,70	0,70	0,70	0,70
Talco	0,30	0,30	0,30	0,30

LB: Lote de Bancada

2.4. Determinação do ângulo de repouso e tempo de escoamento

Os produtos intermediários dos LB I a IV manipulados foram lançados sobre um funil normatizado, deixando-os cair sobre uma folha de papel milimetrado. Com o auxílio de uma régua, mediu-se a altura (h) do triângulo formado e o raio (r) do mesmo. O ângulo formado é a relação existente entre a altura e o raio do triângulo.

O tempo necessário para que ocorra esse escoamento foi verificado com o auxílio de um cronômetro (Prista *et al.*, 1997; Nigro & Carazzatto, 1999).

2.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os produtos intermediários dos LB I a IV também foram analisados através de MEV. Utilizou-se um instrumento Superscan SS-550 Shimadzu®. A voltagem de aceleração foi de 10 kV, a distância de trabalho foi de 10 a 15 mm, e o *spot size* foi de 3 ou 4. As amostras foram depositadas sobre fitas de carbono em *stubs* de alumínio e foram metalizadas com uma camada de ouro de ~20 nm.

2.6. Determinação da Área superficial e Porosidade

Foram pesados 200 mg de cada uma das amostras dos produtos intermediários dos LB I a IV os quais foram previamente tratadas a 100°C por 5 h, em estufa, para otimização do processo de adsorção. Posteriormente, as amostras foram degaseificadas por 48 h a 110°C para remover qualquer material adsorvido no interior dos poros e na superfície do material. Este processo foi realizado no próprio equipamento que possui doze estações de tratamento.

As análises foram realizadas obtendo-se as isotermas de adsorção e dessorção, e aplicando-se os modelos apropriados para o ajuste dos pontos experimentais. A isoterma de adsorção/dessorção foi obtida pela adsorção física progressiva de nitrogênio a 77 K sobre o material, e subsequente dessorção. A aplicação do modelo de Brunauer-Emmett-Teller (BET) sobre a porção apropriada da curva forneceu o valor da área superficial (S_{BET}). Para a determinação da porosidade (tamanho de poro e volume total de poros), foi utilizado o método de Barret-Joyner-Halenda (BJH).

Para a realização destes ensaios, foi utilizado um Analisador de Área Superficial e Tamanho de Poros ASAP 2440 micromeritics[®], munido de software próprio para determinar a área superficial e porosidade.

2.7. Controle de qualidade físico-químico

O controle de qualidade físico-químico (Guedes, 1987) dos Lotes de Bancada foram realizados utilizando os seguintes equipamentos: balança analítica (Mettler[®]); desintegrador (Nova Ética[®]), aparelho para determinação de umidade (Sartorius Moisture Analyzer[®]), cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Shimadzu[®]) e aparelho de dissolução (Varian[®]).

As metodologias analíticas para peso médio, desintegração, e umidade seguiram a Farmacopéia Brasileira IV ed., e a da uniformidade de peso seguiu a United States Pharmacopoeia 33. As metodologias para a análise do marcador por cromatografia líquida de alta eficiência, e para a dissolução estão descritas abaixo.

Análise do marcador por cromatografia líquida de alta eficiência

Preparação das amostras

As amostras dos LB I a IV foram analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência.

As análises foram realizadas em triplicata, pesando-se 100 mg de cada amostra. A massa foi transferida para um tubo de ensaio, adicionados 3 mL de acetona e, em seguida, foi sonicada durante 10 min., utilizando um banho ultrassônico Branson[®] mod. 2510. Posteriormente, a solução obtida foi transferida para frascos de vidro, com o auxílio de pipeta *Pasteur* e um pedaço de algodão utilizado como filtro. Esta solução foi denominada como primeiro volume da extração. À massa retida no tubo de ensaio, foram adicionados mais 3 mL de acetona e transferida ao banho ultrassônico para sonicação durante 10 min. Após o término da sonicação, a solução foi pipetada, filtrada, e adicionada ao primeiro volume da extração. Homogeneizou-se. A solução obtida foi filtrada, utilizando um filtro de seringa de nylon de 13 mm e 0,45 µm e, em seguida, foi transferida para uma capela a fim de que todo o solvente fosse evaporado. Após a secagem, a massa proveniente da extração foi tratada por extração em fase sólida (SPE), para reter os interferentes, principalmente clorofila. Solubilizou-se a massa em 900 µL de acetonitrila, com o auxílio do banho ultrassônico por 1 min. Foram adicionados 100 µL de água ultra-pura e a solução foi sonicada por mais 1 min. Em seguida, a solução foi transferida para um cartucho SPE Strata Phenomenex[®] C18-E 100 mg/mL, previamente condicionado com 1 mL de acetonitrila e 1 mL de água ultra-pura. A solução coletada nesta extração (V1) foi desprezada, ficando o analito retido no cartucho. A este cartucho, passaram-se mais 2,0 mL da solução acetonitrila:água (9:1), e a solução coletada (V2) foi separada em um frasco de vidro e transferida para a capela para evaporar o solvente. A massa residual foi ressuspensa em 200 µL de acetonitrila e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um método isocrático com 54% de acetonitrila.

Preparação da curva de calibração

Foi preparada uma curva de calibração, nas concentrações de 2, 10, 20, 40 e 100 ppm, utilizando como solvente a acetonitrila e como marcador 3',4',7-tri-O-metoxiflavona, que foi isolado e identificado por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (Silva, 2010).

Parâmetros Cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos utilizados foram coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (250 x 4,6mm, 5 µm, 110Å), pré-coluna Phenomenex[®] C18 (4,0 x 3,0 mm, 5 µm), fase móvel acetonitrila:água (54:46), fluxo de 1 mL/min., volume de injeção 20 µL e comprimento de onda 342nm.

Dissolução

Os parâmetros utilizados para o teste de dissolução foram: meio de dissolução - água destilada contendo 0,5% de lauril sulfato de sódio, volume do meio – 900 mL, rotação - 50 rpm, aparato - cesta e um intervalo de tempo igual a 45 min.

Os parâmetros cromatográficos foram os mesmos utilizados para a análise do marcador descrita anteriormente.

Preparação das amostras

Foram coletados 20 mL de cada amostra e a solução foi transferida para um cartucho SPE Strata Phenomenex[®] C18-E 1000 mg/6 mL, previamente condicionado com 5 mL de acetonitrila e 5 mL de água ultra-pura. A solução coletada nesta extração (V1) foi desprezada, ficando o analito retido no cartucho. A este cartucho, passaram-se 5 mL de acetonitrila, e a solução obtida foi filtrada, utilizando um filtro de seringa de nylon de 13 mm e 0,45 µm, e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um método isocrático com 54% de acetonitrila.

Foi preparada uma solução do marcador 3',4',7-tri-O-metoxiflavona, utilizando como solvente acetonitrila, na concentração de 15 mg/mL, que foi utilizada como padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram utilizados os diluentes flowlac[®] (lactose obtida por *spray dryer*), starch[®] 1500 (amido pré-gelatinizado), celulose microcristalina 250, e cellactose[®] 80 (mistura de 75% de α -lactose monohidratada com 25% de celulose).

Estes excipientes utilizados são considerados “excipientes modernos”. São excipientes modificados que podem influenciar de forma significativa na morfologia, tamanho de partícula, área superficial específica, porosidade e densidade da formulação manipulada. Possuem elevada performance e transferem essa característica para a formulação final permitindo transposição de escala industrial e aumento da solubilidade de princípios ativos. Permitem redução da quantidade de excipientes utilizados, simplificando a forma farmacêutica final e o processo produtivo (RIOS, 2006).

3.1. Determinação do ângulo de repouso e tempo de escoamento

Os valores obtidos com a determinação do ângulo de repouso para os LB I, II, III e IV foram 4,61°; 4,57°; 4,97° e 3,99°, respectivamente. Quando o valor do ângulo é

menor ou igual a 30° , o pó apresenta bom escoamento e, se o valor deste ângulo for superior a 40° , a forma farmacêutica apresentará um fluxo ruim (Prista *et al.*, 1997; Nigro & Carazzatto, 1999).

Com relação ao tempo de escoamento, os quatro lotes manipulados apresentaram um tempo de escoamento de apenas 1 segundo. Pós com tempo de escoamento inferior ou igual a 10 s apresentam um bom fluxo na encapsuladeira (Prista *et al.*, 1997; Nigro & Carazzatto, 1999).

Todos os LB apresentaram um bom escoamento, sendo confirmado na prática durante a manipulação dos mesmos. Portanto, utilizou-se um adequado percentual de lubrificantes (estearato de Mg e talco) nas formulações.

Os lubrificantes têm como finalidade facilitar o escoamento dos pós pelo equipamento, favorecendo o enchimento das cápsulas e diminuindo a aderência (Niro & Carazzatto, 1999).

Porém, foi observado que os LB II e III apresentaram um pouco de dificuldade durante o encapsulamento devido a uma menor densidade dos pós.

3.2. Microscopia eletrônica de varredura

O LB I apresentou partículas esféricas, com tamanhos entre 10 e 100 μm , superfície irregular, possivelmente devido a alguma porosidade, e alguns aglomerados quebrados.

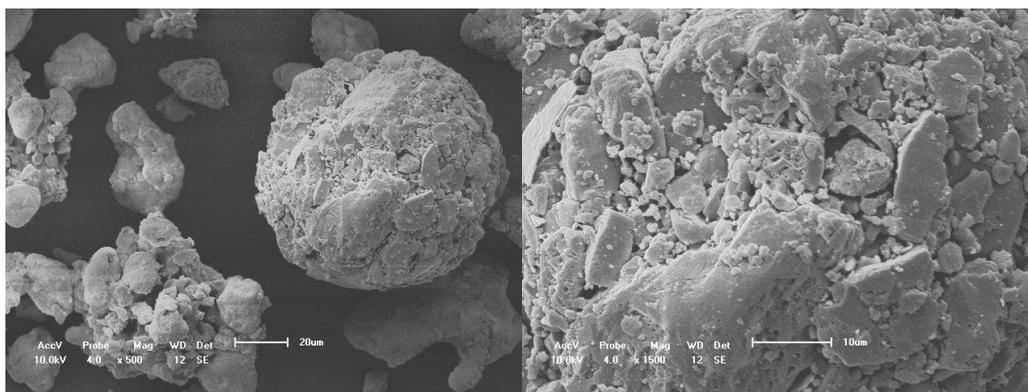


Figura 1. Fotomicrografia do Lote de bancada I. As barras de escala nas figuras equivalem a 20 μm , com aumento de 500x (à esquerda) e 10 μm , com aumento de 1500x (à direita).

O LB II apresentou blocos e uma grande distribuição de partículas com formatos irregulares, com tamanhos entre 10 e 100 μm .

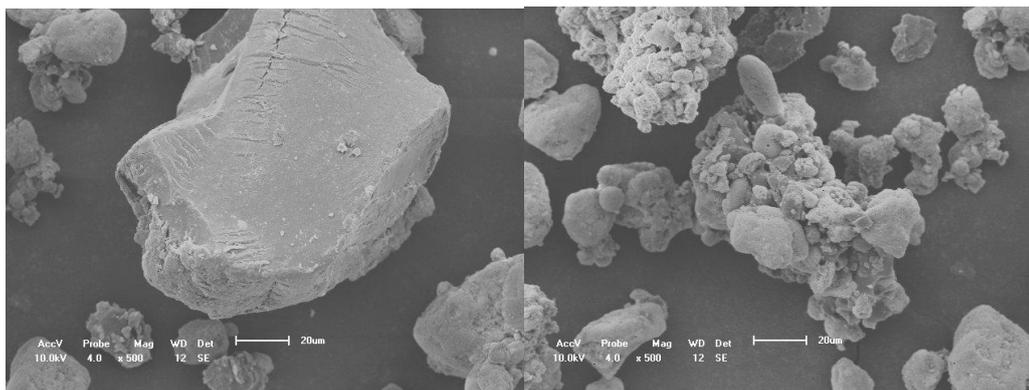


Figura 2. Fotomicrografia do Lote de bancada II. As barras de escala nas figuras equivalem a 20 µm, com aumento de 500x (à esquerda e à direita).

O LB III apresentou partículas grandes, irregulares, materiais mais alongados e blocos grandes.

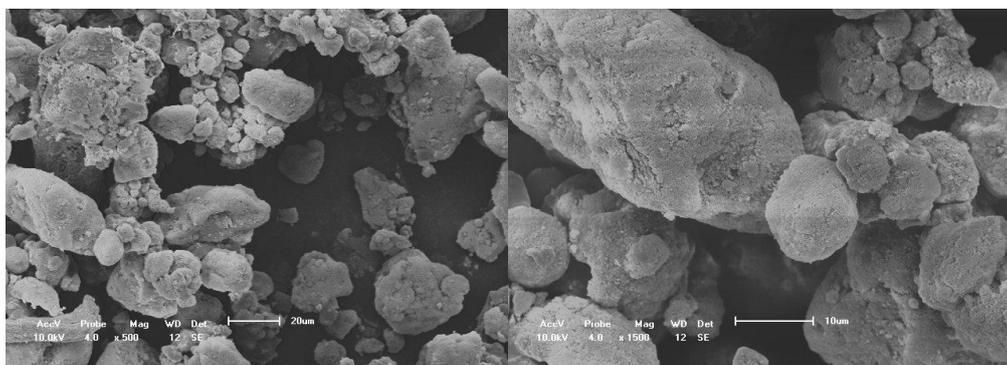


Figura 3. Fotomicrografia do Lote de bancada III. As barras de escala nas figuras equivalem a 20 µm, com aumento de 500x (à esquerda) e 10 µm, com aumento de 1500x (à direita).

O LB IV apresentou uma distribuição de partículas de formatos regulares e alguns aglomerados.

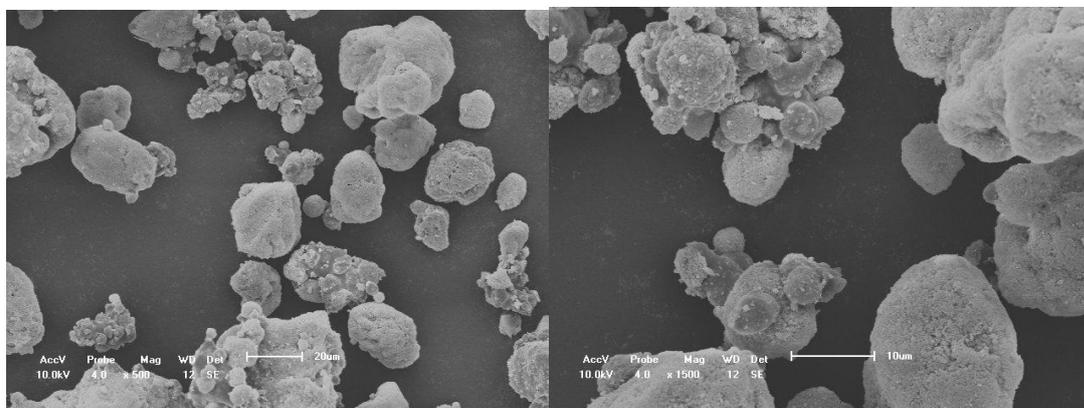


Figura 4. Fotomicrografia do Lote de bancada IV. As barras de escala nas figuras equivalem a 20 μm , com aumento de 500x (à esquerda) e 10 μm , com aumento de 1500x (à direita).

3.3. Determinação da Área superficial e Porosidade

O pré-tratamento térmico empregado nas amostras teve por objetivo retirar umidade ou traços residuais de vapor ou qualquer outro solvente que pudessem ocupar algum espaço (Nery *et al.*, 2008).

Os resultados da área superficial e porosidade estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados de área superficial e porosidade das amostras dos Lotes de Bancadas I a IV

Amostra	Área superficial (BET)	Volume de Poro	Tamanho de Poro
LB I	18,9945 m^2/g	0,125092 cm^3/g	263,4270 Å
LB II	22,0951 m^2/g	0,118531 cm^3/g	214,5834 Å
LB III	30,8535 m^2/g	0,161473 cm^3/g	209,3420 Å
LB IV	32,2697 m^2/g	0,151046 cm^3/g	187,2298 Å

LB: Lote de Bancada

Todos os produtos seguiram a isoterma de BET apresentando linearidade segundo o modelo proposto por Brunauer-Emmett-Teller (1938) para cálculo da área superficial.

A faixa de aplicação da isoterma de BET é válida para a determinação de microporos ($< 20 \text{ Å}$) e mesoporos (entre 20 Å e 500 Å) (Nery *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos afirmam que os produtos analisados possuem mesoporos.

Considerando o parâmetro molhabilidade das partículas, em virtude do maior tamanho de poros, a formulação do LB I possibilita uma melhor dissolução das cápsulas obtidas.

3.4. Controle de Qualidade Físico-químico

Os resultados para o controle de qualidade físico-químico estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores relativos aos ensaios físico-químicos efetuados nos lotes de bancada (I a IV)

Testes	Especificações	LB I	LB II	LB III	LB IV
Peso médio da cápsula	0,2100 g \pm 10%	0,2091	0,2048	0,2073	0,2076
Peso médio do conteúdo	0,1500 g \pm 10%	0,1484	0,1446	0,1471	0,1456
Desintegração	Não mais que 30 min	5 min	5 min	5 min	5 min
Umidade (%)	Não mais que 5,0%	2,94	2,00	1,00	2,97
Teor (%)	90,0 a 110,0%	91,32	90,33	91,26	90,22
Dissolução (%)	Não menos que 80% em 45 min	15,70	8,80	10,50	9,74
Uniformidade de Peso (%)	85 a 115%	89,97	89,10	91,08	88,00

Em se tratando de peso médio da cápsula, peso médio do conteúdo, desintegração, umidade, teor e uniformidade de peso, todos os LB manipulados atenderam às especificações. Porém, a metodologia utilizada no teor precisará ser otimizada e validada, a fim de melhorar a recuperação do marcador na extração sugerida pelo método.

Com relação à dissolução, todos os LB apresentaram baixos valores, dentre eles, o LB I apresentou o melhor resultado, conforme confirmado pela determinação da porosidade. Contudo, essa metodologia também deverá ser otimizada e validada. Deverão ser realizados testes aumentando a rotação para 75 e 100 rpm, a concentração do tensoativo lauril sulfato de sódio para 1,00%, o tempo de coleta das amostras para 60 min., e diminuindo o volume do meio de dissolução para 500 mL. Também deve-se considerar que o marcador analisado é apenas um marcador químico. Deverão ser realizados os testes farmacológicos a fim de comprovar a eficácia *in vitro* e *in vivo* da substância analisada, confirmando a sua utilização como padrão para o teste de dissolução.

4. CONCLUSÃO

Os estudos de pré-formulação conduziram à definição da forma farmacêutica cápsula.

Na determinação do ângulo de repouso e tempo de escoamento, todos os LB apresentaram um bom escoamento.

Na microscopia eletrônica de varredura, os melhores resultados foram obtidos com os LB I e IV.

Na determinação da porosidade, o LB I apresentou o maior valor de tamanho de poros, possibilitando uma melhor molhabilidade da formulação.

A fórmula LB I, contendo flowlac[®], foi selecionada entre as 4 propostas. Os resultados de controle de qualidade físico-químicos demonstraram que a formulação selecionada atende aos parâmetros pré-estabelecidos, mostrando-se economicamente viável. Contudo, as metodologias para determinação do teor e dissolução deverão ser otimizadas e validadas.

Os resultados obtidos fornecerão parâmetros para que empreendedores da indústria farmacêutica baseiem-se para a produção e controle de qualidade de intermediários e do produto acabado à base de *P. pellucida*.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, F.C. Desenvolvimento de formas farmacêuticas de β -lapachona para utilização em terapias antineoplásicas. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. 2002. 157p.

ARRIGONI-BLANK, M.; DMITRIEVA, E.G.; FRANZOTTI, E.M.; ANTONIOLLI, A.R.; ANDRADE, M.R.; MARCHIORO, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). J Ethnopharmacol. 2004; 91: 215-8.

AZIBA, P.I.; ADEDEJI, A.; EKOR, M.; ADEYEMI, O.; Analgesic activity of *Peperomia pellucida* aerial parts in mice. Fitoterapia 72 (2001) 57-58.

BOJO, A.C.; ALBANO-GARCIA, E.; POCSÍDIO, G.N. The antibacterial activity of *Peperomia pellucida* (L.) H.B.K. (Piperaceae). Ásia Life Sciences 3, 1994. p. 35-44.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu editora, 1988. pt.1, p. v.1.5-v.1.5.-4.

GUEDES, L. C. Controle de qualidade na indústria farmacêutica. Rio de Janeiro: Editora confederação Nacional da Indústria, 1987. p.33-68.

HERMES, A.G.; HERMES, E. G.; CAVALCANTE, F.L.M.; LUNA, M.S.; LEAL, R.A.; CUOCO, V.; LINS, A.F.A.; SORIANO, S. Ações Anti-hipertensivas da *Peperomia pellucida* (L.) em Cães e na Espécie Humana. Raízes; Cl. Bio. Cl. Saúde, Belém, 1981, 1(1): 47-52, jul.

KHAN, M.R.; OMOLOSO, A.D. Antibacterial activity of *Hygrophila stricta* and *Peperomia pellucida*. *Fitoterapia* 73 (2002) 251-254.

KHAN, A.; RAHMAN, M. ISLAM, S. Antipyretic Activity of *Peperomia pellucida* Leaves in Rabbit. *Turk J Biol* 32 (2008) 37-41.

NERY, C.G.C.; PIRES, M.A.S.; PIANETTI, G.A, VIANNA-SOARES, C.D. Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* vol. 44, n. 1, p. 61-73, 2008.

NIGRO, P.R.A.; CARAZZATTO, R. A Farmacotécnica das Cápsulas. *Revista Racine*, nº 52, 1999. p. 19 – 22.

PRISTA,L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. Tecnologia farmacêutica. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1997. p.291-297.

RIOS, M. Debating excipients functionality. *Pharmaceutical Technology*. 2 September 2006 Disponível em : <http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/Special+Report/Debating-Excipient-Functionality/ArticleStandard/Article/detail/3711322>. Acesso em: 03 mar 2010.

SANTOS, E.V.M. Extração de matérias-primas vegetais. In: Sharapin, N. Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos. Santafé de Bogotá: Cytel. 2000. p. 27-60.

SILVA, R.M.F.; OLIVEIRA, F.H.C.; ROLIM, C.M.B.; PIMENTEL, M.F.; MEDEIROS, F.P.M.; ALBUQUERQUE, M.M.; ROLIM NETO, P.J. Cápsulas de sulfato de indinavir: desenvolvimento farmacotécnicoindustrial, desenvolvimento do método de dissolução e avaliação. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. vol. 43, n. 3, 2007.p. 385-395.

SILVA, R.M.M. Flavonóides de *Peperomia pellucida*. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará. Belém. 2010. 48p.

SINGH, A.K.; DIKSHIT, A.; DIXIT, S.N. Antifungal studies of *Peperomia pellucida*. Beitrage zur Biologie der Pflanzen. Berlin [BEITR. BIOL. PFLANZ.] Vol. 58, 1983, p. 357-368.

Conclusão e Perspectivas

14. CONCLUSÃO

As características anatômicas e microquímicas foram fundamentais na identificação e caracterização da espécie.

Na espectrofotometria, determinou-se que os flavonóides presentes no material vegetal provavelmente não se tratam de quercetina ou rutina. Contudo, de acordo com a cromatografia líquida de alta eficiência, foi evidente que a fração flavonoídica de *P. pellucida* trata-se de uma mistura de flavonóides os quais precisariam ser isolados e identificados através de métodos espectrométricos, para caracterizar um possível marcador.

Diferentes resultados foram obtidos comparando-se as técnicas convencional e análise térmica de determinação de perda por dessecação e cinzas totais analisados. Estas diferenças podem estar relacionadas à quantidade e uniformidade da amostra analisada e à sensibilidade da técnica empregada, exigindo uma interpretação criteriosa dos valores gerados.

A avaliação da sazonalidade indicou que não há influência dos valores de precipitação das chuvas sobre o teor do marcador utilizado para a *P. pellucida*, a 3',4',7-tri-O-metoxiflavona, nas amostras coletadas nos meses março, maio e agosto de 2010. Na variação da concentração do solvente da maceração (50, 70 e 90%), o marcador apresentou um maior valor de teor na concentração de 70% de álcool etílico.

O extrato etanólico demonstrou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, com uma concentração inibitória mínima de 62,5 µg/mL, e atividade cardiovascular na dose 75 mg/kg.

A micropropagação de *P. pellucida* foi possível utilizando-se gemas axilares jovens.

O extrato seco obtido por *spray dryer* apresentou menor aderência ao equipamento utilizado e partículas esféricas, possibilitando uma melhor fluidez durante o desenvolvimento farmacotécnico-industrial de formas farmacêuticas sólidas.

Os estudos de pré-formulação conduziram à definição da forma farmacêutica cápsula para o tratamento antimicrobiano. Os resultados de controle de qualidade demonstraram que a formulação selecionada atende aos parâmetros pré-estabelecidos, além de mostrar-se economicamente viável. Entretanto, as metodologias para a análise do teor do marcador e para a dissolução precisam ser otimizadas e validadas.

Os resultados obtidos contribuem para a determinação de especificações de uma futura monografia farmacopeica e fornecerão parâmetros para que empreendedores da indústria farmacêutica baseiem-se para a produção de insumos, bem como para o controle de qualidade de intermediários e do produto acabado à base de *P. pellucida*.

15. PERSPECTIVAS

- Realizar o estudo farmacológico do marcador 3',4',7-tri-O-metoxiflavona, para verificar se este possui atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias Gram negativas e Gram positivas que poderão ser testadas;
- Otimizar e validar as metodologias para análise do teor do marcador e estudos de dissolução;
- Realizar os estudos pré-clínicos e clínicos da formulação selecionada, o Lote de Bancada I, contendo flowlac[®] como diluente.
- O extrato etanólico de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) apresentou atividade cardiovascular portanto, pretende-se desenvolver uma formulação com ação anti-hipertensiva.
- Realizar estudo farmacológico do marcador 3',4',7-tri-O-metoxiflavona, para verificar se este possui atividade cardiovascular *in vitro* e *in vivo*.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, N.D.C.; SANTOS, T.C.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C.; LIRA, L.M.; DORNELAS, C.B.; CABRAL, L.M. Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinais do Estado do Rio de Janeiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, supl.13, p.745-53, 2008.

BORGES, L.; SCILIAR, M.; ALMEIDA, S. Biodiversidade brasileira e produtos industriais, Belo Horizonte: UFMG, 2003. Disponível em <http://www.icb.ufmg.br/~ibem/aulas/grad/tge/biodiv/2002/prodindust/>. Acesso em 12 nov. 2003.

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

CAÑIGUERAL, S.; DELLACASSA, E.; BANDONI, A.L. Plantas medicinales y fitoterapia: indicadores de dependência o factores de desarrollo? **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.22, n.3, p. 265-78, 2003.

MIOTO, R. País deixa de gerar US\$ 5 bilhões por ano com fitoterápicos. ABIFISA (Associação brasileira das empresas do setor fitoterápico) [Internet] 2010 [citado 2010 set 23]. Disponível em: http://www.abifisa.org.br/noticias_ver.asp?news=3594.

VIEIRA, R.A. Validação científica de plantas medicinais como fator catalisador no desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional. **Revista Saúde e Ambiente**, v.2, p.57-64, 2001.

ANEXOS

REVISÃO SOBRE ANÁLISE TÉRMICA

**Aplicação da Análise Térmica na Indústria Farmacêutica de Fitoterápicos e
Fitocosméticos**

Artigo submetido à Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

Aplicação da Análise Térmica na Indústria Farmacêutica de Fitoterápicos e Fitocosméticos

Rosali Maria Ferreira da Silva^{1,2}; Magaly Andreza Marques Lyra¹; Thays Cristiane Barbosa Lucena Gomes¹, Graziella Silvestre Marques¹, Monize Santos Peixoto¹, José Lourenço Freitas Neto¹; Lariza Darlene Santos Alves¹; Keyla Emanuelle Ramos Silva¹; Pablo de Ataíde Ferreira¹; Pedro José Rolim Neto¹

¹Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.

²Laboratório de P&D Farmacotécnico, Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará.

RESUMO

Este artigo apresenta a análise térmica como uma ferramenta para os estudos das propriedades físicas e químicas de fitoterápicos e fitocosméticos. Os autores relatam alguns trabalhos da literatura em que diferentes técnicas termoanalíticas são utilizadas tanto no controle da matéria prima, quanto do produto acabado, possuindo potencial emprego no desenvolvimento e na caracterização de novos produtos e avaliação dos processos de secagem. Diante dos estudos apresentados, demonstra-se a importância das técnicas termoanalíticas na indústria de fitoterápicos e fitocosméticos visto à grande variedade de suas aplicações.

Palavras-chave: análise térmica, controle de qualidade, fitoterápicos, fitocosméticos.

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no Brasil vem se consolidando nos últimos tempos em especial com a promulgação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Brasil, 2006).

O novo avanço dos medicamentos fitoterápicos caracteriza-se pela busca de produção em escala industrial, diferentemente das formas artesanais que caracterizaram os estágios iniciais de sua utilização (Turolla; Nascimento, 2006).

Segundo a Associação Brasileira de Empresas do Setor Fitoterápico (ABIFISA), o mercado mundial de fitoterápicos envolve hoje cerca de US\$ 44 bilhões, enquanto que não existem dados oficiais sobre o tamanho desse mercado no Brasil. As estimativas variam entre US\$ 350 milhões e US\$ 550 milhões. Os pesquisadores acreditam que o país, por ser dono da maior biodiversidade do planeta, deveria ter um papel de liderança na área (Miotto, 2010). A fitoterapia é uma forma de prática em saúde que vem crescendo nos últimos anos. A Resolução RDC nº 14/10 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2010) define fitoterápico como todo medicamento obtido exclusivamente utilizando-se matérias primas ativas de origem vegetal. Dentre as vantagens dos fitoterápicos, Pedrosa *et al.* (2001) citam os efeitos sinérgicos, menores riscos de efeitos colaterais e baixos custos de pesquisa. Nos últimos anos, portanto, observa-se um retorno ao uso de ervas e medicamentos delas derivados, tanto nos países em desenvolvimento, como nos desenvolvidos (Bello *et al.*, 2002), onde muitas pessoas continuam adeptas da medicina natural, seja devido ao baixo custo ou por acharem nela o meio ideal para recuperar a saúde e manter o equilíbrio orgânico. Porém é incorreto afirmar que drogas vegetais não fazem mal ao indivíduo, uma vez que, dependendo do princípio ativo e sua concentração, o uso do mesmo pode ser letal (Schulz; Hänsel, Tyler, 2001).

Paralelamente, Fitocosmético pode ser definido como o cosmético que contém ativo natural, de origem vegetal, seja um extrato, óleo ou óleo essencial, cuja ação define a atividade do produto (Isaac *et al.*, 2008). No mercado brasileiro de medicamentos e cosméticos, 25% dos produtos fabricados contêm princípios ativos naturais, demonstrando a importância desses produtos na economia brasileira e também mundial (Silva Júnior *et al.*, 2006).

Diante do exposto, a busca de metodologias confiáveis e de rápida execução para esses tipos de produtos é um desafio enfrentado pelos pesquisadores e surge como

uma necessidade das indústrias farmacêuticas, pela necessidade de garantir a qualidade requerida dos produtos desenvolvidos. Neste sentido, atualmente as novas metodologias analíticas visam substituir os atuais métodos clássicos utilizados no controle de qualidade de produtos naturais, que consomem muito tempo e alto custo, além de utilizarem grandes quantidades de solventes orgânicos e reagentes tóxicos.

Adicionalmente, os métodos fitoquímicos clássicos, utilizam grandes quantidades de extratos vegetais, e tem a cromatografia em placa ou coluna em alumina ou gel de sílica como método para se obter os metabólitos principais em quantidades suficientes para identificação pelos métodos espectroscópicos (ultravioleta-UV, espectrometria de massa-MS, ressonância magnética nuclear-RMN). Porém estas metodologias não são adequadas para o controle de qualidade de fitoterápicos, visto que as indústrias farmacêuticas exigem resultados imediatos. Por outro lado, análises através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG) são utilizadas com bastante eficiência, porém apresentam altos custos operacionais (Aragão *et al.*, 2002).

Visando contornar essas limitações, técnicas de análise térmica vêm sendo desenvolvidas para o controle de produtos naturais. A análise térmica é definida como um grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura e/ou tempo, enquanto essa substância é submetida a um programa controlado de temperatura e sob uma atmosfera específica (Silva; de Paola e Matos, 2007; Storpirtis *et al.*, 2009; Klancnik; Medved; Mrvar, 2010).

Entre as técnicas mais largamente empregadas podem ser citadas: a termogravimetria (TG), a termogravimetria derivada (DTG) a análise térmica diferencial (DTA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Na área de fármacos e medicamentos, as técnicas termoanalíticas são muito adequadas para a caracterização de fármacos sólidos e excipientes; a determinação da pureza de uma dada espécie por DSC a partir da avaliação da endotermia de fusão; a caracterização de polimorfos em fármacos empregando a associação das técnicas de TG/DTG e DSC; os estudos da estabilidade térmica de produtos farmacêuticos por TG/DTG aplicando-se métodos cinéticos isotérmicos e/ou não isotérmicos (dinâmicos); os estudos de pré-formulação visando à obtenção de informações acerca das características físicas ou interações químicas entre o componente ativo e os excipientes; a determinação da umidade, entre outros (Storpirtis *et al.*, 2009).

2. TERMOGRAVIMETRIA (TG) / TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (DTG)

A Termogravimetria (TG) fornece informações com relação às variações de massa em função do tempo e/ou temperatura sob determinadas condições atmosféricas. Os experimentos são executados por meio de uma termobalança de elevada sensibilidade, reprodutibilidade e resposta rápida às variações de massa. As curvas obtidas fornecem informações relativas à composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado. Dada a natureza dinâmica da variação de temperatura da amostra para originar curvas TG, fatores instrumentais [razão de aquecimento, atmosfera (N₂, ar ou outros), vazão de gás, composição do cadinho, geometria do porta-amostra e tamanho e forma do forno] e relacionados às características da amostra (quantidade, granulometria, forma cristalina, empacotamento, condutividade térmica, solubilidade dos gases liberados da amostra e calor de reação envolvido) podem influenciar a natureza, a precisão e a exatidão dos resultados experimentais (Silva, de Paola e Matos, 2007; Storpirtis *et al.*, 2009).

A Termogravimetria Derivada (DTG) é a derivada primeira da curva TG. Nesta, os “degraus” correspondentes às variações de massa da curva TG são substituídos por picos que determinam áreas proporcionais às variações de massa, tornando as informações, visualmente, mais acessíveis e com melhor resolução. Apesar da curva DTG trazer as mesmas informações que a TG, ela permite: a partir da altura do pico, à qualquer temperatura, obter a razão de Δm (variação de massa) naquela temperatura; obter as temperaturas correspondentes ao início e final da reação com maior exatidão, e também, na maioria das vezes, calcular a Δm no caso de sobreposição de reações. No entanto, em caso de reações de decomposição térmica que ocorrem lenta e gradativamente, a curva DTG não mostrará um pico, mas se aproximará de um patamar dificultando a avaliação dos eventos térmicos, uma vez que a derivada de uma constante é nula (Silva, de Paola e Matos, 2007; Storpirtis *et al.*, 2009). Alguns estudos vem sendo realizados, utilizando essa técnica.

Aragão *et al.* (2002) estudaram a aplicação da TG no controle de qualidade de *Cissampelos sympodialis*, conhecida popularmente como milona. As amostras obtidas, das folhas secas (FOL) e raízes (RA), foram moídas e tamisadas (mesh de 0,85 mm) sendo submetidas à maceração com etanol:água (70:30) até a exaustão, obtendo-se os extratos brutos das folhas (EBF) e raízes (EBR) e as tortas das folhas (TF) e raízes (TR).

Os extratos foram submetidos à marcha para extração de alcalóides terciários totais obtendo-se as frações dos alcalóides totais das folhas (FAT-f) e das raízes (FAT-r). E foram submetidas à cromatografia em coluna (adsorvente Al_2O_3), eluída com hexano-clorofórmio, clorofórmio e clorofórmio-metanol aumentando-se gradativamente a polaridade da fase móvel. Das frações (F 10-12) foi isolado metilwarifteina (MWAR) e das frações (F 36-64) foi isolado arifteina (WAR). Foram obtidas curvas TG das FOL, RA, EBF, EBR, TF, TR, FAT-f, FAT-r, F 10-12, MWAR, F 36-64 e WAR numa termobalança Shimadzu[®], modelo TGA-50H, com atmosfera de nitrogênio a 50 mL/min e ar sintético a 20 mL/min, na razão de aquecimento de 10°C/min, numa faixa de temperatura de 25 – 900°C, as amostras foram empacotadas numa célula de alumina com massa de 5,00 mg. A análise comparativa das curvas TG das amostras obtidas das folhas de milona revelou a seguinte ordem de estabilidade: WAR > MWAR > TF > FOL > FAT-f > EBF. A análise comparativa das curvas TG das amostras das raízes de milona sugere a seguinte ordem de estabilidade: WAR > F 34-64 > MWAR > RA > TR > FAT-r > F 10-12. Estes dados evidenciam uma maior estabilidade das amostras alcaloídicas.

Silva Júnior *et al.* (2006) estudaram o procedimento de secagem do extrato fluido de *Symphytum officinale* por nebulização, mostrando que a utilização de hidroxietilcelulose como adjuvante de secagem, na concentração de 1,5%, propicia uma melhor recuperação do produto seco durante seu processamento. Os perfis termogravimétricos apresentaram-se semelhantes para o extrato fluido liofilizado e para o seco por nebulização sugerindo que o procedimento de secagem não tenha interferido na integridade de seus constituintes, entre eles a alantoina.

Alguns autores têm contribuído com trabalhos em que aplicam a análise térmica em estudos de matérias-primas de uso cosmético e à aplicação das várias técnicas termoanalíticas no desenvolvimento, produção e controle de produtos cosméticos (Silva, de Paola e Matos, 2007). Dentre eles, Mothé *et al.* (2006) realizaram estudo termogravimétrico (TG/DTG) de um creme anticelulite à base de *Gingko biloba*, *Centella asiática* e *Fucus vesiculosus*. Essa técnica mostrou-se como uma importante ferramenta no estudo da estabilidade térmica e da composição do produto.

3. ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA)

A Análise Térmica Diferencial (DTA) é a técnica pela qual a diferença de temperatura (ΔT) entre a substância e o material de referência (termicamente estável) é medida em função da temperatura, enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura. A temperatura é medida por termopares conectados aos suportes metálicos das cápsulas de amostra e do material de referência, ambos contidos no mesmo forno. As variações de temperatura na amostra são devidas às transições entálpicas ou reações endotérmicas ou exotérmicas. As curvas DTA representam os registros de ΔT em função da temperatura (T) ou do tempo (t), de modo que os eventos são apresentados na forma de picos. Os picos ascendentes caracterizam os eventos exotérmicos e os descendentes os endotérmicos (Silva, de Paola e Matos, 2007; Storpirtis *et al.*, 2009).

Estudos realizados por Freire *et al.* (2008) apontaram para uma alta estabilidade térmica do *Ginkgo biloba*, observada tanto nas curvas TG como na curva DTA. O *G. biloba* se decompõe a uma temperatura de cerca de 270°C; a amostra apresentou teor de 11% de umidade, sendo esta desidratada a 110°C, logo é possível secá-la a esta temperatura já que sua decomposição é bem superior a esta, evitando assim condições para o crescimento de micro-organismos; ou seja, aumentando sua estabilidade quanto ao processamento, embalagem e estocagem do produto.

Os óleos fixos e essenciais, gorduras, ceras e ácidos graxos livres são matérias primas amplamente utilizadas na área cosmética em função de suas características de emoliência e hidratação da pele; fabricação de perfumes ou mesmo como fonte para síntese de outros produtos. Diversos trabalhos citam a análise térmica como método de caracterização, de avaliação do comportamento térmico e da estabilidade, podendo ser empregada no controle de qualidade de matérias primas e produtos (Silva, de Paola e Matos, 2007).

Kaloustian, Pauli e Pastor (2000) analisaram aspectos químicos e térmicos de biopolímeros do óleo essencial de lavanda, citando aspectos econômicos da coleta das flores e da importância ambiental do trabalho em função da inflamabilidade do óleo. O risco de inflamabilidade pode ser observado por análise térmica em torno de 300°C. Verificaram, também, a presença de um evento exotérmico por DTA, perda de massa por TG e determinação da velocidade máxima de decomposição por DTG. Segundo os autores em razões de aquecimento elevadas, em torno de 50°C/min, a decomposição térmica das partes aéreas da planta aumenta principalmente com o nível de celulose.

Brandão *et al.* (2006) caracterizaram o óleo de pequi, *Caryocar brasiliensis* Camb e avaliaram sua estabilidade térmica. TG e DTA mostraram um patamar de estabilidade até cerca de 180°C, apresentando a maior transição entálpica com T_{pico} de 356°C, devido à decomposição dos ácidos graxos.

Faria *et al.* (2002) estudaram a estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG, DTG e DTA, concluindo que as técnicas foram adequadas a esse fim. Os autores usaram um módulo simultâneo DSC-TGA da TA-Instruments®, modelo SDT 2960, numa faixa de temperatura de 30 a 650°C, com razão de aquecimento de 10°C min^{-1} e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL min^{-1} e cadinho de alumina com massa de 10 a 20mg. Foi observado um patamar de estabilidade térmica dos óleos entre 180 e 321°C e o processo de decomposição térmica ocorreu em uma única etapa, sendo finalizado entre 433 e 478°C. A estabilidade térmica dos óleos foi determinada através da faixa de temperatura na qual a massa permaneceu inalterada. Os autores afirmaram que os óleos analisados apresentaram a seguinte ordem crescente de estabilidade: babaçu, murici, guariroba, araticum e buriti, fator determinante no controle de qualidade de óleos e gorduras durante o processamento, estocagem e utilização industrial (Isaac *et al.*, 2008).

4. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é a técnica de análise térmica, na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência termicamente inerte, em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura. Existem duas configurações possíveis para aparelhos de DSC, ou seja, *DSC com compensação de potência* e *DSC com fluxo de calor*. Na primeira configuração, a amostra e o material de referência são aquecidos em compartimentos separados em condições isotérmicas e submetidos à igual variação de potência de entrada no forno. Neste caso, os eventos são apresentados na curva DSC como picos, os ascendentes correspondem a processos endotérmicos e os descendentes a exotérmicos. No caso da DSC com fluxo de calor, a amostra e o material de referência são colocados em cápsulas idênticas, localizadas sobre o disco termoeletrico e aquecidas por uma única fonte de calor. As curvas DSC obtidas nesse sistema mostram picos ascendentes que caracterizam eventos exotérmicos,

enquanto os descendentes eventos endotérmicos (Silva, de Paola e Matos, 2007; Storpirtis *et al.*, 2009).

É importante a associação de dados provenientes dos ensaios de TG/DTG e DSC, para melhor caracterização de materiais, visto que a TG/DTG indicam eventos térmicos relacionados a variações de massa, enquanto a DSC detecta eventos associados ou não à perda de massa. Por exemplo, eventos térmicos de origem física, como mudança de estado físico (fusão), podem ser inequivocamente atribuídos a partir da curva DSC, desde que na mesma faixa de temperatura não forem observados, nas curvas TG/DTG, eventos de perda de massa. Para melhor interpretação dos resultados e evitar possíveis equívocos é imprescindível a comparação das curvas TG/DTG e DSC obtidas nas mesmas condições experimentais (Silva, de Paola e Matos, 2007; Storpirtis *et al.*, 2009).

A DSC é uma técnica derivada da DTA, por isso, são consideradas técnicas semelhantes e complementares, pois permitem avaliar as variações entálpicas que ocorrem com uma dada substância durante um processo de aquecimento ou resfriamento. A palavra “diferencial” enfatiza as medidas que envolvem tanto a própria substância como o material de referência (termicamente estável) (Storpirtis *et al.*, 2009).

A DTA nos fornece dados qualitativos de variações de entalpia e nos permite executar trabalhos em faixas de temperatura superiores a 1000°C. A DSC, pelo seu próprio refinamento, possibilita acompanhar e obter dados quantitativos quanto às alterações físicas ou químicas da amostra, tais como: mudança de estado físico (fusão, ebulição etc.), transições de fase (modificações na estrutura cristalina) ou reações de desidratação, de decomposição, de oxirredução etc. Contudo, deve-se ressaltar que, nesta técnica, a temperatura de operação da célula não excede 725°C. Em resumo, pode-se dizer que, dentro dos limites operacionais de temperatura, a célula DSC executa todas as aplicações da DTA, além de fornecer informações quantitativas de um dado material em relação à quantidade de calor envolvida nos processos, caracterizando, com isso, o seu emprego em diversos estudos (Storpirtis *et al.*, 2009).

Aragão *et al.* (2002) caracterizaram termicamente a biflorina, orto-quinona de *Capraria biflora* L., através da TG e DSC fotovisual. Os resultados termogravimétricos demonstraram que a reação de decomposição da biflorina ocorre em três etapas. O DSC da biflorina apresentou cinco picos relacionados às transições de fase. O DSC fotovisual mostrou modificações físico-químicas na biflorina, relacionadas a ponto de fusão, decomposição e transformação molecular.

Costa *et al.* (2002) caracterizaram rutina e quercetina por TG e DSC acoplado a um sistema fotovisual. Os parâmetros cinéticos, a razão da constante, a energia de ativação e a ordem da reação foram determinados por parâmetros TG isotérmicos e dinâmicos. Os resultados das curvas TG mostraram a decomposição de duas substâncias ocorrendo em quatro estágios. Os dados de DSC revelaram a presença de transições de fases para os dois compostos. O método do DSC-fotovisual confirmou a decomposição e o processo polimórfico para a quercetina e rutina, respectivamente, de acordo com a literatura.

A resina natural e os produtos de derivatização da *Protium heptaphyllum* foram caracterizados por Vieira Júnior, Souza e Chaves (2005) através de TG e DSC. As curvas TG mostraram duas etapas de perda de massa para todas as amostras, sendo a primeira atribuída a processos de evaporação de água, resíduos de solventes orgânicos e a segunda etapa, à degradação da amostra. A comparação das curvas termogravimétricas mostrou que o processo de derivatização reduz a estabilidade térmica da resina. As curvas DSC das amostras de resina pura e derivatizadas mostraram eventos endotérmicos característicos de evaporação de substâncias adsorvidas e decomposição térmica, como sugerido nas curvas TG.

Araújo *et al.* (2006) avaliaram, a partir da TG/DTG e DSC, o comportamento térmico de amostras comerciais de *Paullinia cupana* Kunth em pó existentes no Brasil e estabeleceram um estudo comparativo entre os métodos convencionais e termogravimétrico para determinação dos teores de umidade e cinzas. A similaridade entre os perfis das curvas TG/DTG e DSC indicaram que não houve diferenças entre as amostras. A utilização da TG mostrou que é possível reduzir o tempo de análise, utilizar menor quantidade de amostra, assim como, fazer a determinação simultânea dos teores de umidade e cinzas. Em relação ao método convencional, erros de análise inerentes à manipulação das amostras foram minimizados. As técnicas termoanalíticas mostraram-se como ferramentas potenciais para a obtenção de parâmetros tecnológicos, em controle de qualidade, torrefação e condições adequadas de armazenamento.

Segismundo, Matos e Mercuri (2010) avaliaram o comportamento térmico e se o processo de lavagem interferia na composição química da casca do fruto de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por TG/DTG e DSC. Os resultados obtidos pelas técnicas termoanalíticas indicaram que as amostras com e sem lavagem apresentaram decomposição térmica completa a 900°C. O procedimento de lavagem não interferiu na

composição química da casca de jatobá, visto que o perfil das curvas TG/DTG e DSC de ambas as amostras, com e sem lavagem, são similares.

No desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, o uso da temperatura é muitas vezes inevitável. Logo a implementação das técnicas térmicas, TG, DSC-*fotovisual*, surgem como poderosas ferramentas na avaliação da qualidade destes produtos, após os processos de secagens de soluções extrativas vegetais, visando monitorar o efeito do calor sobre a qualidade original da matéria prima vegetal (Aragão, 2010).

Aragão *et al.* (2010) analisaram a aplicação da TG, DSC e DSC-*fotovisual* na avaliação do efeito da temperatura sobre o processo de secagem de produtos contendo *Cissampelos sympodialis*. Os dois diferentes extratos obtidos por *soxhlet* (a quente, Q) e maceração (a frio, F) foram submetidos à secagem através de dois diferentes sistemas: a nebulização, obtendo-se os ESNQ e ESNF, e a liofilização que deu origem aos ESLQ e ESLF. Os dados térmicos demonstraram a alteração da composição química dos extratos de *Cissampelos sympodialis* em temperaturas inferiores a 110°C em ESNQ, ESNF e ESLQ, exceto o ESLF.

Medeiros A., Medeiros I., Macêdo (2002) utilizaram o TG e o DSC acoplado a um sistema fotovisual para avaliar o comportamento térmico de extratos secos de *Albizia inopinata* preparados com e sem agentes estabilizantes. Os extratos foram preparados por percolação das folhas pulverizadas em um sistema solvente etanol:água (70:30) e posteriormente secos utilizando a técnica do spray-dryer. Dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200) e β-ciclodextrina foram usados como estabilizantes para a preparação dos extratos secos. As curvas TG foram obtidas utilizando uma termobalança Shimadzu®, modelo TGA-50H. As curvas DSC foram obtidas utilizando um calorímetro Shimadzu®, modelo DSC-50 acoplado a um sistema fotovisual. As curvas TG para os extratos de *A. inopinata* e *Albizia*-estabilizantes exibiram seis estágios de decomposição térmica. As curvas DSC mostraram diferenças nas transições de fase entre as amostras. As figuras obtidas no DSC fotovisual apresentaram diferenças no comportamento térmico entre os produtos.

5. CONCLUSÃO

No desenvolvimento de diversos estudos, é possível a associação de duas ou mais técnicas termoanalíticas, como por exemplo, a DTA ou a DSC com a TG. Em muitas situações, para a solução de problemas, é necessário associar os resultados de

análise térmica a resultados obtidos por outras técnicas convencionais físico-química e analíticas.

A pequena quantidade de amostra utilizada, a rapidez de resultados e a limpeza da técnica fazem da análise térmica uma poderosa ferramenta nos estudos tecnológicos para padronização das matérias primas vegetais e na avaliação do impacto da temperatura durante os processos de secagens de soluções extrativas vegetais, garantindo a qualidade original da matéria prima vegetal.

As técnicas termoanalíticas possuem grande importância na indústria de fitoterápicos e fitocosméticos devido à grande variedade de aplicações. A análise térmica pode ser utilizada tanto no controle da matéria prima, quanto do produto acabado, possuindo potencial emprego no desenvolvimento e estabilidade e na caracterização de novos produtos, avaliação dos processos de secagem e outras aplicações. Nos últimos anos, muitos progressos foram realizados nesta área, contribuindo para o avanço na análise de produtos fitoterápicos.

6. REFERÊNCIAS

ARAGÃO, C.F.S.; SOUZA, F.S.; BARROS, A.C.S.; VERAS, J.W.E.; BARBOSA FILHO, J.M.; MACÊDO, R.O. Aplicação da termogravimetria (TG) no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.) Menispermaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2002; 12: 60-61.

ARAGÃO, C.F.S.; LIMA, C.S.A.; AMORIN, E.L.C.; AQUINO, T.M.; MACÊDO, R.O. Thermal behavior of biflorin by beans TG and a DSC photovisual system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2002; 12:110-111.

ARAGÃO, C.F.S.; GOMES, A.P.B.; FREIRE, F.D.; SOUZA, F.S.; MACÊDO, R.O. Aplicação da TG, DSC e DSC-*fotovisual* na avaliação do efeito da temperatura sobre o processo de secagem de produtos contendo *Cissampelos sympodialis*. VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria. 2010 abr 25-28, São Pedro – SP. 2010:1-4.

ARAÚJO, A.A.S.; MERCURI, L.P.; SEIXAS, S.R.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná

utilizando métodos convencionais e análise térmica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**. 2006; 42(2):269-277.

BELLO, C. M.; MONTANHA, J. A.; SHENKEL, E. P. Análise das bulas de medicamentos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2002;12(2):75-83.

BRANDÃO K.S.R.; NASCIMENTO, U.M.; SILVA, F.C.; SOUZA, A.G.; CONCEIÇÃO, M.M. Avaliação da estabilidade térmica do óleo de pequi. (Caryocar Coriaceum seed oil). In: **Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria**. Livro de resumos. Poços de Caldas, ABRATEC, 2006;5:172.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução Diretora Colegiada RDC nº 14 de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília/DF. 2010.

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

COSTA, E.M.; BARBOSA FILHO, J.M.; NASCIMENTO, T.C.; MACÊDO, R.O. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. **Thermochimica Acta**. 2002;392–393:79–84.

FREIRE, R.M.L.; MOURA, M.F.V.; SILVA, D.R.; XAVIER, J.C. Análise da decomposição térmica do Ginkgo biloba. 2008. [Internet] 2010 [2010 mai 25] Disponível em: < <http://www.abq.org.br/cbq/2008/trabalhos/4/4-495-994.htm>>.

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 Aplicada**. 2008; 29(1):81-96.

KALOUSTIAN, J.; PAULI, A.M.; PASTOR, J. Chemical and thermal analysis of biopolymers in lavandin. **J. Appl. Polym. Sci.**, New York, 2000;77(7):1629-1641.

KLANCNIK, G.; MEDVED, J.; MRVAR, P. Differential thermal analysis (DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) as a method of material investigation. **RMZ – Materials and Geoenvironment**, 2010; 57(1):127–142.

MEDEIROS, A.C.D.; MEDEIROS, I. A.; MACÊDO, R.O. Thermal studies of *Albizia inopinata* crude extract in the presence of cyclodextrin and Aerosil[®] by TG and DSC coupled to the photovisual system. **Thermochemica Acta**. 2002;392-393:93-98.

MIOTO, R. País deixa de gerar US\$ 5 bilhões por ano com fitoterápicos. ABIFISA (Associação brasileira das empresas do setor fitoterápico) [Internet] 2010 [citado 2010 set 23]. Disponível em: http://www.abifisa.org.br/noticias_ver.asp?news=3594.

MOTHÉ, C.G.; CARESTIATO, T.; BUSNARDO, N.G.; GARRIDO, J. Estudo termoanalítico do creme anticelulite à base de Gingko biloba, centella asiática e fucus vesiculosos. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISE TÉRMICA E CALORIMETRIA**. Livro de resumos. Poços de Caldas. ABRATEC. 2006; 5:351.

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

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. Medicinal plants, phytomedicines, and phytotherapy. In: **Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine**. 4.ed. New York, Berlin: Springer.2001; 1:1-39.

SEGISMUNDO, N.R.; MATOS, J.R.; MERCURI, L.P. Estudo do comportamento térmico da casca de frutos de *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá). **VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria**. 2010 abr 25-28, São Pedro – SP. 2010.

SILVA, E.C.; DE PAOLA, M.V.R.V.; MATOS, J.R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2007;43(3):347-356.

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

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIAMN, C.; GAI, M.N. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. Capítulo 4. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.. 2009. p. 31-65.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2006;42:2.

VIEIRA JÚNIOR, G.M.; SOUZA, C.M.L.; CHAVES, M.H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Quim. Nova**. 2005; 28(2):183-187.

REVISÃO SOBRE PROCESSOS DE SECAGEM

**Uma abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na
obtenção de extratos secos de plantas medicinais**

Artigo submetido à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

Uma abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais

SILVA, R.M.F. ^{*1,2}; GOMES, T.C.B.L.¹; ALBUQUERQUE, M.M.¹; SILVA JUNIOR, J.O.C.²; BARBOSA, W.L.R.²; ROLIM NETO, P.J.¹

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, CEP: 50740-521. Recife - Brasil; ²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, CEP: 66.075-110, Belém - Brasil

RESUMO

Na indústria farmacêutica de fitoterápicos, o extrato seco é considerado tecnologicamente viável para fins de produção em larga escala, devido à sua estabilidade física, química e microbiológica, além da facilidade de padronização dos princípios ativos. Entre as técnicas de secagem empregadas na preparação de extratos secos, encontra-se a nebulização ou spray-dryer, o leito de jorro, a liofilização e a evaporação rotativa. A escolha do processo de secagem é motivada pela potencialidade dos diferentes equipamentos secadores, na secagem de materiais presentes na forma líquida, no caso, soluções extrativas de plantas medicinais, fornecendo um produto de alta qualidade e com um investimento relativamente modesto.

Palavras-chave: técnicas de secagem, plantas medicinais, fitoterápicos, extratos secos, indústria farmacêutica

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a produção de fitoterápicos tem explorado novas possibilidades tecnológicas para a obtenção de extratos secos. Isso decorre das vantagens apresentadas pelos extratos secos, quando comparados aos extratos fluidos. Os extratos secos vegetais são muito mais adaptados às necessidades da terapêutica moderna, devido à facilidade de padronização e de manuseio, o que contribui para a garantia da homogeneidade de preparações farmacêuticas. (De Paula, 1997; Teixeira, 1996; Runha *et al.*, 2001).

Por definição, extratos secos são preparações sólidas, pulverulentas ou granuladas obtidas por evaporação de extratos de plantas medicinais adicionadas ou não de

adjuvantes, apresentando o teor de substâncias ativas indicado na respectiva monografia (Farmacopéia Brasileira, 1988).

O extrato seco é considerado tecnologicamente viável para fins de produção em larga escala, devido à sua estabilidade física, química e microbiológica, além da facilidade de padronização dos princípios ativos. Na indústria farmacêutica de fitoterápicos, o extrato seco é aplicado na preparação de comprimidos, cápsulas, granulados, pomadas e outras formas farmacêuticas, como produto intermediário. Entre outras vantagens, apresentam maior estabilidade e distribuição granulométrica dos constituintes da preparação (Cordeiro, 2000).

Na preparação de extratos secos, a adição de adjuvantes à solução extrativa melhora o rendimento e as características farmacotécnicas do pó obtido durante a secagem, sendo a sua adição indispensável para a maioria dos produtos desenvolvidos. Os adjuvantes devem caracterizar-se pela inércia química, inocuidade e termo-estabilidade (Teixeira, 1996).

Entre as técnicas de secagem empregadas com sucesso na preparação de extratos secos encontra-se a nebulização ou spray-dryer (Masters, 1979; Bassani, 1990; Broadhed *et al.*, 1992; Teixeira, 1996, Souza, 2003), o leito de jorro (Souza, 2007), a liofilização e a evaporação rotativa (Sousa *et al.*, 2007; Dutra *et al.*, 2009), técnicas estas que serão descritas com destaque, para a sua aplicação na obtenção e padronização de extratos secos, para fins de utilização como insumo farmacêutico de interesse para a produção de fitoterápicos no Brasil.

2. SECAGEM EM SPRAY-DRYER (OU SECAGEM POR NEBULIZAÇÃO)

O spray-dryer é frequentemente usado em processos industriais que envolvem a geração e secagem de gotículas líquidas. Pós finos secos, granulados ou aglomerados podem ser produzidos continuamente pela secagem de soluções, emulsões ou suspensões. Os pós produzidos por spray-dryer reúnem padrões elevados de qualidade com respeito à granulometria do produto, umidade final, homogeneidade, densidade e forma, sendo que estas características podem ser alteradas por modificações nos parâmetros do processo. O pó obtido por esta tecnologia é particularmente apreciado devido à sua alta fluidez, sendo que esta propriedade pode ser atribuída à forma esférica das partículas obtidas (Remili *et al.*, 1994).

O processo spray-dryer consiste basicamente na atomização de uma mistura diluída sólido-fluido em uma corrente gasosa aquecida que promove a evaporação do

solvente, levando a um produto seco. Embora seja uma tecnologia cara que necessita de altos investimentos em instalações e operações, muitas são as razões pelas quais a mesma é amplamente utilizada (Wendel e Celic, 1998). Essas razões incluem a produção de materiais com propriedades físicas desejadas, a capacidade de processar diferentes tipos de matérias-primas e a flexibilidade da operação. Opera em temperaturas de gás de entrada relativamente baixas com eficiência similar a outros tipos de secagem direta, sendo que o produto seco obtido apresenta características homogêneas (Isono *et al.*, 1995). O tempo de residência do material no interior da câmara de secagem é relativamente pequeno, o que torna esse equipamento adequado para a secagem de produtos termo-sensíveis, como os extratos vegetais. A qualidade do pó obtido é baseada em uma série de propriedades dependentes das variáveis de processo utilizadas. Em geral, o conteúdo de umidade final, o índice de solubilidade e a densidade aparente são de fundamental importância (Souza, 2003).

Algumas vantagens atribuídas aos extratos vegetais produzidos por spray-dryer podem interessar à fitoterapia. Os produtos obtidos são, em geral, mais solúveis e concentrados. O processo envolve extração primária da planta com solventes apropriados como soluções de etanol-água em diferentes proporções. O extrato bruto então é concentrado e seco em spray-dryer a temperaturas variando entre 100 e 200°C (Souza, 2003).

Uma grande vantagem do processo spray-dryer é que a secagem ocorre em condições assépticas evitando possíveis contaminações durante o processamento, podendo-se assumir que uma contaminação bacteriana final procede essencialmente da planta original ou após o processamento, pela manipulação humana.

Remili *et al.* (1994) estudaram as contaminações microbianas em extratos secos de plantas medicinais obtidas por spray-dryer e a influência do processo na qualidade do produto. Como este material é essencialmente destinado ao uso oral, existe limites aceitáveis de contaminação microbiana. Estes autores constataram que, qualitativamente, os extratos produzidos por spray-dryer apresentam baixa contaminação, mas o conteúdo total de bactérias viáveis permaneceu relativamente alto, excedendo 10^3 UFC mL⁻¹ (unidade formadora de colônia/mililitro) em 35 das 82 amostras analisadas.

A umidade é uma variável interessante no processo de desidratação e é ótimo parâmetro a ser medido durante a operação. A temperatura é uma medida secundária que não pode ser a causa de diferenças higroscópicas em produtos, seguida da

mudança da composição e mudanças na umidade do ar de entrada. Medidas da umidade do produto após o processo são um indicador da eficiência do processo de desidratação.

A maioria dos equipamentos de secagem faz medidas da temperatura, da vazão de alimentação, da vazão e da umidade do gás de entrada. Medidas da umidade do ar de exaustão podem ser usadas em vários tipos de análises para prever e melhorar a eficiência incluindo balanço de massa, balanço de energia, análise higroscópica, análise estatística e/ou simulação do processo.

Extratos de *Amaranthus betacyanin* foram secos em spray-dryer por Cai & Corke (2006) usando uma série de maltodextrinas e amido como adjuvantes. Analisaram a influência das temperaturas de ar de entrada/saída e a concentração de sólidos da solução de alimentação nas características finais do produto. Constataram que elevadas temperaturas do ar de entrada/saída causaram grande perda de betacianina (pigmento) durante a secagem, afetando levemente a estabilidade durante a armazenagem do produto.

O emprego de adjuvantes tecnológicos como o amido, a celulose microcristalina, a β -ciclodextrina, o dióxido de silício coloidal, etil-celulose e gelatina foram avaliados por Teixeira (1996). No entanto, o emprego resultou na obtenção de produtos com baixíssimos rendimentos devido principalmente a aderência do extrato nas paredes da câmara de secagem. Uma exceção foi observada nos produtos obtidos a partir do dióxido de silício coloidal como já relatado em outros trabalhos (Bassani, 1990; Senna, 1993; Senna *et al.*, 1997; Cordeiro, 2000; Runha *et al.*, 2001).

Três combinações de adjuvantes de secagem [dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina + dióxido de silício coloidal (1:1) e β -ciclodextrina + dióxido de silício coloidal (1:1)] foram analisados por De Paula *et al.* (1998) na obtenção de extratos secos nebulizados de marcela (*Achyrocline satureioides*). Os extratos secos foram incorporados em base para pomada. Foram avaliadas a influência dos adjuvantes de secagem nas características das formulações, como espalhabilidade, índice de oleosidade, viscosidade e pH. Os resultados indicaram a influência dos adjuvantes de secagem nos parâmetros físicos das formulações em diferentes níveis, apesar de todas terem mantido seu comportamento plástico. A presença apenas de dióxido de silício coloidal no extrato seco concedeu à pomada um baixo valor no índice de oleosidade e uma área de espalhabilidade intermediária. A redução no conteúdo de dióxido de silício coloidal e substituição desta parte por celulose microcristalina ou β -

ciclodextrina aumentou o índice de oleosidade e levou a uma melhora na espalhabilidade da pomada.

Casadebaig *et al.* (1986) avaliaram dois adjuvantes tecnológicos, a goma arábica e o aerosil[®] 200, na preparação de extratos secos de *Fraxinus excelsior*. Extratos aquosos e alcoólicos foram preparados e submetidos ao processo de secagem. Foram realizadas análises de distribuição granulométrica, testes de estabilidade do pó seco em atmosfera de umidade relativa controlada e cromatografia em camada delgada do produto final. Os resultados indicaram que o pó produzido pelo extrato alcoólico foi de qualidade superior ao pó obtido do extrato aquoso. Os cromatogramas obtidos indicaram que o processo de secagem por nebulização não modifica as substâncias ativas presentes nos extratos. A presença de adjuvantes tecnológicos no produto seco faz com que seu tempo de validade seja aumentado. Com os resultados apresentados, pode-se verificar que adjuvantes tecnológicos se mostram de grande importância na produção de extratos secos.

3. LEITO DE JORRO

Este tipo de secador foi desenvolvido em 1954, por Glishler e Mathu. Ele foi inicialmente projetado para a secagem de grãos de trigo (Marreto, 2006).

O leito de jorro tem por finalidade promover o íntimo contato entre um fluido e partículas relativamente grandes (acima de 1,0 mm), as quais apresentam fluidização de baixa qualidade. Esta técnica é recomendada para a secagem de materiais granulares, pastas e suspensões, granulação e revestimento de partículas, entre outras (Souza, 2003).

No caso da secagem, a utilização do leito de jorro tem sido difundida devido às características de alta taxa de circulação de partículas inertes e da uniformidade da temperatura no leito. Outro fator positivo desta técnica é o baixo custo de construção, manutenção e operação do equipamento. Patel *et al.* (1986) mencionam que, em secador de leito de jorro, os custos de capital são aproximadamente a metade do custo de um secador spray além de ocupar um espaço menor.

O regime de jorro é estabelecido em um leito de partículas sólidas através da injeção de um fluido (geralmente ar) na sua parte inferior verticalmente através de um único ponto cujo diâmetro é reduzido em relação ao diâmetro do leito, ocorrendo a formação de canal preferencial como consequência das regiões distintas:

- a) Região central (canal preferencial): ocorre o transporte pneumático das partículas devido à grande velocidade do fluido.
- b) Região de jorro (fonte): região acima do leito onde as partículas advindas da região central movimentam-se em regime desacelerado, como em uma fonte, caindo na região anular.
- c) Região anular (deslizante): nesta região, as partículas caem da região de jorro e deslizam para baixo, operando como um leito deslizante.

Muitos autores, no entanto, definem como região de jorro ao conjunto região central-região de jorro (Oliveira, 2006).

Os principais parâmetros fluidodinâmicos no estudo dos regimes de jorro são a velocidade mínima do jorro, a altura máxima de jorro estável, e a perda de carga em função da velocidade do ar. A velocidade mínima do fluido necessária para manutenção do regime jorro é função das propriedades dos sólidos, da geometria do leito e do próprio fluido. Os valores da velocidade mínima do jorro podem diminuir com o aumento do diâmetro da câmara de secagem e com a diminuição da altura do leito fixo de sólidos. A altura máxima de jorro estável é a altura máxima de partícula inertes, acima da qual não se observa a ocorrência do regime de jorro, e sim uma fluidização de má qualidade. A perda de carga em função da velocidade do ar é gerada pela elevada demanda energética necessária para estabelecer o regime de jorro (Marreto, 2006).

O regime fluido dinâmico único, observado neste tipo de equipamento, propicia inúmeras vantagens durante suas aplicações. A excelente mistura de sólidos e o intenso contato fluido-sólido permitem uma secagem segura e eficiente de materiais termossensíveis.

Segundo Mathur e Epstein (1974), existem basicamente três geometrias de secadores de jorro (a cônica, a cone-cilíndrica e a retangular). Nem todo leito de jorro apresenta as três regiões descritas bem definidas.

Os secadores de jorro dividem-se em dois grupos principais - o JSB (Jet Spouted Bed) e o CSB (Conventional Spouted Bed). A diferença entre esses dois grupos está no diâmetro da entrada, que para o JSB é superior, e na porosidade do leito, que para o CSB é inferior a 85%, e para o JSB é superior.

Souza (2007) investigou o potencial tecnológico e econômico do processo de secagem em leito de jorro, para a produção de extratos secos padronizados de plantas

medicinais brasileiras utilizando como modelo experimental a *Bauhinia forficata* Link. Ensaio de secagem com diversos adjuvantes apontaram o dióxido de silício coloidal como o responsável pelos melhores resultados, sendo o material de escolha para os ensaios seguintes. Os ensaios de secagem realizados em duas configurações de leito de jorro (convencional e com instalação de tubo *draft*) foram delineados através de planejamento composto central. Os resultados deste trabalho indicam a viabilidade técnica e econômica do processo em leito de jorro para a obtenção de extratos secos de plantas medicinais, despontando como um processo alternativo frente ao *spray-dryer* comumente usado nas indústrias de processamento fitoterápico.

4. LIOFILIZAÇÃO

A liofilização é um processo que consiste de três etapas. A primeira etapa é o congelamento do produto, de modo que a água presente no material seja convertida em gelo. Na segunda etapa da liofilização, o gelo formado durante o congelamento é removido do material pela conversão direta do estado sólido para vapor num processo denominado sublimação. No terceiro passo, a água que ainda permanece ligada fortemente aos solutos, denominada água adsorvida, é convertida em vapor e removida do produto, num processo chamado dessorção (Jales, 1999). Para isto faz-se necessário que a zona da temperatura de sublimação seja abaixo do ponto triplo (num gráfico de pressão *versus* temperatura, é o ponto onde há a coexistência das três fases – sólida, líquida e vapor).

O congelamento é a principal etapa, deste processo, pois dela depende o desempenho global da liofilização devido a forma dos poros; a distribuição do tamanho dos poros; da conexão entre as redes de poros da camada seca formada pela sublimação da água ou da substância aquosa congelada durante a secagem primária; a dependência do processo de liofilização com os cristais de gelo formados durante o estágio de congelamento, tendo influência, também, na consistência do produto final, cor e retenção de aroma (Boss, 2004).

Quando as estruturas dos cristais são pequenas e descontínuas a taxa de transferência de massa do vapor d' água para a camada seca é limitada. Por outro lado, se o tamanho dos dendrites dos cristais de gelo forem apropriados e a dispersão homogênea da solução congelada pode ser realizada, a taxa de transferência de massa do vapor d' água para a camada seca pode ser alta e o produto pode ser secado mais rapidamente. O método e a

taxa de liofilização, bem como a forma da solução contida e a natureza do produto, são críticos no curso da liofilização porque eles afetam a taxa de secagem e a qualidade do produto (Boss, 2004).

Segundo Adamiec *et al.* (1995), o congelamento lento (10-100⁰C/min) é prejudicial para as células porque propicia a formação de grandes cristais de gelo que após a sublimação da água ou da substância aquosa podem causar prejuízos mecânicos à estrutura das células como a membrana plasmática. O congelamento “ultraswift” (1000⁰C/min) é resultado de queda brusca de pressão ou temperatura. Em consequência desta espécie de choque pequenos cristais de gelo são formados e distribuídos uniformemente sem afetar a estrutura das células. Este tipo de congelamento não só facilita o processo tecnológico como intensifica a desidratação. O congelamento “ultraswift” ou auto congelamento é indicado nos casos em que os materiais têm baixa umidade. Para materiais com alta umidade faz-se, primeiramente, um congelamento inicial.

Este método de desidratação tem como objetivo preservar a qualidade do produto. Neste processo, a rápida transição das fases minimiza várias reações de degradação que ocorrem durante a secagem como a reação de Maillard, desnaturação de proteínas e reações enzimáticas (Boss, 2004).

As condições de procedimento: baixa temperatura, pressão reduzida, ausência da fase líquida intermediária eliminam em grande parte os fatores de alteração e de desnaturação. É um método de preservação no qual são completamente interrompidas todas as atividades bioquímicas.

As bactérias não são exterminadas por este tipo de secagem, mas sua proliferação não é possível no material seco. Após a secagem, as atividades das enzimas são inativadas porque não há água no meio e as reações químicas oxidativas ou não-oxidativas ocorrem em pequena quantidade, trazendo um resultado satisfatório (Boss, 2004).

O produto seco obtido, de aspecto poroso, friável, possui um caráter líofilo, particularmente, uma avidez pela água que possibilita uma reconstituição rápida e integral da solução ou da pseudo-solução inicial. A liofilização, apesar de ser um processo caro, é utilizada como meio de estabilização e de conservação de corpos ou de misturas frágeis, de preparações assépticas e de produtos biológicos (Jales, 1999).

Ishikawa *et al.* (2008) avaliaram o extrato liofilizado das folhas de *Plinia edulis* quanto ao perfil fitoquímico e à atividade antimicrobiana. A triagem fitoquímica

evidenciou a presença de substâncias de interesse farmacológico tais como flavonóides, taninos, saponinas e terpenóides. No entanto, o extrato não inibiu o crescimento de *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* na concentração de até 1.000 mg mL⁻¹.

Silva *et al.* (2001) comprovaram que a liofilização foi eficiente para conservar as sementes de ipê-rosa (*Tabebuia heterophylla*) nos ambientes não controlado e de câmara seca, mas desnecessária para o armazenamento em câmara fria. As sementes não liofilizadas, armazenadas em câmara fria, conservaram melhor a qualidade fisiológica do que as liofilizadas, armazenadas nos ambientes não controlados e de câmara seca.

Há diversos tipos de liofilizadores.

Liofilizador tipo bandeja: é o mais utilizado. Existem dois tipos principais que diferem de acordo com o condensador utilizado. Os condensadores podem ser colocados dentro da câmara, ou o condensador localiza-se numa câmara separada conectada por tubos. Este tipo de equipamento proporciona dificuldades em trabalhar com produtos farmacêuticos, como ampicilina, devido à dificuldade em manter o produto estéril. Porém possui a vantagem de ser mais econômico no que diz respeito à energia.

Multibatelada: O fluxo de massa e as operações de manuseio do produto são descontínuos, devido às características do processo.

Túnel: A secagem ocorre numa grande câmara de vácuo em forma de túnel, onde o produto a ser secado entra, na forma congelada cominuída, sobre bandejas dispostas em vagões ou esteiras que atravessam a câmara. Este tipo de equipamento não trabalha simultaneamente com diferentes produtos. Seu sistema de refrigeração opera normalmente com amônia. O aquecimento da corrente a vácuo proporciona diversas vantagens como o alto calor latente de condensação e o controle da temperatura pela pressão (Mujundar, 2006). Conforme o volume da produção aumenta, aumenta-se apenas o comprimento do túnel e introduz-se nova bomba de vácuo. Este equipamento utiliza ciclos de pressão que traz em vantagens suficientes para compensar o alto custo do equipamento. O tempo de secagem diminui 30% em comparação com equipamentos que trabalham a pressão constante (Lichtfield; Farhadpour, 1981).

Liofilizador contínuo: As condições de operação são constantes e por isso de fácil controle, requer menor mão-de-obra e supervisão. O uso é muito interessante para plantas que trabalham com um único produto ou que a alimentação provém de

processo contínuo. Estes secadores contínuos são mais econômicos que os secadores em batelada.

Liofilização por micro-ondas: Tem como desvantagens o alto valor com relação ao preço desta forma de energia, é de difícil controle porque a água tem uma constante dielétrica maior que a do gelo e qualquer ponto onde tenha ocorrido fusão do gelo ocorre perda de calor, além de não existir este tipo de secador disponível em escala industrial.

O alto custo deste processo pode ser compensado pela não necessidade de manuseamento e estocagem do produto em local refrigerado e também quando o produto tem alto valor agregado.

5. EVAPORAÇÃO ROTATIVA (ROTAEVAPORADOR)

O evaporador rotativo é o método mais comum, bastante eficiente na evaporação de solventes a partir de uma mistura. É constituído por vaso rotativo aquecido (normalmente um grande balão), que é mantido sob vácuo (para reduzir substancialmente a pressão dentro do sistema do evaporador), conectando um tubo de ligação a um refrigerante. O balão de rotação é aquecido por imersão parcial em banho de água quente. A rotação do balão proporciona melhor transferência de calor para o líquido contido; a rotação também reduz fortemente a formação de grandes bolhas causadas por superaquecimento do líquido. Os vapores de solvente deixam o balão pelo tubo de ligação e são condensados na seção do condensador. A seção do condensador é organizada de modo que ocorra a fuga de vapores condensada para outro frasco, onde são recolhidos (RPW, S., 2010). É uma maneira muito eficiente de eliminar rapidamente grandes quantidades de solvente.

O principal uso em cromatografia é a recuperação de solutos não-voláteis em cromatografia preparativa e à recuperação dos solventes para reciclagem (RPW, S., 2010).

Um simples sistema de evaporador rotativo foi inventado por Lyman C. Craig. Ele foi o primeiro comercializado pela empresa suíça Büchi[®], em 1957, e patenteada em 1964. O *Rotavapor* Büchi[®] continua a ser o mais utilizado rotativo evaporador, tanto assim que "rotavapor" tornou-se sinônimo de tais instrumentos. Outros fabricantes de evaporador rotativo incluem Heidolph[®], Yamato[®], IKA[®], Stuart[®], EYELA[®] e ONGIs[®]. A forma mais comum é a unidade de bancada de topo, embora em grande

escala (por exemplo, nas versões 20L-50L) estejam disponíveis no mercado e são utilizados em plantas-piloto em operações químicas e farmacêuticas comerciais (Wikipedia, 2010).

Ao reduzirem a pressão, os evaporadores a vácuo reduzem os pontos de ebulição dos líquidos contidos nele. Geralmente, os líquidos de interesse dos evaporadores rotativos são solventes de pesquisa que se deseja remover a partir de uma amostra após a extração, como por exemplo, quando se isola um produto natural ou durante alguma etapa em síntese orgânica.

São frequentemente aplicados para separar solventes com baixo ponto de ebulição como n-hexano e acetato de etila. Solventes com maior ponto de ebulição, como água (100°C à pressão atmosférica normal), dimetilformamida (DMF, 153°C) ou dimetilsulfóxido (DMSO, 189°C), também podem ser evaporados, ao mesmo tempo, se o sistema da unidade de vácuo for capaz de reduzir suficientemente a pressão. Por exemplo, nestas condições, tanto DMF e DMSO podem entrar em ebulição abaixo de 50°C. Contudo, como existem outros métodos de evaporação mais eficazes, a água só é evaporada através do rotavapor em um último recurso. A utilização de rotavapor permite que os solventes sejam removidos sem aquecimento excessivo.

As principais vantagens da utilização de um evaporador rotativo são:

1. Devido à grande superfície de contato que está sendo aquecida no banho de água, as forças centrífuga e de atrito entre a parede do balão de rotação e a amostra de líquido promovem fina película de difusão de solvente;
2. As forças criadas pela rotação evitam a formação violenta de bolhas, provenientes da ebulição;
3. A combinação destas características e as conveniências modernas construídas em evaporadores rotativos permitem a evaporação rápida e suave de solventes da maioria das amostras, mesmo nas mãos dos utilizadores relativamente inexperientes;
4. Solvente restante após a evaporação rotativa pode ser removido, expondo a amostra a vácuo ainda mais profundo, em sistema de vácuo mais hermeticamente fechado, à temperatura ambiente ou temperatura mais elevada.

Uma desvantagem chave em evaporações rotativas é o potencial de alguns tipos de exemplos para colisão, por exemplo, etanol e água, que pode resultar na perda de parte do material destinado a ser mantido (Wikipedia, 2010).

Sousa *et al.* (2007) investigaram e confirmaram os efeitos analgésico e anti-inflamatório da *Posoqueria acutifolia*. Após submeterem galhos deste vegetal à secagem a 50°C, sob ventilação forçada, o material botânico foi triturado e pulverizado, e o extrato metanólico obtido por maceração estática durante três semanas com dez trocas de solvente. Após remoção do metanol por rotaevaporação, o extrato bruto seco foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) 1% (v/v) em solução salina para avaliação das atividades farmacológicas.

A cicatrização de queimaduras cutâneas em coelhos, com aplicação tópica de cremes à base de fração hexânica obtida das sementes de *Pterodon emarginatus*, foi avaliada e confirmada por Dutra *et al.* (2009). As sementes foram trituradas e submetidas à extração utilizando aparelho de Soxhlet. Após o acondicionamento das sementes ao cartucho e adaptação do balão de fundo redondo, a amostra foi submetida a extrações sucessivas com hexano, por 24 h, até atingir o esgotamento do solvente. A fração hexânica foi submetida à rotaevaporação, em temperatura de $50 \pm 5^\circ\text{C}$, até eliminação completa do solvente.

6. CONCLUSÃO

Atualmente, o extrato seco é a forma preferida pelas indústrias farmacêuticas, principalmente pela maior concentração, estabilidade e facilidade de padronização dos princípios ativos presentes nas plantas. Esses fatores aumentam o valor agregado do produto, e contribuem também no atendimento das indústrias a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 14, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 31 de março de 2010, que visa controlar e monitorar a produção indiscriminada de produtos vegetais no Brasil, estabelecendo critérios rígidos para o registro desses tipos de produtos.

A escolha do processo de secagem é motivada pela potencialidade dos diferentes equipamentos secadores, na secagem de materiais presentes na forma líquida, no caso, soluções extrativas de plantas medicinais, fornecendo produto de alta qualidade e com investimento relativamente modesto.

Dentre as tecnologias utilizadas em secagem, o spray-dryer é a mais difundida e empregada por indústrias químicas e farmacêuticas na transformação de materiais líquidos e sólidos. Contudo, como o spray-dryer é equipamento comercial que não pode ser adquirido facilmente, necessitando porém, de alto investimento inicial, têm-se como alternativas o leito de jorro, a liofilização e a evaporação rotativa.

A escolha do tipo de secador passa por análise do tipo de partícula a ser seca, da capacidade de produção, da eventual necessidade de recuperação de solvente e da demanda energética do processo.

7. REFERÊNCIA

ADAMIEC, J. *et al.* In: MUJUMDAR, A.S. **Handbook of Industrial Drying**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1995. p.775-808.

BASSANI, V.L. **Valorisation de Formes Galeniques Vegetales Desalcoolisation et Concentration de Solutions Extratives sur Membrane d'Osmose Inverse**, 1990. 261p. Tese. Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier, Montpellier.

BOSS, E.A. **Modelagem e otimização do processo de liofilização: aplicação para leite desnatado e café solúvel**. 2004. 129p. Tese. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

BRASIL, 2010. Resolução-RDC nº14, de 31 de março de 2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União nº 63, de 5 de abril de 2010.

Broadhead, J.; Rouan, S.K.E.; Rhodes, C.T. **The Spray Drying of Pharmaceuticals, Drug Development and Industrial Pharmacy**. V.18 (11-12), p. 1169-1206, 1992.

Cai, Y.Z.; Corke, H. Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments, **Journal of Food Science**, v.65, n.7, p.1248-1252. 2006.

Casadebaig, J.; Jacob, M.; Cassanas, G.; Gladys, D.; Baylac, G.; Puech, A. Physicochemical and Pharmacological Properties of Spray-dried Powders from *Fraxinus excelsior* leaf Extracts, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 26, n. 2, p.211-216, 1989.

Cordeiro, D.S. **Produção de extrato seco de *Maytenus ilicifolia* Martius Ex Reiss pelo Processo Leito de Jorro**, 2000. 80p. Dissertação - PPG-FCFRP/USP, Ribeirão Preto.

De Paula, I.C.; Ortega, G.G.; Bassani, V.L.; Petrovick, P.R. Development of Ointment Formulations Prepared with *Achyrocline satureioides* Spray dried Extracts, **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24 (3), p. 234-241, 1998.

De Paula, I.C.; Petrovick, P.R. Desenvolvimento Tecnológico de Forma Farmacêutica Plástica Contendo Extrato Seco Nebulizado de *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. Compositae. **Caderno de Farmácia**. Vol.13. n.2. p.143-145. 1997.

Dutra, R.C.; Pittella, F.; Ferreira, A.S.; Larcher, P.; Farias, R.E.; Barbosa, N.R. Efeito Cicatrizante das Sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel em Modelos de Úlceras Dérmicas Experimentais em Coelhos. **Latin American Journal of Pharmacy**, 28 (3):375-82 2009.

Farmacopéia Brasileira, 4 ed. São Paulo: Andrei, 1988. p. IV.7

Ishikawa, T.; Kato, E.T.M.; Yoshida, M.; Kaneko, T.M. Morphoanatomic aspects and phytochemical screening of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol.44, n.3, jul./set. p. 515-520, 2008.

Isono, Y.; Araya, G.; Hoshino A. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* for Ethanol Fermentation on γ - Alumina Particles using a Spray-dryer. **Process Biochemistry**, v.30, n.8, p. 743-746, 1995.

Jales, S.T.L. **Avaliação da atividade microbiológica e tecnologia de obtenção das formas farmacêuticas cápsulas e flaconetes à base de *Zymomonas mobilis***. 1999. 103p. Dissertação - Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Lichtfield, R. J., Liapis, A. I., Farhadpour, F. A. Cycled pressure and near - Optimal pressure policies for a freeze dryer. **Journal of Food Technology**. Missouri, v. 16, p. 637-646, 1981.

Marreto, R.N. **Estudo da técnica de leito de jorro convencional para secagem de microcápsulas de caseína e pectinas.** 2006. 199p. Tese - Programa de Pós-graduação em Ciência Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão de Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Masters, K. **Spray Drying Handbook**, George Godwing, Ltd., London, 3rd., 1979. 687p.

Mathur, K.B. & Epstein, N. **Spouted Beds.** 1^a Ed. London: Academic Press. 1974. 304p.

Mujumdar, A.S. **Handbook of industrial drying.** Thrid edition. Ed. CRC Press. 2006. 1312p.

Oliveira, E.O. **Secagem de *Spirulina platensis*: análise das técnicas de leito de jorro e camada delgada.** 2006. 92p. Dissertação - Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Departamento de Química. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

Patel, K.; Bridgwater, J.; Baker, C.G.J.; Shneider, T. **Spouting Behavior of Wet Solids**, *Drying'86*, New York, Hemisphe-Publ.Co.,v.1. 1986, p. 415-420.

Remili, H.; Boussard, P.; Devleeschouwer, M. Microbiological Quality of Spray-dried Pharmaceutical Plants Extracts. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** v.1., p.265-268, 1994.

Runha, F.P.; Cordeiro, D.S.; Pereira, C.A.M.; Vilegas, J.; Oliveira, W.P. Production of Dry Extracts of Medicinal Brazilian Plants by Spouted Bed Process: Development of the Process and Evaluation of Thermal Degradation During Operation. **Trans IChemE.** v. 79, Part C, September, 2001.

RPW, S. Evaporador rotativo. 2010. Disponível em:
<http://translate.google.com.br/translate?hl=pt->

[BR&langpair=en%7Cpt&u=http://www.chromatography-online.org/topics/rotary/evaporator.html](http://www.chromatography-online.org/topics/rotary/evaporator.html). Acesso em: 14/02/10.

Senna, E.M.T.L. Desenvolvimento de Extratos Secos Nebulizados de *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. Compositae (Marcela), 1993. 140p. Dissertação - PPG-CF/UFRGS, Porto Alegre.

Senna, E.M.T.L. *et al.* Preparation and Characterization of Spray-dried Powders from *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. Extracts, **Phytoterapy Research**, v.11, p.123-127, 1997.

Silva, A.; Figliolia, M.B.; Aguiar, I.B.; Perecin, D. Liofilização e armazenamento de sementes de ipê-rosa *Tabebuia heterophylla* (A.P. Candolle Britton) – Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Sementes**. vol. 23, nº 1, p. 252-259, 2001.

Souza, C.R.F. **Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos spray-dryer e leito de jorro**. 2003. 208p. Dissertação - USP, Ribeirão Preto.

Souza, C.R.F. **Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras: estudo da viabilidade técnica e econômica do processo em leito de jorro**. 2007. 219f. Tese - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto,

Sousa, O.V.; Del-Vechio-Vieira, G.; Almeida, B.H.; Miranda, M.A.; Figueiras, R.C.; Campos, A.C.; Silvério, M.S. Efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato *Posoqueria acutifolia* Mart. (Rubiaceae) em roedores. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.28, n.1, p. 51-56, 2007.

Teixeira, H.F. Avaliação da Influência de Adjuvantes Farmacêuticos sobre as Características Físicas, Químicas, Tecnológicas e Farmacológicas de Extratos Secos Nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae – Marcela, **Caderno de Farmácia**. v. 13. n.2. p. 151-152. 1997.

Wendel, S.; Celik, M. Uma Visão Geral sobre o Uso da Tecnologia de Spray-Drying, **Pharmaceutical Technology**, 1998. v.5. p. 32-43.

Wikipedia. Evaporador rotativo. 2010. Disponível em:
http://en.wikipedia.org/wiki/Rotary_evaporator. Acesso em : 14/02/10.



REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS

Brazilian Journal of Medicinal Plants

Fundação do Instituto de Biociências - FUNDIBIO

Homepage: <http://www.lbb.unesp.br/rbpm>

ISSN 1678-4585

ISSN 1678-4585

ROTEIRO PARA AVALIAÇÃO DOS TRABALHOS CIENTÍFICOS

Protocolo nº 09/117

Recebido: 24/08/09

TÍTULO: "Caracterização físico-química e análises por cromatografia em camada delgada e espectrofométrica de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.)"

1. Trata-se de uma contribuição atualizada e original ?
(X) Sim () Não
2. O título reflete clara e objetivamente o conteúdo ?
(X) Sim () Não
3. O resumo contém as informações essenciais sobre o trabalho ?
(X) Sim () Não
4. Os métodos empregados são apropriados ?
(X) Sim () Não
5. A organização e extensão do trabalho são satisfatórias ?
(X) Sim () Não
6. Os resultados são apresentados claramente ?
() Sim (X) Não
7. As conclusões estão de acordo com o objetivo do trabalho ?
(X) Sim () Não
8. Os quadros e figuras são todos necessários ?
() Sim (X) Não
9. As referências são adequadas e representativas ?
(X) Sim () Não



REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS

Brazilian Journal of Medicinal Plants

Fundação do Instituto de Biociências - FUNDIBIO

Homepage: <http://www.ibb.unesp.br/rbpm>

ISSN 1677-0512
CODEN RBPM 1992-093X

FICHA DE AVALIAÇÃO

PARECER SOBRE O TRABALHO Nº 09/117 2ª versão

Os autores atenderam as recomendações sugeridas, melhorando consideravelmente o manuscrito. Ainda assim, verificamos a necessidade de pequenos ajustes e correções. Para facilitar o entendimento, fizemos nossas observações no próprio texto (destacada em vermelho) e também algumas correções (destacado em amarelo).

(Utilize folha extra, se necessário)

AVALIAÇÃO FINAL

- APROVADO, sem alterações.
- APROVADO, com pequenas alterações do relator.
- Necessita retornar ao relator, após correção ?
- sim não
- O trabalho deverá ser REFORMULADO.
- O trabalho NÃO TEM CONDIÇÕES de ser publicado.



ISSN 1516-0572
ISSN on line 1983-084X

REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS

Brazilian Journal of Medicinal Plants

Fundação do Instituto de Biociências - FUNDIBIO

Homepage: <http://www.ibb.unesp.br/rbpm>

ROTEIRO PARA AVALIAÇÃO DOS TRABALHOS CIENTÍFICOS

Protocolo nº 09/117

Recebido: 24/08/09

TÍTULO: "Caracterização físico-química e análises por cromatografia em camada delgada e espectrofométrica de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.)"

1. Trata-se de uma contribuição atualizada e original ?

Sim Não

2. O título reflete clara e objetivamente o conteúdo ?

Sim Não

3. O resumo contém as informações essenciais sobre o trabalho ?

Sim Não

4. Os métodos empregados são apropriados ?

Sim Não

5. A organização e extensão do trabalho são satisfatórias ?

Sim Não

6. Os resultados são apresentados claramente ?

Sim Não

7. As conclusões estão de acordo com o objetivo do trabalho ?

Sim Não

8. Os quadros e figuras são todos necessários ?

Sim Não

9. As referências são adequadas e representativas ?

Sim Não



ISSN 1518-0572
ISSN on line 1983-084X

REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS
Brazilian Journal of Medicinal Plants
Fundação do Instituto de Biociências - FUNDIBIO
Homepage: <http://www.ibb.unesp.br/rbpm>

FICHA DE AVALIAÇÃO

PARECER SOBRE O TRABALHO Nº 09/117 2ª versão

(Utilize folha extra, se necessário)

AVALIAÇÃO FINAL

- APROVADO, sem alterações.
- APROVADO, com pequenas alterações do relator.
- Necessita retornar ao relator, após correção ?
- sim não
- O trabalho deverá ser REFORMULADO.
- O trabalho NÃO TEM CONDIÇÕES de ser publicado.
-

Revisão do manuscrito.

Os autores atenderam as indagações feitas na primeira correção do manuscrito. Agregaram a cromatografia a líquido de alta eficiência deixando o trabalho mais substanciado. Aumentaram as análises com mais padrões de flavonóides, porem ainda existe uma lacuna em relação a planta: como justificar um fitoterápico utilizando a planta inteira? Nenhum aspecto de cultivo e distribuição da espécie foi abordado.

Sugerimos o título: Caracterização físico-química e análises por espectrofotometria e cromatografia em camada delgada e à líquido de alta eficiência de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.).

Atendendo a essas sugestões o manuscrito pode ser aceito para publicação

Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

[PÁGINA INICIAL](#) [SOBRE](#) [PÁGINA DO USUÁRIO](#)

[PESQUISA](#) [ATUAL](#) [ARQUIVOS](#)

[CORPO EDITORIAL/EDITORIAL BOARD](#) [INSTRUÇÃO AOS](#)

[AUTORES/INSTRUCTIONS TO AUTHORS](#)

SISTEMA
ELETRÔNICO
DE
EDITORÇÃO
DE REVISTAS

[Página inicial](#) > [Usuário](#) > [Autor](#) > [Submissões](#) > #1462 > [Resumo](#)

#1462 Sumário

[RESUMO](#) [AVALIAÇÃO](#) [EDIÇÃO](#)

Submissão

Autores Pedro José Rolim-Neto, Rosali Silva Maria Ferreira Silva, Magaly Andreza Marques Lyra, Thays Cristiane Barbosa Lucena Gomes, Graziella Silvestre Marques, Monize Santos Peixoto, José Lourenço Freitas Neto, Lariza Darlene Santos Alves, Keyla Emanuelle Ramos Silva, Pablo de Ataíde Ferreira

Título Aplicação da Análise Térmica na Indústria Farmacêutica de Fitoterápicos e Fitocosméticos

Documento Original 1462-S440-1-SM.DOCX **2010-09-24**

Doc. Sup. Nenhum(a) [INCLUIR DOCUMENTO SUPLEMENTAR](#)

Submetido por Pedro José Rolim-Neto 

Data de submissão setembro 24, 2010 - 03:32

Seção Artigos de Revisão/Review Articles

Editor Nenhum(a) designado(a)

[Ajuda do sistema](#)

[USUÁRIO](#)

Logado como...
pedrorolim

- [Meus periódicos](#)
- [Perfil](#)
- [Sair do Sistema](#)

Situação

Situação Aguardando designação

Iniciado 2010-09-24

Última alteração 2010-09-24

[AUTOR](#)

[Submissões](#)

- [Ativo \(5\)](#)
- [Arquivo \(3\)](#)
- [Nova Submissão](#)

Metadados da Submissão

[LISTAR METADADOS](#)

Autores

Nome Pedro José Rolim-Neto 

Instituição Universidade Federal de Pernambuco
País Brasil
Resumo da Biografia Graduado em Farmácia pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em 1982, obtendo habilitação em Indústria em 1983 pela mesma Universidade. Mestre em Ciências Farmacêuticas, em 1988, pela UFPE. Obteve o título de Especialista em Farmácia Industrial, (1989), Diploma de Estudos Aprofundados (1990) e o Doutorado (de 1988 a 1992) pela Universidade de Montpellier 1, na França. Participou do curso promovido pela Food and Drug Administration (FDA) sobre Boas Práticas de Fabricação para Produtos Farmacêuticos, na Universidade de Puerto Rico, em San Juan em 2001. Desenvolve pesquisa para diversas Indústrias Farmacêuticas há 26 anos. Atualmente é professor adjunto da UFPE, Coordenador do Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE. Atua na área de Tecnologia Farmacêutica, obtenção de formas farmacêuticas clássicas e sistemas de vetorização de fármacos de origem natural e sintética.

Contato Principal para correspondência.

Nome Rosali Silva Maria Ferreira Silva 
Instituição Universidade Federal do Pará
País —
Resumo da Biografia —

Nome Magaly Andreza Marques Lyra 
Instituição —
País —
Resumo da Biografia —

Nome Thays Cristiane Barbosa Lucena Gomes 
Instituição —
País —
Resumo da Biografia —

Nome Graziella Silvestre Marques 
Instituição —
País —
Resumo da Biografia —

Nome Monize Santos Peixoto 
Instituição —
País —
Resumo da Biografia —

Nome José Lourenço Freitas Neto 
Instituição —
País —
Resumo da Biografia —

IDIOMA

Português (Bra

CONTEÚDO DA REVISTA

Pesquisa

Todos

Pesquisar

Procurar

- Por Edição
- Por Autor
- Por Título
- Outras revistas

TAMANHO DE FONTE

Menor

Médio

Maior

INFORMAÇÃO

- Para Leitores
- Para Autores
- Para Bibliotecár

Nome	Lariza Darlene Santos Alves 
Instituição	--
País	--
Resumo da Biografia	--
Nome	Keyla Emanuelle Ramos Silva 
Instituição	--
País	--
Resumo da Biografia	--
Nome	Pablo de Ataíde Ferreira 
Instituição	--
País	--
Resumo da Biografia	--

Título e Resumo

Título	Aplicação da Análise Térmica na Indústria Farmacêutica de Fitoterápicos e Fitocosméticos
Resumo	Este artigo apresenta a análise térmica como uma ferramenta para os estudos das propriedades físicas e químicas de fitoterápicos e fitocosméticos. Os autores relatam alguns trabalhos da literatura em que diferentes técnicas termoanalíticas são utilizadas tanto no controle da matéria prima, quanto do produto acabado, possuindo potencial de emprego no desenvolvimento e na caracterização de novos produtos e avaliação dos processos de secagem. Diante dos estudos apresentados, demonstra-se a importância das técnicas termoanalíticas na indústria de fitoterápicos e fitocosméticos visto à grande variedade de suas aplicações.

Indexação

Área e sub-área do Conhecimento Acadêmico	Ciências Farmacêuticas; Indústria Farmacêutica; Fitoterápicos
Classificação de Assunto	--
Palavras-chave	análise térmica, controle de qualidade, fitoterápicos, fitocosméticos
Cobertura Geo-espaçial	--
Cobertura Cronológica ou Histórica	--
Características da amostra da pesquisa	--
Tipo, método ou ponto de vista	--

Idioma pt

Agências de Financiamento

Agências —



Home > User > Author > Active Submissions

Active Submissions

ACTIVE | ARCHIVE

ID	MM-DD SUBMIT SEC	AUTHORS	TITLE	STATUS
RBFAR-377	07-05	Rolim Neto, Silva, Silva Júnior,...	PEPEROMIA PELLUCIDA: CHEMICAL AND PHARMACOLOGY IN THE...	QUEUED FOR EDITING Decline Submission
RBFAR-637	12-05	Rolim Neto	INFLUENCE OF SEASONALITY AND EXTRACTION PROCESS ON THE...	Awaiting assignment
RBFAR-639	12-06	Silva, Gomes, Rolim, Silva, Costa,...	IN VITRO MICROPROPAGATION OF PEPEROMIA PELLUCIDA L. (T.B.K.)	Awaiting assignment

1 - 3 of 3 Items

Start a New Submission

[CLICK HERE](#) to go to step one of the five-step submission process.

Title and Abstract

Title Influence of seasonality and extraction process on the concentration of flavonoids in *Peperomia pellucida* L. Kunth (Piperaceae)

Abstract In the phytotherapics obtainment, standardization of raw plant materials is ensured by herbal drug quality, extraction conditions, followed by the content determination of one or more components or by the content determination of some representative compounds in the extract. The content is adjusted to values previously defined, resulting in greater uniformity of plant derivatives, which is important in the production of safe and effective medicines. **This study aimed to analyze the content of *Peperomia pellucida* L. Kunth (Piperaceae) marker in different extraction process (maceration and percolation) with different solvent concentrations and at three collection times in order to evaluate the seasonality. The highest rainfall during the settled period does not influence the amount of marker available in the sample. The maceration with 70% ethanol indicated the highest level of the marker, 3', 4', 7-tri-O-methoxyflavone.**

Indexing

Academic discipline —
and sub-disciplines

Keywords *Peperomia pellucida*, seasonality, extraction process

Language en

Supporting Agencies

Agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior



Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada

Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Araraquara, 19 de outubro de 2010.

Ref. RCFBA-034/2010

Em nome da Editoria Científica, temos o prazer de informar que o artigo:

Título: Atividade Antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pelucida* e *Portulaca pilosa*.

Autores: Lorena Paula Mercês Mendes, Karen Marinho Maciel, Antonia Benedita Rodrigues Vieira, Lúcia Carla Vasconcelos Mendonça, Rosali Maria Ferreira da Silva, Pedro José Rolim Neto, Wagner Luiz Ramos Barbosa, José Maria dos Santos Vieira.

foi aceito para publicação na *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*.

Enviaremos, na época oportuna, a prova gráfica para correção final.

Atenciosamente,

Eliana Aparecida Varanda
Editora Chefe

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto



REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS

Brazilian Journal of Medicinal Plants

Fundação do Instituto de Biociências - FUNDIBIO

Homepage: <http://www.ibb.unesp.br/rbpm>

ISSN 1678-0873

ISSN (cd) 1661-084X

Botucatu, 13 de maio de 2010

Ilm^o Sr^o

Rosali Maria Ferreira Silva

Prezada Senhora

Temos a grata satisfação de acusar o recebimento da revisão "**Uma abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais**", de autoria de SILVA, R.M.F.; GOMES, T.C.B.L.; ALBUQUERQUE, M.M.; SILVA JUNIOR, J.O.C.; BARBOSA, W.L.R.; ROLIM NETO, P.J., a qual recebeu o protocolo nº 10/014.

Sem mais para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente

Prof. Dr. Lin Chau Ming

Editor Chefe

CERTIFICADO

XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil
X International Congress of Ethnopharmacology

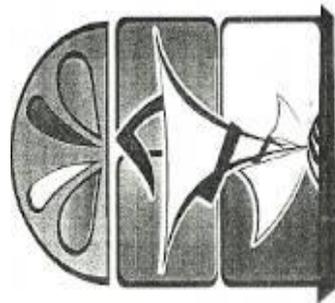
São Paulo, 16 a 19 de setembro de 2008



Certificamos que o trabalho "**7046 - Phytochemical evaluation of Peperomia pellucida (L.) H. B. K. ethanolic extract**" de autoria de *Ribeiro, J. F. A.; Silva, R. M. F.; Vasconcelos, F.; Barbosa, W. L. R.; Silva Jr, J. O. C.; Rolim, P. J.* foi apresentado como **pôster** no XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, realizado no Centro de Convenções Frei Caneca, de 16 a 19 de setembro de 2008 em São Paulo, SP, Brasil.

Elaine Elisabethsky
President Organizing
Committee

Elisaldo A. Carfíni
Presidente Comissão
Organizadora



1º CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS

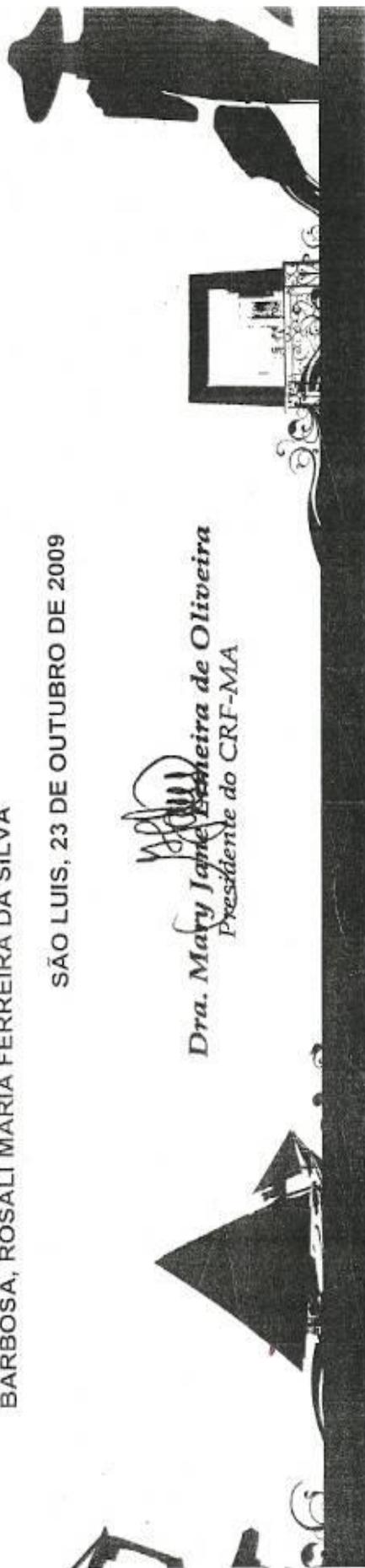
CERTIFICADO

CERTIFICAMOS QUE JEANE FRANCISCA ALVES RIBEIRO

PARTICIPOU DO I CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS COMO AUTOR DO TRABALHO CIENTÍFICO: ANÁLISE FITOQUÍMICA E ESPECTROFOTOMÉTRICA UV/VIS DO EXTRATO ETANÓLICO DE PEPEROMIA PELLUCIDA L. (H.B.K.), COM OS CO-AUTORES WAGNER LUIZ RAMOS BARBOSA, ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA

SÃO LUIS, 23 DE OUTUBRO DE 2009

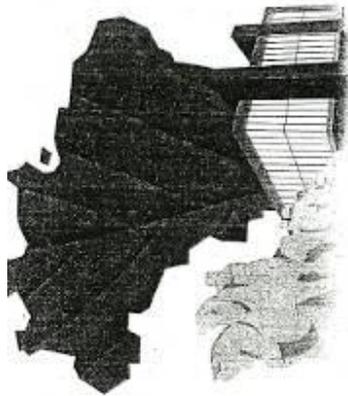

Dra. Mary Jane Ferreira de Oliveira
Presidente do CRF-MA



CERTIFICADO

XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil
X International Congress of Ethnopharmacology

São Paulo, 16 a 19 de setembro de 2008



Certificamos que o trabalho "7046 - Phytochemical evaluation of *Peperomia pellucida* (L.) H. B. K. ethanolic extract" de autoria de "Ribeiro, J. F. A.; Silva, R. M. F.; Vasconcelos, F.; BARBOSA, W. L. R.; Silva Jr, J. O. C.; Rolim, P. Jr" foi apresentado como pôster no XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, realizado no Centro de Convenções Frei Caneca, de 16 a 19 de setembro de 2008 em São Paulo, SP, Brasil.

Elaine Elisabetisky
President Organizing
Committee

Elissaldo A. Carlini
Presidente Comissão
Organizadora



**XXI Simposio
de Plantas
Medicinais
do Brasil**

14 a 17 de setembro de 2010
Tropical Hotel Tambau - João Pessoa-PB

CERTIFICADO

Certificamos que **ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA, GOMES, T.C.B.L., ROLIM, L.A., SILVA, K.E.R., SOUZA, F.S., SOARES SOBRINHO, J.L., ALBUQUERQUE, M.M., SILVA JÚNIOR, J.O.C., BARBOSA, W.L.R., ROLIM NETO, P.J.**, participaram do XXI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, realizado no período de 14 a 17 de setembro de 2010, no Centro de Convenções do Tropical Hotel Tambau, na cidade de João Pessoa-PB, na qualidade de: **AUTOR (S) DO TRABALHO: ANÁLISE TÉRMICA DE EXTRATOS SECOS DE PEPEROMIA PELLUCIDA (L.) H. B. K., na categoria POSTER.**

João Pessoa-PB, 17 de setembro de 2010.




Isac Almeida de Medeiros
Presidente do XXI SPMB


Maria de Iatima Agra
Coord*. da Comissão Científica





XXI Simposio
de Plantas
Medicinais
do Brasil

14 a 17 de setembro de 2010
Tropical Hotel Tambau | João Pessoa-PB

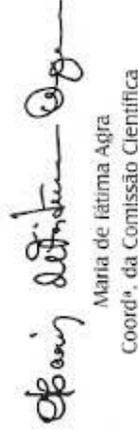
CERTIFICADO

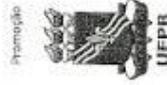
Certificamos que ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA, GOMES, T.C.B.L., STRATMAN, R.R., ROLIM, L.A., SILVA, K.E.R., SOARES SOBRINHO, J.L., ALBUQUERQUE, M.M., SILVA JÚNIOR, J.O.C., BARBOSA, W.L.R., ROLIM NETO, P.J., participaram do XXI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, realizado no período de 14 a 17 de setembro de 2010, no Centro de Convenções do Tropical Hotel Tambau, na cidade de João Pessoa-PB, na qualidade de: AUTOR (S) DO TRABALHO: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PÓ DE PEPEROMIA PELLUCIDA (L.) H. B. K., na categoria POSTER.

João Pessoa-PB, 17 de setembro de 2010.

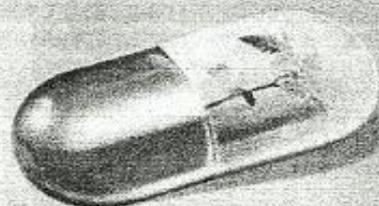



Isac Almeida de Medeiros
Presidente do XXI SPMB


Maria de Iatima Agra
Coordª. da Comissão Científica



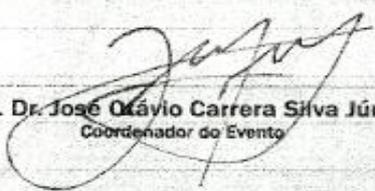
II Workshop sobre Desenvolvimento
Tecnológico de Medicamentos
Fitoterápicos



Certificado

Certificamos que o trabalho **ASPECTOS ANATÔMICOS DE PEPEROMIA PELLUCIDA L. (H.B.K.)** dos autores: Silva, R.M.F.; Freitas, M.C.C.; Silva Júnior, J.O.C.; Vieira, J.G.P.; Barbosa, W.L.R.; Rolim Neto, P.J.R.; foi apresentado na modalidade Pôster no II Workshop sobre Desenvolvimento Tecnológico de Medicamentos Fitoterápicos, realizado na cidade de Belém-Pará, no período de 24 a 26/11/2010.

Belém - Pará, 26 de novembro de 2010

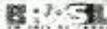

Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Júnior
Coordenador do Evento



Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas

Patrocínio

Ministério
da Saúde



Conselho
Federal de
Farmácia
www.cff.org.br

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

