



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

NATHÁLIA ALEXANDRA DE OLIVEIRA CARTAXO FURTADO

**PADRONIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL E INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO
DE *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville COM AÇÃO ANTIMICROBIANA**

Recife-PE
2019

NATHÁLIA ALEXANDRA DE OLIVEIRA CARTAXO FURTADO

**PADRONIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL E INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO
DE *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville COM AÇÃO ANTIMICROBIANA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produção e Controle Qualidade de Medicamentos.

Orientador: Prof^o. Dr. Rui Oliveira Macêdo.

Recife-PE
2019

Catálogo na fonte:
bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

F992p	<p>Furtado, Nathália Alexandra de Oliveira Cartaxo Padronização da droga vegetal e insumo farmacêutico ativo de <i>stryphnodendron adstringens</i> (mart.) coville com ação antimicrobiana/ Nathália Alexandra de Oliveira Cartaxo Furtado. – 2019. 142 f.; il.</p> <p>Orientador: Rui Oliveira Macêdo. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2019. Inclui referências e apêndice.</p> <p>1. <i>Stryphnodendron barbatiman</i>. 2. Fitoterapia. 3. Controle de qualidade. 4. Potência microbiológica.. I. Macêdo, Rui Oliveira. (orientador). II. Título.</p> <p>615.1 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 196)</p>
-------	---

NATHÁLIA ALEXANDRA DE OLIVEIRA CARTAXO FURTADO

**PADRONIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL E INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO
DE *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville COM AÇÃO ANTIMICROBIANA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 15 de março de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo (Presidente e Orientador)
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares (Avaliador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques (Avaliadora Externa)
Universidade Estadual da Paraíba

Prof. Dr. Ionaldo José Basílio Diniz (Avaliador Externo)
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dra. Cinthya Maria Pereira de Souza (Avaliadora Externa)
Universidade Estadual da Paraíba

Dedico esse trabalho ao meu Pai Celestial, amigo e conselheiro, Deus, aos meus pais Marcos e Nancy e ao meu esposo Fabricio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que é o meu tudo, o meu guia, a minha inspiração e a minha força. A ti todo o meu amor e a minha gratidão por teres me ajudado a finalizar mais essa etapa na minha vida e me ajudado a realizar os meus sonhos.

À minha família, especialmente aos meus pais, Marcos e Nancy, pelo amor, fidelidade, pelo incentivo que me fez chegar até aqui e por serem o meu anjo aqui na terra, intercedendo sempre por mim.

Aos meus irmãos (Thiago e Naylla) e cunhados (Genival e Renata) que me deram nesse período os maiores presentes, meus sobrinhos: Davi, Lalá, Mamá, Teteu e Isaac. Obrigada pela força. Aos meus sogros, Djair e Fátima por todo o carinho e apoio. Às minhas avós Vilanis que sempre intercederam por mim e à Vilani Palitot que me acolheu em seu lar durante esses 4 anos. Às minhas primas e tia por sempre estarem por perto e acreditarem em mim.

Ao meu amado esposo, Fabrício Furtado, presente de Deus em minha vida, por ter dividido comigo todos os momentos dessa caminhada; por seu companheirismo, dedicação e carinho, pelas palavras de esperança e fé, capazes de me manter sempre no caminho que levou até este momento. Eu te agradeço, meu amor!

Aos meus amigos e familiares, especialmente aqueles que sempre estiveram por perto, dando-me o apoio necessário.

Ao meu Orientador Professor Rui Oliveira Mâcedo, por toda confiança, dedicação e disponibilidade fornecida durante esses quatro anos. Gratidão por todos os seus conhecimentos compartilhados me mostrando sempre o melhor caminho a seguir.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE, pela oportunidade de ingresso no Doutorado.

À Nerilin e Rilvan, secretários do PPGCCF/UFPE, por toda dedicação e paciência.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE, que contribuíram por meio de disciplinas e debates à minha formação.

Aos professores Luís Alberto, Jozinete Vieira, Ionaldo Basílio e Cinthya Maria, pelas contribuições positivas na avaliação deste trabalho.

Aos professores Thiago e Alisson por todo o auxílio nas análises realizadas no Laboratório de Proteínas da UFPE, bem como à Martha Maria, no Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM/ UFPB) e a Mayson no Laboratório de Solidificação Rápida (LSR/UFPB).

À turma do doutorado 2015.1 do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE, particularmente Paulo, Suellen e Luanne por toda a amizade que construímos e pelas aventuras em Recife logo no início dessa longa jornada

Aos colegas dos Laboratórios Unificados de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LUDEM) em especial a Deysiane, Monik, Fernando, Rayane, Taynara, Ravelly, Geovani, Fabrício, Lázaro, Ertha, Glória e os demais, pelas contribuições, auxílio e discussões ao longo desses anos em que passamos juntos. Agradeço aos senhores Fernando e Raminho, que auxiliaram na coleta e processamento do material vegetal.

Aos amigos Deysiane e Fernando, pela parceria, amizade e companheirismo, desde a graduação, estando presentes em todos os momentos até hoje. Vocês foram muito importantes no meu caminho.

À professora Ana Cláudia, pelos conselhos e cessão dos equipamentos que foram decisivos para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao grande professor Ivan Coelho Dantas (*In memoriam*), pelo lindo trabalho que executou, assim como por despertar o interesse pelas plantas medicinais.

A Universidade Federal da Paraíba e Universidade Estadual da Paraíba por me fornecer a estrutura física necessária a realização dos trabalhos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse estudo. Enfim, o meu muito obrigado!

RESUMO

Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville (Fabaceae), conhecida popularmente como "barbatimão" é uma árvore nativa do Brasil e típica do cerrado. É utilizada no tratamento de inflamações vaginais e de infecções em geral. O objetivo desse estudo foi padronizar droga vegetal e insumo farmacêutico ativo de folhas de *S. adstringens* com ação antimicrobiana. Foi coletada na praia de Jacarapé, em João Pessoa (PB) e fez-se a tamização do material vegetal seco nos tamanhos de partículas: 50-100 mesh (BF1), 100-200 mesh (BF2), 200-400 mesh (BF3) e <400 mesh (BF4) bem como obteve-se o insumo farmacêutico por nebulização (extrato/IFAV). Essas amostras foram submetidas a caracterização por meio de termogravimetria, cinética de degradação pelo método de Ozawa, análise térmica diferencial, microscopia eletrônica de varredura (MEV), pirólise acoplada à cromatografia gasosa (para droga vegetal), espectroscopia de infravermelho (para o extrato), determinação da concentração inibitória mínima (CIM), potência microbiológica das amostras comparando-se a antibióticos sintéticos, determinação do teor de polifenóis, taninos e flavonoides das amostras e toxicidade por *Artemia salina* e aguda do extrato. Por fim, fez-se um estudo de compatibilidade térmica extrato/excipientes. Observou-se que as amostras apresentaram perfis térmicos e cinéticos diferentes, onde a quarta etapa apresentou os maiores valores de perda de massa e a energia de ativação foi maior em BF4. Droga e extrato obtiveram concentrações significativas de taninos, flavonóides e polifenóis totais, apresentando uma maior concentração no extrato, 145, 23 e 289mg/g do padrão, respectivamente. As amostras inibiram o crescimento dos microrganismos apresentando excelente atividade antimicrobiana com CIMs <13mg/mL frente a todas as cepas testadas. A potência do extrato foi maior que 90% comparada aos padrões, mostrando assim que *S. adstringens* teve uma ótima potência microbiológica pelo método validado. A toxicidade do extrato mostrou-se mínima. Portanto, as tecnologias analíticas utilizadas possibilitaram traçar perfis térmico, cinético, microbiológico e toxicológico de *S. adstringens*, significativos e diferenças quantitativas de compostos químicos entre as faixas granulométricas, destacando quantidade significativa de polifenóis. Destaca-se a eficácia, através da potência microbiológica e baixa toxicidade, sendo possível a incorporação em um produto semi-sólido indicado para feridas cirúrgicas e diversas infecções dermatológicas.

Palavras-chaves: *Stryphnodendron barbatiman*. Fitoterapia. Controle de qualidade. Potência microbiológica.

ABSTRACT

Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville (Fabaceae), popularly known as "barbatimão" is a tree native to Brazil and typical of the cerrado. It is used in the treatment of vaginal inflammations and infections in general. The objective of this study was to standardize plant drug and active pharmaceutical ingredient of leaves of *S. adstringens* with antimicrobial action. It was collected at Jacarapé beach, João Pessoa (PB) and the dry plant material was sieved at particle sizes: 50-100 mesh (BF1), 100-200 mesh (BF2), 200-400 mesh (BF3) and <400 mesh (BF4) as well as the pharmaceutical ingredient was obtained by nebulization (extract/IFAV). These samples were subjected to characterization by means of thermogravimetry, degradation kinetics by Ozawa method, differential thermal scanning electron microscopy (SEM), pyrolysis coupled to gas chromatography (for vegetable drug), Infrared spectroscopy (for the extract), determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), microbiological power of samples compared to synthetic antibiotics, determination of the content of polyphenols, tannins and flavonoids of the samples and toxicity by *Artemia salina* and acute of the extract. Finally, a study of thermal compatibility extract/Excipient was made. The samples presented different thermal and kinetic profiles, where the fourth stage had the highest values of mass loss and the activation energy was higher in BF4. Vegetable drug and extract obtained significant concentrations of tannins, flavonoids and total polyphenols, presenting a higher concentration in the extract, 145, 23 and 289mg/g of the standard, respectively. The samples inhibited the growth of the microorganisms presenting excellent antimicrobial activity with MICs <13mg/mL against all strains tested. The potency of the extract was higher than 90% compared to the standards, thus showing that *S. adstringens* had an excellent microbiological potency. The toxicity of the extract was minimal in the methodologies employed. Therefore, the analytical technologies used allowed the tracing of thermal, kinetic, microbiological and toxicological profiles of *S. adstringens*, significant and quantitative differences of chemical compounds among the granulometric bands, highlighting significant amount of polyphenols. It is noteworthy the efficacy, through microbiological power and low toxicity, and it is possible to incorporate in a semi product indicated for surgical wounds and several dermatological infections.

Keywords: *Stryphnodendron barbatiman*. Phytotherapy. Quality control. Microbiological Power

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Árvore de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville e suas folhas.....	28
Figura 2 -	Caule e flores de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville.....	30
Figura 3 -	Histogramas de distribuição granulométrica das drogas vegetais de <i>S. adstringens</i>	62
Figura 4 -	Histogramas de distribuição granulométrica do IFAV de <i>S. adstringens</i>	63
Figura 5 -	Imagens da Microscopia eletrônica de Varredura nos aumentos de 50 (a), 100 (b), 200 (c), 500(d), 1000(e) e 2000 (f) de BF1 de <i>S. adstringens</i>	64
Figura 6 -	Imagens da Microscopia eletrônica de Varredura nos aumentos de 50 (a), 100 (b), 200 (c), 500(d) , 1000(e) e 2000(f) x de BF2 de <i>S. adstringens</i>	65
Figura 7 -	Imagens da Microscopia eletrônica de Varredura nos aumentos de 50 (a), 100 (b), 200 (c), 500(d) , 1000(e) e 2000(f)x de BF3 de <i>S. adstringens</i>	65
Figura 8 -	Imagens da Microscopia eletrônica de Varredura nos aumentos de 50 (a), 100 (b), 200 (c), 500(d) , 1000(e) e 2000(f) x de BF4 de <i>S. adstringens</i>	66
Figura 9 -	Imagens da Microscopia eletrônica de Varredura nos aumentos de 50 (a), 100 (b), 200 (c), 500(d) , 1000(e) e 2000(f) x de IFAV de <i>S. adstringens</i>	67
Figura 10 -	Curvas TG das drogas vegetais de <i>S. adstringens</i> em diferentes tamanhos de partículas na razão de aquecimento de 10°C/min-1 em ar sintético (A) e Nitrogênio (B).....	68
Figura 11 -	Curvas TG das drogas vegetais de <i>S. adstringens</i> em atmosfera de ar sintético nas razões de aquecimento de 5, 10, 20 e 40 °C/min ⁻¹	69
Figura 12 -	Curvas DTA das drogas vegetais de <i>S. adstringens</i> em diferentes tamanhos de partículas na razão de aquecimento de 10°C ⁻¹	74

Figura 13 -	Curvas TG do IFAV de <i>S. adstringens</i> na razão de 10°C/min ⁻¹ em ar sintético e nitrogênio.....	76
Figura 14 -	Curvas TG do IFAV de <i>S. adstringens</i> em atmosfera de ar sintético nas razões de aquecimento de 5, 10, 20 e 40°C/min ⁻¹	78
Figura 15 -	Curva DTA do IFAV de <i>S. adstringens</i> na razão de aquecimento de 10°C/min ⁻¹	79
Figura 16 -	Espectro de infravermelho do IFAV de <i>S. adstringens</i>	80
Figura 17 -	Piogramas obtidos de <i>S. adstringens</i> nas temperaturas de 450, 350 e 250°C.....	81
Figura 18 -	Biplotagem de todas as variáveis (compostos) e amostras na temperatura de 250°C.....	83
Figura 19 -	Dendrogramas da HCA das amostras obtidas das folhas (A) e dos compostos (B) na temperatura de 250°C.....	84
Figura 20 -	Biplotagem de todas as variáveis (compostos) e amostras na temperatura de 350°C.....	85
Figura 21 -	Dendrogramas da HCA das amostras (A) e dos compostos (B) na temperatura de 350°C.....	85
Figura 22 -	Biplotagem de todas as variáveis (compostos) e amostras na temperatura de 450°C.....	86
Figura 23 -	Dendrogramas da HCA das amostras obtidas das folhas (A) e dos compostos (B) na temperatura de 450°C de <i>S. adstringens</i>	87
Figura 24 -	Curva de crescimento dos microrganismos <i>S. aureus</i> (A) e <i>E. coli</i> (B) no tempo de 24 horas.....	91
Figura 25 -	Curva da quantidade de unidades formadoras de colônias de <i>S.aureus</i> em função da concentração da substância de referência (cefalotina) e das amostras testes.....	93
Figura 26 -	Curva da quantidade de unidades formadoras de colônias de <i>E.coli</i> em função da concentração da substância de referência (gentamicina) e das	

amostras teste.....	93
Figura 27 - Gráficos dos Resíduos das análises do extrato de <i>S. adstringens</i> obtido das folhas (A) e das análises realizada com Cefalotina (B) frente a <i>S. aureus</i>	97
Figura 28 - Gráficos dos Resíduos das análises do extrato de <i>S. adstringens</i> obtido das folhas (A) e das análises relizadas com Gentamicina (B) frente a <i>E. coli</i>	98
Figura 29 - Curvas DSC e TG das misturas (1:1) do extrato-carbopol.....	110
Figura 30 - Curvas DSC e TG das misturas (1:1) do extrato-natrosol.....	111
Figura 31 - Curvas DSC e TG das misturas (1:1) do extrato-glicerina.....	113
Figura 32 - Curvas DSC e TG das misturas (1:1) do extrato-propilenoglicol.....	114
Figura 33 - Curvas DSC e TG das amostras do extrato, ácido benzóico e suas misturas (1:1).....	116
Figura 34 - Curvas DSC e TG das amostras do extrato, ácido cítrico e suas misturas (1:1).....	117
Figura 35 - Curvas DSC e TG das amostras do extrato, citrato e suas misturas (1:1).....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis e concentrações utilizadas das amostras de referência (antimicrobianos) e amostras testes (IFAV e droga vegetal).....	54
Tabela 2 - Classes dos excipientes utilizados no estudo.....	60
Tabela 3 - Distribuição granulométrica das amostras de <i>S. adstringens</i>	61
Tabela 4 - Etapas de decomposição térmica da droga vegetal de <i>S. adstringens</i> na atmosfera de ar sintético e de nitrogênio na razão de 10°C/min ⁻¹	68
Tabela 5 - Parâmetros de decomposição da quarta etapa de degradação das amostras obtidas de folhas de <i>S. adstringens</i>	71
Tabela 6 - Resíduo mineral de <i>S. adstringens</i> em atmosfera de nitrogênio e ar sintético na razão de 10°C/min ⁻¹	72
Tabela 7 - Parâmetros cinéticos de degradação térmica das drogas vegetais de <i>S. adstringens</i> obtidos pelo método de Ozawa.....	72
Tabela 8 - Eventos exotérmicos das DTA das drogas vegetais obtidas das folhas de <i>S. adstringens</i> em diferentes tamanhos de partículas.....	74
Tabela 9 - Etapas de decomposição térmica do IFAV de <i>S. adstringens</i> na atmosfera de ar sintético e de nitrogênio na Rz de 10°C/min ⁻¹	76
Tabela 10 - Parâmetros de decomposição da quarta etapa de degradação, em ar sintético, do IFAV obtido de folhas de <i>S. adstringens</i>	77
Tabela 11 - Eventos exotérmicos das DTA do IFAV obtido das folhas de <i>S. adstringens</i> em diferentes tamanhos de partículas.....	78
Tabela 12 - Teor de Taninos, flavonoides e polifenóis obtidos por espectroscopia na região do visível.....	88
Tabela 13 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das drogas vegetais de <i>S. adstringens</i>	89
Tabela 14 - Dados das equações das retas obtidas com os níveis 50, 100 e 200 das concentrações dos antimicrobianos e do IFAV frente a <i>S. aureus</i>	94

Tabela 15 - Dados das equações das retas obtidas com os níveis 50, 100 e 200 das concentrações dos antimicrobianos e do IFAV frente a <i>E. coli</i>	95
Tabela 16 - Determinação da potência do IFAV de <i>S. adstringens</i> em relação aos padrões de gentamicina 80mg/mL e cefalotina 1000mg.....	95
Tabela 17 - Parâmetros de curva analítica (intercepto - a, inclinação - b, e coeficiente de correlação - r ²) para o padrão Cefalotina 1000mg e o IFAV nos níveis de 50%, 100% e 200% frente a <i>S. aureus</i>	99
Tabela 18 - Parâmetros de curva analítica (intercepto - a, inclinação - b, e coeficiente de correlação - r ²) para o padrão Gentamicina 80mg/mL e o IFAV nos níveis de 50%, 100% e 200% frente a <i>E. coli</i>	99
Tabela 19 - Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão para precisão e exatidão intra e inter-dias da amostra em três diferentes níveis de concentração contra <i>S. aureus</i>	100
Tabela 20 - Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão para precisão e exatidão intra e inter-dias da amostra em três diferentes níveis de concentração contra <i>E. coli</i> ...	101
Tabela 21 - Valores do limite de quantificação, desvio padrão e coeficiente de variação calculado intradia e interdias nas análises com <i>S. aureus</i>	101
Tabela 22 - Valores do limite de quantificação, desvio padrão e coeficiente de variação calculado intradia e interdias nas análises com <i>E. coli</i>	102
Tabela 23 - Valores de potência relativa do IFAV aos antimicrobianos frente a <i>S. aureus</i> em diversas condições.....	102
Tabela 24 - Valores de potência relativa do IFAV aos antimicrobianos frente a <i>E. coli</i> em diversas condições.....	103
Tabela 25 - Parâmetros hematológicos de sangue de animais do grupo controle e tratamentos com IFAV de <i>S. adstringens</i> por 14 dias.....	105
Tabela 26 - Parâmetros bioquímicos de sangue de animais do grupo controle e tratamentos com IFAV de <i>S. adstringens</i> por 14 dias.....	106
Tabela 27 - Avaliação do consumo de alimentos e água, e ganho de peso dos animais dos grupos controle e tratados co IFAV de <i>S. adstringens</i> por 14 dias.....	106
Tabela 28 - Efeito com IFAV de <i>S. adstringens</i> (2000 mg/Kg v.o e i.p) em camundongos fêmeas Swiss após 14 dias de tratamento em dose única N2..	107
Tabela 29 - Estudo de compatibilidade de extrato de <i>S. adstringens</i> e excipientes usando DSC e TG na Rz 10 °C/min ⁻¹ na atmosfera de N2.....	109

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior que
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual a
°C/min	Graus célsius por minuto
µl	microlitros
µm	Micrômetros
ACAM	Herbário Manuel de Arruda Câmara
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain heart infusion
CG	Cromatografia gasosa
CG-MS	Cromatografia gasosa/ Espectrometria de massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL50	Concentração letal 50
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DL50	Dose letal 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-D6	DMSO deuterado
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica diferencial
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
h	Horas
HCA	Análise hierárquica de agrupamentos
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
kJ/mol	quilojoule por mol
m	Massa
m/z	massa/carga
mg	Miligramas

mg/mL	Miligramas por mililitros
MHz	Megahertz
min	Minutos
min⁻¹	Por minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetros
nm	Nanômetros
n°	Número
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PCA	Análise dos componentes principais
ppm	Partes por milhão
PYR-GC / MS	Pirólise acoplada a Cromatografia gasosa/ Espectrometria de massa
RDC	Resolução Diretiva Colegiada
rpm	Rotação por minuto
T	Temperatura
t	tempo
TG	Termogravimetria
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
V	Volts
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	OBJETIVOS.....	21
1.1.1	Objetivo geral.....	21
1.1.2	Objetivos específicos.....	22
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1	MICROORGANISMOS ENVOLVIDOS EM INFECÇÕES DERMATOLÓGICAS.....	24
2.1.1	Uso de géis em infecções dermatológicas.....	24
2.2	UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	26
2.2.1	<i>Stryphnodendron adstringens</i> Coville(Fabaceae).....	27
2.2.1.1	Características gerais.....	27
2.2.1.2	Usos e propriedades medicinais de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville.....	28
2.3	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	31
2.3.1	Taninos.....	31
2.3.2	Flavonoides.....	32
2.3.3	Saponinas.....	33
2.3.4	Alcalóides.....	34
2.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	34
2.4.1	Métodos Biológicos Utilizados no Doseamento de Antibióticos.....	35
2.5	CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL.....	38
2.5.1	Produtos terapêuticos de origem vegetal.....	38
2.5.2	Emprego de tecnologias analíticas para a padronização de materiais vegetais.....	40

2.5.2.1	Técnicas analíticas aplicadas na padronização de matérias-primas vegetais.....	40
2.5.2.1.1	<i>Tamanho, distribuição e morfologia das partículas.....</i>	41
2.5.2.1.2	<i>Análise térmica.....</i>	41
2.5.2.1.3	<i>Pirólise acoplada a Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa.....</i>	43
2.5.2.1.4	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....</i>	44
2.5.2.1.5	<i>Análise multivariada.....</i>	44
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	46
3.2	PROCESSAMENTO DA DROGA VEGETAL E PREPARO DO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO VEGETAL (IFAV).....	46
3.3	PADRONIZAÇÃO DAS DROGAS VEGETAIS E INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO VEGETAL.....	47
3.3.1	Distribuição dos tamanhos de partículas.....	47
3.3.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	48
3.3.3	Análise térmica na padronização de <i>S. adstringens</i>.....	48
3.3.3.1	Termogravimetria.....	48
3.3.3.2	Determinação da Cinética de degradação.....	48
3.3.3.3	Análise Térmica Diferencial.....	49
3.3.4	Pirólise acoplada a CG/MS.....	49
3.3.5	Espectroscopia no infravermelho (IV) com Transformada de Fourier (FTIR).....	50
3.4	QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	50
3.4.1	Determinação de polifenóis totais.....	50
3.4.2	Determinação de flavonoides totais.....	51

3.4.3	Determinação do teor de taninos condensados.....	51
3.4.4	Análise estatística.....	52
3.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>S. adstringens</i>	52
3.5.1	Determinação da potência microbiológica relativa do IFAV de <i>S. adstringens</i>.....	53
3.5.1.1	Determinação das condições experimentais.....	53
3.5.1.2	Cálculo da potência antimicrobiana da amostra.....	55
3.5.1.3	Validação do método analítico.....	55
3.6	ENSAIOS TOXICOLÓGICOS COM O IFAV.....	57
3.6.1	Teste de letalidade de <i>Artemia salina</i> Leach.....	57
3.6.2	Toxicidade aguda.....	57
3.6.3	Screening hipocrático.....	58
3.6.4	Análise bioquímica e hematológica.....	58
3.6.4.1	Massa dos órgãos.....	59
3.6.5	Análise histopatológica.....	59
3.6.6	Análise estatística.....	59
3.7	ESTUDO DE INTERAÇÃO TÉRMICA DA MISTURA BINÁRIA IFAV-EXCIPIENTES (1:1).....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1	PADRONIZAÇÃO DAS DROGAS VEGETAIS E INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO VEGETAL (IFAV).....	61
4.1.1	Distribuição do tamanho de partícula.....	61
4.1.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de <i>S. adstringens</i>.....	64
4.1.3	Análise térmica na padronização de <i>S. adstringens</i>.....	67
4.1.3.1	Termogravimetria das drogas vegetais.....	67
4.1.3.2	Determinação da cinética de degradação.....	72
4.1.3.3	Análise Térmica Diferencial.....	73

4.1.3.4	Termogravimetria do IFAV.....	75
4.1.4	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	79
4.1.5	Pirólise acoplada a CG/MS.....	80
4.2	QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	87
4.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>S. ADSTRINGENS</i>	89
4.3.1	Determinação da potência microbiológica relativa do IFAV de <i>S. adstringens</i>.....	91
4.3.1.1	Curva de crescimento.....	91
4.3.1.2	Determinação da potência antimicrobiana do IFAV.....	92
4.3.1.3	Validação do método analítico.....	96
4.4	ENSAIOS TOXICOLÓGICOS COM O IFAV.....	103
4.5	ESTUDO DE INTERAÇÃO TÉRMICA DE MISTURAS BINÁRIAS IFAV-EXCIPIENTES (1:1).....	108
5	CONCLUSÃO.....	120
	REFERÊNCIAS.....	123
	APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NO JOURNAL OF THERMAL ANALYSIS AND CALORIMETRY.....	142

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos países de maior diversidade biológica por abrigar 25% da flora mundial. Há uma crescente demanda para o uso de produtos naturais, o que impulsionam as investigações científicas e a busca por drogas naturais, como ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos (JESUS et al., 2010; KANTATI et al., 2016).

Os fitoterápicos se mostram como uma terapêutica interessante, pois os medicamentos industrializados desencadeiam diversas reações adversas que podem ser menores com algumas plantas medicinais. Quando se trata dos antimicrobianos, os fitoterápicos podem ser uma alternativa aos antibióticos sintéticos, os quais são mais onerosos e frequentemente os microrganismos têm desenvolvido mecanismos de resistência frente aos fármacos já comercializados (GUPTA; DUBEY; KUMAR, 2016).

A qualidade de um fitoterápico é determinada pela qualidade do material vegetal, do produto intermediário e pelas propriedades do produto final, levando em consideração os requisitos de boas práticas na fabricação de produtos farmacêuticos de origem vegetal (FONSECA, SILVA, LEAL, 2010). Santana (2016) afirma que é de fundamental importância a aplicação de uma padronização da matéria-prima para que haja garantia dos benefícios advindos desses produtos.

Silva-Júnior et al (2009) afirmam que o controle de qualidade é válido, seguindo critérios farmacopeicos e levando-se em consideração o controle da granulometria dos pós provenientes de drogas vegetais. Esta é uma fase importante durante o processo de fabricação, pois a distribuição do tamanho de partícula influi significativamente em várias etapas da produção. Assim, alguns métodos termoanalíticos, espectroscópicos e cromatográficos vêm sendo utilizados para padronizar drogas e extratos vegetais, que são matérias-primas para produzir fitoterápicos (FERNANDES et al., 2013).

Durante o desenvolvimento de um medicamento, é fundamental a avaliação da compatibilidade por meio de técnicas analíticas entre os insumos farmacêuticos ativos e os excipientes, pois interações podem afetar a natureza química da composição, conseqüentemente sua segurança e eficácia (TITTA et al., 2011).

As plantas medicinais disponíveis no Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira Terapêutico de Plantas Medicinais já têm seu uso consagrado na cultura da medicina popular brasileira. Entre as plantas incluídas no Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011) está *Stryphnodendron adstringens* Coville, conhecida popularmente como "barbatimão", barbatimão-verdadeiro, barba-de-timão,

charãozinho-roxo e casca-da-virgindade, que é uma árvore nativa do Brasil, endêmica e típica do cerrado brasileiro, pertencente à família Fabaceae (OLIVEIRA, et al., 2014). Na medicina popular é largamente utilizada para a cicatrização e higienização de feridas, tratamento de inflamações vaginais, de infecções, como antinociceptivo, antisséptico, (Oliveira, et al., 2014), no tratamento de leucorréia, hemorragias, diarreia, hemorroidas e na forma de gotas contra conjuntivite (SOUZA et al., 2007). *S. adstringens* é uma planta rica em metabólitos secundários, especialmente taninos, que lhes confere atividades farmacológicas importantes estando envolvido com a sua atividade antimicrobiana frente a microrganismos de importância clínica, tais como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (AUDI et al., 2004; COSTA et al., 2011; FIORI, et al., 2013; SOARES, et al., 2008; SOUZA, et al., 2007; TOLEDO, 2002).

Diante do exposto, observa-se a importância de pesquisar novas substâncias, preferencialmente de origem natural e que tenha um uso popular descrito, o que favorece sua utilização também por grupos populacionais com acesso restrito à assistência em saúde. Verifica-se na literatura que estudos de pré-formulação obtidos da folha de *S. adstringens* são escassos.

A maior parte dos trabalhos que confirmam a atividade antimicrobiana do barbatimão tem sido realizada com cascas e raízes (ORLANDO, 2005; SANTOS et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2008), sendo que, no presente estudo, esta propriedade foi estudada com as folhas da espécie, na forma de infusões de drogas vegetais e extrato seco. Esta parte da planta foi escolhida por ser a forma mais utilizada na medicina popular, ser uma boa alternativa sustentável, garantindo a preservação da espécie.

Assim, este trabalho se propõe a utilizar técnicas analíticas para padronizar drogas vegetais e extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* determinando o perfil térmico, cinético, espectroscópico, fitoquímico e antimicrobiano de um insumo farmacêutico ativo vegetal candidato a uma formulação semi-sólida.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Padronizar droga vegetal e insumo farmacêutico ativo obtido de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville com ação antimicrobiana.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Obter drogas vegetais pulverizadas das folhas de *S. adstringens* previamente desidratadas;
- Separar as drogas vegetais obtidas em diferentes faixas granulométricas;
- Obter Insumo Farmacêutico Ativo Vegetal (IFAV) pela técnica de *spray dryer*.
- Determinar a distribuição do tamanho das partículas das drogas vegetais e do IFAV, bem como seus aspectos morfológicos através de microscopia eletrônica de varredura (MEV)
- Avaliar o perfil pirolítico, térmico e a cinética de degradação térmica das drogas vegetais;
- Aplicar análises multivariadas para discriminação das drogas vegetais pelos dados obtidos durante a pirólise;
- Preparar infusos das drogas estudadas de acordo com o que preconiza a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 10/2010;
- Realizar um *screening* microbiológico das drogas vegetais frente à cepas bacterianas e fúngicas, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM);
- Quantificar as classes de metabólitos secundários (polifenóis totais, taninos condensados e flavonoides totais) presentes nos infusos obtidos de drogas vegetais bem como do IFAV;
- Caracterizar físico-quimicamente o IFAV (extrato nebulizado) em termos de tamanho e morfologia de partículas; perfil espectroscópico e térmico bem como cinética de degradação térmica;
- Desenvolver e validar um método de doseamento da potência antimicrobiana do IFAV;
- Determinar a potência microbiológica do IFAV comparando a padrões com eficácia conhecida;
- Determinar a toxicidade do IFAV por meio de testes de letalidade, toxicidade aguda, análise bioquímica, hematológica e histopatológica;
- Realizar um estudo de interação térmica entre IFAV-excipientes por meio de técnicas termoanalíticas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS EM INFECÇÕES DERMATOLÓGICAS

A pele ou cútis é o manto de revestimento do organismo, indispensável à vida. Ela representa 12% do peso seco total do corpo, com aproximadamente 4,5 quilos, e é o maior sistema de órgãos expostos ao meio ambiente (MENDONÇA; RODRIGUES et al, 2011).

Kede; Sabatovich (2014) afirmam que a pele é formada por tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica que se arranjam em três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme. A epiderme possui função de barreira cutânea, a derme é composta de colágeno, elastina e matriz extracelular; a hipoderme é a camada mais profunda da pele onde se encontra o tecido adiposo (FELLER, ZIMMERMANN, 2018).

A pele apresenta apenas 15 microns de espessura e, a sua camada superior, conhecida como o estrato córneo, é a barreira física mais importante e também desempenha um papel surpreendentemente agudo na função mecânica da pele de espessura total. Quando a função de barreira e proteção é comprometida resulta em danos onipresentes para a pele, como rachaduras e condições mais graves e até fatais relacionadas à infecção, feridas crônicas e lesões cutâneas (BERKEY; BINIEK; DAUSKARDT, 2017)

As infecções tópicas estão entre as condições mais comuns em indivíduos que comparecem ao pronto socorro, representando cerca de 7 a 10% das admissões (KEMPFER et al., 2010). A úlcera de decúbito ou escara é um exemplo de infecção dermatológica em que o paciente por permanecer muito tempo deitado no leito acaba desenvolvendo lesões na pele o que favorece a entrada de microrganismos responsáveis por potentes infecções causadas por estafilococos, estreptococos e algumas enterobactérias, como *Escherichia coli*. Às vezes, são suficientemente graves para evoluir a um choque séptico, podendo levar a óbito em até 7,2% dos pacientes (MALHEIRO, et al., 2017).

Por outro lado, o paciente pode ter sido admitido sem nenhum indício de infecção e adquirí-la após a sua entrada no hospital através de fômites e transmissão por contato com outro paciente e/ou profissionais de saúde, caracterizando a infecção hospitalar, através da Portaria nº 2.616 de 12/05/1998 (LIMA et al, 2015). Aproximadamente 25-30% dos indivíduos saudáveis apresentam colonização ocasional por *S. aureus*, especialmente em axilas, períneo, faringe, mãos e narinas (LIPNHARSKI et al, 2013). Entretanto, existem condições predisponentes para a colonização da pele por baixa resistência ao agente, dentre as quais estão as dos pacientes diabéticos, que são mais propensos a uma série de complicações metabólicas

e infecciosas, como as alterações cutâneas bacterianas, fúngicas e virais. Sendo assim, a invasão direta a partir de lesão que leva à interrupção da continuidade da pele e de seus anexos resulta em uma variedade de infecções superficiais (SEITÉ et al., 2011).

Santos et al. (2016) fizeram uma pesquisa bibliográfica em diversos artigos e concluíram que os principais microrganismos infectantes em feridas pós cirúrgicas foram as bactérias *Staphylococcus aureus* (39,3%), *Escherichia coli* (30,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (19,6%), *Staphylococcus epidermidis* (17,8%), *Klesbsiella* spp (12,5%) e *Enterobacter* spp (10,7%).

Na pele, *S. aureus* pode causar o impetigo bolhoso, a furunculose, a caburcunlose, a foliculite além da contaminação de feridas cirúrgicas (LIPNHARSKI et al, 2013), podendo ainda causar infecções como meningite, pericardite, bacteremia e síndrome do choque tóxico (LIMA et al, 2015).

Malheiro et al. (2017) observou que em pacientes hospitalizados, *Escherichia coli* foi o patógeno mais comumente isolado na fascíte necrotizante, mesmo em pacientes oriundos da comunidade, que foram admitidos há pouco tempo. Foi visto também nesse estudo que essa mesma bactéria está mais envolvida com as contaminações de feridas cirúrgicas. Um fato que pode ter contribuído para este achado é a elevada proporção de envolvimento perineal, devido à proximidade desta região dos tratos geniturinário e gastrintestinal, e pelo fato de muitos destes casos terem sido precedidos por abscessos perianais ou perineais, nos quais bactérias Gram-negativas como a *E. coli* estão comumente envolvidas (SWAIN et al., 2013).

2.1.1 Uso de géis em infecções dermatológicas

Os profissionais da saúde ainda têm muitas dúvidas sobre como realizar a terapia tópica e o que utilizar para infecções de feridas pelo fato de nessas situações haver modificações da microbiota do leito da ferida, o que poderia propiciar o desenvolvimento de infecção (GOMES; CARVALHO; LIMA, 2009).

Além disso, algumas soluções antissépticas podem interferir no processo de cicatrização, por serem citotóxicas para fibroblastos, interferindo na formação do colágeno, retardando a epitelização e diminuindo a força tensional no tecido recém formado. Já as pomadas antimicrobianas à base de iodo ainda podem causar dor, mancham a pele e causam sensibilização, impedindo a avaliação fidedigna da lesão e a recuperação do tecido lesionado. As coberturas impermeáveis ou semipermeáveis, supostamente podem acarretar em um aumento do índice de infecções (GOMES; CARVALHO; LIMA, 2009).

Entre as formas farmacêuticas semi-sólidas, os géis ganham destaque em produtos dermatológicos e farmacêuticos por apresentarem vantagens em relação aos cremes e pomadas. Algumas destas são a fácil espalhabilidade, por não serem gordurosos, e por poderem veicular princípios ativos hidrossolúveis e lipossomas através da derme. A administração de fármacos através da via transdérmica está em evidência devido à facilidade de aplicação, além de proporcionar maior conforto ao paciente usuário do medicamento (NUNES et al, 2012).

Existem duas classes de géis, os hidrofóbicos, nas quais bases (oleogéis), geralmente constituídos de parafina líquida como polietileno ou óleos gordurosos gelificados, e os géis hidrofílicos, cujas bases hidrossolúveis (hidrogéis) consistem de água, glicerol ou propilenoglicol (GUZZI, 2011).

Os géis hidrofílicos (hidrogéis) são mais utilizados, sendo relativamente pequena a quantidade de preparações em oleogel (NUNES et al, 2012). Os hidrogéis têm sido muito usados em produtos cosméticos e como base dermatológica (CORRÊA et al., 2005). Esses géis possuem na maioria das vezes, comportamento reológico do tipo pseudoplástico e tixotrópico, ou seja, deformam-se durante a aplicação, tornando-se mais fluidos, facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento em que encerra a aplicação, evitando que o gel escoe (SOUZA; FERREIRA, 2010).

Assim, a veiculação de princípios ativos antimicrobianos em géis pode ser uma saída interessante aos problemas decorrentes das soluções antissépticas, pomadas à base de iodo e aos curativos semi e impermeáveis utilizados corriqueiramente nos hospitais para controlar infecções dermatológicas causadas especialmente por *S. aureus* e *E. coli*.

Nunca houve um momento em que a pesquisa para o desenvolvimento de antimicrobianos se fez tão necessária. A pesquisa pré-clínica fornece novos agentes, associações e formas de tratamento. A pesquisa clínica avalia a segurança e eficácia desses agentes, bem como otimiza o regime de dosagens, enquanto a pesquisa de implementação avalia o impacto dessa implementação sobre a resistência a níveis de comunidades. Todas as instâncias da pesquisa se fazem extremamente necessárias (SANTANA, 2016). As plantas medicinais mostram-se promissores agentes terapêuticos devido à diversidade de compostos químicos que produzem, como os metabólitos secundários que, por muitas vezes, apresentam propriedades farmacológicas (SVETAZ et al., 2010).

2.2 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS

A medicina tradicional é uma prática antiga ainda usada por milhões de pessoas no mundo todo. O uso de plantas medicinais com fins preventivos e curativos de doenças é altamente prevalente (ASADBEIGI et al., 2014).

Inclusive, em uma pesquisa realizada por Razafindraibe et al (2012), 90,56% dos participantes afirmaram que utilizam plantas medicinais para algum fim medicinal. Foram entrevistadas 498 pessoas, sendo 301 (60,44%) mulheres e 197 (39,56%) homens. Observou-se que a faixa etária mais comum foi a de adultos, entre 40-49 anos (98,29%) de idade e a menor, jovens entre 15-19 anos (45,73%).

As formas de preparo para uso das plantas variam conforme a necessidade de extração dos seus princípios ativos e as condições específicas. A população faz uso fitoterápico na forma de infuso, macerado, filtrado, tinturas, cataplasma e garrafadas para tratar diversas patologias que, por serem de baixo custo e fácil acesso são bem aceitas (PEREIRA et al., 2010; BRANDÃO et al., 2016).

Silva et al (2014) afirmam que 66% da população brasileira não têm acesso aos medicamentos diante do alto custo financeiro e que 62,9% dos brasileiros utilizam práticas complementares, como por exemplo para a cura e prevenção de infecções e inflamações, como: *Achillea colina* (mil-folhas) *Achyrocline satureoides* (macela), *Allium schoenoprasum* (Cebolinha miúda), *Cordia curassavica* (erva baleeira), *Coriandrum sativum* (coentro), *Cyperus articulatus* (piprioca), *Cyperus rotundus* (tiririca), *Punica granatum* (romã) e *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) (DUARTE, 2006; LIMA et al., 2016; SANTOS et al., 2009).

Os produtos naturais desempenham um papel importante no campo da pesquisa e desenvolvimento de novas drogas (ASADBEIGI et al., 2014). Associado ao conhecimento científico está o conhecimento popular que fornece interessantes informações contribuindo para a ciência. As pesquisas etnobotânicas envolvem levantamentos nas sociedades tradicionais sobre os principais usos populares das plantas medicinais, de acordo com as questões culturais da população local (CARVALHO et al., 2013).

A crescente resistência de patógenos aos antibióticos já comercializados no mercado prejudica a saúde da população e os produtos naturais podem ser a alternativa terapêutica para o tratamento destas infecções (BRANDÃO et al. 2016).

Partindo desse enfoque, diversas pesquisas com plantas têm sido realizadas para avaliar a atividade antimicrobiana. Por exemplo, *Schinopsis brasiliensis* mostrou forte atividade frente

à *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, *Ximenia americana* L. mostraram atividade sobre *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus oralis* (SILVA et al., 2012). *Annona coriácea* (Mart.) mostrou boa atividade frente à *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* (TOLEDO et al., 2011). Extratos de *Syzygium cumini* L. (Skeels) foram testados frente a bactérias e fungos e constatou-se atividade antimicrobiana especialmente frente à *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, sendo, portanto, mais efetivo sobre os fungos (CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004). *Mormodica charantia* mostrou-se ativa frente às cepas de *S. aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa* e *K.pneumoniae*, com potente ação antimicrobiana (BRANDÃO et al., 2016).

2.2.1 *Stryphnodendron adstringens* Coville (Fabaceae)

2.2.1.1 Características gerais

Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville (Fabaceae, Mimosoideae) ou *S. barbatimam* é uma árvore perenifólia, típica do cerrado brasileiro. Ela possui ampla distribuição geográfica no país podendo a árvore atingir uma altura entre 2-8m, com copa arredondada. Seu tronco possui 20 a 30 cm de diâmetro, a casca é grossa, rígida e avermelhada em seu interior e acinzentada por fora; os ramos são curtos e espessos, as folhas bipinadas com cerca de cinco a oito pares de pinas, os folíolos são arredondados e ovalados; as flores são pequenas e numerosas e possuem a forma de espiga, brotando entre setembro e novembro; a maturação dos frutos geralmente acontece no final da estação entre agosto e setembro, estes possuem cerca de 6 a 10 cm de comprimento com inúmeras sementes achatadas e envoltas por uma faixa escura (DELGADO et al., 2017; LIMA et al., 2016; NICIOLI, 2006).

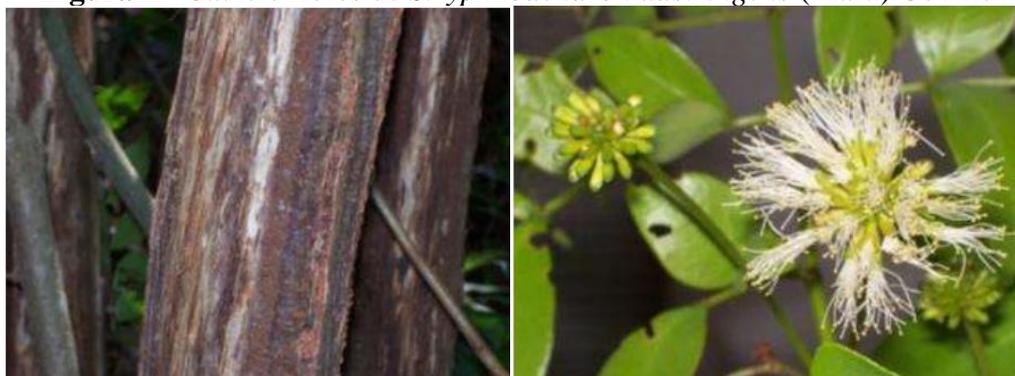
A espécie recebe diversas denominações populares, que variam de acordo com a região: barbatimão-verdadeiro, barba-de-timão, charãozinho-roxo e casca-da-virgindade. Os povos indígenas descobriram o seu poder medicinal quando perceberam a adstringência desta planta, sendo denominada por eles de Ibatimó, cujo significado é árvore que aperta, ou seja, adstringente (LIMA et al., 2016). Esta espécie possui grande importância econômica, destacando-se especialmente o seu uso madeireiro, farmacológico e industrial (SCALON et al. 2014).

Figura 1 - Árvore de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e suas folhas



Fonte: Próprio autor

Figura 2 - Caule e flores de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville



Fonte: Próprio autor

2.2.1.2 Usos e propriedades medicinais de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

Na medicina popular, uma série de usos terapêuticos é empregada com a casca do caule; pouco se é descrito sobre as folhas, que é uma parte da planta que pode ser utilizada de uma maneira mais sustentável.

As atividades farmacológicas desempenhadas por *S. adstringens* estão relacionadas com a grande quantidade de compostos químicos produzidos, como taninos, alcalóides, terpenos, estilbenos, esteróides e inibidores de proteases (como a tripsina). Destaca-se o alto teor de taninos condensados na planta, especialmente em casca, que variam de 20% até 50%. Os taninos são ricos em polímeros de proantocianidinas que incluem prodefininidinas e prorobinetinidinas (GOULART et al., 2015; LIMA et al., 2016). Esteroides, fenóis simples,

flavonóides, saponinas e taninos foram identificados em extratos hidroalcoólicos de folhas de *S. adstringens* (PINHO et al., 2012).

Pesquisa realizada por Martins *et al.* (2009) no município de Montes Claros – MG, para verificar o teor de taninos e flavonóides em cascas de caule, de galhos e folhas de *S. adstringens* foram coletadas de 19 árvores diferentes da região. Constatou-se que os valores de taninos em cascas do tronco e cascas dos galhos foram superiores ao encontrado nas folhas. Já os resultados obtidos com flavonoides, as folhas tiveram um teor maior em relação às cascas do tronco e dos galhos.

S. adstringens é bastante utilizada na cultura popular, principalmente como antiinflamatória, antibacteriana e antiulcerígena (LIMA et al., 2016; SANTOS et al. 2009). O uso é feito com as folhas e, sobretudo com a casca do caule através de chás e decoctos para tratar: úlcera, inflamação, feridas, corrimento, diarreia, infecções, tumores, irritação vaginal e utilizada como adstringente (Corette-Pasa, 2011; Souza et al., 2010; Moreira; Guarim-Neto, 2009; Pereira et al., 2009), inflamação do ovário e do útero (Alves et al., 2007), má circulação, cicatrização e limpeza de feridas uterinas (Albuquerque et al., 2007; Lopes, 2010). Nascimento et al. (2013) ainda enfatiza outras propriedades medicinais como: antioxidante, antitirozinase, antimicrobiana, tripanocida, leishmanicida e moluscicida. Decocção e infusão da casca do caule tem sido utilizada popularmente pelos nativos do Brasil para o tratamento de leucorreia, diarreia e infecções, principalmente ginecológicas bem como no tratamento de impingem, hérnia, hemorragia, feridas, hemorróidas, tosse, oftalmias e cicatrização de feridas (GLASENAPP et al 2014; NASCIMENTO et al., 2013).

S. adstringens é uma espécie vegetal com grande abrangência de aplicação medicinal, principalmente quando se refere à *screening* microbiológico (SOARES, VINHOLISA, SILVA, 2008; MELO et al., 2009; GONÇALVES, 2007; ISHIDA et al., 2009). Thomazi, Bertolin, Pinto (2010) fizeram um estudo comparativo entre casca de caule e folha e constataram que a casca de *S. adstringens* apresentou 12 espécies sensíveis ao seu extrato de caule (*Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli*, *BGN-NF*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*) e 9 espécies do extrato de folhas (apresentando resistência frente à esses microrganismos: *Enterobacter sp*, *S. aureus* e *S. saprophyticus*).

Quanto à atividade antiinflamatória, Lima et al. (1998), utilizando uma solução acetônica de *S. adstringens* em modelo de inflamação aguda e crônica em ratos observaram que a solução foi capaz de diminuir um edema inflamatório induzido por carragenina e dextrana,

comparando-se à indometacina, mostrando-se a eficácia desta planta como agente anti-inflamatório.

Um estudo realizado por Martins et al. (2003) revela o poder cicatrizante do barbatimão ao aplicar solução aquosa da casca do caule em feridas induzidas cirurgicamente em equinos. Na fase inflamatória, *S. adstringens* foi capaz de produzir crostas espessas e irregulares, provavelmente devido ao poder adstringente dos taninos.

S. adstringens apresentou ótima ação anti-hemolítica ao investigarem os efeitos enzimáticos e biológicos causados por peçonhas das botrópicas (com ação hemolítica) quando testado o seu extrato aquoso (casca do caule) frente à veneno de serpentes (20µg). Percebeu-se no estudo realizado por De Lucena; Mendes e Brandeburgo (2008) que a peçonha de *Bothrops moojeni* e de *Bothrops pauloensis* formavam um halo, mas na presença do extrato de barbatimão, houve a inibição do veneno. Depois da aplicação das peçonhas incubadas com o extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*, aconteceu a inibição de 100% da atividade da peçonha de *Bothrops moojeni* na razão de 1:5 (m/m, peçonha/extrato) e inibição de 84% da atividade da peçonha de *Bothrops pauloensis* na razão de 1:10 (m/m, peçonha/extrato). Desse modo, barbatimão pode ser uma alternativa ou coadjuvante na soroterapia, pois se mostrou como um importante neutralizante de peçonha de cobras botrópicas.

Costa et al. (2010) e Sousa et al. (2003) relataram que o extrato de *S. adstringens* e uma fração rica em polímero de proantocianidina não demonstraram efeitos genotóxicos. Rebecca et al. (2002), concluíram em um estudo de toxicidade aguda e subaguda com extrato aquoso de casca do caule de *S. adstringens* que a administração oral diária de barbatimão nas doses de 800 e 1600 mg/kg durante 30 dias não alterou o comportamento do animal e não induziu alteração significativa nas contagens de leucócitos total e diferencial, bem como não houve alteração nas concentrações plasmáticas de ureia, creatinina, fosfatase ácida (FA) e alanina aminotransferase (ALT). No entanto, quando essa dose diária foi elevada, perceberam-se efeitos indesejáveis como a involução do timo e aumento nos níveis de glicemia.

Devido a gama de potenciais atividades terapêuticas e a diversidade de constituintes que apresenta, *S. adstringens* mostra-se como fonte promissora para ser incorporada a um fitoterápico através do insumo farmacêutico ativo vegetal obtido de folhas para preservação da espécie.

2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O grande arsenal terapêutico encontrado nas plantas se deve aos metabólitos secundários que elas produzem. Estes são os responsáveis pelas plantas exibirem atividades biológicas que beneficiam a humanidade na prevenção e tratamento de doenças, sendo utilizadas por indivíduos de todas as faixas etárias e gêneros (NWODO et al., 2011; MURTI et al., 2012). Consistem em estruturas complexas, de baixo peso molecular e que normalmente apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG; LUBERT, 2008).

Como exemplo de metabólitos secundários, têm-se os taninos, terpenóides, alcalóides, flavonóides, fenóis e quinonas, entre outros compostos, os quais são responsáveis por uma série de atividades farmacológicas, por exemplo, ação antibacteriana, antiparasitária, antiviral anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, dentre outras (OLIVEIRA et al., 2011; GUPTA, DUBEY, KUMAR, 2016; TRAORE, 2015).

2.3.1 Taninos

Os taninos são produtos naturais de composição polifenólica que são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas contra ao ataque de insetos e microrganismos. A aplicação mais antiga dos taninos vegetais consiste no curtimento de peles de animais. Hoje em dia são compostos fenólicos de grande interesse terapêutico (ALMEIDA et al., 2010).

A sensação de adstringência que os taninos proporcionam é gerada devido à sua propriedade de precipitar proteínas, ou seja, quando em contato com as proteínas presentes na saliva formam um complexo insolúvel que popularmente se caracteriza pela sensação adstringente (BERNARDES et al., 2011). Portanto, ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico. Inativando assim as proteínas essenciais aos microrganismos, como as lipoproteínas e algumas proteínas estruturais. A ligação entre taninos e proteínas ocorre, provavelmente, através de pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas (MACHADO, et al., 2010).

Muitos produtos farmacêuticos são desenvolvidos a base de taninos devido a sua ação bactericida, antiviral, moliscidal e antihelmíntica, antihepatotóxica, inibição de xantina oxidase e mono-amino oxidase e inibição de glicosiltransferases (ALMEIDA et al., 2010).

Em termos gerais, os taninos parecem afetar o crescimento bacteriano por vários mecanismos, como a inibição de enzimas microbianas extracelulares, a privação dos substratos

necessários para o crescimento microbiano ou a ação direta sobre o metabolismo microbiano através da inibição da fosforilação oxidativa. Além dos taninos exercerem atividade antimicrobiana em vegetais, possuem propriedades vasoconstritoras e anti-inflamatórias que estimulam o crescimento da epiderme, auxiliando a reepitelização (NASCIMENTO, 2011; PASSARETTI et al, 2016).

Os taninos são classificados como polímeros fenólicos de elevado peso molecular e pertencem a um grupo de substâncias químicas que possuem em comum um anel aromático com uma ou mais hidroxilas substituintes que se encontram formando glicosídeos (MENDIZÁBAL, 2011).

Taninos estão inclusos em dois grupos. Os pertencentes ao primeiro grupo são denominados taninos hidrolisáveis e incluem os galotaninos e os elagitaninos, polímeros derivados dos ácidos gálico e elágico. Este grupo de taninos pode ser detectado em elevadas concentrações principalmente em madeiras, cascas de árvores, folhas e galhos. O outro tipo de tanino envolve os condensados, também chamados de proantocianidinas, os quais quimicamente compreendem um grupo de polihidroxi-flavan-3-ol e apresentam uma estrutura semelhante aos flavonoides, com coloração variando do vermelho ao marrom (NASCIMENTO, 2011).

Uma planta que é conhecida na literatura por ser rica nesse constituinte fitoquímico é o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) que possui em sua constituição 20% de taninos, apresentando sua casca de coloração avermelhada (PANIZZA et al, 1988). A espécie, inclusive, faz parte da lista da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS, 2014).

2.3.2 Flavonoides

Flavonoides (ou biflavonoides) são uma classe de metabólitos secundários comumente encontrados em frutas, legumes, nozes, sementes, caules, flores, chá, vinho, própolis e mel. Durante séculos, os preparativos contendo estes compostos têm sido utilizados para tratar doenças humanas. Os flavonoides são polifenóis bioativos de baixo peso molecular, que desempenham um papel vital na fotossíntese celular das plantas (SHOHAIB et al., 2011).

Este grupo fitoquímico exerce ampla atividade biológica que incluem: anti-inflamatória, antibacteriano, antiviral, antialérgica, antitumoral, citotóxica, tratamento de doenças neurodegenerativas, ação vasodilatadora. Além disso, são conhecidos por inibir a peroxidação lipídica, agregação plaquetária, a permeabilidade capilar e fragilidade, ciclooxigenase e as

atividades da enzima lipoxigenase. Eles exercem esses efeitos como antioxidantes, varredores de radicais livres, quelantes de cátions divalentes. Estes são também relatados por inibir a variedade de enzimas como hidrolases, hialuronidase e fosfatase alcalina (SANDHAR et al, 2011).

A atividade antibacteriana dos flavonoides tem relação com a capacidade desse grupo de se complexar com proteínas solúveis e extracelulares e com a parede de células bacterianas. Os isoflavonoides possuem propriedades antifúngicas (DESOTI et al., 2011). A atividade antimicrobiana desses compostos deve-se provavelmente à atribuição de grupos fenólicos hidroxilo que apresentam afinidade para as proteínas e, por essa razão, atuam como inibidores de enzimas bacterianas, assim como interferem nas suas vias de síntese. Por outro lado, a natureza lipofílica dos flavonoides é também capaz de romper as membranas celulares de diversos microrganismos (ARIF et al., 2011; ÀVILA, et al., 2008; LI et al., 2012).

Flavonoides como a quercetina podem desenvolver ação anti-inflamatória no corpo humano por inibir a COX-2 e a óxido nítrico sintase. A luteolina e a quercetina também podem reduzir a resposta inflamatória por gerarem uma redução na ativação do sistema complemento e diminuírem a adesão de células inflamatórias ao endotélio (MACHADO et al, 2008).

2.3.3 Saponinas

Dentre os metabólitos secundários produzidos pelos vegetais, as saponinas constituem uma das classes de maior destaque devido à sua ampla distribuição no reino vegetal e suas importantes atividades biológicas (KAISER; PAVEI; ORTEGA, 2010). Saponinas, bem como os triterpenos e esteróides são quimicamente relacionados, diferindo uns dos outros apenas na presença de unidades de sacarídeos relativamente ligados por ligações glicosídicas (ARRANZ, 2011).

A atividade mais comum das saponinas é a capacidade de produzir hemólise. Essa propriedade é resultado da interação das suas moléculas com colesterol presentes na membrana de eritrócitos resultando na mudança conformacional da membrana levando a uma penetração de íons e água para dentro da célula com conseqüente rompimento celular e liberação de hemoglobina. Essa atividade hemolítica das saponinas, que faz parte do sistema de proteção do vegetal contra ataques de predadores (insetos, vírus, fungos e bactérias), está ligada a muitas das atividades antibacteriana, antifúngica e espermicida apresentada por uma variedade de plantas. Além dessas propriedades, possuem efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, hipoglicêmicos, antioxidantes e anti-hipertensivos, diuréticos, entre outros (DINIZ, 2006).

2.3.4 Alcalóides

Alcalóides são um dos mais diversos grupos de produtos naturais e são encontrados em aproximadamente 20% de espécies de plantas. Muitos dos alcalóides exibem potentes atividades farmacológicas e vários são amplamente utilizados como produtos farmacêuticos. Alcalóides são derivados dos produtos do metabolismo primário com aminoácidos, tais como fenilalanina, tirosina, triptofano, ornitina e lisina, servindo como seus precursores principais. Alguns exibem propriedades farmacológicas benéficas, antiarrítmicas, antimicrobiana, atividades ocitócicas, anti-inflamatórias, hipoglicemia, e antipirética e, assim, podem ser usados como drogas. Eles podem, portanto, servir como potenciais compostos de partida para o desenvolvimento de novas drogas e no controle de pragas de plantas. Por outro lado, podem ser citotóxicos (BUNSUPA, et al. 2012).

2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A antibioticoterapia é utilizada como primeira escolha no tratamento de diversas enfermidades na medicina. Essas drogas estão entre as mais frequentemente prescritas em hospitais. Cerca de 40% dos pacientes hospitalizados são tratados com antimicrobianos, tanto para indicações terapêuticas como profiláticas, e seu uso inadequado ocasiona uma grande resistência bacteriana e altera o equilíbrio ecológico, provocando uma quebra na homeostase do organismo, persistindo os processos infecciosos. Segundo a OMS, seu uso é inadequado em 50% dos casos (RODRIGUES; BERTOLDI, 2010; SAMPAIO, SANCHO; LAGO, 2018).

Os microrganismos são seres capazes de sofrer evoluções grandiosas para que possam habitar em quaisquer locais hoje existentes, seja sob condições amenas ou até mesmo extremas. A resistência aos antimicrobianos ocasiona uma variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural, dando vantagens aos microrganismos mais aptos. É causada pela mutação espontânea e recombinação de genes (MICHAEL, DOMINEY-HOWES, LABBATE, 2014).

A OMS (2017) publicou uma lista de bactérias para as quais se necessitam de novos antibióticos urgentemente. Bactérias multiresistentes a exemplo de *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e várias *Enterobacteriaceae* (incluindo *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* e *Proteus*) estão inclusas no grupo mais crítico, pois estão envolvidas em infecções graves, como as da corrente sanguínea e pneumonia. Estas cepas tem se mostrado resistentes inclusive a carbapenemas, antibióticos de amplo espectro.

Por isso, é necessário que pesquisas sejam realizadas para buscar novas drogas eficazes contra os microrganismos que se mostraram resistentes frente aos antibióticos industrializados disponíveis no mercado. Os produtos naturais, como os óleos essenciais, as drogas vegetais e os extratos de plantas mostram-se como uma alternativa terapêutica, visto que já têm um uso bastante difundido pela população e muitas plantas, a exemplo de barbatimão e melão de são caetano, já são utilizadas na medicina popular para tratar infecções (CONDEA et al., 2015; BRANDÃO et al., 2016).

2.4.1 Métodos Biológicos Utilizados no Doseamento de Antibióticos

As primeiras descobertas no campo da clínica microbiológica ocorreram entre o final de 1800 e início do ano 1900. Baseando-se na teoria de que agentes patogênicos específicos pudessem causar doença, o médico alemão Robert Koch postulou que a remoção do patógeno poderia deter ou reverter o processo da doença (KHULLER, 2009).

Dentre vários parâmetros considerados, o meio de cultura, o inóculo do microrganismo, a difusão da substância teste, as condições de incubação e os critérios de leitura são fundamentais para a confiabilidade do método (CARTAXO, 2014).

Na pesquisa clínica, testes que auxiliem na seleção correta da terapia antimicrobiana para eliminar os patógenos envolvidos na infecção precisam ser realizados, como por exemplo, a determinação do perfil de sensibilidade que utiliza metodologias como: métodos de difusão, que pode ser executado por meio de disco e cilindros de aço inoxidável e perfuração em ágar e o turbidimétrico (OSTROSKY et al, 2008).

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é utilizado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relacionando o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo, e desafiando com a concentração da substância ensaiada (OSTROSKY et al, 2008). O antimicrobiano se difunde no ágar, em concentrações decrescentes, e a cepa bacteriana semeada cresce e a partir do ponto de aplicação se forma um halo de inibição ao redor do cilindro ou disco. Esse halo é determinado em milímetros e é diretamente proporcional à concentração da substância antimicrobiana (SOLANO, et al., 2011).

No método turbidimétrico, o meio de cultura líquido é inoculado com microrganismo teste e concentrações seriadas da amostra, as quais são adicionadas para permitir o contato entre o meio e a solução. A resposta do microrganismo a ação da amostra é evidenciada pela alteração da turvação do meio de cultura, sendo medida em espectrofotômetro ou com a utilização de um

corante revelador, portanto, pode ser feito por macrodiluição ou microdiluição (TRAPLE et al., 2014). Segundo Alves et al. (2008) a microdiluição envolve a medida de pequenos volumes de caldo inseridos em placas de até 96 cavidades, divididos em linhas e em colunas. Abrange pequenos volumes, por isso o nome da técnica, microdiluição. As placas de microdiluição inoculadas devem ser incubadas por determinado tempo e temperatura, dependendo da exigência do microrganismo.

Em laboratórios de rotina, aquelas consideradas padrão-ouro, como a macrodiluição em ágar e a microdiluição em caldo, são laboriosas para serem executadas. Porém, essas duas técnicas fornecem resultados quantitativos (Concentração Inibitória Mínima- CIM), sendo bastante utilizadas em pesquisas científicas, já que técnicas qualitativas, como a disco difusão, apesar de fácil execução não são capazes de prever a CIM (CAMPANA et al., 2011). Esta é influenciada por alguns fatores primários, a saber: a sensibilidade do organismo, o diluente utilizado, o estágio e a taxa de crescimento bacteriano (ALVES et al., 2008).

De acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2002), a CIM é definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo e são consideradas excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos e, portanto, usadas para julgar o desempenho de todos os outros métodos de susceptibilidade. Nos laboratórios de diagnóstico, as CIM's são também usadas como uma ferramenta de pesquisa para determinar a atividade *in vitro* de novos antimicrobianos.

A classificação sobre os valores de CIM na literatura é variável segundo autores. Holetz et al. (2002) classificam a CIM da seguinte maneira: 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. Aligiannis et al. (2001) apresentaram: CIM até 0,5mg/mL são inibidores potentes; CIM entre 0,6 e 1,5mg/mL são inibidores moderados; CIM acima de 1,6 mg/mL são inibidores fracos. Webster et al. (2008) propõem que determinado extrato apresenta boa atividade quando o valor da CIM é decrescente a partir de 1000 µg/mL.

Othman et al. (2011) relatam um estudo comparativo em que se avaliou a consistência e discrepâncias entre as técnicas de disco difusão em ágar e diluição em caldo ou microdiluição, testando-se duas plantas de diferentes espécies. Percebeu-se que houve pouca variação nos resultados, mas a microdiluição se destacou por mostrar cinética de crescimento das bactérias, incluindo extratos de plantas com baixa polaridade o que não pode ser visto com as outras técnicas.

Além da CIM, o *Checkerboard* e o *Time-kill* são outras metodologias antimicrobianas de boa confiabilidade pois são aplicadas para quantificar o efeito de combinações de agentes antimicrobianos no crescimento bacteriano *in vitro* (JACKSON et al., 2009). O primeiro método avalia o efeito inibitório das substâncias-teste em combinação e em diferentes concentrações, semelhantemente ao empregado para determinação de CIMs por microdiluição em caldo; já o *time-kill* avalia a cinética de morte bacteriana, comprovando o tempo em que a substância teste, em determinada concentração, leva para matar as células microbianas, excelente opção para avaliar a potência antimicrobiana do composto (ROZATTO, 2012).

Botelho, Lourenço, Pinto (2013) afirmam que a potência desconhecida de um material é avaliada por comparação de seus efeitos em um sistema biológico (cultura de microrganismos) com aqueles padrões de referência, cuja potência já é conhecida. A potência é expressa como a razão entre a dose que inibe o crescimento de um microrganismo sensível, em relação à dose de substância padrão que produz inibição similar (LEONEL; SOARES; SIQUEIRA, 2012).

Os ensaios para determinar essa potência têm sido realizados por métodos biológicos, sendo uma alternativa a outros métodos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência que têm sido amplamente adotados. Uma importante vantagem dos métodos físico-químicos é a rapidez das análises, embora que os equipamentos necessários sejam frequentemente caros. Nos métodos biológicos, a potência dos antibióticos geralmente é determinada, comparando-se a dose com a qual se inibe o crescimento de um microrganismo adequado e susceptível com a dose da preparação do antibiótico de referência nas mesmas condições de trabalho (LOURENÇO; PINTO, 2011).

O principal uso dos doseamentos microbiológicos é na determinação da potência de substâncias inibidoras de crescimento (principalmente antibióticos) e de compostos promotores de crescimento. Os principais métodos utilizados para determiná-la são por meio de métodos turbidimétricos e de difusão em ágar (BOTELHO, LOURENÇO, PINTO, 2013).

Todavia, para o sucesso terapêutico de substâncias antimicrobianas também é necessário que a potência dessas substâncias esteja correta nas apresentações farmacêuticas que serão administradas ao paciente. Se a potência estiver abaixo da necessária, o fármaco pode não atingir no plasma uma concentração capaz de exercer a atividade esperada. Por outro lado, se a concentração estiver muito alta, poderá provocar toxicidade. Nesse aspecto, é crescente a preocupação com a qualidade dos medicamentos inovadores, a questão dos genéricos, a bioequivalência e a estabilidade das formulações (LI et al., 2012).

Uma redução na atividade antimicrobiana pode revelar mudanças não demonstráveis por métodos químicos. Dessa forma, a determinação da potência antimicrobiana é extremamente importante para o controle e garantia de qualidade em produtos e preparações farmacêuticos, portanto, é necessário o desenvolvimento de práticas e procedimentos de baixo custo que possa ser aplicado na validação e dosagem de drogas (LEONEL, SOARES e SIQUEIRA, 2012).

Embora geralmente sejam utilizadas as normatizações internacionalmente conhecidas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) como base para testes de suscetibilidade antimicrobiana, as diretrizes são direcionadas para antimicrobianos com parâmetros já conhecidos. Há poucos estudos comparativos relatando qual é o melhor método a ser utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, mesmo no que se refere às metodologias usualmente utilizadas. Além disso, há a necessidade da uniformização dos métodos de extração e testes *in vitro*, para que a pesquisa possa ser mais eficiente, e a interpretação dos resultados, mais facilitada e confiável (BONA et al, 2014).

2.5 CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL

2.5.1 Produtos terapêuticos de origem vegetal

As drogas vegetais, as quais são obtidas após o processo de coleta, estabilização (quando aplicável), e secagem, em sua forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada, servem como base para a obtenção de uma ampla gama de produtos farmacêuticos, como por exemplo, tinturas, pomadas, xarope, cápsulas e na forma *in natura* (SOARES, FREIRE e SOUZA, 2015; PEREIRA et al., 2010).

Os extratos são preparações concentradas obtidas a partir das drogas vegetais que passaram ou não por tratamento prévio, a exemplo da moagem. Este tipo de preparação é obtido através do contato com um solvente para a extração de compostos específicos de um meio complexo e a concentração por meio da remoção completa ou total, envolvendo processos como rotaevaporação, liofilização ou nebulização. Extratos vegetais podem ser incorporados em diferentes preparações cosméticas e dependendo da classe química de seus ativos podem ser responsáveis pela atividade do produto (BRASIL, 2010).

Os extratos secos obtidos por nebulização ou liofilização representam um atrativo para a indústria farmacêutica no desenvolvimento de fitoterápicos por apresentarem maior facilidade de padronização dos princípios ativos, serem mais estáveis facilidade de manipulação e

características como precisão das doses, eficácia e segurança de administração (CORREIA, 2011).

Na indústria farmacêutica a utilização de adjuvantes tecnológicos adequados, juntamente com a tecnologia de *spray drying*, representa um passo importante na garantia da estabilidade e qualidade adequadas de um extrato vegetal (SANTANA, et al, 2017). Recomenda-se a incorporação destes extratos nebulizados em formulações, uma vez que são facilmente obtidos, padronizados e podem ser integrados em formas de dosagem. Estes extratos também têm alta estabilidade microbiológica, química e físico-química (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA define fitoterápicos como medicamentos preparados exclusivamente com plantas ou partes de plantas medicinais. Eles são obtidos empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato e suco) que possuem efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população bem como, validadas em estudos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou ensaios clínicos de fase III (BRASIL, 2006).

O maior interesse e demanda por parte da população pelos produtos “naturais” deixa clara a necessidade de uma investigação mais profunda acerca da qualidade dos mesmos, devido à toxicidade existente em algumas plantas e efeitos colaterais decorrentes do uso indiscriminado. O chá verde (*Camellia sinensis*), por exemplo, é um dos mais consumidos por quem deseja emagrecer, reduzindo medidas. No entanto, em excesso pode causar danos ao fígado e arritmia, além de interagir com outros medicamentos (SCHÖNTHAL, 2011).

Segundo Dias et al. (2013), essa preocupação com tais produtos reside no fato de que, ao serem analisadas algumas amostras, foram encontradas alterações na qualidade, tais como a autenticidade do vegetal, a composição química das matérias-primas e sua pureza, fatores que contribuem diretamente para a qualidade ou a má qualidade de um fitoterápico.

Assim, as agências regulatórias e os fabricantes devem assegurar não apenas a eficácia terapêutica desses produtos, mas também sua qualidade seja da matéria-prima para uso direto ou de produtos farmacêuticos (GINDRI et al., 2012).

Pensando na qualidade e segurança do uso de medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais, a ANVISA regulou o uso popular de plantas medicinais na forma de drogas vegetais através da Resolução de Diretoria Colegiada 10/2010 (CARVALHO et al., 2012). Essa RDC regulamenta a produção de drogas vegetais no Brasil, estando voltada a indústria farmacêutica, e para os produtores e distribuidores de drogas vegetais, além da população em geral.

2.5.2 Emprego de tecnologias analíticas para a padronização de materiais vegetais

Insumos farmacêuticos ativos vegetais (IFAV) como plantas e seus derivados (extratos, tinturas, óleos essenciais ou produtos secos) têm sido largamente empregados em farmácias magistral e estabelecimentos de produção industrial. O controle de qualidade de um produto envolve várias etapas que vão desde o início da cadeia produtiva, ou seja, a partir da obtenção da matéria-prima, passando por todo o processo produtivo, culminando com a análise do produto final (NUNES et al., 2009).

O estudo inicial para o desenvolvimento de um novo medicamento é denominado de pré-formulação, utilizando técnicas analíticas a exemplo da análise térmica. Esta fase de desenvolvimento é caracterizada como a avaliação das propriedades físico-químicas do fármaco isolado ou associado a diversos excipientes farmacêuticos, pois o fármaco/droga e os adjuvantes devem ser compatíveis uns com os outros para produzir um medicamento, ou seja, estável, eficaz, atrativo, fácil de administrar e seguro (TITTA et al., 2011). Com os resultados dos estudos de pré-formulação elabora-se um informe que definirá a viabilidade da forma farmacêutica proposta e a metodologia a ser seguida no desenvolvimento na fase de formulação e elaboração (NUNES et al., 2009).

O controle de qualidade procura avaliar matérias-primas vegetais empregando métodos de identificação emitidos por um profissional habilitado que permita a confirmação da identidade botânica, ensaios fitoquímicos (identificação de grupos de princípios ativos), monitoramento microbiológico e testes de autenticidade para verificar impurezas e falsificações (cinzas, umidade, granulometria, características organolépticas) (BRASIL, 2009; FONSECA; SILVA; LEAL, 2010; FARMACOPEIA V 2010).

2.5.2.1 Técnicas analíticas aplicadas na padronização de matérias-primas vegetais

As técnicas termoanalíticas vêm ganhando espaço na área de pesquisas científicas para caracterizações de materiais vegetais. O uso dessa metodologia foi favorecido pela disponibilidade de equipamentos controlados por microprocessadores que fornecem informações importantes quanto ao comportamento térmico dos materiais de forma rápida e precisa (SILVA; BOTELHO; SOUZA, 2008). Espectroscopia de infravermelho, difração de raios-X, análise térmica e microscopia eletrônica de varredura são exemplos de técnicas analíticas empregadas para caracterizar compostos provenientes de plantas medicinais além de seus produtos intermediários e extratos vegetais (FERNANDES et al., 2013).

Diversos estudos, utilizando tais técnicas vêm sendo realizados para caracterizar, padronizar, efetuar o controle de qualidade e obter o *fingerprint* de diversos materiais vegetais obtidos de plantas medicinais, fornecendo informações importantes à literatura. Araújo et al. (2006), Noriega et al. (2010), Frade et al. (2010), Oliveira et al. (2010), Wang et al. (2011); Gomes (2011), Correia (2011), Santana (2013); Holanda Neto (2013); Brandão et al (2016) e Guimarães et al (2017) caracterizaram drogas vegetais. Aragão (2002), Silva-Júnior et al. (2009), Camelo et al (2012), Costa et al. (2011) avaliaram a qualidade de extratos vegetais; Giuffrida et al. (2006) e Benício, Neto e Sousa (2010) utilizaram as técnicas para avaliar óleos essenciais.

2.5.2.1.1 Tamanho, distribuição e morfologia das partículas

O tamanho e a distribuição de partícula de drogas vegetais, bem como sua morfologia através de técnicas analíticas, a exemplo do uso de analisador de partículas e microscópio eletrônico de varredura, são aspectos fundamentais que podem influenciar em muitas operações de produção e processamento envolvendo materiais particulados influenciando diretamente na velocidade de dissolução, suspensibilidade e uniformidade na distribuição para que a substância tenha a eficácia esperada (CORREIA et al. 2015; ALBERTON et al., 2001; AULTON, 2005). Estas informações devem ser consideradas em sua caracterização física, química e biológica. A padronização destes aspectos confere uma melhor qualidade tanto para a droga vegetal quanto aos seus produtos derivados (CORREIA et al., 2015).

Em um estudo realizado por Pujol et al (2013) foi observado que, após separarem um material vegetal de talos de uva em três frações, houve maior concentração de extrativos e materiais inorgânicos na amostra com menor tamanho de partícula.

Dessa maneira, percebe-se que a separação granulométrica pode ser utilizada como ferramenta para melhor aproveitamento do material devido ao enriquecimento seletivo de componentes nas diferentes frações.

2.5.2.1.2 Análise térmica

Análise térmica é um termo que abrange um conjunto de técnicas nas quais a propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra é submetida a uma programação controlada, sob uma atmosfera específica (KANG, et al. 2011.).

Segundo a Brasil (2010), a análise térmica pode ser aplicada na avaliação do comportamento térmico, determinação do teor de umidade e/ou solventes, determinação da temperatura de ebulição e sublimação, determinação da temperatura de decomposição térmica e determinação do teor de cinzas através da análise termogravimétrica.

Na indústria farmacêutica é importante a inserção de técnicas de análise térmica, especialmente no controle de qualidade. Tais métodos são analítico, quantitativo e comparativo, capazes de produzir resultados rápidos e reprodutíveis (BRASIL, 2010).

Em se tratando de drogas vegetais e produtos derivados, as análises térmicas têm servido de base na padronização desses produtos, bem como na simples estimativa do conteúdo de água residual presente em extratos vegetais nebulizados e na padronização e diferenciação de frações granulométricas distintas de drogas vegetais por meio da determinação de parâmetros cinéticos de degradação térmica (CORREIA et al., 2015; COSTA et al., 2009).

Técnicas termoanalíticas como a calorimetria diferencial exploratória (DSC) e a termogravimetria (TG) são há muito utilizadas por pesquisadores para a padronização de diversos tipos de materiais, por permitirem a rápida obtenção de resultados, com pequeno gasto de amostra, por procedimentos experimentais são relativamente simples (KANG et al., 2011).

A propriedade física das substâncias como estabilidade, compatibilidade, cinética, decomposição térmica, fase de transição e polimorfismo são determinadas por meio de curvas TG e DSC (NUNES et al., 2009).

A termogravimetria mede a variação de massa de uma determinada substância em função do tempo ou temperatura, sob condições específicas, com controle de temperatura. A partir da derivada primeira da curva de termogravimetria obtém-se a curva termogravimétrica derivada ou DTG. As informações que essa curva fornece são composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado (SILVA; PAOLA; MATOS, 2007).

Segundo Silva; Paola; Matos (2007) vários fatores podem influenciar a natureza, a precisão e a exatidão dos resultados experimentais na termogravimetria tais quais: fatores instrumentais [razão de aquecimento, atmosfera (N_2 , 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).

A interpretação das curvas de TG sempre requer o uso de técnicas complementares que confirmam a identidade dos processos investigados, como DSC, análise de gás desprendido

(EGD), as determinações estruturais (difração de raios-X), microscopia (mudanças texturais dos sólidos), cromatografia gasosa, etc (HOLANDA NETO, 2013).

Miranda (2016) afirma que a aplicação do DSC pode ter o objetivo de avaliar a cristalização (transição exotérmica), fusão (transição endotérmica) e/ou troca de calor como a transição vítrea (troca de linha de base), bem como compatibilidade fármaco excipiente.

A análise térmica diferencial consiste em um processo físico que mede a diferença de calor que é fornecido à amostra e à substância de referência termicamente estável em função da temperatura ou tempo a qual estão submetidas quando os dois estão sendo submetidos a uma programação determinada de temperatura (KANG et al., 2011). A temperatura é medida por termopares conectados aos suportes metálicos dos compartimentos onde são acondicionados a amostra e o material de referência no mesmo forno. As variações de temperatura na amostra são devidas às transições entálpicas, reações endotérmicas (picos descendentes e/ou exotérmicas (picos ascendentes) (CORREIA, 2011).

2.5.2.1.3 Pirólise acoplada a Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa

A pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas, quando associada à análise térmica mostra-se uma ferramenta de grande utilidade na compreensão da composição química e dos produtos provenientes da decomposição térmica de materiais como as drogas vegetais (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2011).

Pirólise é uma reação de análise ou decomposição que ocorre pela ação de altas temperaturas produzindo misturas complexas de moléculas menores. Assim, geralmente é utilizada hifenada na qual um pirolisador pode ser diretamente conectado via interface a um cromatógrafo a gás que, por sua vez, encontra-se acoplado a um espectrômetro de massas. Esta associação tem o objetivo de promover uma melhor separação das espécies produzidas (BÖER et al., 2013; SILVÉRIO; BARBOSA, 2008).

Esta técnica pode ser utilizada no estudo de decomposição parcial de macromoléculas, com destruição das mesmas e separação das frações resultantes. Assim, os produtos resultantes dos processos pirolíticos podem ser avaliados qualitativamente ou quantitativamente. Ocorre uma ruptura da estrutura molecular original de um determinado composto pela ação do calor em um ambiente com pouco ou nenhum oxigênio (BÖER et al., 2013; FIGUEIREDO, 2011).

Quando a amostra é submetida a uma pirólise, parte dela é reduzida a carbono e a outra quando oxidada pode dar origem a vários compostos, como carboidratos, alcoóis, ácidos carboxílicos, aldeídos, cetonas e fenóis. Com os resultados obtidos, quanto à composição

química, é possível determinar a impressão digital (*Fingerprint*) da amostra (FIGUEIREDO, 2011).

Os dados gerados podem ser compreendidos de diversas formas, incluindo a utilização de análises multivariadas.

2.5.2.1.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia é responsável por avaliar a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus objetivos a determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Além disso, podem-se obter informações sobre a estrutura molecular e as ligações químicas de determinado composto (GUIMARÃES, 2011).

A leitura abrange comprimentos de onda maiores que a luz visível, entre 400 a 800 nm. A espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) é um tipo de espectrômetro de infravermelho bastante utilizado em pesquisas e oferece espectros na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} (DA COSTA, 2008), a exemplo da realizada por Costa et al. (2013) com fração obtida de *S. adstringens*.

2.5.2.1.5 Análise multivariada

Devido à grande quantidade de dados gerados por diferentes técnicas analíticas empregadas na caracterização materiais vegetais, torna-se necessário simplificá-los, organizando-os para melhor compreensão. Dessa forma, faz-se necessário o uso da quimiometria que utiliza métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para o planejamento ou a seleção de maneira otimizada, visando extrair o maior número de informações químicas possíveis a partir dos dados disponíveis (SOUZA; POPPI, 2012).

Os dados químicos extraídos são usualmente multidimensionais e são chamados de multivariados (SABINO et al., 2012). Dentre as ferramentas de análise estatística multivariada, destacam-se a análise de componentes principais (PCA – Principal Component Analysis) e de agrupamento hierárquico (HCA – Hierarchical Cluster Analysis) as quais mostram-se importantes, identificando diferenças ou semelhanças entre as amostras. Essas duas análises permitem a interpretação multivariada de conjunto de dados complexos por meio de gráficos bi ou tridimensionais (PRATA; EMÍDIO; DOREÁ, 2011).

Ambas as análises, PCA e HCA são consideradas técnicas não supervisionadas visto que, é verificada a ocorrência de agrupamentos naturais, sem o conhecimento prévio de

características da amostra o que é indicado para ser aplicado no estudo de plantas medicinais (FERNANDES, 2012).

A aplicação de análise multivariada, como PCA e HCA tem sido empregada nos estudos com amostras vegetais, como foi o caso de pesquisas desenvolvidas por Uarrota et al., (2014), Rubiolo et al., (2006); Loziene, et al., (2013) e Liu et al., (2011). Tais técnicas serviram como um importante subsídio na análise estatística multivariada, garantindo relevância aos estudos.

A PCA permite extrair de um determinado conjunto de dados informações relevantes para o seu entendimento. Baseia-se na manipulação dos dados matemáticos para obter novas variáveis, as quais consistem em combinações lineares das variáveis originais, bem como tem o objetivo de encontrar um perfil similar entre as amostras, detectando as anômalas (*outliers*) e reduzindo a dimensionalidade do conjunto de dados (VERAS et al., 2012; CORREIA; FERREIRA, 2007; SOUZA; POPPI, 2012).

A HCA busca agrupar as amostras em classes, baseando-se na similaridade dos participantes de uma mesma classe e nas diferenças entre os membros de classes diferentes. É um método de classificação que interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma onde as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si (CORREIA; FERREIRA, 2007; VERAS et al., 2012).

O dendrograma consiste em um tipo específico de diagrama em forma de árvore que organiza determinados fatores e variáveis decorrentes de uma análise estatística de determinados dados, em que se emprega um método quantitativo que leva a agrupamentos e à sua ordenação hierárquica ascendente. Apresenta um eixo horizontal e um vertical, em que no primeiro estão os dados relacionados à história de agrupamento e o segundo, os elementos que foram considerados semelhantes, isto é, a distância do agrupamento ou o nível de similaridade (MINGOTI, 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O material botânico utilizado na pesquisa foram folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Fabaceae, as quais foram coletadas no mês de Outubro (Fernando Pessoa *et al.*, sn), na Praia de Jacarapé, João Pessoa, Paraíba, Brasil (7°12' 30" SUL, 34°49' 30" OESTE). Em seguida, foi preparada uma exsicata, sendo depositada no Herbário IPA Dárdano de Andrade Lima, sob o número do voucher 61512 IPA (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária), determinada pela botânica Dr^a Rita de Cássia A. Pereira.

O material vegetal foi previamente limpo, higienizado e foi submetido à desidratação em uma estufa de secagem com circulação de ar, à temperatura de 40°C até a estabilização final do peso. O material seco foi moído utilizando um moinho de quatro facas móveis e quatro fixas, modelo Willey, da marca Marconi.

Inicialmente coletou-se 19 kg de planta fresca que, após a secagem, conseguiu-se um peso de 7,5 kg, representando assim um rendimento de 39,5%.

3.2 PROCESSAMENTO DA DROGA VEGETAL E PREPARO DO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO VEGETAL (IFAV)

Para o processamento da droga vegetal, fez-se uma separação por faixas granulométricas. As folhas pulverizadas foram submetidas a um sistema de peneiras com diferentes tamanhos de poros utilizando um separador vibratório (GY- 600 – 35 - A, Guan Yeu Machinery Factory Co., China) com malhas de aço com aberturas de 50, 100, 200 e 400 mesh, respectivamente 297, 149, 74 e 37 µm, conforme preconiza a Farmacopéia Brasileira V Edição (2010). As drogas vegetais separadas por tamanho de partículas foram denominadas como Barbatimão folha (BF): BF1 (40-100mesh), BF2 (100-200 mesh), BF3 (200-400 mesh) e BF4 (<400 mesh) e acondicionadas em sacos plásticos com fecho hermético, armazenadas ao abrigo da luz, umidade e temperatura ambiente, obtendo um rendimento maior diretamente proporcional ao maior tamanho de partícula, ou seja, em BF1 conseguiu-se reter aproximadamente 40% (3000g) da droga vegetal, BF2 = 30% (2250g), BF3 = 20% (1500g) e BF4 =10% (750g).

Para o preparo do insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV), foram obtidos, inicialmente, extratos secos hidroalcoólicos de *S. adstringens*. Foi utilizado o método da

maceração a frio, na proporção de 100 g de droga vegetal para 1000 mL de solução hidroalcoólica (50% v/v), com a mistura resultante sendo armazenada durante cinco dias. Para a secagem dos extratos e obtenção do insumo farmacêutico ativo foi utilizado um *spray dryer* de escala laboratorial Modelo LAB PLANT SD-05 com sistema de atomização de bico duplo fluido, pneumático com orifício de abertura 1.2 mm que operou com taxa de vazão de ar de 40 L/min⁻¹ e pressão de 2.0 bar. A alimentação das dispersões à câmara de secagem foi realizada na parte inferior através de uma bomba peristáltica, na qual se controlou a vazão em 5 L/h⁻¹. As condições de secagem foram: temperatura de entrada = 120 °C, vazão do soprador = 2,8 m³/min⁻¹, vazão de ar comprimido = 40 L/min⁻¹. Como adjuvante de secagem foi utilizado o dióxido de silício coloidal na proporção de 20% com relação ao resíduo sólido do extrato hidroalcoólico. Obteve-se então o extrato seco nebulizado que apresentou um bom aspecto, com rendimento de 30% e pH de 5,7 sendo conservado na geladeira, pois ele tende a se oxidar a temperatura ambiente.

Assim, diante do processamento do material vegetal obtido de *S. adstringens*, seguiu-se com a padronização da droga vegetal, separada em quatro tamanhos de partícula, buscando-se fazer um controle de qualidade da matéria-prima vegetal bruta até o insumo farmacêutico ativo vegetal (extrato), obtido pela tecnologia de *spray dryer* para ser, futuramente, incorporado em uma formulação.

3.3 PADRONIZAÇÃO DAS DROGAS VEGETAIS E INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO VEGETAL

Foi proposto um modelo analítico para padronização das drogas vegetais e IFAV com base em diferentes técnicas: avaliação do tamanho de partícula e da morfologia por microscopia eletrônica de varredura, análise térmica (termogravimetria e análise térmica diferencial), e cromatografia (pirólise acoplada à cromatografia gasosa - espectrometria de massas) e espectroscopia de infravermelho.

3.3.1 Distribuição dos tamanhos de partículas

A distribuição dos tamanhos de partícula das drogas vegetais e IFAV foi determinada em um analisador de tamanho de partícula por difração de laser (Cilas 1090, Orleans, França). As leituras foram realizadas na faixa de 0,10 a 500 µm, utilizando alíquotas de cada droga vegetal à seco. A distribuição granulométrica foi expressa em termos de diâmetro médio, D10%, D50% e D90%, que representam os diâmetros para os quais 10%, 50% e 90% da

população estão abaixo de cada valor, respectivamente. A dispersão das populações de partículas foi caracterizada pelo índice *span*, sendo calculado conforme a Equação 1 (GALLO et al., 2015):

$$Span = \frac{D_{90\%} - D_{10\%}}{D_{50\%}} \quad (1)$$

3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise da morfologia das drogas vegetais e IFAV em seus diferentes tamanhos de partícula utilizou-se o método de microscopia eletrônica de varredura (MEV) que foi realizado em um microscópio ZEISS® LEO1430, do Laboratório de Solidificação Rápida (LSR/UFPB). As amostras foram fixadas em fita dupla face de carbono e, em seguida, foram metalizados com ouro por 1,5 min (Metalizador EMITECH®, k550x). As fotomicrografias foram obtidas em uma câmara com tensão de excitação de 15 kV. As amostras foram visualizadas nos aumentos de 50,100, 200, 500, 1000 e 2000x.

3.3.3 Análise térmica na padronização de *S. adstringens*

3.3.3.1 Termogravimetria

As curvas termogravimétricas dinâmicas das drogas vegetais e IFAV foram obtidas em uma termobalança modelo TGA-50H (Shimadzu) nas razões de aquecimento de 5, 10, 20 e 40 °C/min⁻¹, variando de 35 °C até temperatura de 900 °C. Utilizou-se atmosfera de nitrogênio e de ar sintético, com fluxo de 50 mL/min e 20 mL/min, respectivamente. Foi utilizado massa de 5,00 ± 0,05 mg acondicionada em cadinho de alumina para cada amostra. A calibração da termobalança foi feita utilizando oxalato de cálcio monohidratado. As curvas foram analisadas através do software TA 60 WS da Shimadzu, para caracterizar as etapas de perda de massa.

3.3.3.2 Determinação da Cinética de degradação

A cinética de degradação das amostras obtidas das folhas de *S. adstringens* foi realizada utilizando curvas termogravimétricas em atmosfera de ar sintético (20mL/min) nas seguintes razões de aquecimento: 5, 10, 20 e 40 °C/min⁻¹. Com base nos dados obtidos nas curvas

gravimétricas aplicou-se o modelo de Ozawa para determinação dos parâmetros cinéticos, ordem de reação (n), fator de frequência (A) e energia de ativação (E_a). Para determinação desses parâmetros utilizou-se o software TA 60 WS, da Shimadzu.

3.3.3.3 Análise Térmica Diferencial

As curvas térmicas diferenciais foram obtidas em um analisador térmico diferencial, modelo DTA-50 (Shimadzu). A razão de aquecimento utilizada foi de $10^\circ\text{C}/\text{min}^{-1}$, variando de 25°C até temperatura de 900°C , em atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 50 mL min^{-1} . As amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina utilizando massa de $5,00 \pm 0,5\text{ mg}$ para droga vegetal e extrato. A calibração do equipamento foi realizada através do ponto de fusão e entalpia dos padrões de índio e zinco. As curvas térmicas diferenciais foram analisadas usando o programa TA 60, da Shimadzu.

3.3.4 Pirólise acoplada a CG/MS

A pirólise das drogas vegetais foi realizada utilizando um pirolisador (SHIMADZU, Pyr-4A), diretamente acoplado a um sistema de Cromatografia gasosa/Espectrometria de massas (SHIMADZU, GCMS-QP5050A). Foi utilizada uma coluna capilar com fase estacionária fenil:dimetilpolissiloxano (5:95) (com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de tamanho de partícula). A temperatura de interface foi de 300°C . O forno foi operado com a seguinte programação de temperatura: 70°C (inicial) e $10^\circ\text{C}/\text{min}^{-1}$ até 300°C , permanecendo nessa temperatura por 5 minutos. Utilizou-se como gás de arraste o Hélio a um fluxo de $1,7\text{ mL}/\text{min}$ e uma razão de split de 1:5. Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico a uma energia 70 eV .

A amostra correspondente a 2 mg do pó das drogas vegetais foi colocada em cadinho de platina e introduzida no pirolisador nas temperaturas de 250 , 350 e 450°C , selecionadas de acordo com as etapas de termodecomposição visualizadas através de termogravimetria das amostras.

Os compostos químicos produzidos nos processos pirolíticos foram identificados através da análise comparativa com os espectros de massa da biblioteca Wiley, 6ª edição para o Class-500. Com os dados das áreas obtidos nos pirogramas foram montadas matrizes para análise hierárquica de agrupamentos (HCA) e análise dos componentes principais (PCA).

3.3.5 Espectroscopia no infravermelho (IV) com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho do extrato nebulizado foi obtido em pastilha de brometo de potássio. A pastilha formada foi analisada em um espectrofotômetro Shimadzu IRPrestige-21, do Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM/ UFPB), ao longo de um intervalo de 4000-400 cm^{-1} . O espectro obtido foi analisado no programa IR-solutions da Shimadzu.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Para a quantificação dos metabólitos secundários da droga vegetal, preparou-se infusos a 5% (50mg/mL) (m/v) de cada tamanho de partícula, conforme a RDC 10/2010; já para o IFAV partiu-se da concentração de 2mg/mL.

O conteúdo de Polifenóis totais, Flavonoides totais e Taninos condensados dos infusos foram mensurados por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o Leitor de ELISA EZ Read 2000 (Biochrom). Utilizando microplacas de 96 poços, diluiu-se as amostras de modo a obter uma concentração final de 0,02%. As soluções dos extratos foram diluídas de modo a obter uma concentração final de 0,625 mg/mL.

3.4.1. Determinação de polifenóis totais

O conteúdo de polifenóis totais foi mensurado através do método de Folin-Ciocalteu descrito por Chandra e Mejia (2004) com adaptações.

Foram adicionados na microplaca de 96 poços 50 μL de cada solução e em seguida adicionado 50 μL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N. Esta mistura permaneceu em repouso durante 2 minutos antes da adição de 100 μL da solução de Na_2CO_3 a 20% (p/v). A solução foi deixada em repouso pelo período de 10 minutos e posteriormente foi realizada a leitura no comprimento de onda de 757 nm, tendo como “branco” 50 μL água destilada adicionado de 50 μL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N e 100 μL da solução de Na_2CO_3 a 20% (p/v). As análises foram realizadas em triplicata.

A curva de calibração foi obtida com solução estoque de ácido gálico (1mg mL^{-1}), da qual foram feitas diluições seriadas nas concentrações 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em balões volumétricos de 10 mL. As leituras foram realizadas da mesma forma descrita anteriormente, substituindo-se as amostras pelas soluções de ácido gálico.

O conteúdo total de polifenóis foi expresso em microgramas equivalentes do padrão utilizado.

3.4.2 Determinação de flavonoides totais

O total de flavonoides foi determinado através do método descrito por Meda et al. (2005).

Foram adicionados na microplaca de 96 poços 100 μL de cada solução e adicionado 100 μL AlCl_3 a 2% em metanol (p/v). Esta mistura permaneceu em repouso durante 10 minutos antes da leitura da absorbância no comprimento de onda de 415 nm. Foram realizadas ainda leituras das infusões com metanol no lugar da solução de AlCl_3 e o valor da absorbância da leitura anterior foi subtraído do valor desta para que a coloração das drogas vegetais não influenciasse na absorbância, superestimando a quantidade de flavonoides. A amostra do “branco” consistiu em 100 μL de metanol adicionado 100 μL AlCl_3 a 2% em metanol (p/v). As análises foram realizadas em triplicata.

O total de flavonoides foi determinado utilizando a curva de calibração utilizando Quercetina (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) nas concentrações de 4, 8, 10, 16, 20, 24 e 28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e expresso em μg equivalente de quercetina.

3.4.3 Determinação do teor de taninos condensados

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de Makkar e Becker (1993).

Foram adicionados na microplaca de 96 poços 25 μL de cada solução e adicionado 150 μL de uma solução de vanilina (4% p/v em metanol); em seguida, adicionou-se 75 μL de HCl concentrado (37%). A leitura foi feita a 500 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, HCl e metanol. As análises foram realizadas em triplicata.

A curva de calibração para este ensaio foi obtida a partir de uma solução padrão de catequina obtida pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram realizadas diluições de forma a obter soluções de catequina nas concentrações de 50, 100, 200, 300, 500 e 600 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de taninos condensados foi expressa em microgramas equivalentes de catequina.

3.4.4 Análise estatística

Para verificar a significância da diferença entre as concentrações dos metabólitos nas frações granulométricas de cada droga vegetal foi aplicada a análise de variância (ANOVA) utilizando o suplemento para Microsoft Excel XLStat, v. 2012.1.01 (Addinsoft, França). Foram aplicados os modelos de Tukey, Fisher e Bonferroni, sendo considerados significantes os valores de $p < 0,05$.

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *S. adstringens*

Inicialmente foi feito um *screening* microbiológico das drogas vegetais frente a diversas cepas bacterianas e fúngicas. Em seguida, diante dos resultados dessa triagem determinou-se a potência do IFAV comparando-se a antibacterianos disponíveis no mercado, com ação e eficácia já comprovadas. Utilizou-se infusões a 5% das drogas vegetais.

Cepas padrão American Type Culture Collection (ATCC) foram utilizadas no *screening*, tais como: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22009), as quais foram disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ).

As bactérias foram mantidas em tubos de ensaios contendo ágar BHI e os fungos em ágar sabouraud e em seguida as bactérias foram cultivadas em ágar Muller Hinton a 37°C durante 24 horas e os fungos em Ágar Sabouraud Dextrose a 25°C durante 48 horas. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. Foram utilizadas microplacas com 96 poços de acordo com os procedimentos do Clinical and Laboratory Standards Institute procedures (CLSI, 2005; CLSI, 2008).

Os inóculos foram padronizados em tubos contendo 5 mL de solução salina estéril a 0,9%. A suspensão foi ajustada em espectrofotômetro a 625 nm para bactérias e 580 nm para fungos, em uma concentração equivalendo a 10^6 UFC.

Cem microlitros da infusão a 5% (50 mg/mL) foram submetidos a diluição seriada em caldo Mueller Hinton em cada microplaca obtendo assim as seguintes concentrações 25;12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39 e 0,195 mg/mL de cada infusão. Dez microlitros das culturas dos microrganismos foram adicionados em cada poço das microplacas.

Foram utilizados como controle negativo água destilada e como controle positivo Gentamicina a 80 mg/mL e cefalotina 1g (bactérias) e fluconazol 100mg (fungos). O crescimento bacteriano foi indicado pela adição de 20 µl de solução aquosa de resazurina (Sigma Aldrich) a 0,01% com uma incubação adicional a 37° C ± 1° C durante 2 h. Microrganismos viáveis reduziram o corante azul à coloração rosa. Dessa forma, a CIM foi definida pela menor concentração onde não ocorreu alteração de cor do corante de resazurina, capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória (CLSI, 2005). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5.1 Determinação da potência microbiológica relativa do IFAV de *S. adstringens*

3.5.1.1 Determinação das condições experimentais

O meio de cultura utilizado foi o caldo Müeller Hinton cátion-ajustado. Assim, após a dissolução do meio de cultura, este teve seu pH ajustado entre 7,0 e 7,5 com ácido clorídrico 6,0 M ou hidróxido de sódio 6,0 M e a seguir esterilizado em autoclave a 121° por 15 minutos.

O ensaio foi realizado utilizando cepas padrão American Type Culture Collection (ATCC) *Escherichia coli* (25922) e *Staphylococcus aureus* (25923) as quais foram disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ).

Como substâncias de referências ou padrão foram utilizados antimicrobianos de emprego clínico, conforme preconizado no Clinical and Laboratory Standards Institute procedures (CLSI) (2015) para as bactérias em questão. Assim foram utilizados o antimicrobiano Cefalotina (Sigma- aldrich L5501) para as análises com *Staphylococcus aureus* e para as análises com *Escherichia coli* o antimicrobiano Gentamicina (Sigma- aldrich G1914-Sulfato de gentamicina).

As concentrações dos antimicrobianos de referência também foram preconizadas de acordo com o CLSI (2015) no que diz respeito à Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cada antimicrobiano. Considerando que a via endovenosa a biodisponibilidade é teoricamente 100%, então a concentração no estudo dos padrões (cefalotina e gentamicina injetável) foram menores do que as das amostras, conforme demonstradas na Tabela 1 de substâncias referências e insumo farmacêutico ativo obtido da folha. Todas as substâncias foram diluídas em solução salina a 0,9%.

Tabela 1 - Níveis e concentrações utilizadas das amostras de referência (antimicrobianos) e amostras testes (IFAV e droga vegetal).

Níveis de concentração (%)	Cefalotina $\mu\text{g/mL}$	Gentamicina $\mu\text{g/mL}$	IFAV e Droga vegetal mg/mL
25	0,250	0,250	0,250
50	0,500	0,500	0,500
100	1,000	1,000	1,000
200	2,000	2,000	2,000
400	4,000	4,000	4,000

Fonte: Dados da pesquisa

Inicialmente preparou-se um inóculo bacteriano dos dois microrganismos. Assim partindo-se de culturas recentes cultivadas em meio sólido, diluiu em solução salina até atingir uma absorbância de 0,08 no comprimento de onda de 630 nm correspondente a 10^6 UFC (CLSI, 2017). Para essa leitura utilizou-se um Leitor de ELISA EZ Read 2000 (Biochrom). Em seguida, colocou-se essa suspensão em caldo Müeller Hinton na concentração de 1:10 e incubou-se a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Realizaram-se leituras de 30 em 30 minutos até 24 horas e repiques em meio sólido ágar nutriente foram feitos através do semeio de superfície. Ao final de 24 horas foi feita uma contagem das colônias e construiu-se uma curva para observar as fases do crescimento microbiano observando as quantidades de Unidades formadoras de colônia/mL na fase exponencial, estacionária e de decaimento. A curva de crescimento microbiano tem o objetivo de identificar o melhor tempo (fase de crescimento) para inserir a amostra teste e as substâncias de referências (SALIH et al., 2012).

A amostra teste e as substâncias de referências foram inseridas quando os microrganismos encontravam-se em suas fases exponenciais de crescimento. Todas as substâncias testes foram adicionadas nas concentrações estabelecidas. Após 24 horas foram feitas as leituras das absorbâncias e realizou-se repiques em meio sólido ágar nutriente, através do semeio de superfície. Ao final de 24 horas realizou-se a contagem das colônias e foi traçado um gráfico, onde o eixo das abscissas representa a concentração da substância teste e o eixo das ordenadas representa a quantidade e Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Esse gráfico foi utilizado como referência para se determinar a potência antimicrobiana dos extratos nebulizados e das drogas vegetais em relação aos padrões de referência utilizados.

3.5.1.2 Cálculo da potência antimicrobiana da amostra

Para a determinação da potência da substância teste em relação aos padrões de referência foi utilizado o Ensaio Balanceado ou fatorial com 3 doses (3x3) onde utiliza-se três concentrações do padrão e três concentrações da amostra teste. Para efetuação dos cálculos foram utilizadas as seguintes expressões matemáticas (LOURENÇO, 2009; SOLANO, 2008; PINTO; KANECO; PINTO,(2010); FARMACOPÉIA, 2010).

$$P = \text{AntiLog}M \quad (3)$$

Onde: P = Potência antimicrobiana

$$M = \text{Log}(r) * A/B \quad (4)$$

Onde: r = razão entre as concentrações das amostras

A = Diferença entre a somatória das concentrações do padrão e das amostras.

B = Soma das diferenças entre a maior e menor dose do padrão e das amostras.

3.5.1.3 Validação do método analítico

Após a determinação das condições que apresentaram melhor curva dose/resposta, o método desenvolvido foi validado. A validação foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pela Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e *International Conference on Harmonization* (ICH, 2015), através da determinação dos parâmetros através da avaliação dos parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão e robustez. As curvas respostas também foram avaliadas quanto aos parâmetros de regressão linear, falta de ajustes, dispersão dos resíduos e paralelismos entre as retas dos padrões e das amostras.

Linearidade

Foram obtidas curvas analíticas tanto da amostra como das substâncias testes nas concentrações apresentadas na Tabela 1. Para cada curva analítica foi obtida a equação da reta de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e realizada a análise da adequação do

modelo proposto. Além disso, calculou-se o coeficiente de correlação linear (r) que, segundo a resolução brasileira (RDC 899/03) deve ser igual ou superior a 0,98 para considerar a curva analítica adequada. Além disso, foi realizado o teste da falta de ajuste, o teste de significância da regressão e análise dos resíduos.

Precisão e exatidão

Três níveis de concentração foram utilizados para avaliar a repetitividade e exatidão da potência antimicrobiana calculada.

Soluções dos antimicrobianos foram preparados nas concentrações de 0.125, 0.250 e 0.500 $\mu\text{g/mL}$ e da amostra foi nas concentrações de 0.125, 0.250 e 0.500 mg/mL para a avaliação do nível a 50 % do valor real. Para avaliação do nível de 100% foram utilizadas as concentrações de 0.250, 0.500 e 1.00 $\mu\text{g/mL}$ dos antimicrobianos e 0.250, 0.500 e 1.00 mg/mL do extrato. Por fim, para análise do nível de 200% foram estabelecidas as concentrações dos antimicrobianos de 0.500, 1.00 e 2.00 $\mu\text{g/mL}$, assim como do extrato de 0.500, 1.00 e 2.00 mg/mL .

Para cada uma das três faixas de concentração foram preparadas cinco séries de soluções, realizando desta forma, cinco doseamentos a cada nível, sendo realizados dois experimentos em um único dia e mais três experimentos em dias diferentes, avaliando assim a precisão intermediária e a exatidão intradia e interdia.

Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é a menor concentração do analito, que é possível detectar pelo método. Assim, foram realizadas análises com os antimicrobianos, amostra e apenas a solução salina a 0.9% (diluente). Além disso, calculou-se o limite de detecção também pela curva de calibração. Portanto, calculou-se na análise do LD a média corrigida do número de Unidades formadoras de colônias obtidas com as análises do extrato e dos antimicrobianos, assim como o branco que foi o solvente utilizado para diluir a amostra. Além disso, obteve-se o limite de detecção também pela curva de calibração.

Limite de quantificação (LQ)

Utilizou-se a curva de calibração para determinação do limite de quantificação, que é a menor concentração que pode ser quantificada com exatidão e precisão. Cinco procedimentos foram realizados, dois no mesmo dia e três em dias diferentes; foram calculados o desvio padrão e coeficiente de variação para determinação da exatidão e precisão.

Robustez

Para avaliação da robustez houve variação de três parâmetros: Comprimento de onda da leitura da absorbância no espectro (600 e 650nm), pH do meio de cultura utilizado (6.0 e 8.0 ajustados com Ácido clorídrico e Hidróxido de sódio respectivamente) e diluente da amostra (DMSO- 10% e Glicose- 5%). Utilizou-se como controle as condições utilizadas para obtenção da curva de calibração.

Assim, utilizando as concentrações dos níveis 50, 100 e 200% (Tabela 1) calculou-se a potência antimicrobiana do extrato nessas condições.

3.6 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS COM O IFAV

3.6.1 Teste de letalidade de *Artemia salina* Leach

O ensaio foi realizado usando cistos de *A. salina* comprados a partir de San Francisco Bay Brand, Inc. (EUA). Em primeiro lugar, uma solução salina artificial (3,8%, v/v) foi preparado utilizando o sal do mar (Marinex, Brasil) e água destilada. Em cada ensaio, 10 náuplios foram adicionados a soluções de extração em concentrações diferentes (100-1.000 µg/ml) por diluição da substância teste em 10 ml de solução salina artificial. No controle, os náuplios foram incubados apenas com a solução salina. Cada concentração foi testada em triplicata e três experiências independentes foram executadas. Os ensaios foram mantidos sob luz artificial durante 24 horas a 27 ± 2 ° C. Após esse período, as taxas de mortalidade foram determinadas. Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Meyer et al., (1982).

3.6.2 Toxicidade aguda

O teste foi iniciado a partir da administração dos produtos na dose de 2000 mg/kg, e estabelecidas classificações do nível de toxicidade de acordo com a mortalidade em diferentes doses.

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos *Swiss* fêmeas (*Mus musculus*) pesando 25-30 g e criados no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos à temperatura de 21 ± 1 ° C, ciclo claro escuro 12C: 12E com acesso *ad libitum* a comida (Purina®) e água. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Pernambuco sob o número: 23076.016325/2018-00.

A substância foi dissolvida em salina 0,9% e a toxicidade aguda (mortalidade e alterações comportamentais) foi avaliada por administração oral e intraperitoneal. Os camundongos foram separados em três grupos (n = 3 para cada grupo), de acordo com as instruções da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD): grupo controle, recebeu solução salina (veículo), e dois grupos de teste (v.o e i.p), que recebeu a substância 2000 mg / kg de peso corporal. Os camundongos foram observados inicialmente por 1 hora e realizada a avaliação hipocrática e também durante 14 dias.

3.6.3 Screening hipocrático

A avaliação do *screening* hipocrático fornece uma estimativa geral da natureza toxicológica de uma substância: estado de consciente e disposição, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos, atividades sobre o sistema nervoso central. As amostras foram administradas por via intraperitoneal (i.p) e por via oral em grupos distintos na dose de 2000 mg/Kg de peso animal. Aos animais foram observados individualmente durante 1h após a administração da substância e a cada 24 h por 14 dias.

3.6.4 Análise bioquímica e hematológica

No final de ensaios de toxicidade, o sangue dos animais foi colhido e os seguintes parâmetros bioquímicos foram avaliados: proteína total, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartatoaminotransferase (AST), fosfatase alcalina, gama-glutamyltransferase (GGT), uréia e creatinina, usando kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) e um analisador COBAS Mira Plus (Roche Diagnostics Systems, Basel, Suíça). Análise hematológica foi realizada utilizando um analisador automático (Sangue de animal Counter-

ABC Vet, Montpellier, França) e microscopia óptica; os parâmetros avaliados foram: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e análise total e diferenciada dos leucócitos.

3.6.4.1 Massa dos órgãos

Após eutanásia dos animais, o fígado, rins, baço, pulmão, coração e estômago e cérebro foram retirados e pesados. O cálculo da massa dos órgãos de cada animal foi realizado o peso de cada órgão (g) de cada animal no dia da coleta.

3.6.5 Análise histopatológica

A análise histológica do fígado, rim, baço e pulmão de animais do controle e dos animais tratados com substância teste foram realizados por microscopia óptica. Fragmentos dos órgãos foram fixados em formalina tamponada (10%, v / v) e em seguida desidratadas através de uma série gradual de etanol (70-100%), diafanizado em xilol, e incluídos em parafina. Os cortes histológicos (5 mm) foram coradas com hematoxilina-eosina e montado usando lamínulas com resina Entellan (Merck, Alemanha). Os materiais foram observados sob um microscópio Motic BA200 acoplado a um Moticom 1.000 1.3 MP câmera digital (Motic Incorporação Ltd, Causeway Bay, Hong Kong).

3.6.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm SD e submetidos a ANOVA de um fator seguido de teste de Bonferroni, com nível de significância de $p < 0,05$.

3.7 ESTUDO DE INTERAÇÃO TÉRMICA DA MISTURA BINÁRIA IFAV-EXCIPIENTES (1:1)

O estudo utilizou o sistema de misturas binárias, as quais foram produzidas na proporção 1:1 do IFAV com os excipientes indicados para a formulação de um gel, apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Classes dos excipientes utilizados no estudo

Função	Excipiente
Gelificantes	Carbopol; Natrosol
Umectante	Propilenoglicol; Glicerina
Agente tamponante	Ácido cítrico e citrato
Conservante	Ácido benzóico

Fonte: Dados da pesquisa

Cada mistura assim como o extrato e os excipientes isolados foram submetidos a Calorimetria de varredura diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TG). As curvas de TG e DSC foram obtidas em termobalança modelo TGA-50H (Shimadzu) e DSC-50 (Shimadzu), utilizando cadinhos de alumínio hermeticamente fechados, com cerca de $2 \pm 0,1$ mg, sob uma atmosfera de nitrogênio a 50 mL/min. Os experimentos foram realizados em temperatura crescente no intervalo de 25 a 400 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min⁻¹. As curvas térmicas diferenciais foram analisadas usando o programa TASY 60, da Shimadzu.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PADRONIZAÇÃO DAS DROGAS VEGETAIS E INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO VEGETAL (IFAV)

4.1.1 Distribuição do tamanho de partícula

Na Tabela 3 encontram-se descritos os resultados da análise de distribuição dos tamanhos de partícula das drogas vegetais e IFAV de *S. adstringens* por difração de laser. Devido a dificuldades técnicas relacionadas principalmente à heterogeneidade do material, não foi possível realizar, por esta técnica, a análise da amostra na faixa granulométrica 50-100 mesh (BF1).

Tabela 3 - Distribuição granulométrica das amostras de *S. adstringens*.

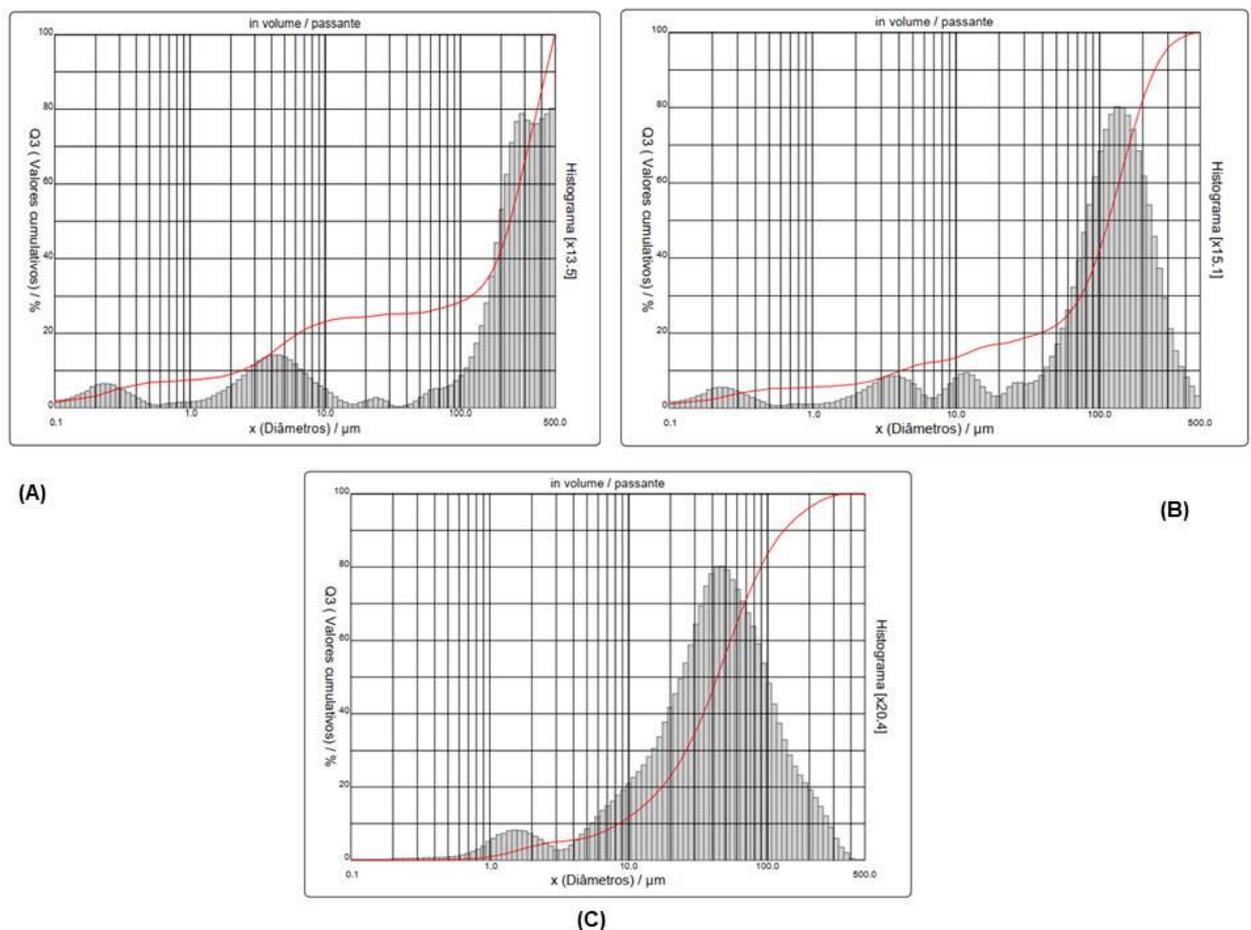
Espécie vegetal	Amostra	Abertura da malha (µm)	Diâmetro médio (µm)	D10% (µm)	D50% (µm)	D90% (µm)	Span
	BF2	149-74	218	2	233	432	1,84
	BF3	74-37	123	4	115	242	2,07
<i>S. adstringens</i>	BF4	<37	60	8	36	95	2,41
	IFAV	-	8.37	0.27	6	17.65	2.89
Desvio padrão							0,40

Fonte: Dados da pesquisa

Em todas as frações granulométricas foram observadas partículas apresentando diâmetro acima do valor de abertura da maior malha utilizada durante a separação, ocasionando uma distribuição heterogênea dos tamanhos de partícula. Este comportamento também foi evidenciado em estudo anterior (Correia et al., 2013) que realizaram a separação granulométrica de drogas vegetais de modo similar ao do presente trabalho. Esse fato pode estar relacionado à irregularidade na forma das mesmas que, apesar de apresentarem tamanho acima da abertura da malha utilizada, existe a possibilidade de partículas não esféricas que tenham uma seção transversal menor que a abertura da malha assumam, durante o processo de separação, uma orientação que permita a passagem da mesma através da abertura (ESHEL et al., 2004).

Na Figura 3 estão representados os histogramas de distribuição granulométrica das drogas vegetais de *S. adstringens*. Foi possível observar uma distribuição irregular dos tamanhos de partícula de cada fração granulométrica.

Figura 3 - Histogramas de distribuição granulométrica das drogas vegetais de *S. adstringens*



Legenda: (a) = BF2; (b) = BF3; (c) = BF4

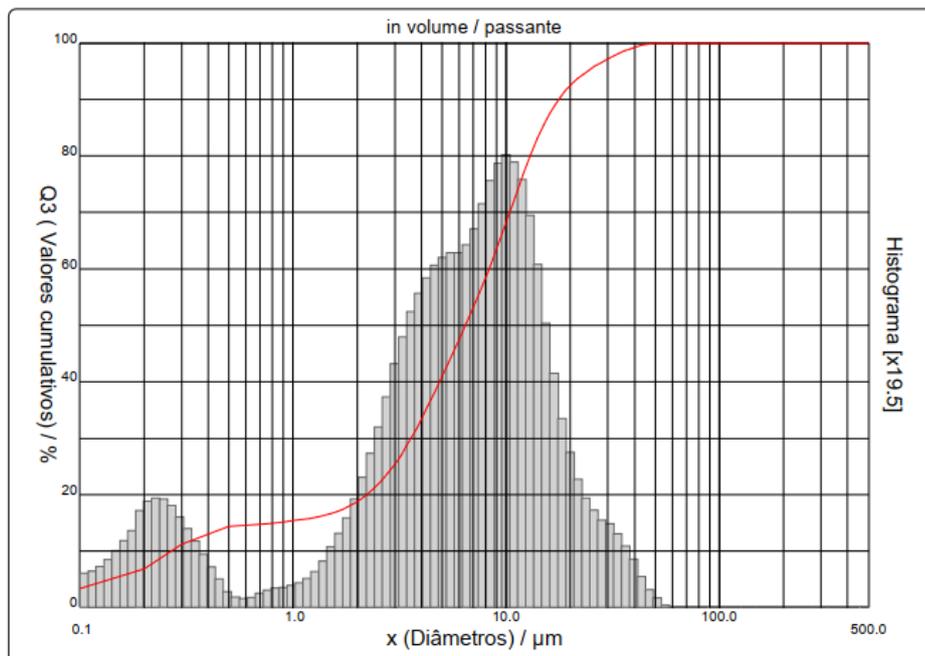
Fonte: Dados da pesquisa.

O valor de span é um indicativo da polidispersão de um sistema; quanto mais próximo de um, mais uniforme é a dispersão (GALLO et al., 2015). Correlacionando os valores de *span* obtidos (Tabela 3) com os histogramas (Figura 3) pôde-se observar que na faixa granulométrica 100-200 mesh houve, aparentemente, uma distribuição de partículas com maior uniformidade que nas demais. Apesar de apresentar heterogeneidade na distribuição das partículas, essa amostra (100-200 mesh), por ter se dividido em três populações ligeiramente mais separadas que nas demais faixas granulométricas, apresentou um valor de span mais próximo da uniformidade.

O extrato nebulizado de *S. adstringens* apresentou-se como um pó verde, fino, com tamanho médio de partícula de 8,37 μm (Tabela 3). No estudo de Sousa (2014) observou-se que o diâmetro médio das partículas do extrato seco por *spray dryer* foi similar ao atual estudo, estando na faixa de aproximadamente 10 μm . Na produção de pós finos com aplicação na indústria farmacêutica ou alimentícia, o diâmetro médio das partículas deve variar entre 8-30 μm (SOUSA, 2014). Sendo assim, o extrato obtido nesta secagem, quanto ao tamanho de partícula, se adequa ao recomendado pela literatura.

O material apresentou irregularidade na distribuição granulométrica, com comportamento bimodal, com distinção de duas populações (Figura 4).

Figura 4 - Histograma de distribuição granulométrica do IFAV de *S. adstringens*



Fonte: Dados da pesquisa.

De modo geral, o extrato apresentou tamanho de partícula reduzido, característica relacionada ao adjuvante de secagem utilizado (dióxido de silício coloidal). O dióxido de silício coloidal é bastante utilizado com esse propósito por apresentar alta pureza, ser quimicamente inerte e atóxico (BACCARIN et al., 2016).

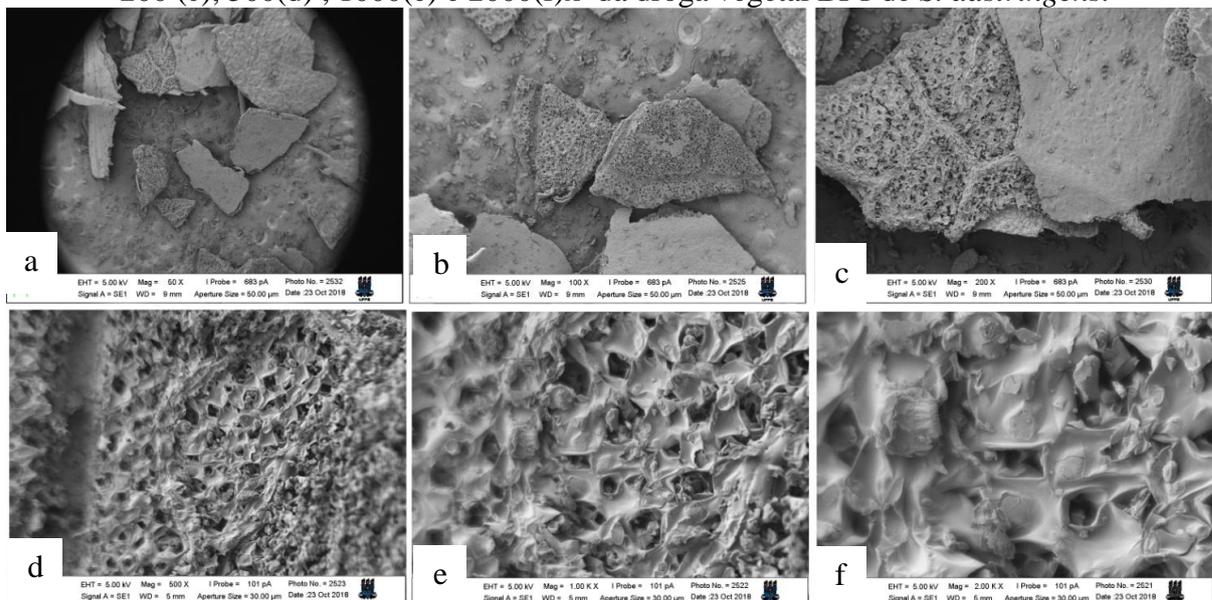
O valor de span obtido (2,89) confirmou a polidispersão das partículas do extrato, uma vez que quanto mais próximo de 1, mais uniforme é a dispersão (GALLO et al., 2015). A distribuição granulométrica irregular mostrou-se diferente de outros trabalhos. Gallo et al. (2015) obtiveram extratos secos por *spray drying* partindo de extratos aquosos de sete espécies

vegetais; a distribuição granulométrica em todos os extratos mostrou-se bastante regular, com valores de span próximos a 1. Deve-se salientar que as condições de secagem do presente estudo bem como a forma de extração foram diferentes, gerando propriedades distintas com relação, por exemplo, ao conteúdo de sólidos extraídos.

4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *S. adstringens*

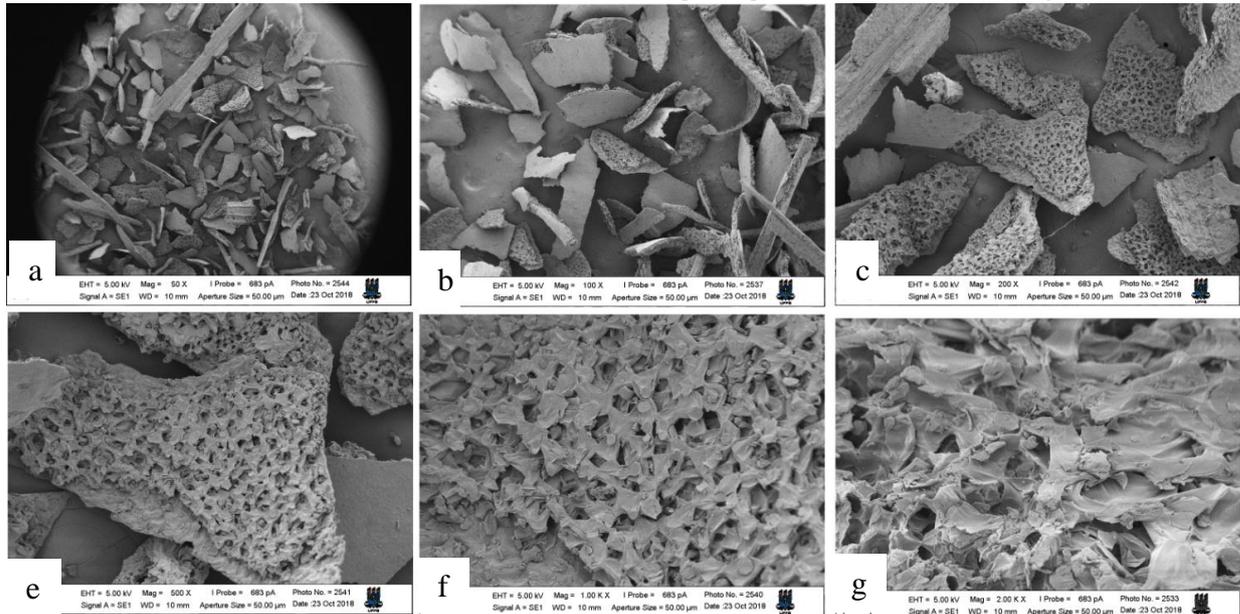
Observou-se na Microscopia Eletrônica de Varredura das drogas vegetais as variações morfológicas nos tamanhos de partículas das amostras analisadas, BF1 (297 μm), BF2 (149 μm), BF3 (74 μm), BF4 (37 μm) (Figuras 5, 6, 7 e 8, respectivamente).

Figura 5 - Imagens da Microscopia eletrônica de Varredura nos aumentos de 50 (a), 100 (b), 200 (c), 500(d) , 1000(e) e 2000(f)x da droga vegetal BF1 de *S. adstringens*.



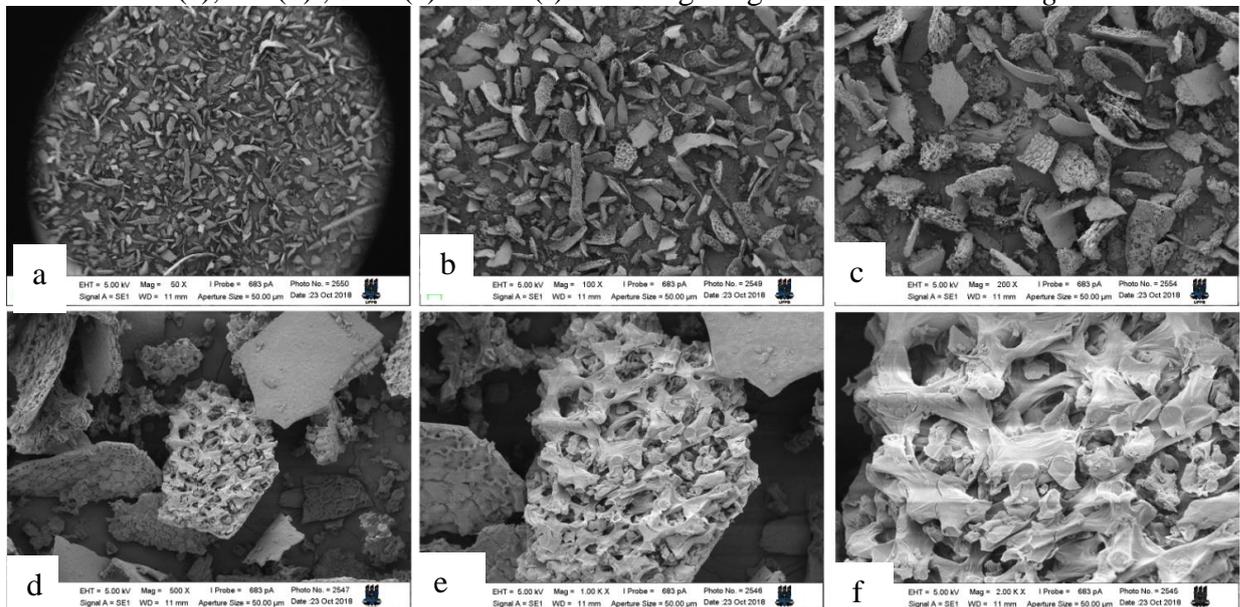
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 6 - Imagens da Microscopia eletrônica de Varredura nos aumentos de 50 (a), 100 (b), 200 (c), 500(d) , 1000(e) e 2000(f)x da droga vegetal BF2 de *S. adstringens*.



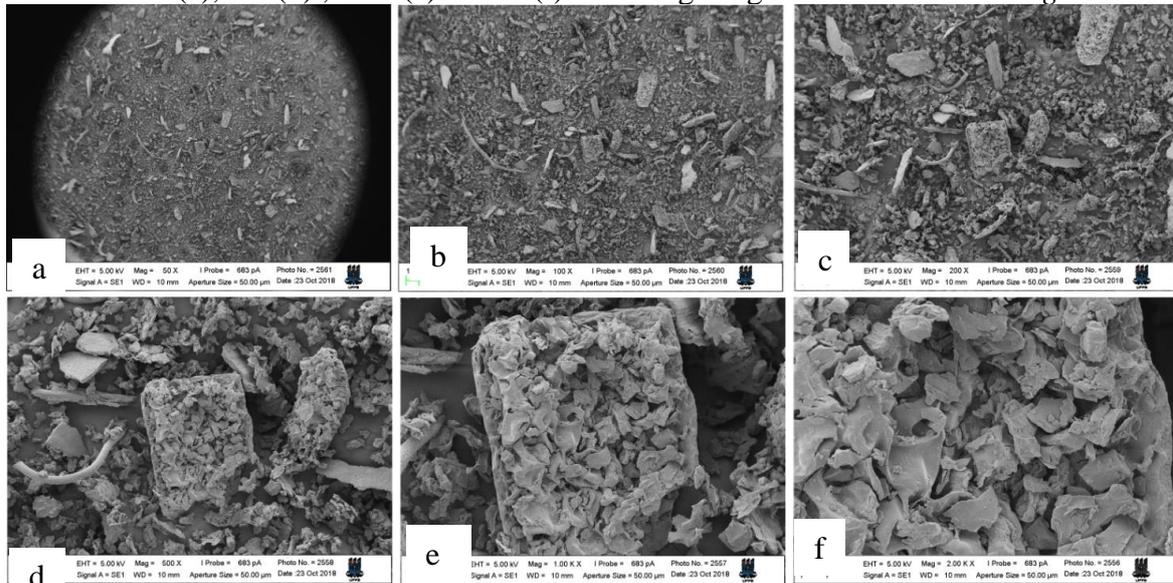
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 7 - Imagens da Microscopia eletrônica de Varredura nos aumentos de 50 (a), 100 (b), 200 (c), 500(d) , 1000(e) e 2000(f)x da droga vegetal BF3 de *S. adstringens*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 8 - Imagens da Microscopia eletrônica de Varredura nos aumentos de 50 (a), 100 (b), 200 (c), 500(d) , 1000(e) e 2000(f)x da droga vegetal BF4 de *S. adstringens*.



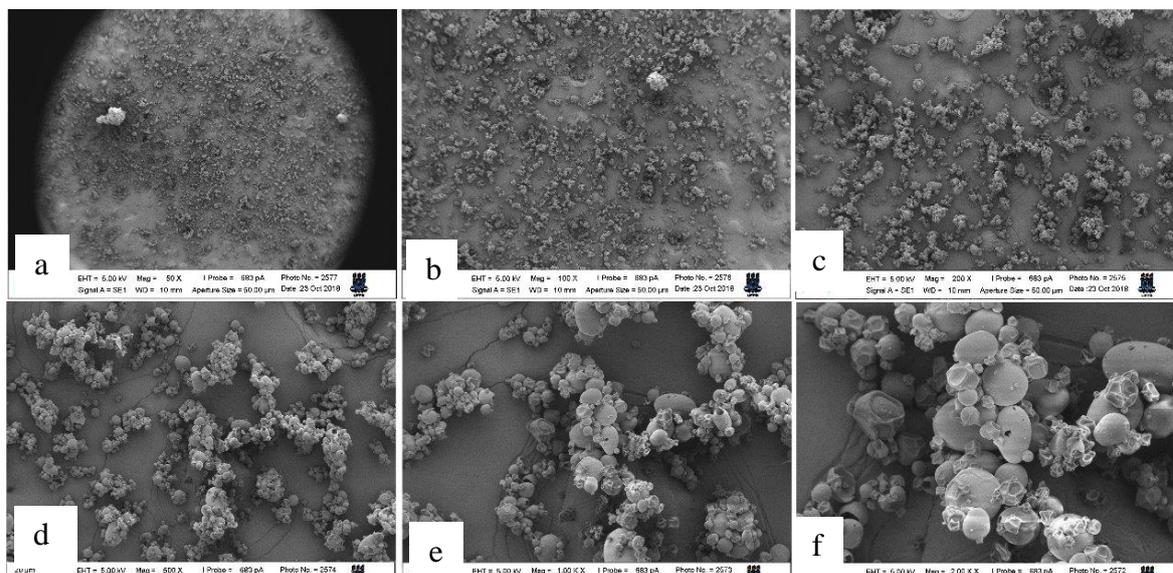
Fonte: Dados da pesquisa.

A moagem granulométrica possibilitou reduzir mecanicamente o material vegetal a fragmentos, em quatro diferentes tamanhos de partículas com o intuito de rastrear qual é o melhor tamanho granulométrico adequado para se fazer a extração. Alberton et al (2001); Aulton (2005) afirmam que o tamanho da partícula da droga influencia diretamente na velocidade de dissolução, suspensibilidade e uniformidade na distribuição para que o extrato tenha a eficácia esperada. No entanto, a escolha do tamanho de partícula deve ser feita com cautela para que não interfira nas propriedades farmacêuticas do extrato e futura formulação. Por isso foi associado a granulometria e a Microscopia Eletrônica de Varredura para escolher qual é o melhor tamanho de partícula para que se obter o extrato seco.

A Figura 9 mostra as imagens obtidas através da Microscopia eletrônica de Varredura do IFAV.

A fotomicrografia do extrato revelou partículas com formas irregulares e rugosas, semelhantemente à obtida na pesquisa desenvolvida por Sousa (2014) com o extrato seco em *spray dryer* com a casca de *S. adstringens*.

Figura 9 - Imagens da Microscopia eletrônica de Varredura nos aumentos de 50 (a), 100 (b), 200 (c), 500(d) , 1000(e) e 2000(f)x do IFAV de *S. adstringens*.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.1.3 Análise térmica na padronização de *S. adstringens*

4.1.3.1 Termogravimetria das drogas vegetais

De acordo com as curvas demonstradas nas Figuras 10 e 11, a decomposição térmica das drogas vegetais de *Stryphnodendron adstringens* em seus quatro tamanhos de partículas (BF1, BF2, BF3 e BF4) aconteceu em seis etapas quando submetidas as atmosfera de ar sintético e em atmosfera inerte na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, com exceção de BF1 que apresentou cinco etapas (Tabela 4).

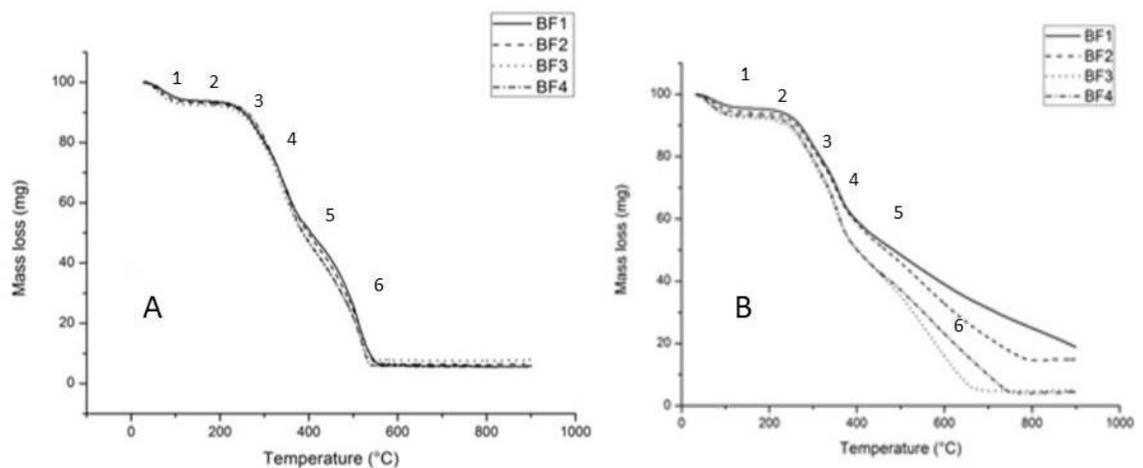
Durante a decomposição térmica de determinada amostra, ocorrem diferentes etapas de perda da massa em função da temperatura. Este fenômeno ocorre devido ao fato de curvas de decomposição térmica estar envolvidas com fenômenos físico-químicos quando a droga vegetal é aquecida por estas se tratarem de misturas multicomponentes de compostos orgânicos e inorgânicos, além disso, há influência da forma e imperfeições das partículas (WESOLOWSKI; KONIECZYNSKI, 2003; FERNANDES et al., 2013; COSTA et al., 2013).

Tabela 4 - Etapas de decomposição térmica da droga vegetal de *S. adstringens* na atmosfera de ar sintético e de nitrogênio na razão de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$

<i>S. adstringens</i>		AMOSTRAS											
RZ $10^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$	Etapas	BF1			BF2			BF3			BF4		
		Ti ($^{\circ}\text{C}$)	Tf ($^{\circ}\text{C}$)	Δm (%)	Ti ($^{\circ}\text{C}$)	Tf ($^{\circ}\text{C}$)	Δm (%)	Ti ($^{\circ}\text{C}$)	Tf ($^{\circ}\text{C}$)	Δm (%)	Ti ($^{\circ}\text{C}$)	Tf ($^{\circ}\text{C}$)	Δm (%)
Ar sintético	Primeira	35,0	115,8	5,7	35,0	78,1	4,4	35,0	96,3	6,5	35,0	107,2	5,1
	Segunda	115,8	231,6	2,2	78,1	199,2	2,5	96,3	215,6	1,7	107,2	216,3	1,5
	Terceira	231,6	325,5	18,9	199,3	316,7	16,9	215,6	316,3	17,4	216,3	318,0	17,2
	Quarta	325,5	402,6	22,5	316,7	407,9	27,6	316,3	405,0	28,7	318,0	426,0	34,
	Quinta	402,6	568,6	13,3	407,9	493,9	21,4	405,0	500,8	24,0	426,0	512,2	24,6
	Sexta	-	-	-	493,3	565,9	20,0	500,8	567,0	13,9	512,2	570,8	11,1
Nitrogênio	Primeira	35,0	112,5	4,0	35,0	121,2	5,5	35,0	122,1	7,2	35,0	122,5	6,3
	Segunda	112,5	265,0	5,0	121,2	261,8	4,3	122,0	261,8	5,5	122,5	252,8	3,7
	Terceira	265,0	336,6	15,6	261,8	328,2	13,9	261,9	327,4	15,9	252,8	316,6	14,4
	Quarta	336,6	436,0	20,4	328,2	438,9	23,1	327,4	472,8	31,9	316,6	466,4	34,0
	Quinta	436,0	622,3	17,8	438,9	600,3	20,4	472,8	609,1	25,2	466,4	618,5	20,7
	Sexta	-	-	-	600,3	807,4	18,1	609,1	701,1	9,3	618,5	773,9	16,4

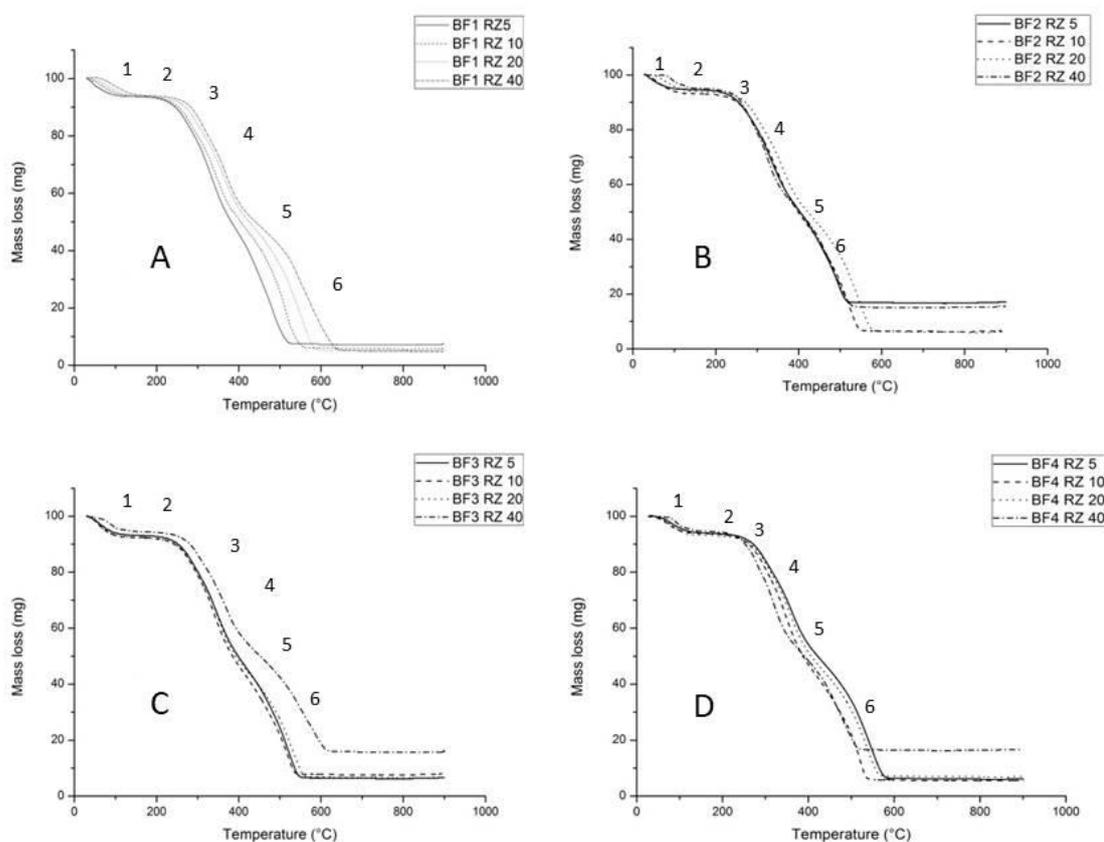
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 10 - Curvas TG das Drogas vegetais *S. adstringens* (Folhas) em diferentes tamanhos de partículas na razão de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ em ar sintético (A) e Nitrogênio (B).



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 11 - Curvas TG das drogas vegetais de *S. adstringens* em atmosfera de ar sintético nas razões de aquecimento de 5, 10, 20 e 40 °C/min⁻¹.



Fonte: Dados da pesquisa.

Evidenciou-se um início de perda de massa em 35,00°C, terminando em 115,87°C para ar sintético e em 112,50°C em atmosfera de nitrogênio para BF1 (Tabela 4). Em ar sintético (Figura 11) houve, no geral, uma perda de massa maior quando comparada à de nitrogênio, sendo BF3 a amostra com maior decomposição nas duas atmosferas (6,55% e 7,23%) e a menor foi BF2, em ar sintético (4,38%) e em nitrogênio (4,00%) foi BF1.

Segundo Fernandes et al. (2012) e Correia et al. (2015), na etapa inicial é onde ocorre a perda de alguns produtos voláteis da amostra, principalmente a água livre. Considerando esta primeira etapa, percebe-se que a perda de água não superou 14%, estando dentro dos limites indicados por Araujo et al. (2012).

A segunda etapa, por sua vez, representou a perda de água ligada presente nas amostras caracterizadas (Storpirts et al., 2009), o que revelou uma alteração discreta na massa do material, em que atingiu a perda máxima de 2,58% em BF2 (ar sintético), 5,51% em BF3, em atmosfera inerte (Tabela 4), em nitrogênio.

A degradação do conjunto dos macro e microconstituintes da amostra, como os sais minerais e proteínas, e dos grupos carboxílicos presentes é representada na terceira etapa de decomposição (CORREIA et al., 2013; FRANCIOSO et al., 2007). Na análise termogravimétrica de folhas de *S. adstringens*, este evento foi iniciado na faixa de 200°C e se estendeu até 336,60°C com perda de massa entre 13,90% a 18,89%, variando entre as amostras e a atmosfera em que foi utilizada.

Para todas as amostras avaliadas, a quarta etapa apresentou os maiores valores de perda de massa (Tabela 5). Ocorreram as perdas de massa mais significativas, variando entre 20,44 - 34,32%, sendo sutilmente mais elevada na atmosfera de ar sintético, comparada à inerte. Esta etapa foi por isso considerada como a principal de degradação térmica onde possivelmente maiores quantidades de compostos sofreram degradação e também serviu como referência durante a obtenção dos parâmetros da cinética pelo método de Ozawa (Tópico 5.1.3.2).

Decomposição térmica semelhante nessa faixa de temperatura (215-355°C) foi encontrada por Correia et al. (2013) em uma pesquisa de caracterização térmica da droga vegetal de *Passiflora edulis* separados em dois tamanhos de partículas diferentes. A perda de massa de ambas as amostras, em atmosfera de ar sintético, aconteceram na faixa de temperatura de 215-247°C (33,6%) e 217-352°C (36,6%), assemelhando-se especialmente a BF4 (34,32%). Durante esta etapa, muitas cadeias químicas são quebradas, provavelmente causadas por dióxido de carbono, outros gases e compostos orgânicos presentes na espécie, que se unem para formar compostos mais estáveis que se decompõem em temperaturas mais elevadas (CHAVES et al., 2016).

Essa alta porcentagem de perda de massa pode ser atribuída à maior quantidade de constituintes químicos degradáveis nessa amostra e faixa de temperatura. Inclusive, BF4 apresentou a maior perda de massa em relação às outras drogas vegetais nos tamanhos de partículas maiores, onde as médias de perdas de massa de cada amostra foram 26,98; 27,15; 28,81 e 32,14% para BF1, BF2, BF3 e BF4, respectivamente. Dessa forma, quanto menor o tamanho de partícula, ou seja, quanto menor a faixa granulométrica da amostra, maior a degradação.

Nota-se no geral, que houve um deslocamento das temperaturas e perdas de massas de BF1, BF2, BF3 e BF4 quando obtidos na mesma razão de aquecimento (Tabela 5).

Tabela 5 - Parâmetros de decomposição da quarta etapa de degradação das amostras obtidas de folhas de *S. adstringens*.

Amostras	Razão de aquecimento (°C/min.)	Onset (°C)	Endset (°C)	Perda de massa (%)
BF1	5	328,11	353,20	28,70
	10	329,65	349,58	22,55
	20	344,02	387,33	29,42
	40	353,88	396,59	27,27
BF2	5	323,7	355,04	27,01
	10	328,82	366,02	27,60
	20	338,69	378,58	29,89
	40	298,05	337,19	24,12
BF3	5	322,13	346,62	31,26
	10	324,37	363,17	28,73
	20	333,96	377,11	29,02
	40	351,60	393,68	26,24
BF4	5	317,69	343,97	33,81
	10	330,08	375,51	34,32
	20	341,37	386,92	29,74
	40	307,58	330,03	30,71

Fonte: Dados da pesquisa

Titta et al. (2011) e Pan et al. (2015) afirmam que esses deslocamentos estão associados com a possível diferença de componentes químicos, variando em cada tamanho de partícula, com diferenças nas taxas de transferência de calor para cada amostra, bem como diferentes gradientes de temperatura entre a superfície e o interior das partículas em cada razão de aquecimento.

As etapas seguintes representaram a continuidade do processo de degradação com formação de resíduo mineral no final (Tabela 6) que variou de 4,27 a 37,31%, sendo maior em BF1, o que justifica pelo seu maior tamanho de partícula, restando o resíduo mineral final maior, em ambas as atmosferas.

Tabela 6 – Resíduo mineral de *S. adstringens* em atmosfera de nitrogênio e ar sintético na razão de 10°C/min⁻¹.

AMOSTRA	RESÍDUO MINERAL (%)	
	Nitrogênio	Ar sintético
BF1	37,10	37,31
BF2	14,62	7,57
BF3	4,78	6,12
BF4	4,27	6,06

Fonte: Dados da pesquisa.

4.1.3.2 Determinação da cinética de degradação

Na Tabela 7 encontram-se os dados obtidos durante a avaliação do quarto evento de degradação aplicando-se o modelo cinético de Ozawa.

Tabela 7 -Parâmetros cinéticos de degradação térmica das drogas vegetais de *S. adstringens* obtidos pelo método de Ozawa

AMOSTRAS	PARÂMETROS CINÉTICOS			
	Droga vegetal	Ea (kJ.mol ⁻¹)	n	A (min ⁻¹)
BF1		158,69	0	8,366x10 ¹¹
BF2		153,88	0	6,399x10 ¹²
BF3		99,63	0	1,663x10 ⁸
BF4		52,85	0	1,206x10 ³

Legenda: EA: energia de ativação, n: ordem de reação; A: fator de frequência

Fonte: Dados da pesquisa.

A decomposição térmica de todas as drogas vegetais se apresentou sempre como uma reação de ordem zero e o valor de energia de ativação foi diretamente proporcional ao tamanho de partícula das amostras em estudo, estando dispostas da seguinte maneira: BF1>BF2>BF3>BF4. Este comportamento também foi evidenciado por Correia et al (2015),

Brandão et al (2016) e Guimarães et al (2017) ao avaliarem a cinética de degradação de drogas vegetais separadas por tamanho de partículas de *Tabebuia caraíba*, *Momordica charantia* e *Poincianella pyramidalis*, respectivamente.

Esse perfil de energia de ativação ser baixo para tamanhos de partículas menores pode ser justificado pelo fato de que amostras com essas características apresentam maior área superficial além de serem mais instáveis e conseqüentemente necessitam de uma menor energia de ativação para promover eventos de entalpia para a sua termodecomposição (CORREIA et al., 2015).

4.1.3.3 Análise Térmica Diferencial

De acordo com a Figura 12, que representa as curvas de DTA obtidas para as diferentes amostras de drogas vegetais de *S. adstringens*, percebe-se que foram evidenciados três picos exotérmicos. Os valores de entalpia e as temperaturas dos picos estão apresentados na Tabela 8.

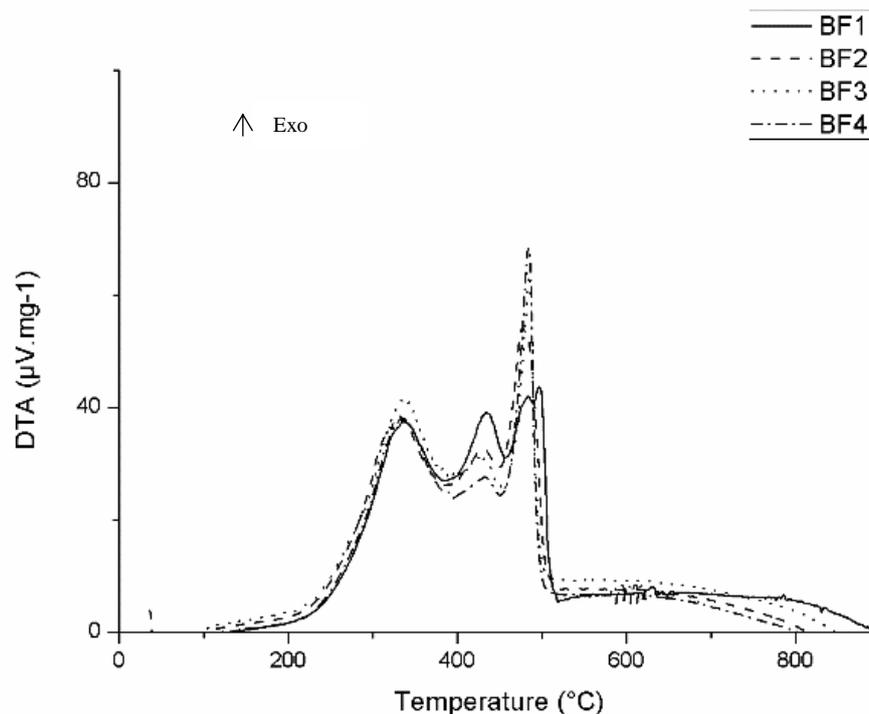
Percebe-se na Figura 12 e Tabela 8 que no primeiro e terceiro eventos a entalpia seguiu um padrão, ou seja, esta variou com o tamanho de partícula, uma vez que, quanto menor o tamanho da partícula, menor foi a entalpia.

Houve também uma diminuição diretamente proporcional da entalpia em função dos tamanhos de partículas em uma pesquisa realizada por Brandão et al. (2016) com a droga vegetal de *Momordica charantia* (folhas).

Alguns autores atribuem essa variação de entalpia ao fato de que drogas vegetais com tamanhos de partículas maiores serem compostas de macrocomponentes como celulose e lignanas exigindo assim, uma maior energia liberada para degradação desses componentes (MA; MU, 2016; LIM;TEY; CHAN, 2014).

Dessa forma, observou-se que BF1 apresentou uma maior entalpia por ser a amostra que apresenta o maior tamanho de partícula (>297 μ m).

Figura 12 - Curvas DTA das drogas vegetais de *S. adstringens* em diferentes tamanhos de partículas na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$



Legenda: Exo = exotérmico

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 8- Eventos exotérmicos das DTA das drogas vegetais obtidas das folhas de *S. adstringens* em diferentes tamanhos de partículas.

Amostras	1º evento		2º evento		3º evento	
	Temperatura de pico (°C)	Entalpia (Kj/g)	Temperatura de pico (°C)	Entalpia (Kj/g)	Temperatura de pico (°C)	Entalpia (Kj/g)
BF1	335,48	0,82	434,13	0,20	496,82	0,90
BF2	331,96	0,73	430,83	0,11	476,39	0,79
BF3	339,41	0,68	429,47	0,08	484,78	0,77
BF4	336,80	0,63	432,29	0,06	484,89	0,54

Fonte: Dados da pesquisa.

Correlacionando os resultados de DTA com TG na mesma razão de aquecimento ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$), observou-se que os eventos exotérmicos apresentados na DTA ocorreram dentro da faixa de temperatura ($331\text{-}496,82^{\circ}\text{C}$) em que ocorreram as principais perdas de massa das amostras na TG ($263,56\text{-}530,70^{\circ}\text{C}$), na quarta etapa. As temperaturas evidenciadas em DTA

apresentaram-se dentro da faixa em que ocorreram a quarta e quinta etapas de decomposição térmica na TG.

Verificou-se que, no terceiro evento da DTA para droga vegetal (Figura 12) houve o maior pico exotérmico em relação aos outros dois eventos e, pôde-se destacar BF4, a qual, dentre todas as amostras foi a que atingiu o maior pico nessa faixa de temperatura. Este fenômeno ocorreu devido à sua maior perda de massa na TG (33,68%, na quarta etapa e 21,30% na quinta) em relação às outras amostras e, conseqüentemente o seu maior valor de entalpia.

Segundo Francioso et al. (2007), é nesta etapa em que provavelmente inicia-se a decomposição de carboidratos e lipídios de compostos com anéis aromáticos presentes. Para confirmar o que afirma este autor, e diante da faixa de temperatura em que ocorreu a decomposição térmica das drogas vegetais de *S. adstringens* constatadas pela termogravimetria e análise térmica diferencial, elucidou-se a identificação de produtos de degradação por meio de ensaios de Pirólise acoplada a cromatografia gasosa realizados nas temperaturas de 250, 350 e 450°C.

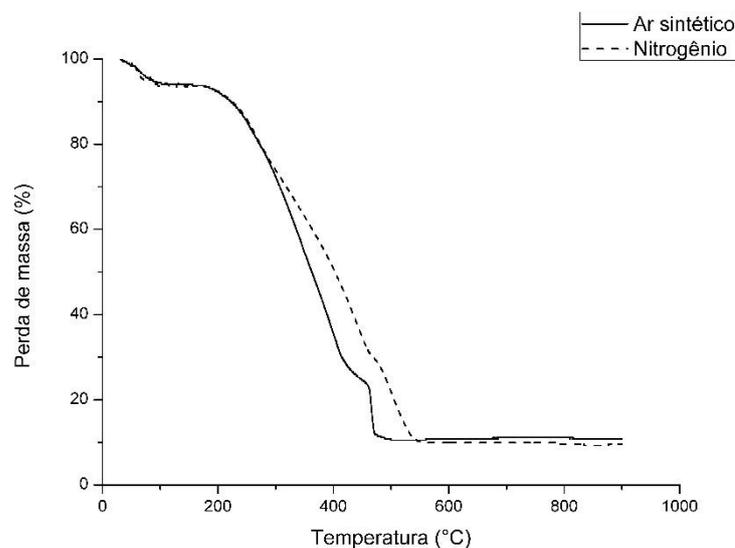
4.1.3.4 Termogravimetria do IFAV

A Figura 13 representa as curvas termogravimétricas do IFAV de *S. adstringens* submetido à mesma razão de aquecimento ($10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em atmosferas distintas (ar sintético e nitrogênio). Os valores de perda de massa de cada etapa encontram-se descritos na Tabela 9.

A primeira etapa de decomposição térmica em atmosfera de nitrogênio ocorreu na faixa de temperatura de 35,00-76,31 °C, com perda de massa de 4,70%. Em atmosfera de ar sintético o mesmo evento foi observado entre 35,00 °C e 85,16 °C, com perda de 4,78% de massa. Esta etapa tem como característica a perda de componentes voláteis, principalmente água livre.

Evento similar foi observado no trabalho desenvolvido por Chaves et al. (2016) em que na primeira etapa de decomposição térmica de extrato nebulizado de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) houve uma perda de massa igual a 6,36%, estando perto da faixa ao que foi encontrado no atual estudo com o extrato nebulizado de *S. adstringens*.

Figura 13 - Curvas TG do IFAV de *S. adstringens* na razão de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ em ar sintético e Nitrogênio.



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 9 - Etapas de decomposição térmica do IFAV de *S. adstringens* na atmosfera de ar sintético e de nitrogênio na razão de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$

RZ $10^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$	Etapas	IFAV		
		Ti ($^{\circ}\text{C}$)	Tf ($^{\circ}\text{C}$)	Δm (%)
Ar sintético	Primeira	35,00	85,16	4,78
	Segunda	85,16	213,15	3,97
	Terceira	213,15	293,22	16,55
	Quarta	293,22	365,00	25,37
	Quinta	365,00	417,50	19,63
	Sexta	417,50	472,35	17,47
Nitrogênio	Primeira	35,00	76,31	4,70
	Segunda	76,31	219,60	4,20
	Terceira	219,60	284,25	13,19
	Quarta	284,25	459,00	45,44
	Quinta	459,00	515,04	15,07
	Sexta	515,04	545,72	6,38

Fonte: Dados da pesquisa.

A segunda etapa, representativa principalmente da perda de água ligada, ocorreu na faixa de 76,31-219,60 °C (4,20%) em atmosfera de nitrogênio e entre 85,16 °C e 213,15 °C em ar sintético, com perda de massa de 3,97%. Pôde-se inferir que o IFAV (extrato seco) apresentou baixo conteúdo de umidade. Na terceira etapa observou-se um comportamento distinto das anteriores, com maior valor de perda de massa em atmosfera de ar sintético (16,55%), representando o início da decomposição e carbonização da matéria orgânica presente no extrato (COSTA et al., 2009).

A quarta etapa apresentou, dentre todas os maiores valores de perda de massa independente da atmosfera, atingindo até 45,44%. Assim, a mesma foi considerada como etapa de referência para o estudo da cinética de degradação do extrato utilizando o método de Ozawa. Para isto, foram obtidas curvas termogravimétricas das amostras em atmosfera de ar sintético em diferentes razões de aquecimento (5, 10, 20 e 40 °C/min⁻¹), que se encontram representadas na Figura 14 e Tabela 10. Nesta tabela estão os parâmetros de decomposição da quarta etapa de degradação das amostras obtidas de folhas de *S. adstringens*. Nota-se que a maior perda de massa foi evidenciada no extrato quando submetido às razões de 5 e 20°C/min⁻¹.

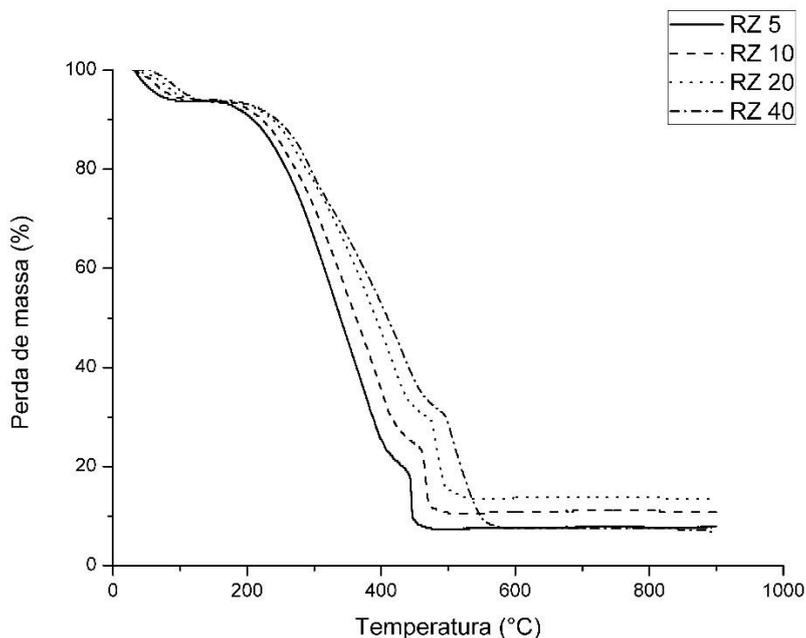
Tabela 10 - Parâmetros de decomposição da quarta etapa de degradação, em ar sintético, do IFAV obtido de folhas de *S. adstringens*.

Amostras	Razão de aquecimento (°C/min.)	Onset (°C)	Endset (°C)	Perda de massa (%)
IFAV	5	364,81	390,58	43,94
	10	293,00	365,00	25,37
	20	309,00	439,00	41,44
	40	394,52	444,04	31,38

Fonte: Dados da pesquisa.

As etapas seguintes representaram a continuidade do processo de degradação com formação de resíduo mineral no final em ambas as atmosferas representando o valor de 11,02% e 12,23% para nitrogênio e ar sintético, respectivamente.

Figura 14 - Curvas TG do IFAV de *S. adstringens* em atmosfera de ar sintético nas razões de aquecimento de 5, 10, 20 e 40 °C.min⁻¹.



Fonte: Dados da pesquisa.

Por meio da análise cinética constatou-se que a degradação térmica do IFAV de *S. adstringens* ocorreu como uma reação de ordem zero, com energia de ativação de 75,13 kJ.mol⁻¹ e fator de frequência 1,065 x 10⁴ min⁻¹.

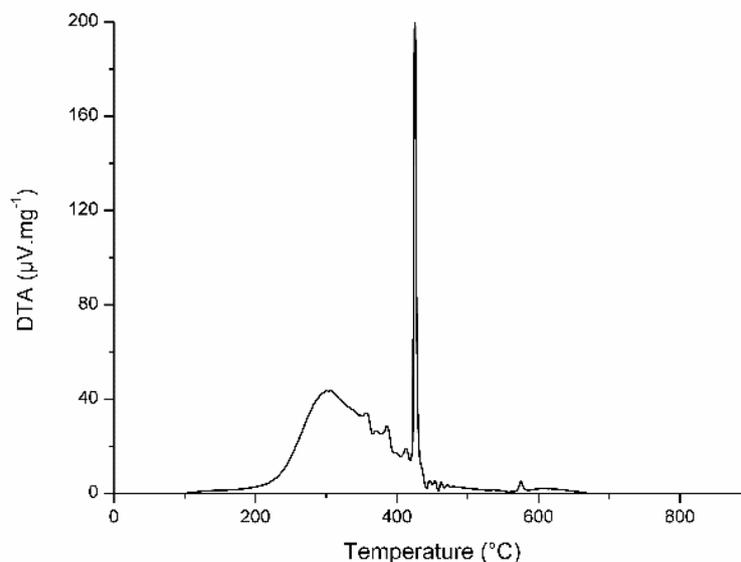
Na Figura 15 pode ser visto o perfil de análise térmica diferencial do IFAV de *S. adstringens*. Foi observada a ocorrência de quatro picos exotérmicos, o dobro da quantidade das drogas vegetais, com uma maior entalpia no primeiro (2,40kJ/g) (Tabela 11).

Tabela 11- Eventos exotérmicos das DTA do IFAV obtido das folhas de *S. adstringens* em diferentes tamanhos de partículas.

Amostras	1° evento		2° evento		3° evento		4° evento	
	Temp. pico (°C)	Entalpia (Kj/g)						
EXTRA TO	300,47	2,40	392,06	1,00	425,48	1,73	574,53	0,96

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 15 – Curva DTA do IFAV de *S. adstringens* na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$.



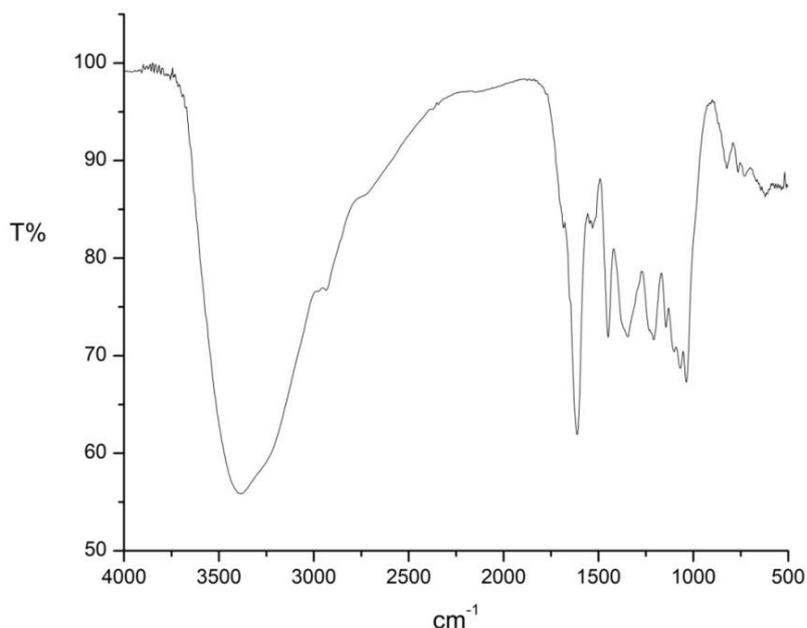
Fonte: Dados da pesquisa.

No IFAV, o pico com maior entalpia, ou seja, no primeiro evento, ocorreu na faixa de temperatura de $244,72\text{-}348,67^{\circ}\text{C}$, estando dentro da faixa em que ocorreu a maior degradação térmica da amostra na termogravimetria ($293\text{-}365^{\circ}\text{C}$).

4.1.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 16 mostra o espectro de infravermelho do extrato de *S. adstringens*. Observou-se bandas de absorção semelhantes ao do estudo realizado por Costa et al. (2013), com fração de *S. adstringens*, corroborando com a atual pesquisa.

Fortes absorções na região de 3375 cm^{-1} foram observadas, características de estiramento axial de O-H, como é mostrado na Figura 23. Bandas de absorção na região de 2936 cm^{-1} foram visíveis, típicas de vibração de estiramento C-H (alcano), sendo atribuídas à natureza de compostos orgânicos no extrato. A presença de carbonos do tipo sp^3 em grupamento metil, é demonstrada nas bandas de 1346 e 1448 cm^{-1} .

Figura 16 – Espectro de infravermelho do IFAV de *S. adstringens*

Fonte: Dados da pesquisa.

Os picos de média intensidade observados na região 1037 e 1209 cm^{-1} estão relacionados com ligações carbono-oxigênio (CO) característicos de grupos funcionais como éter, ésteres e ácidos carboxílicos, os quais são indicativos de uma ampla variedade de metabólitos, tais como taninos, flavonóides e antraquinonas, entre outros (FERNANDES et al., 2013). Tal efeito também é mostrado na banda de absorção de média intensidade em 1513cm^{-1} , sugestiva de grupo carbonílico. A banda de absorção em 1614cm^{-1} é indicativa de ligação C=C. A absorção em 731 e 823cm^{-1} sugerem a presença de CH aromático (FERNANDES et al., 2013).

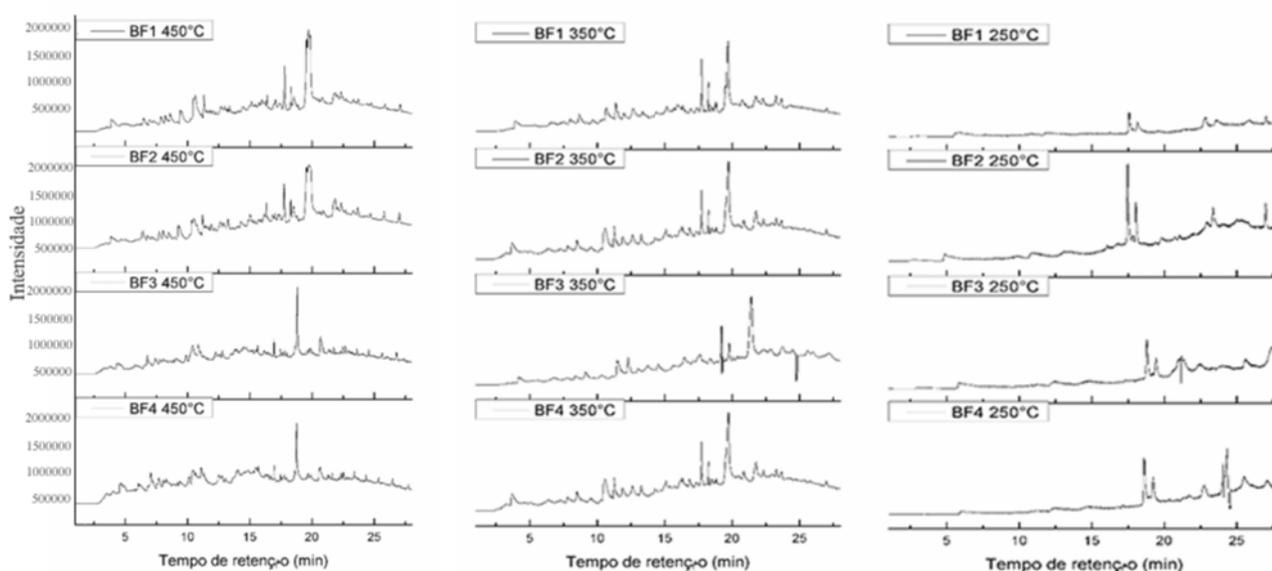
4.1.5 Pirólise acoplada a CG/MS

No intuito de avaliar quais os produtos de degradação estavam sendo liberados, as amostras foram submetidas ao processo de pirólise acoplada à cromatografia gasosa-espectrometria de massas, nas temperaturas representativas das etapas iniciais (250°C) e intermediárias (350 e 450°C) do processo de decomposição dos macro e microconstituintes, conforme representa a Figura 17.

Os principais compostos liberados durante as etapas de degradação térmica foram analisados pela biblioteca Willey 6ª edição para o Class-500. De acordo com os resultados

apresentados na Figura 17, percebe-se que as drogas vegetais apresentaram perfis diferenciados em função da temperatura devido à quantidade de compostos liberados, assim, quanto maior a temperatura, maior a quantidade de substâncias químicas. Dessa forma, na temperatura de 450°C, números maiores de substâncias foram formados em relação a 350°C e 250°C. Além disso, pode-se notar que em uma mesma temperatura, os mesmos componentes foram liberados por cada droga vegetal (BF1, BF2, BF3 e BF4), porém diferindo em seus valores de intensidade, área e tempo de retenção, que variaram de acordo com o tamanho de partícula.

Figura 17 - Pirogramas obtidos de *S. adstringens* nas temperaturas de 450, 350 e 250°C



Fonte: Dados da pesquisa.

Os pirogramas das amostras de BF1, BF2, BF3 e BF4 mostraram perfis cromatográficos semelhantes entre si, apresentando na temperatura de 250°C quatro compostos comuns à todas as amostras, porém com áreas de picos diferentes. Os compostos identificados foram o Neoftadieno ($C_{20}H_{38}$), 2-Hexadeceno-1-ol ($C_{20}H_{40}O$), Pentatriacontano ($C_{35}H_{72}$) e Octadecano, 1-cloro ($C_{18}H_{37}Cl$).

Na temperatura de 350°C, tem-se a continuidade de processos de decomposição iniciados em 250°C, além da formação de novos produtos decorrente de outros processos. O número de picos resultantes do processo pirolítico revelou a presença de uma quantidade maior de substâncias provenientes da degradação térmica, permitindo caracterizar a presença de três

componentes (9,12 ácido octadecadienóico, benzociclooctena (C₁₃H₂₂O) e 8,11, 14 ácido eicosatrienóico (C₂₀H₃₄O₂) as mais identificadas na temperatura de 250°C.

Da mesma forma, a 450°C em todas as amostras, houve a liberação de cinco novos compostos que não foram liberados em 250°C e 350°C, tais quais: fenol (C₈H₁₀O), benzofurano (C₈H₈O), 3-penteno (C₉H₁₀O₂), 9 ácidooctadecenoico (C₁₈H₃₄O₂) e tritetracontane (C₄₃H₈₈). Este evento é esperado quando correlaciona com os resultados encontrados na termogravimetria pois na faixa de temperatura próxima a 450°C foi onde ocorreu a maior perda de massa na análise termogravimétrica (TG) e uma maior liberação de energia na análise térmica diferencial (DTA).

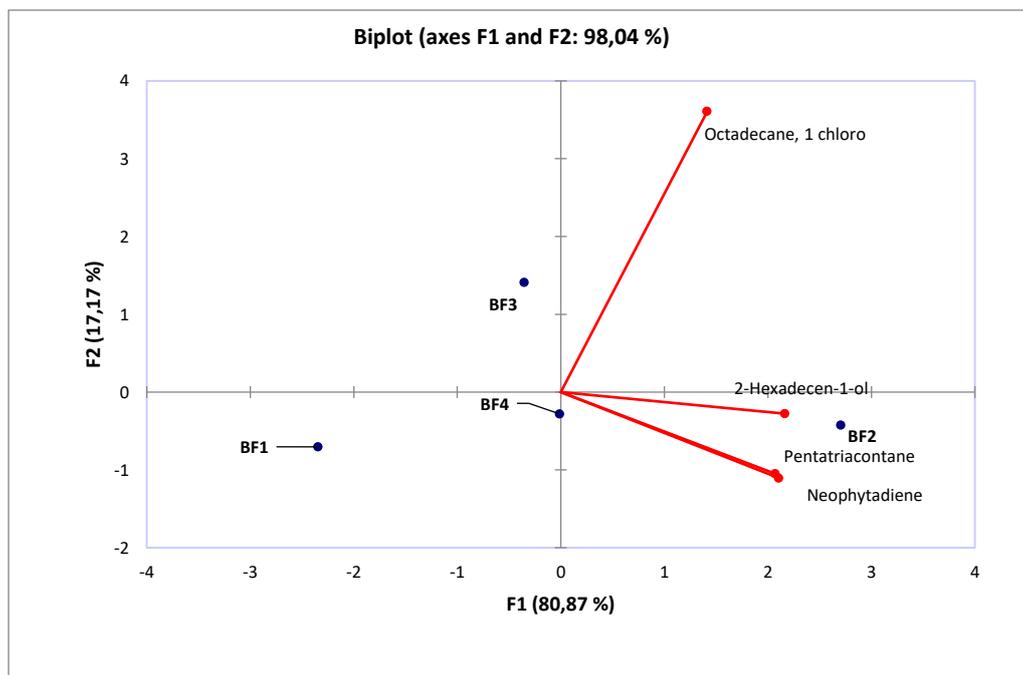
Perfil cromatográfico semelhante foi encontrado na pesquisa realizada por Correia et al. (2013) onde caracterizou as drogas vegetais de uma espécie da mesma família de *S. adstringens*, *Erythrina velutina*, e constatou comportamento idêntico, ou seja, à medida que aumentou a temperatura, pôde-se perceber que a quantidade de compostos químicos liberados foram maiores, corroborando com o atual estudo. Inclusive, Correia et al. (2013) também identificou o diterpeno neoftadieno que foi encontrado em todas as amostras em todas as temperaturas a que foram submetidas.

Diante do exposto, percebe-se que há uma complexidade dos dados gerados durante a pirólise. Dessa forma, a análise estatística multivariada, como o PCA e HCA são ferramentas importantes e úteis para serem aplicadas, pois estabelecem através de gráficos, quais os parâmetros/variáveis analisados são os principais responsáveis pela formação dos grupos de amostras, podendo assim ser estabelecida uma assinatura química particular para cada grupo estudado (SANTOS, 2014).

Por isso, aplicou-se PCA e HCA neste estudo com os dados referentes à área de pico média (n=2) dos compostos identificados nas diferentes faixas granulométricas e temperaturas de 250°C, 350°C e 450°C.

A Figura 18 apresenta o gráfico bidimensional das amostras (drogas vegetais) e de todas as variáveis (compostos) nos dois primeiros eixos de componentes principais na temperatura de 250°C, obtida através da PCA.

Figura 18 - Biplotagem de todas as variáveis (compostos) e amostras na temperatura de 250°C.

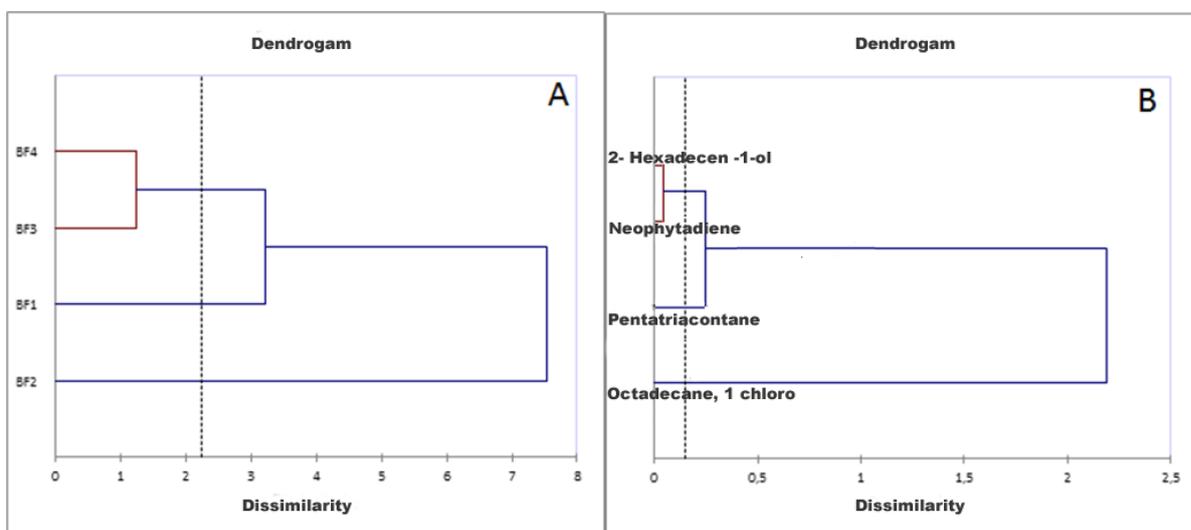


Fonte: Dados da pesquisa.

Nota-se na Figura 18 que os dois componentes principais analisados (F1 e F2) responderam por 98,04% da variância entre as amostras, sendo considerados adequados para descrevê-las. A proximidade entre os compostos e as amostras indica que, para determinada droga vegetal, as substâncias mais próximas encontraram-se em maior concentração, sendo as mais representativas das respectivas amostras (GUIMARÃES et al., 2017). Deste modo, para as drogas vegetais percebeu-se claramente que a presença dos compostos identificados separou as amostras em grupos diferentes, onde BF2 apresentou-se mais distinto em relação aos outros, sendo os compostos 2-hexadecenol, neoftadieno e pentatriacontano os responsáveis por essa dissimilaridade, com uma distância espacial maior em relação às outras amostras. Observou-se uma proximidade entre as amostras BF3 e BF4, sugerindo uma possível relação de similaridade entre elas.

Para comprovar tais afirmações as drogas vegetais e os compostos foram agrupados quanto à sua similaridade utilizando o HCA, cujos gráficos (dendrogramas) encontram-se representados na Figura 19.

Figura 19 - Dendrogramas da HCA das amostras obtidas das folhas (A) e dos compostos (B) na temperatura de 250°C de *S. adstringens*



Fonte: Dados da pesquisa.

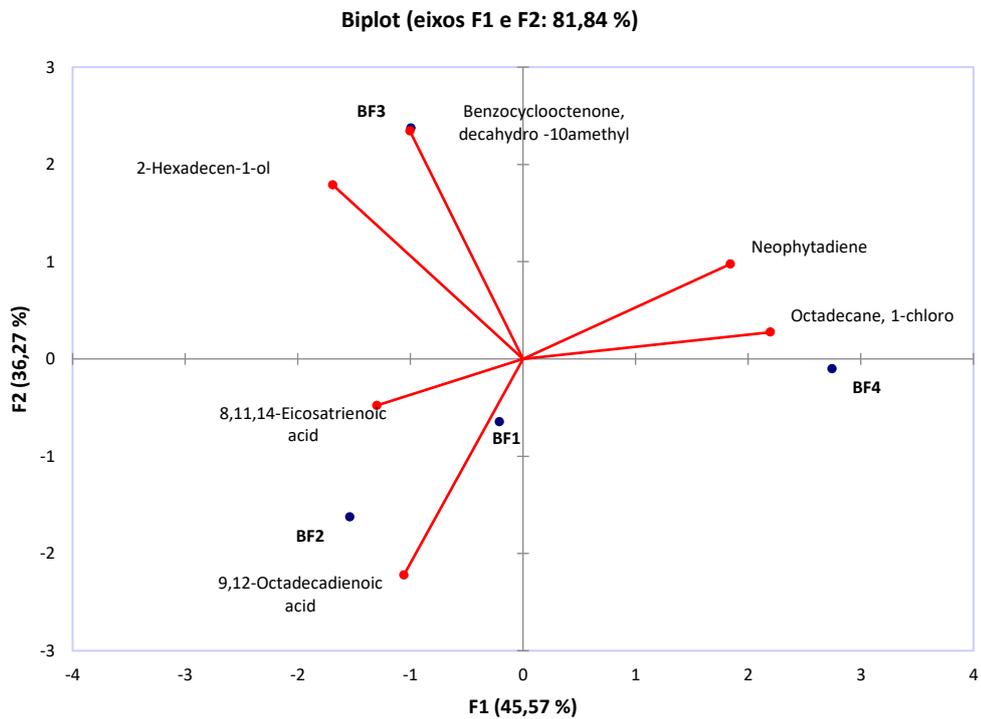
Com os dados da Figura 19 percebeu-se que a similaridade entre BF3 e BF4 foi comprovada por HCA, assim como uma diferenciação entre todas as amostras e BF2. Na Figura 19B, nota-se quais os compostos foram mais similares em termos de concentração, correspondendo aos componentes mais representativos das drogas vegetais, a saber: 2-hexadecenol, neoftadieno e pentatriacontano, os quais, obtiveram maiores similaridades entre si e pouca em relação ao octadecano 1-cloro.

A Figura 20 apresenta o PCA das amostras na temperatura de 350°C. As análises dos dois primeiros componentes ortogonais corresponderam a 81,84% da variância. Observou-se que o composto ácido eicosatrenóico e o ácido octadecadienóico foram representativos das amostras BF1 e BF2 apresentando-se dissimilares à BF3 e BF4.

Apesar do distanciamento espacial evidenciado pelo PCA, a droga vegetal BF3 obteve certa similaridade com BF1 e BF2. BF4 apresentou nitidamente uma dissimilaridade com BF1 e BF2.

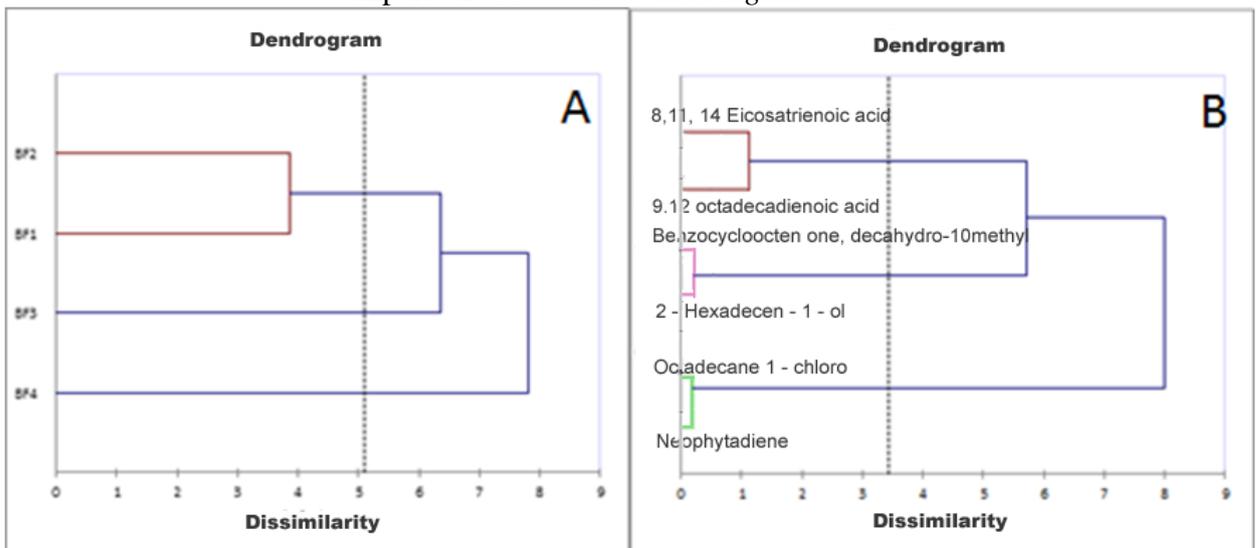
Na HCA (Figura 21) houve similaridade entre BF1, BF2 e BF3 e uma diferenciação de BF4, comprovando os resultados de PCA. Percebeu-se que 8,11,14 ácido eicosatrienóico e ácido octadecadienóico foram bastante semelhantes entre si, bem como benzociclooctenona e 2-hexadecenol e octadecano 1-cloro e neoftadieno.

Figura 20 - Biplotagem de todas as variáveis (compostos) e amostras na temperatura de 350°C



Fonte: Dados da pesquisa.

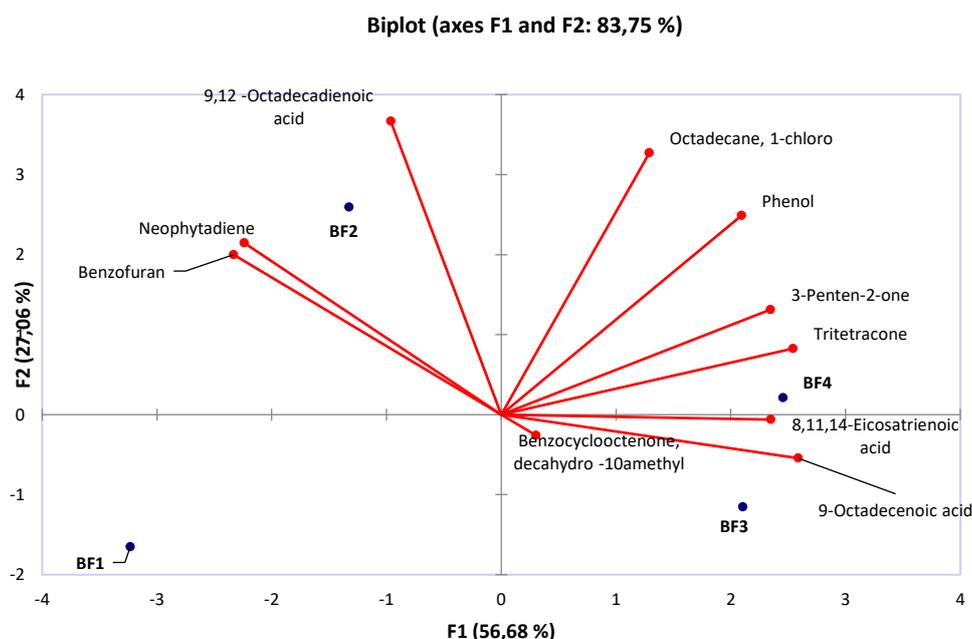
Figura 21 - Dendrogramas da HCA das amostras (A) e dos compostos (B) na temperatura 350°C de *S. adstringens*



Fonte: Dados da pesquisa.

Na Figura 22 encontra-se representada a biplotagem obtida através do PCA para a temperatura de 450°C, com 83,75% de variância.

Figura 22 - Biplotagem de todas as variáveis (compostos) e amostras na temperatura de 450°C



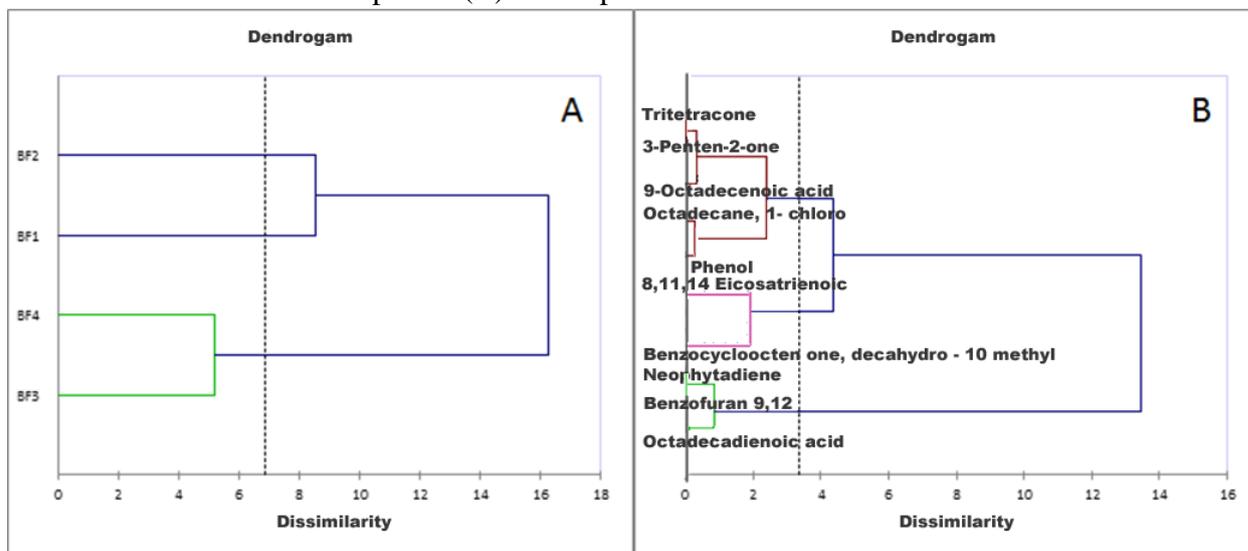
Fonte: Dados da pesquisa.

O grupamento BF3 e BF4 apresentou similaridade de compostos, diferindo das outras amostras e, BF1 e BF2 apresentaram-se em outro grupo.

Com os dados dos dendrogramas na temperatura de 450°C (Figura 23) das amostras obtidas das folhas, observou-se a grande similaridade entre BF3 e BF4 e entre BF1 e BF2, confirmando os resultados do PCA, bem como a enorme similaridade entre os compostos.

A presença dos compostos neoftadieno e octadecano em todos os pirogramas obtidos indica que as reações ou processos que têm como produto a liberação dos mesmos ocorrem em uma extensa faixa de temperatura.

Figura 23 - Dendrogramas da HCA das amostras obtidas das folhas (A) e dos compostos (B) na temperatura de 450°C



Fonte: Dados da pesquisa.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12, o composto fitoquímico que apresentou maior concentração em todas as amostras de *S. adstringens* foi polifenóis, seguido pelos taninos e flavonoides. Observou-se que o teor desses compostos foi inversamente proporcional ao tamanho de partícula quando se tratou de droga vegetal, ou seja, quanto menor a faixa granulométrica, maior a concentração do metabólito secundário presente nas amostras de *S. adstringens*. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa quando aplicada os testes de Tukey, Fisher e Bonferroni, ou seja, em todos os tamanhos de partículas e compostos fitoquímicos, o nível de significância alcançado foi maior que 0,05 ($P > 0,05$).

Destaca-se a presença marcante de taninos atingindo valores de até 99,60 mg/g do pó da droga, ao passo que no IFAV essa concentração atinge um valor bem mais elevado, alcançando quase 150mg/g equivalentes de catequina. A presença de taninos em *S. adstringens* já foi inclusive relatada em alguns estudos (LIMA et al., 2016; AUDI et al., 2004; LOPES et al., 2009; HASENACK et al., 2008). Taninos afetam o nível de crescimento de microrganismos, justificando a sua ação antimicrobiana e cicatrizante, reconstituindo a pele (ALMEIDA, 2010). Esta ação deve estar associada à inibição das enzimas microbianas extracelulares e a ação direta sobre o metabolismo dos microrganismos (SANTOS et al., 2009).

Tabela 12 - Teor de Taninos, flavonoides e polifenóis obtidos por espectroscopia na região do visível

AMOSTRAS	Componentes fitoquímicos		
	Concentração em mg/g do pó da droga vegetal/IFAV		
	<i>Taninos^a</i>	<i>Flavonoides^b</i>	<i>Polifenóis^c</i>
BF1	73,80	6,30	138,20
BF2	80,10	9,80	192,10
BF3	90,90	10,60	210,60
BF4	99,60	12,60	254,60
IFAV	145,03	23,36	289,60

Legenda = a = equivalentes de catequina; b = equivalentes de quercetina; c = equivalentes de ácido gálico

Fonte: Dados da pesquisa.

Apesar de na maioria dos artigos presentes na literatura relacionarem as atividades farmacológicas do barbatimão aos teores de taninos e na casca do caule, neste trabalho além do alto teor deste composto, flavonoides e polifenóis também apresentaram valores consideráveis, e no IFAV, com a tecnologia de *spray dryer* foi capaz de atingir concentrações elevadas, maiores que nas drogas vegetais, atingindo até uma concentração de 23,36mg/g e 289,60mg/g, respectivamente.

As concentrações de polifenóis totais e taninos condensados em *S. adstringens* foram maiores em relação à dos taninos totais. A presença de compostos polifenólicos, principalmente taninos tem sido apontada como a principal responsável pelas atividades antimicrobianas de produtos naturais bioativos (MENDONÇA; CARNEIRO; OLIVEIRA, 2018), pois, estes fitocompostos interferem com a função de células-T, mastócitos e sistemas enzimáticos envolvidos na resposta imune e na geração de processos inflamatórios, como inibição da ativação de NF-kB, COXs e iNOS (GARCÍA-MEDIAVILLA et al., 2007; MIDDLETON, 1992).

De modo geral, o teor de todos os metabólitos secundários do extrato aumentou quando comparados às drogas vegetais. Este comportamento é, inclusive, uma das principais vantagens da utilização de extratos nebulizados, como insumo farmacêutico ativo em produtos fitofarmacêuticos (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2015; COSTA et al., 2009; FERNANDES et al., 2014). O solvente utilizado na obtenção dos extratos (água-etanol 50%)

mostrou-se, portanto, capaz de extrair melhor os constituintes do que a água quente utilizada na quantificação dos metabólitos nas drogas vegetais.

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *S. adstringens*

No *screening* microbiológico de *S. adstringens* todas as linhagens se mostraram sensíveis às drogas vegetais, mostrando-se como inibidoras do crescimento tanto de bactérias quanto de fungos. Destacou-se a excelente atividade antimicrobiana frente às bactérias, principalmente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Tabela 13) e menos potentes em cepas padrões de *Candida*. Os controles positivos (gentamicina 80mg/mL, cefalotina 1000mg e fluconazol 100mg) mostraram-se satisfatórios, com CIM 0,190 mg/mL e não houve contaminação das infusões que eram preparadas no dia da análise e nem dos meios de cultura. O controle negativo também não interferiu nos resultados.

Tabela 13 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das drogas vegetais de *S. adstringens*.

AMOSTRAS	CIM (mg/ml)						
	Microrganismos						
	<i>Sa</i>	<i>Pa</i>	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Ca</i>	<i>Ct</i>	<i>Cp</i>
BF1	0,19	0,78	0,19	6,25	12,5	6,25	6,25
BF2	0,19	0,78	0,19	6,25	12,5	6,25	6,25
BF3	0,19	0,78	0,19	6,25	12,5	6,25	6,25
BF4	0,19	0,78	0,19	6,25	12,5	6,25	6,25

Legenda: R = resistente; *S.a.*: *Staphylococcus aureus*; *E.c.*: *Escherichia coli*; *P.a.*: *Pseudomonas aeruginosa*; *K.p.*: *Klebsiella pneumoniae*; *Ca.*: *Candida albicans*; *Ct.*: *Candida tropicalis*; *Cp.*: *Candida parapsilosis*.

Fonte: Dados da pesquisa.

Observou-se também que todas as drogas vegetais apresentaram a mesma CIM, não diferindo sua inibição de um tamanho de partícula para outro. Alguns estudos relatam a diferenciação na composição química e atividade farmacológica em função do tamanho de partícula (MA e MU, 2016; LIN, TEY e CHAN, 2014).

Popularmente, *S. adstringens* é bastante utilizada para a cicatrização e higienização de feridas, tratamento de infecções e como antisséptico (OLIVEIRA et al., 2014). Assim, uma vez que *S. adstringens* já é utilizada pela população para esses fins, os resultados desta pesquisa mostraram-se satisfatórios, pois corrobora ao uso popular, comprovando a eficácia dos infusos obtidos das folhas, como bacteriostático. Esta propriedade se deve ao fato desta planta ser rica

em metabólitos secundários, especialmente taninos, que lhes confere atividades farmacológicas importantes estando envolvidos com a boa atividade antimicrobiana (AUDI et al., 2004; COSTA et al., 2011; FIORI, et al., 2013; SOARES, et al., 2008; SOUZA, et al., 2007; TOLEDO, 2002).

Estudos na literatura são realizados principalmente com a casca do caule e Orlando (2005) evidenciou que o extrato hidroalcoólico da casca do caule só nas concentrações de 100 mg/ml, 200 mg/ml e 300 mg/ml é que apresentaram atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. No entanto, na atual pesquisa, apesar de terem sido utilizadas infusões das drogas vegetais, os resultados das CIMs apresentaram-se menores (<30mg/mL), mostrando assim o melhor aproveitamento das folhas, induzindo assim a população para o uso de folhas no tratamento de infecções, sendo mais eficazes e contribuindo para a preservação da espécie.

Na medicina popular, a água é geralmente o solvente principal usado para a obtenção de preparações a partir de plantas, tais como infusões e chás medicinais, as quais na maioria são empregadas para tratar infecções bacterianas. Romero et al. (2005) estudaram uma solução aquosa de *S. adstringens* e demonstrou que esta planta foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* e ser inativo frente à *Candida albicans*, o que nesta pesquisa apresentou uma CIM de 12,5mg/ml. Esta informação é importante, pois em ambos os estudos, soluções aquosas de *S. adstringens* foram capazes de exibir um bom perfil de sensibilidade frente à *S. aureus* que é uma bactéria envolvida em infecções importantes e que vem apresentando resistência frente à antibióticos industrializados disponíveis no mercado.

Já na pesquisa realizada por Pinho et al. (2012), utilizando as folhas de *S. adstringens* foi confirmada a atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, mas não contra *E. coli*, contrastando com os resultados desta pesquisa onde a CIM foi igual a 0,190 mg/mL, mostrando como forte inibidor do crescimento de *E.coli* diante das infusões de *S. adstringens*.

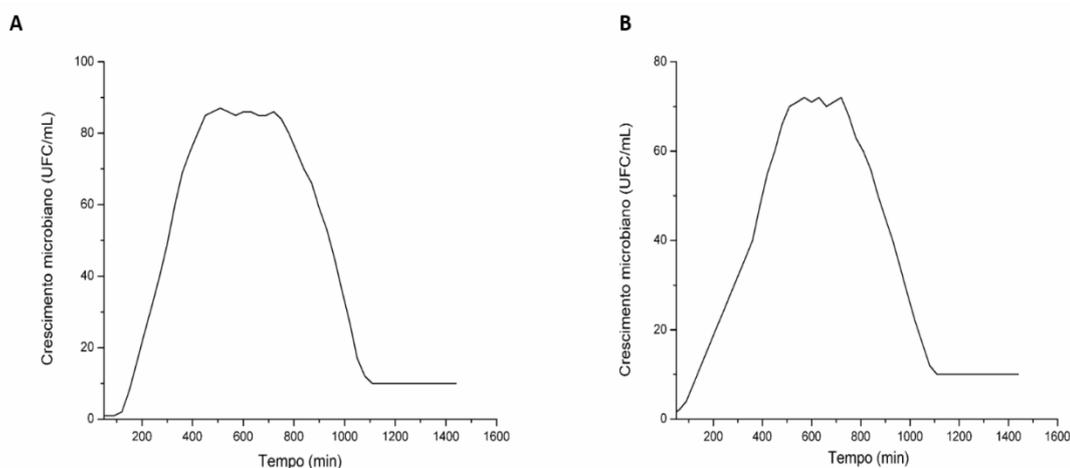
Evidencia-se, dessa maneira, que os resultados do *screening* bacteriano serviram como direcionamento para o desenvolvimento de estudos mais avançados, visando determinar a potência antimicrobiana do IFAV de *S. adstringens* diante das cepas que apresentaram mais sensíveis diante das drogas vegetais, ou seja, *S. aureus* e *E. coli*. Dessa forma, esse insumo poderá apresentar potencial de aproveitamento para fitoterápicos ou para pesquisa de novas drogas antimicrobianas.

4.3.1 Determinação da potência microbiológica relativa do IFAV de *S. adstringens*

4.3.1.1 Curva de crescimento

A Figura 24 mostra a curva de crescimento microbiano de *S. aureus* (Figura 24A) e de *E. coli* (Figura 24B) obtidas no tempo de 24 horas. Segundo Trabulsi (2015) a primeira fase caracteriza-se a fase de adaptação dos microrganismos (fase LAG), onde o mesmo está se adaptando ao meio de cultura e as condições do ambiente; essa fase foi até o tempo de 120 minutos, observando a partir desse tempo o início da fase de crescimento exponencial (LOG) que se estendeu até 450 minutos. A partir desse ponto houve uma constância relativa no número de unidades formadoras de colônias, caracterizando assim, a fase estacionária. Em seguida, a fase de declínio ou morte começou no tempo de 780 minutos e no tempo de 1080 minutos já havia 10×10 UFC/mL, caracterizando o fim dessa fase, assim como da curva de crescimento.

Figura 24 - Curva de crescimento dos microrganismos *S. aureus* (A) e *E. coli* (B) no tempo de 24 horas.



Fonte: Dados da pesquisa.

Comparando-se a curva de crescimento de ambas as bactérias em questão, percebeu-se que *E. coli* (Figura 24B), teve a fase de adaptação (LAG) e fase estacionária mais curtas do que a de *S. aureus* (Figura 24A), quando analisadas nas mesmas condições. A fase de crescimento de *E. coli* iniciou no tempo de 60 minutos, ao passo que a de *S. aureus*, em 80 minutos. A fase estacionária de *E. coli* ocorreu entre os tempos de 500 a 720 minutos. A fase de declínio ou morte ocorreu no tempo de 720 a 1040 minutos, a partir desse ponto a quantidade de unidades

formadoras de colônias de *E. coli* reduziram até 10×10^6 UFC/mL, caracterizando assim, o fim da curva de crescimento microbiano dessa bactéria.

Madigan et al. (2016) afirmam que a modificação entre a fase de adaptação entre essas duas bactérias é devido à variação nas características de crescimento entre esses dois microrganismos, principalmente considerando a diferença na composição da parede celular de gram positivos (*S.aureus*) e gram negativos (*E. coli*).

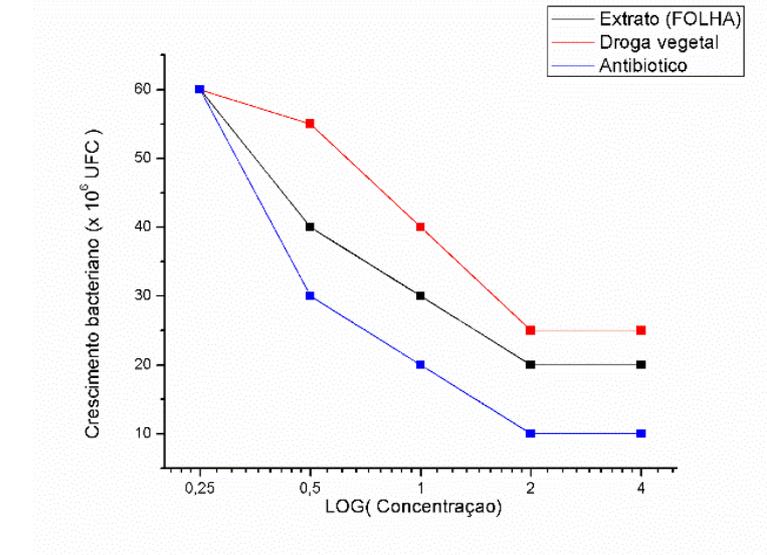
Padrões de crescimento similares foram observados para os dois microrganismos em um estudo realizado por Chatterjee et al., (2015) onde avaliou o efeito de nanopartículas de prata na modulação da curva de crescimento de *E.coli* e *S.aureus*. Nesse estudo, foi observado que *E. coli* foi mais susceptível a essas nanopartículas, e que a atividade antimicrobiana dessas nanopartículas de prata é atribuída a alteração da permeabilidade da membrana celular dessas bactérias provocando um atraso na fase de adaptação do crescimento microbiano desses microrganismos.

Devido a essa diferença na taxa de crescimento de ambas, as bactérias, ficou determinado que o tempo de inserção da amostra teste e do padrão foi de 6 horas para *Staphylococcus aureus* enquanto que para *Escherichia coli* foi de 5 horas após a incubação do inóculo (10^6 UFC/mL) em caldo *Muller Hinton* a 37° C. Esses momentos de inserção das amostras foram escolhidos por se encontrarem dentro da fase exponencial de crescimento das bactérias em questão.

4.3.1.2 Determinação da potência antimicrobiana do IFAV

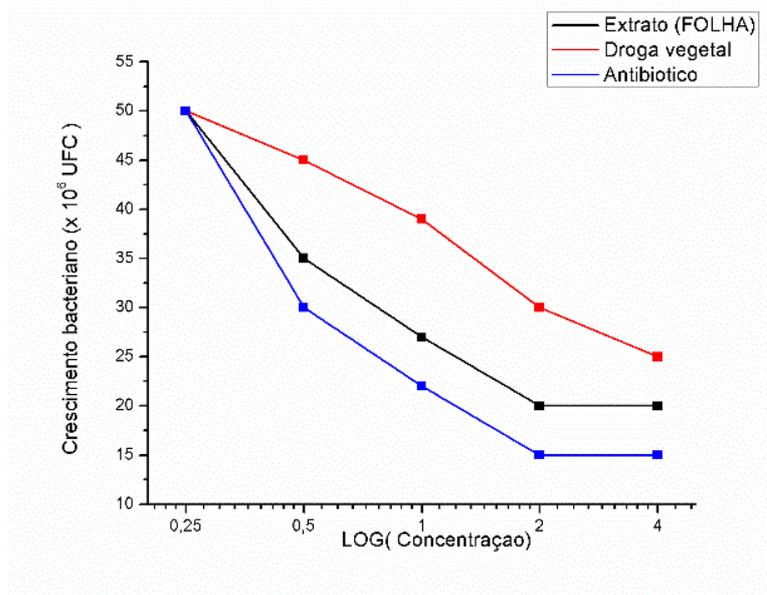
Observando a Figura 25 e 26 percebe-se que foi possível estabelecer o perfil de uma potência microbiológica de ambas as amostras, droga vegetal e IFAV. A atividade antimicrobiana ocorreu em função da concentração reduzindo o número de Unidades Formadoras de Colônias das duas bactérias em relação ao número de UFC do inóculo no momento da inserção dessas amostras. As inclinações das curvas de crescimento dos microrganismos na fase *log*, permitem concluir que em concentrações mais altas das amostras e do padrão, a velocidade de crescimento é menor, de acordo com os princípios de ensaio turbidimétrico (CAZEDE; SALGADO, 2013).

Figura 25 - Curva da quantidade de unidades formadoras de colônias de *S.aureus* em função da concentração da substância de referência (cefalotina) e das amostras testes



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 26 - Curva da quantidade de unidades formadoras de colônias de *E.coli* em função da concentração da substância de referência (gentamicina) e das amostras testes



Fonte: Dados da pesquisa.

Observa-se ainda que o extrato obteve o mesmo perfil dos antimicrobianos utilizados frente às duas bactérias e, para a droga vegetal, foi um pouco diferenciado possivelmente pela forma de preparo (infusão) e pelo tamanho de partícula ser maior do que o extrato seco em *spray dryer*; já o extrato, por ter utilizado uma tecnologia de secagem, assemelhou-se aos padrões, podendo ser comparados. Além disso, já era esperado que a ação antimicrobiana do

extrato fosse maior, pois na determinação dos metabólitos secundários, os taninos apresentaram-se maiores do que nas drogas vegetais. Por isso, deu seguimento aos estudos de potência com apenas o IFAV (extrato seco) como candidato à incorporação na futura formulação semi sólida.

Machado, et al., (2010) explica que o efeito antimicrobiano dos taninos ocorre por dois mecanismos de ação principais: em gram positivos eles se agregam à parede celular destruindo a camada de petideoglicana, semelhante ao mecanismo utilizado pelos betalactâmicos como a Cefalotina na atividade antimicrobiana. O segundo mecanismo está relacionado à inibição de síntese proteica, semelhante à ação da Gentamicina na inibição bacteriana em gram negativos (BENUCCI, et al., 2016; SANTOS, et al., 2017; GUO, et al., 2018; KHARCHOUFI et al., 2018).

Assim, por essa suposição de similaridade nos mecanismos de ação dos antimicrobianos e do extrato utilizado, os microrganismos foram inibidos nas mesmas proporções de concentração, obtendo paralelismo em três pontos (níveis 50%, 100% e 200%) das retas UFC X Concentração do extrato em relação às substâncias de referência, conforme demonstrados os dados das Tabelas 14 e 15.

O paralelismo das retas das amostras em relação aos antimicrobianos foi confirmado, visto que todas as retas possuíam o mesmo coeficiente angular (a) na equação da reta ($y = ax+b$), sendo possível fazer uma relação de doseamento entre as concentrações dos padrões (antimicrobianos) e amostra (extrato/IFAV) (ERMER, JOHN e MILLER, 2008; FRANCISCO et al., 2016).

Tabela 14 - Dados das equações das retas obtidas com os níveis 50, 100 e 200 das concentrações dos antimicrobianos e do IFAV frente a *S. aureus*.

Extrato/ antimicrobiano	Coeficiente angular (a)	Coeficiente Linear (b)	Coeficiente de correlação (r²)
Cefalotina	0,55	70,01	0,997
IFAV	0,55	80,05	0,996

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 15 - Dados das equações das retas obtidas com os níveis 50, 100 e 200 das concentrações dos antimicrobianos e do IFAV frente a *E. coli*.

Extrato/ antimicrobiano	Coefficiente angular (a)	Coefficiente Linear (b)	Coefficiente de correlação (r ²)
Gentamicina	0,37	59,16	0,99
IFAV	0,37	64,16	0,96

Fonte: Dados da pesquisa.

Assim, pôde-se calcular a potência do IFAV comparando-se aos antimicrobianos sintéticos com potência já conhecida, gentamicina 80mg/mL e cefalotina 1000mg (Tabela 16).

Tabela 16 - Determinação da potência do IFAV de *S. adstringens* em relação aos padrões de Gentamicina 80mg/mL e Cefalotina 1000mg.

Padrão	IFAV <i>S. adstringens</i>	
	Gentamicina 80mg/mL	Cefalotina 1000mg
Potência média determinada (mg)	73,22	917,4
Percentual em relação a potência declarada (%)	91,53	91,74

Fonte: Dados da pesquisa.

Comprovou-se que a eficácia do IFAV de *S. adstringens* em relação a ambos os padrões com potência já declarada foi satisfatória, com uma potência superior a 90%, equivalente a 73mg e 917mg da potência da amostra em relação aos padrões de gentamicina 80mg/mL e cefalotina 1000mg, respectivamente.

4.3.1.3 Validação do método analítico

Linearidade

Para verificação da linearidade foram obtidas cinco curvas analíticas (UFC X Concentração) dos padrões e da amostra, sendo duas no mesmo dia (avaliação intradia) e as demais em dias diferentes (avaliação interdias).

O modelo linear foi adequado para as cinco curvas apresentando normalidade, independência dos resíduos (homoscedasticidade) significativos e desvio de linearidade (regressão) não significativa (ERMER, JOHN, MILLER, 2008).

A normalidade e independência de resíduos (homoscedasticidade) são requisitos necessários para que o método dos mínimos quadrados seja empregado na análise de regressão linear (SOLANO, 2011). Portanto, se algum deles estiverem fora dos limites de controle limita o método de ajuste.

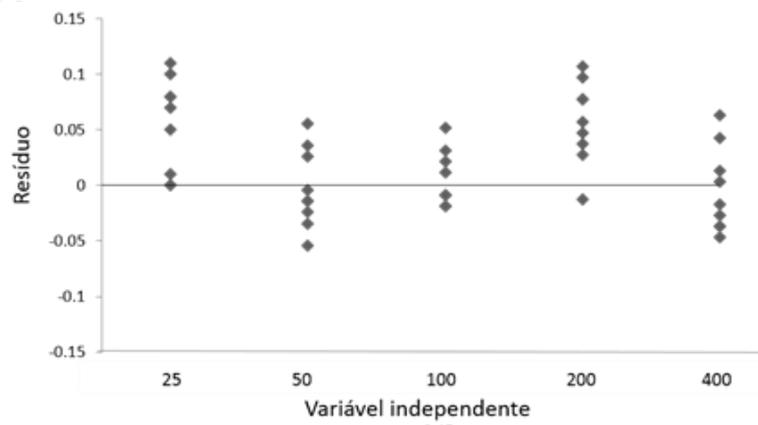
Dessa forma, os resultados do estudo dos parâmetros do modelo linear construído apresentaram para os resíduos uma distribuição normal e sem dependência entre os mesmos (Figuras 27 e 28), a regressão foi adequada para representar a atividade inibitória dos antimicrobianos assim como do extrato frente às bactérias escolhidas.

O coeficiente de determinação (r^2) é a fração da variância total de y que é explicada pela variação em x , ou seja, a proporção da variação total na quantidade de unidades formadoras de colônias que é explicada pela variação da concentração da substância antimicrobiana.

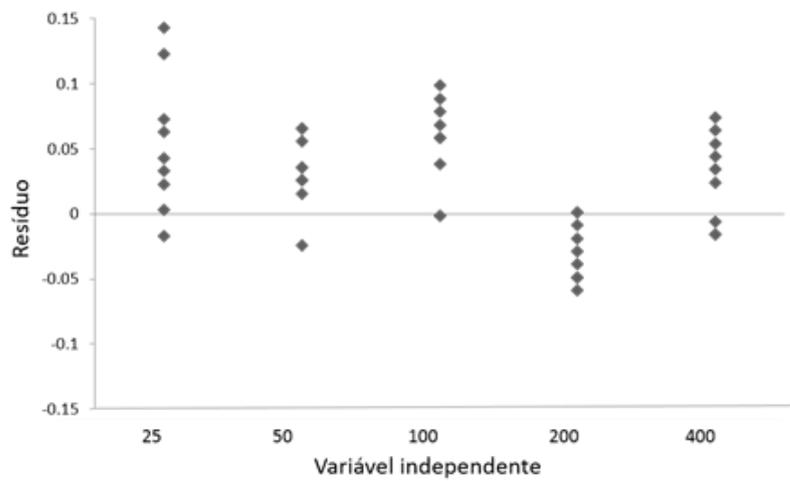
As cinco retas apresentaram coeficiente de correlação (r) superior ou igual a 0,98 (Tabela 17 e 18) conforme critério estabelecido pela resolução brasileira (BRASIL, 2003). Esses valores foram observados nas análises com as duas bactérias.

Figura 27 - Gráficos dos Resíduos das análises do extrato de *S. adstringens* obtido das folhas (A) e das análises realizada com Cefalotina (B) frente a *S. aureus*.

(A)



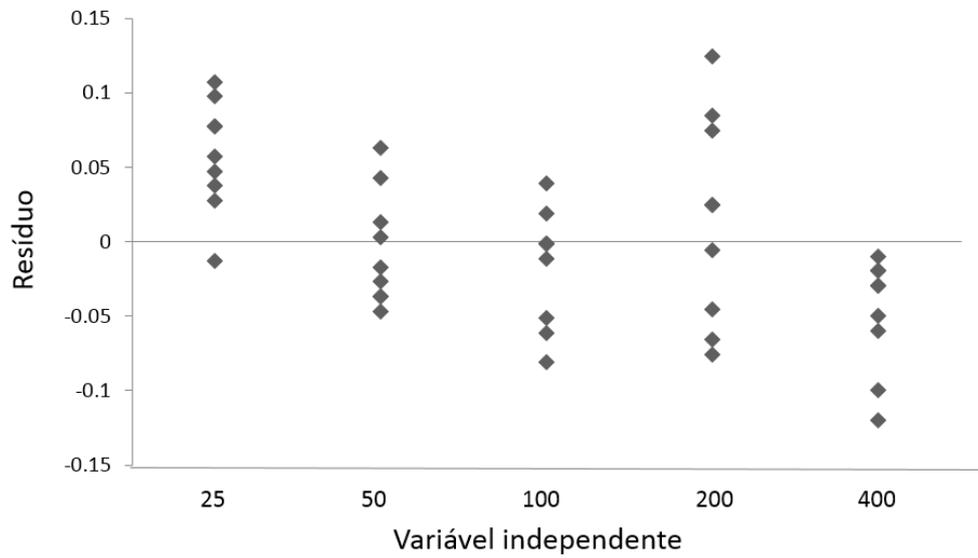
(B)



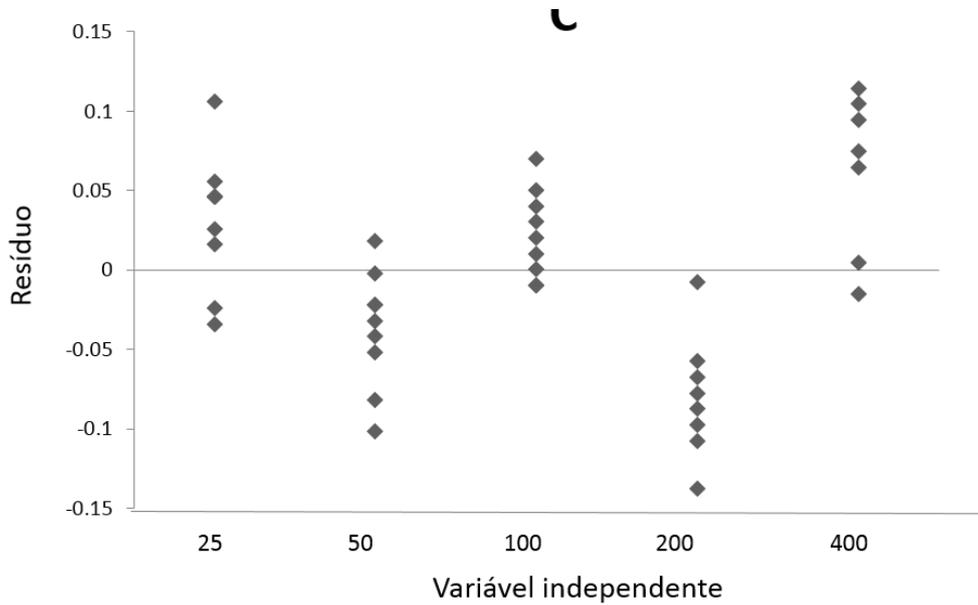
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 28 - Gráficos dos Resíduos das análises do extrato de *M. charantia* obtido das folhas (A) e das análises realizadas com Gentamicina (B) frente a *E. coli*.

(A)



(B)



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 17 - Parâmetros de curva analítica (intercepto - a, inclinação - b, e coeficiente de correlação - r^2) para o padrão cefalotina e o IFAV nos níveis de 50%, 100% e 200% frente a *S. aureus*.

Amostra	Retas	Coefficiente linear (a)	Coefficiente angular (b)	Coefficiente de correlação (r^2)
IFAV	1° Dia A	0,550	80,071	0,9996
	1° Dia B	0,550	80,073	0,9996
	2° Dia	0,550	80,072	0,9995
	3° Dia	0,550	80,071	0,9997
	4° Dia	0,550	80,074	0,9997
Cefalotina	1° Dia A	0,550	70,018	0,9996
	1° Dia B	0,550	70,012	0,9996
	2° Dia	0,550	70,011	0,9995
	3° Dia	0,550	70,013	0,9997
	4° Dia	0,550	70,016	0,9997

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 18 - Parâmetros de curva analítica (intercepto - a, inclinação - b, e coeficiente de correlação - r^2) para o padrão Gentamicina e o IFAV nos níveis de 50%, 100% e 200% frente a *E. coli*.

Amostra	Retas	Coefficiente linear (a)	Coefficiente angular (b)	Coefficiente de correlação (r^2)
IFAV	1° Dia A	0,370	64,166	0,9993
	1° Dia B	0,370	64,163	0,9995
	2° Dia	0,370	64,164	0,9994
	3° Dia	0,370	64,167	0,9992
	4° Dia	0,370	64,162	0,9992
Gentamicina	1° Dia A	0,370	59,165	0,9998
	1° Dia B	0,370	59,163	0,9998
	2° Dia	0,370	59,164	0,9997
	3° Dia	0,370	59,167	0,9996
	4° Dia	0,370	59,165	0,9995

Fonte: Dados da pesquisa.

Desta forma, um valor de r^2 igual a 0,9996 e 0,9988 dos padrões no primeiro dia, significa que 99,96 % e 99,88% da variabilidade do número de UFC são explicadas pela concentração da Cefalotina e Gentamicina, respectivamente (MONTGOMERY et. al., 2001).

Precisão

A precisão foi avaliada quanto à repetitividade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdias), assim como a exatidão. A exatidão pode ser vista como composta pela veracidade (trueness)-(bias) e pela precisão (desvio padrão) como demonstradas nas Tabelas 21 e 22. Desta forma, pode ser considerada como a estimativa do erro total do processo analítico. A veracidade está relacionada com os erros sistemáticos do procedimento analítico e em alguns casos é referenciada como exatidão (SAVIANO et al, 2014; HUBERT 2007).

É recomendável desvio padrão menor do que 5 % em relação à potência calculada, indicando que o método desenvolvido apresenta precisão. Em relação à exatidão intradia e interdias, os valores médios de potência estão de acordo com o critério de validade: valor médio da potência entre 85 e 115 % do valor teórico do padrão (Tabelas 19 e 20), de acordo com a Farmacopéia Brasileira, V edição. Dessa forma, o método foi considerado exato, uma vez que o intervalo de tolerância para a concentração da amostra no nível em questão estava inserido no limite de ± 15 % (variação máxima permitida para avaliação da exatidão segundo resolução brasileira e guia do FDA) (BRASIL, 2003; U.S. FOOD., 2001).

Tabela 19 - Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão para precisão e exatidão intra e interdias da amostra em três diferentes níveis de concentração contra *S.aureus*.

Amostra	Análises	Potência e intervalo de confiança a 95 % (%)		
		50 %	100 %	200 %
IFAV	1º dia A	45.80	91.72	183.58
	1º dia B	45.83	91.80	183.55
	2º dia	45.82	91.71	183.56
	3º dia	45.79	91.73	183.53
	4º dia	45.78	91.73	183.55
	Média	45.80	91.74	183.55
	Desvio padrão	0.021	0.036	0.018
	Coef. de variação	0.045	0.039	0.013

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 20 - Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão para precisão e exatidão intra e interdias da amostra em três diferentes níveis de concentração contra *E. coli*.

Amostra	Análises	Potência e intervalo de confiança a 95 % (%)		
		50 %	100 %	200 %
IFAV	1º dia A	45.73	91.55	183.28
	1º dia B	45.70	91.51	183.35
	2º dia	45.72	91.58	183.36
	3º dia	45.73	91.47	183.29
	4º dia	45.77	91.53	183.32
	Média	45.73	91.53	183.32
	Desvio padrão	0.025	0.041	0.035
	Coef. de variação	0.057	0.045	0.026

Fonte: Dados da pesquisa.

Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Verificou-se então que a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano de forma maior que o solvente, isto é, a que apresentou atividade antimicrobiana detectável pelo método foi igual a 0.125 mg/mL visto que o diluente não apresentou atividade antimicrobiana. Portanto, a concentração de 0.125 mg/mL foi determinada como limite de detecção do método desenvolvido. Com o cálculo obtido pela curva de calibração, o limite de detecção foi de 0.250 mg/mL para o extrato analisado contra os dois microrganismos.

O limite de quantificação foi calculado a partir das curvas de calibração intradia e interdia. Observando assim, nas Tabelas 21 e 22 as menores concentrações que foram detectadas com linearidade do método. Para os antimicrobianos os limites de quantificação encontrados foram de 0.250 µg/mL.

Tabela 21 - Valores do limite de quantificação, desvio padrão e coeficiente de variação calculado intradia e interdias nas análises com *S.aureus*.

Análises	IFAV (mg/mL)	Cefalotina (µg/mL)
1º dia A	0.502	0.501
1º dia B	0.505	0.502
2º dia	0.504	0.504
3º dia	0.503	0.504
4º dia	0.502	0.503
Desvio padrão	0.001	0.001
Coeficiente de variação	0.259	0.259

Tabela 22 - Valores do limite de quantificação, desvio padrão e coeficiente de variação calculado intradia e interdias nas análises com *E. coli*.

Análises	IFAV (mg/mL)	Gentamicina (µg/mL)
1º dia A	0.503	0.504
1º dia B	0.502	0.506
2º dia	0.505	0.502
3º dia	0.504	0.505
4º dia	0.503	0.503
Desvio padrão	0.001	0.002
Coeficiente de variação	0.226	0.314

Fonte: Dados da pesquisa.

Robustez

Os resultados dos métodos analíticos podem variar por uma série de fatores, o que afetaria a sua reprodutibilidade. Assim, deve-se avaliar a robustez do método, isto é, a sua capacidade em resistir a pequenas variações (SAVIANO et al., 2014).

Não ocorreu variação na potência quando variado o comprimento de onda de leitura das absorbâncias e os diluentes das amostras (Tabelas 23 e 24). Portanto, com a alteração do pH, observou-se uma redução do crescimento microbiano nas variações ácidas e alcalina. Com isso ocorreu mudança das absorbâncias e conseqüentemente alteração nos cálculos das potências dos extratos em relação aos antimicrobianos, diminuindo esses valores, todavia obedecendo a variação permitida pela RDC de 2003.

Tabela 23 - Valores de potência relativa dos extratos aos antimicrobianos frente a *S. aureus* em diversas condições.

Amostra	Comprimento de onda (nm)			DP	CV	Solvente			DP	CV	pH			DP	CV
	600	625	650			DMSO (10%)	Glicose (5%)	S.salina (0.9%)			Ácido	Básico	Neutro		
IFAV	91.67	91.72	91.78	0.055	0.600	91.74	91.70	91.76	0.028	0.310	88.54	88.62	88.57	0.040	0.460

Legenda: DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 24- Valores de potência relativa dos extratos aos antimicrobianos frente a *E. coli* em diversas condições.

Amostra	Comprimento de onda (nm)			DP	CV	Solvente			DP	CV	pH			DP	CV
	600	625	650			DMSO (10%)	Glicose (5 %)	S.salina (0.9%)			Ácido	Básico	Neutro		
	Folha	91.52	91.49			91.48	0.021	0.230			91.54	91.50	91.55		

Legenda: DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com Dafalle (2015) a alteração de pH influencia na fase lag de crescimento microbiano, prolongando essa fase e, conseqüentemente retardando a fase de crescimento, justificando assim a diferença das potências calculadas quando ocorre variação desse parâmetro.

Durante a fase log (ou de crescimento exponencial) o crescimento microbiano ocorre de forma rápida. As bactérias, quando em condições adequadas, dividem-se num determinado intervalo de tempo (tempo de geração) de forma que a população microbiana aumenta em progressão geométrica. O tempo de geração é inerente ao microrganismo e depende de vários fatores, inclusive do pH. A turbidez resultante do crescimento microbiano e decorrente da interação entre antibiótico e microrganismo-teste é influenciada pelas fases lag e log de crescimento (AKKERMANS; IMPE, 2018). Conseqüentemente, se o pH do meio de cultura varia de forma significativa durante o período de incubação do ensaio, a atividade do antibiótico avaliado frente ao microrganismo teste pode ser alterada como observada nos dados obtidos por esse estudo.

Diante do estudo de determinação da potência e validação do método analítico de IFAV de *S. adstringens* percebe-se que a amostra em questão apresentou uma excelente eficácia e o método adequado podendo ser estudado para incorporá-lo a uma formulação e utilizada como alternativa terapêutica à resistência antimicrobiana frente à cefalotina e gentamicina e outros representantes dessas classes.

4.4 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS COM O IFAV

Dentre os bioensaios de toxicidade, encontra-se o ensaio de letalidade frente à *Artemia salina* Leach, um microcrustáceo de água salgada comumente utilizado como alimento para peixes. A simplicidade com que pode ser manuseado, a rapidez dos ensaios e o baixo custo

favorece a sua utilização rotineira em análises preliminares de toxicidade geral (LUNA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2008).

S. adstringens causou a morte de 51% dos náuplios na concentração máxima testada (1.000 µg/ml) apresentando assim letalidade frente a *A. salina* L. de modo moderado, pois na literatura (OECD, 2004) cita que uma CL50 inferior a 1000 µg/mL apresenta uma potencial citotoxicidade para os organismos que possam ser expostos à ela. Já no estudo realizado por Mclaughlin; Saizarbitori; Anderson (1995) a toxicidade com *A. salina* se revelou negativa para os extratos obtidos de folhas (CL50>1000mg/ml), indicando uma baixa toxicidade da amostra. Com a casca de *S. adstringens*, Siqueira; Higino (2008) ao avaliarem a toxicidade frente à *A. salina* com amostras de garrafadas obtidas de cascas observou que esta é moderadamente tóxica, corroborando com o estudo. No entanto, em um estudo realizado por Vieira (2014) o extrato etanólico de casca foi letal para os náuplios nas concentrações de 500 200 e 100 µg/mL, possivelmente devido ao tipo de extrato obtido.

Na avaliação da toxicidade aguda oral e intraperitoneal em camundongos a substância teste na dose de 2000 mg/Kg v.o e i.p proporcionaram sinais estimulantes (agitação) nos primeiros 30 minutos, em seguida, sinais depressores foram evidentes. Almeida et al. (2009) após a inoculação do extrato hidroalcoólico das folhas de barbatimão em animais, observaram alterações caracterizadas como neurovegetativas, com respostas estimulantes e depressora. Porém após a primeira 1h no atual estudo, todos os sinais depressores já haviam sido cessados e que se manteve durante os 14 dias de avaliação. Durante esse período de observação os animais não apresentaram sinais anormais, nem mesmo diferenças no consumo de ração, ingestão de água e no peso corporal. Os animais do grupo controle apresentaram uma transitória irritabilidade, comum pela ingestão não espontânea do veículo (etanol a 50%).

Apesar de alguns reações comportamentais terem sido detectadas no *screening* hipocrático não houveram mortes após o período de 14 dias, na dose de 2000 mg/Kg, com isso a DL50 foi considerada como sendo DL50 > 2000 mg/kg, sugerindo uma dose letal acima de 5000 mg/Kg sendo considerada de baixa toxicidade de acordo com protocolo 423 da Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD, 2001). Rebecca et al. (2002) estudaram a toxicidade de diferentes doses orais do extrato acetônico da casca de *S. adstringens*, apresentando uma DL50 800 a 1600 mg/kg e, em outro estudo, constatou que a dose letal do extrato aquoso é 2700mg/kg (REBECA et al. (2003).

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 25, 26, 27 e 28, constatou-se que os parâmetros bioquímicos e hematológicos medidos após inoculação do extrato (2000 mg/Kg) de *S. adstringens* por via oral (v.o.) e via intraperitoneal (i.p.) no geral apresentaram dentro dos

parâmetros normais aos ser comparada ao controle, com exceção de Aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (Tabela 26) tiveram valores aumentados após o contato com a substância durante os 14 dias de observação, corroborando com o estudo de Rebeca et al. (2002).

Tabela 25 - Parâmetros hematológicos de animais do grupo controle e tratados com IFAV de *S. adstringens* por 14 dias.

Parâmetros	Controle	Substância	
		2000 mg/kg v.o	2000 mg/kg i.p.
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	7.00±0.21	6.98±0.32	6.92±0.30
Hematócrito (%)	39.95±0.21	40.27±0.41	39.50±0.72
Hemoglobina (g/dL)	15.32±0.22	15.55±0.44	15.15±0.41
VCM(fL)	65.00±1.01	66.33±0.03	65.00±0.96
HCM (pg)	25.17±0.82	24.91±0.85	24.99±0.93
CHCM (%)	38.20±0.91	37.67±0.85	38.20±1.01
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	6.56±0.43	6.46±0.46	6.51±0.37
Segmentados (%)	53.79±1.16	53.90±1.38	52.71±1.21
Linfócitos (%)	29.22±1.70	28.28±1.57	29.09±0.92
Monócitos (%)	16.94±1.55	17.82±1.22	18.20±1.06

N= 3 animais por grupo. Análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 26 - Parâmetros bioquímicos de sangue de animais do grupo controle e tratamentos com IFAV de *S. adstringens* por 14 dias.

Parâmetros	Controle	Substância	
		2000 mg/kg v.o	2000 mg/kg i.p
Albumina (g/dL)	1.99±0.09	2.01±0.13	2.05±0.15
ALT (U/L)	88.40±1.12	85.3±0.02	99.33±4.73*
AST (U/L)	122.09±3.72	121.97±3.01	159.44±4.11*
Proteínas totais (g/dL)	7.12±0.20	7.09±0.23	7.13±0.19
Fosfatase alcalina (IU/L)	14.00±1.0	13.33±2.52	37.00±2.65*
GGT (U/L)	10.70±0.90	11.07±0.26	11.37±1.01
Ureia (mg/dL)	54.02±2.23	54.39±2.53	54.20±2.05
Creatinina (mg/dL)	0,23±0.08	0,20±0.09	0.21±0.06

* Significativo estatisticamente em relação ao grupo controle: ($p < 0,05$). N= 3 animais por grupo. Análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 27 - Avaliação do consumo de alimentos e água, e ganho de peso dos animais dos grupos controle e tratados com extrato de *S. adstringens* por 14 dias

Parâmetros	Controle	Substância	
		2000 mg/kg v.o.	2000 mg/kg i.p.
Consumo de água (mL)	41.01±1.05	41.05.82±1.26	40.10±1.12
Consumo de alimento (g)	30.22±0.73	30.19±0.90	30.09±1.01
Ganho de peso (g)	12.01±0.55	12.12±0.50	11.99±0.42

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 28 - Efeito com IFAV de *S. adstringens* (2000 mg/Kg v.o e i.p) em camundongos fêmeas Swiss após 14 dias de tratamento em dose única.

Parâmetros	Controle	Substância	
		2000 mg/kg v.o	2000 mg/kg i.p.
Coração (g)	0.18±0.00	0.18±0.01	0.18±0.00
Pulmão (g)	0.24±0.00	0.26±0.02	0.24±0.02
Fígado (g)	2.11±0.10	2.05±0.05	2.09±0.09
Rim (g)	0.23±0.01	0.25±0.02	0.24±0.02
Baço (g)	0.33±0.03	0.29±0.041	0.31±0.04
Estômago (g)	0.28±0.02	0.29±0.02	0.29±0.00
Cérebro (g)	0.45±0.01	0.46±0.02	0.46±0.01

Valores expressos em média ($p < 0,05$). N= 3 animais por grupo. Análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Dados da pesquisa.

Quanto à variação do peso dos órgãos (Tabela 28), não houve alteração. Já no estudo de Rebeca et al (2002), com extrato de casca houve involução do timo.

Portanto, de acordo com os resultados supracitados, o extrato seco por *spray dryer* foi considerado de baixa toxicidade aguda, tanto oral quanto intraperitoneal.

Segundo Rodrigues (2012) o uso tópico do extrato de barbatimão não demonstra efeitos tóxicos a humanos e animais, porém a ingestão deste fitoterápico pode ser extremamente perigosa. No entanto, esta pesquisa mostra que quando se trata folhas de *S. adstringens*, submetidas à tecnologia de secagem por *spray dryer*, a citotoxicidade por *A. salina* e toxicidade via oral são mínimas, podendo ser importante veículo para formulações tanto tópicas quanto orais.

4.5 ESTUDO DE INTERAÇÃO TÉRMICA DE MISTURAS BINÁRIAS IFAV-EXCIPIENTES (1:1)

No presente trabalho optou-se por propor uma formulação do IFAV de *S. adstringens* em um gel para fins de ação antimicrobiana para infecções dermatológicas, com excelente potencial frente à *S. aureus* e *E. coli*. Pela fitoquímica, todos os metabólitos secundários tiveram altos teores; podendo ainda ser utilizado como cicatrizante, antiinflamatório e antioxidante.

Os estudos de interações entre fármaco e excipiente, em que as técnicas térmicas são as mais utilizadas são considerados uma etapa importante na pré-formulação. As alterações de faixa de fusão do fármaco, forma e área dos picos encontrados no DSC ou mudanças no TGA podem indicar possíveis interações e incompatibilidades entre o fármaco e o excipiente analisado. (TITA et al., 2011; NARANG; DESAI; BADAWY, 2012; FULIAS et al., 2013).

A Tabela 29 contém o estudo térmico de interação físico-química entre o IFAV e os excipientes por meio de misturas binárias (1:1). De acordo com os resultados, a maior parte das misturas entre IFAV e excipientes apresentam variações significativas nos perfis térmicos esperados. Os valores de entalpia variaram em cada mistura com o excipiente específico. Algumas alterações relativas à entalpia são esperadas nesses experimentos, devido a problemas na uniformidade de conteúdo de pequenas amostras utilizadas nas análises DSC (SANTANA et al, 2017).

Para a avaliação mais minuciosa de uma interação de um fármaco com um excipiente, é possível executar um estudo por DSC e complementar com TG. É realizada então uma curva TG para o fármaco, outra curva para o excipiente específico, uma terceira referente à mistura binária. Se o resultado da curva TG da mistura binária não for o somatório das curvas TG individuais do fármaco mais o excipiente, existe incompatibilidade na mistura proposta (OLIVEIRA et al. 2011).

Gelificantes

Na Figura 29 e 30 encontram-se representados os dados térmicos relativos ao agente gelificante carbopol e natrosol, respectivamente utilizados nesse estudo e suas misturas binárias com o IFAV de *S. adstringens*.

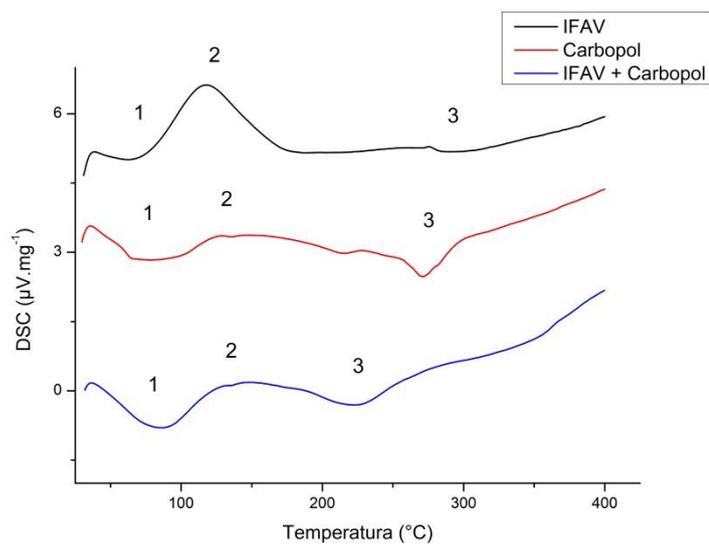
Tabela 29 - Estudo de compatibilidade de IFAV de *S. adstringens* e excipientes usando DSC na R_z 10 °C/min-1 na atmosfera de N₂

EVENTO		1		2		3	
AMOSTRAS		Entalpia (J/g)	Tpico (°C)	Entalpia (J/g)	Tpico (°C)	Entalpia (J/g)	Tpico (°C)
IFAV		-8.52	62.74	131.47	117.94	-8.61	291.22
GELIFICANTES	Natrosol	-52.79	102.16	34.62	173.72	46.63	329.77
	IFAV + Natrosol	-27.49	90.56	20.02	149.60	3.87	343.81
	Carbopol	-16.06	78.91	30.58	148.91	-23.33	270.93
	IFAV + Carbopol	-18.24	86.05	72.79	147.90	-19.69	223.56
UMECTANTES	Glicerina	-1.71	46.67	17.88	110.18	-644.64	193.61
	IFAV + Glicerina	-101.44	39.88	-	-	-52.66	126.03
	Propilenoglicol	-30.02	106.65	-	-	-	-
	IFAV+ Propilenoglicol	-23.89	134.16	-	-	-	-
	Ácido benzoico	-18.02	50.00	90.71	110.25	-30.00	127.60
CONSERVANTE	IFAV + Ác. benzóico	-14.43	37.72	56.42	61.20	-	-
SOLUÇÃO TAMPONANTE	Ácido cítrico	-4.34	41.78	91.28	66.49	-62.86	154.58
	Citrato de sódio	-340	42.17	-	-	-187.49	187.56
	IFAV + Ác. Cítrico	-14.27	42.59	69.18	67.57	-187.49	187.56
	IFAV + citrato de sódio	-16.49	40.77	60.40	72.70	-113.23	164.20

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 29 - Curvas DSC (A) e TG (B) das misturas (1:1) do IFAV-carbopol

(A)



(B)

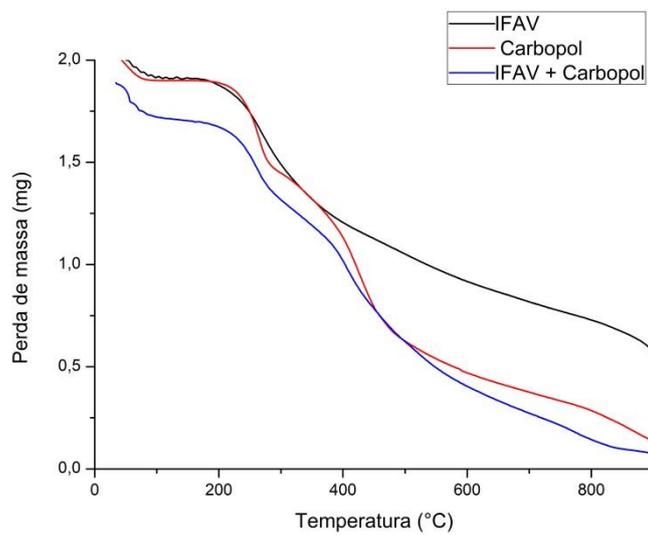
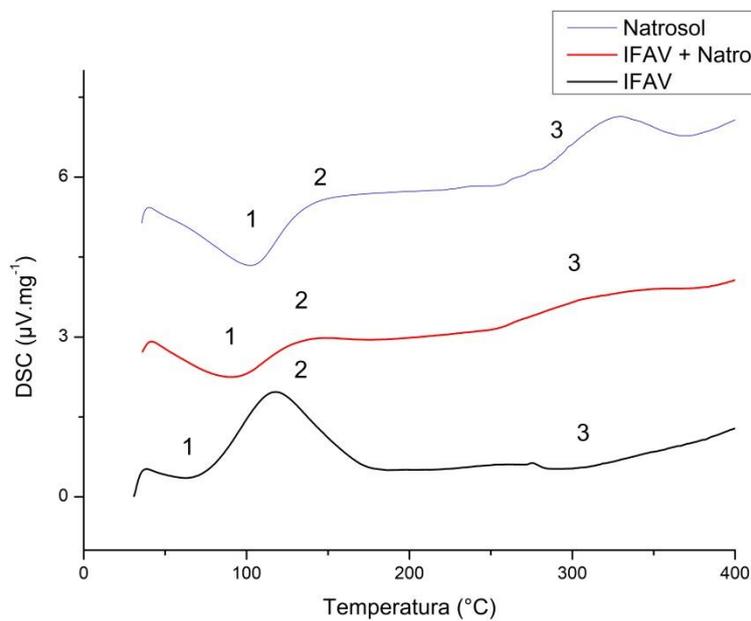
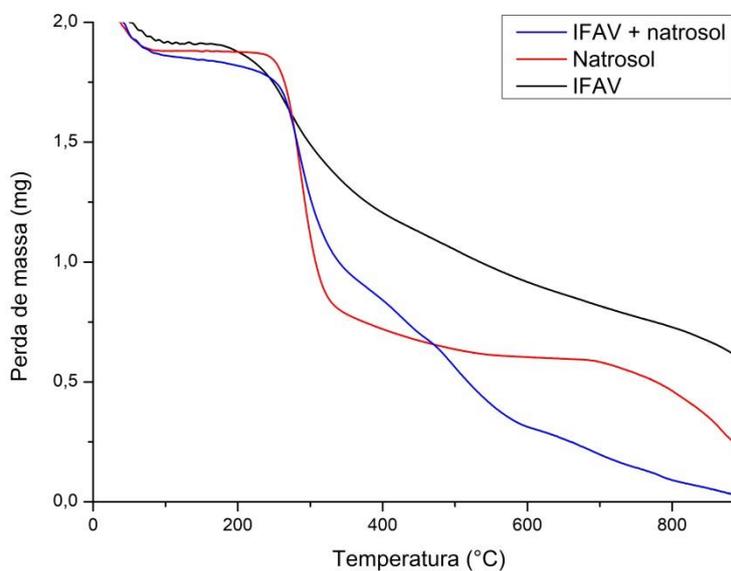
**Fonte:** Dados da pesquisa.

Figura 30 - Curvas DSC (A) e TG (B) das misturas (1:1) do IFAV-natrosol

(A)



(B)



Fonte: Dados da pesquisa.

Observou-se que para o carbopol houve três picos sendo dois endotérmicos e um exotérmico, tanto do IFAV quanto do excipiente e suas misturas; já o natrosol e a mistura IFAV

+ Natrosol ocorreu uma inversão no perfil do pico 3, comportando-se como exotérmico, ao passo que o extrato foi endotérmico, representando uma possível interação. O pico 2 do extrato foi o mais significativo com a maior entalpia igual a 131.47 J/g^{-1} .

Chadha; Bhandari, (2014) afirmam que é importante observar que na mistura binária existe uma alteração no valor da entalpia do IFAV quando associado aos excipientes (mistura física). Este valor equivale a praticamente a metade do valor de entalpia do fármaco, visto que se trata de misturas físicas na proporção 1:1. Para que não seja caracterizada uma incompatibilidade, os eventos térmicos mais significativos devem ocorrer nas mesmas faixas de temperatura. Dessa forma, percebeu-se que em todos os picos do carbopol a entalpia das misturas foi próximo da metade da entalpia do IFAV e os eventos térmicos ocorreram dentro de faixas de temperatura similares (Tabela 31), indicando assim que não houve interação, ao contrário do natrosol que apresentou comportamento anômalo (Figura 30), não se aproximando nem do IFAV nem do excipiente isolado, com mudanças nas temperaturas e ocorrência de picos.

Na termogravimetria dos excipientes e misturas binárias, o IFAV + carbopol teve a maior degradação na mesma faixa de temperatura correspondente ao terceiro evento de degradação, com perda de massa de 13.97%. Os picos observados ocorreram em faixas de temperatura próximas, sendo importante destacar que no perfil da mistura binária não houve supressão dos picos dos componentes isolados.

Pequenas mudanças na forma, altura e largura dos picos são esperadas devido a diferenças na geometria ou uniformidade da mistura. Portanto, nas curvas TG e DSC do carbopol é possível perceber que na curva referente à mistura binária há a conservação da maioria das etapas do extrato, como também do excipiente, quando separados. Algumas etapas da curva TG da mistura mantiveram temperaturas próximas aos valores observados em cada um, separadamente. E o natrosol demonstrou ter interação térmica, sendo necessária a aplicação de outras técnicas a exemplo de difração de raios, cromatografia líquida e microscopia eletrônica de varredura.

Umectante

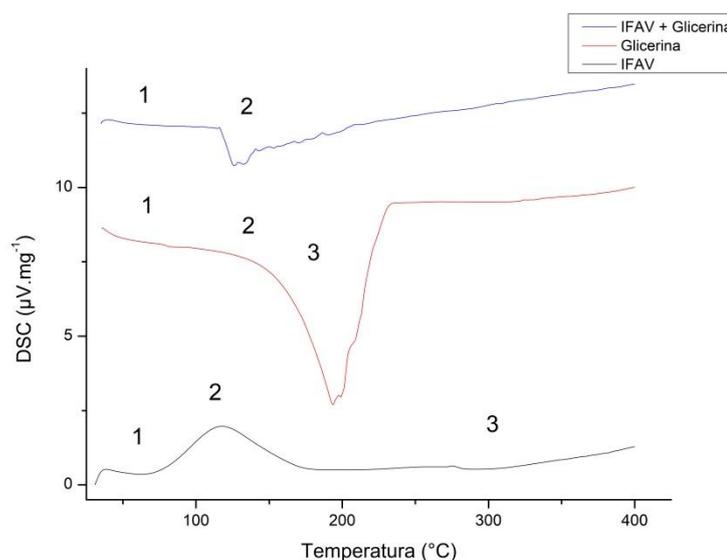
No geral, os agentes umectantes mais empregados correspondem aos polióis, tais como butilenoglicol, propilenoglicol e glicerina. Esses dois últimos foram escolhidos para o estudo de compatibilidade, presentes em uma grande quantidade de produtos que entram em contato com a pele humana, tais como medicamentos de aplicação tópica, dermatológica, cosméticos além

de solubilizarem e dispersarem diversos ingredientes ativos como extratos vegetais e apresentarem ação conservante (GUZZI, 2011; SILVA et al., 2013).

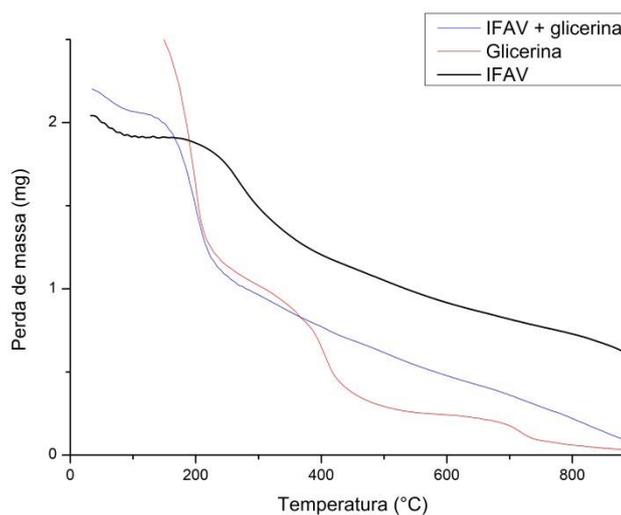
A Figura 31 representa as curvas DSC e TG das amostras do IFAV, glicerina e a Figura 32 a de propilenoglicol e misturas binárias.

Figura 31 - Curvas DSC (A) e TG (B) das misturas (1:1) do extrato-glicerina

(A)



(B)



Fonte: Dados da pesquisa.

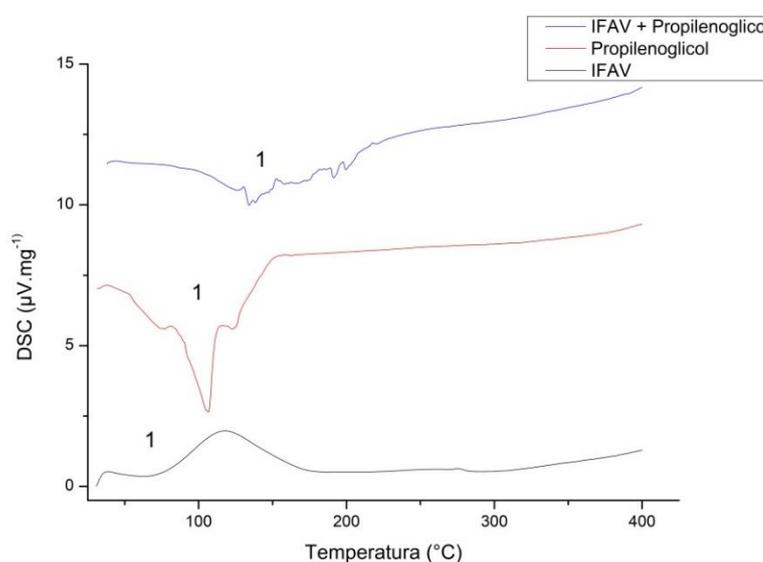
A curva DSC da glicerina mostra que ela apresentou o primeiro pico endotérmico, coincidindo na mesma faixa de temperatura com o IFAV e com a mistura binária. Neste último

caso houve a supressão do segundo pico exotérmico e o endotérmico mais proeminente ocorreu na temperatura de 126.03°C com entalpia de -52.66 J/g (perda de massa na TG 26%), apresentando-se bem menor do que no IFAV que foi expresso na entalpia de 8.61 J/g a uma temperatura mais elevada, 291,22°C.

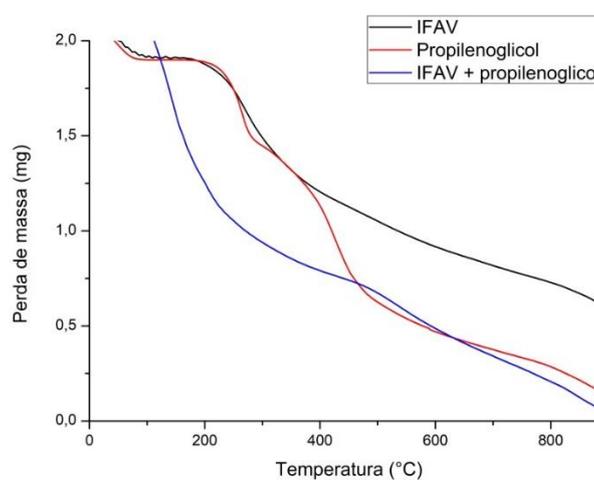
A Figura 32 mostra o estudo de interação do IFAV com outro umectante, o propilenoglicol.

Figura 32 - Curvas DSC (A) e TG (B) das misturas (1:1) do extrato-propilenoglicol

(A)



(B)



Fonte: Dados da pesquisa

Os picos principais do processo térmico por DSC foram compatíveis, ocorrendo dentro da mesma faixa de temperatura expressando picos endotérmicos (Tabela 31). Além disso, a

entalpia da mistura foi praticamente a metade do que a da IFAV. Na curva de TG a perda de massa máxima foi de quase 87% próximo a 200°C.

Conclui-se que, houve indícios de interação térmica do IFAV de *S. adstringens* com a glicerina, devido a supressão de um pico e diferenças na entalpia e o resultado da interação com o propilenoglicol foi mais benéfica visto que conservou melhor as etapas de degradação, não havendo supressão de picos e os eventos de degradação coincidiram nas mesmas faixas de temperatura

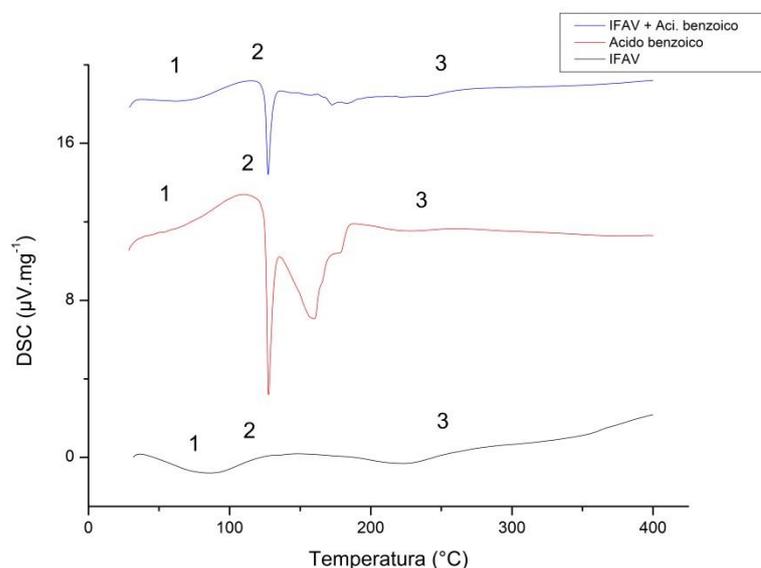
Conservante

O conservante antimicrobiano proposto foi o ácido benzoico, amplamente utilizado em cosméticos e produtos farmacêuticos, efetivo contra bactérias, principalmente gram positivas e fungos com a capacidade de penetrar através da parede celular dos microrganismos. Sua ação depende do pH do meio, em valores de pH entre 2,5-4,5 (SCHMITT, 2015). Por isso, a solução tampão citrato pH 4 foi proposta em conjunto para potencializar a ação conservante e agir como tamponante.

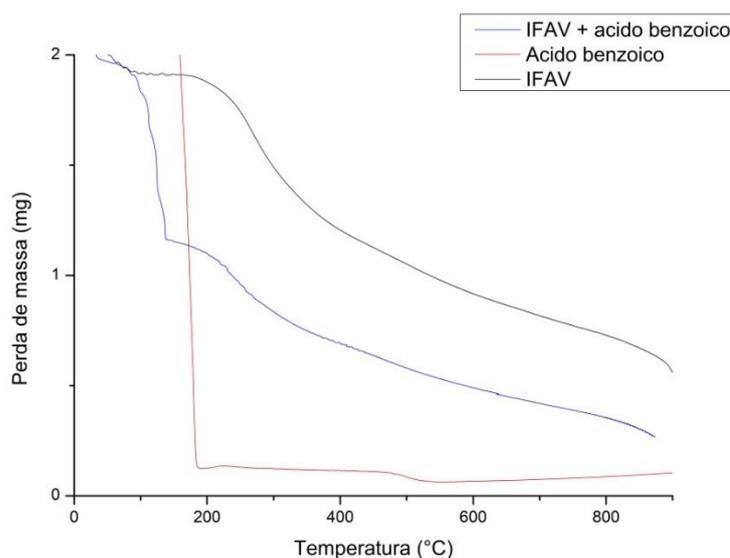
O perfil DSC do ácido benzóico mostrou um evento endotérmico importante na temperatura de 127.60°C ($\Delta H = -30.00 \text{ J/g}^{-1}$). Na mistura binária, no terceiro pico houve degradação em uma faixa de temperatura bem similar com o IFAV, sendo visível na Figura 33. A curva TG do ácido benzóico isolada mostra uma etapa de decomposição térmica com uma perda de massa de quase 70% na seguinte faixa de temperatura 154-174.00°C. Na mistura binária do ácido benzoico com o IFAV nessa faixa de temperatura, a perda de massa ocorreu com 20%; houve quatro etapas de decomposição térmica. Nos perfis TG das misturas do excipiente com o IFAV, é possível identificar que os eventos de decomposição ocorrem nos mesmos intervalos de temperatura, com apenas pequenas diferenças na perda de massa em cada evento.

Figura 33 - Curvas DSC e TG das amostras do extrato, ácido benzóico e suas misturas (1:1).

(A)



(B)

**Fonte:** Dados da pesquisa.

Solução tamponante

Na Figura 34 percebe-se que o ácido cítrico e o IFAV na mistura binária mantiveram o mesmo perfil térmico com três picos endotérmicos, por isso que a degradação térmica dessas duas amostras ocorreu nas mesmas faixas de temperatura e com entalpia similares.

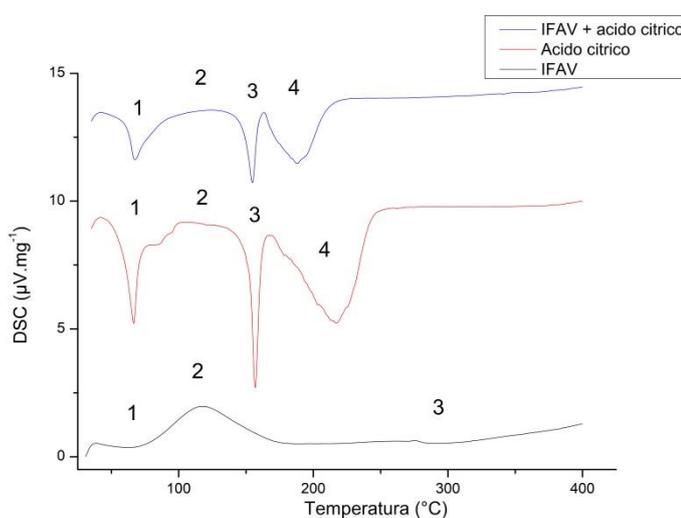
A fusão do ácido cítrico ocorre em 153°C, por isso, na mistura houve um pico endotérmico nessa faixa de temperatura com entalpia de -62.86J/g^{-1} , mostrando a

compatibilidade entre o IFAV de *S. adstringens* com o ácido cítrico, com entalpia de quase o dobro do valor -187.49J/g .

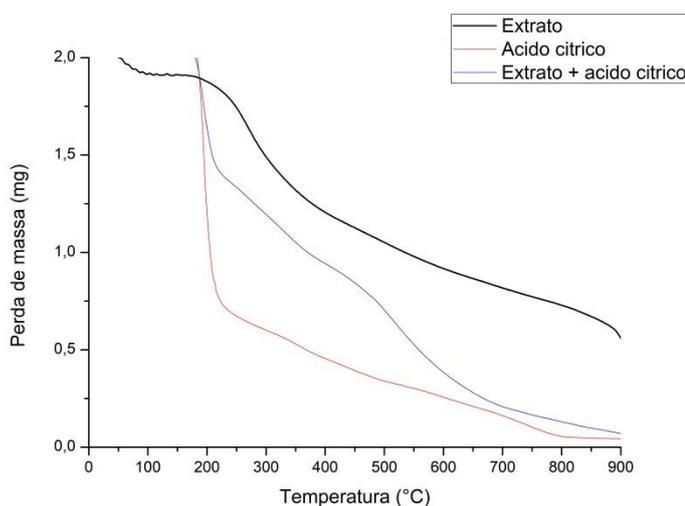
Observa-se ainda que houve o aparecimento de um quarto pico, não indicando uma interação danosa e sim coincidindo com o ácido cítrico. Na TG houve perda de massa máxima, representando 27% da amostra, em todo o processo.

Figura 34 - Curvas DSC e TG das amostras do IFAV, ácido cítrico e suas misturas (1:1).

(A)



(B)

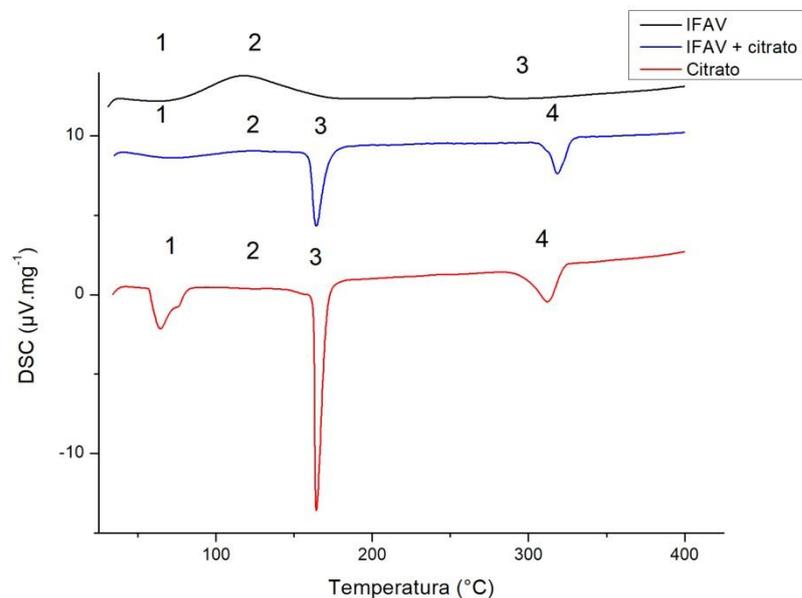


Fonte: Dados da pesquisa

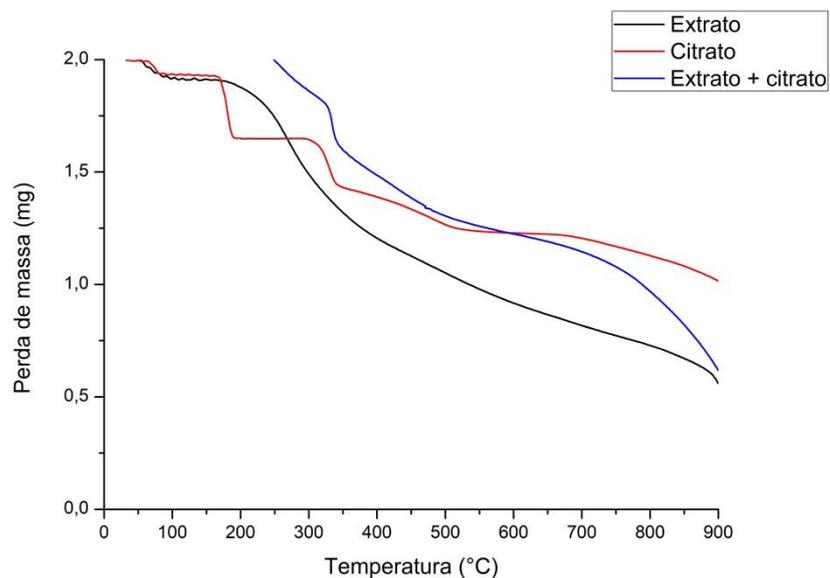
O comportamento do DSC da mistura do IFAV com o citrato (Figura 35) se mostrou com perfil semelhante à mistura com o ácido cítrico, ambas tiveram praticamente os mesmos valores de entalpias.

Figura 35 - Curvas DSC e TG das amostras do IFAV, citrato e suas misturas (1:1).

(A)



(B)



Fonte: Dados da pesquisa

Entretanto, na mistura com o citrato, o quarto pico ocorreu em uma temperatura mais elevada, 318.6°C, ao passo que na do ácido cítrico a degradação térmica ocorreu em 188°C. A curva de TG do citrato apresentou o perfil similar à do ácido cítrico, sendo que os eventos se sobrepuseram melhor, representando compatibilidade ainda maior, com a perda de massa mais

intensa ocorrendo na terceira etapa de 11.15% em uma temperatura maior (330°C), do que na mistura com ácido cítrico nessa mesma etapa. Portanto, sugere-se, compatibilidade desses dois excipientes com *S. adstringens*.

Na termogravimetria, a primeira etapa, representou a perda de água e aconteceu na faixa de 41.5-80.80°C, com perda de massa de 3.11%; a segunda etapa aconteceu entre 153.40-155.39°C com uma perda de massa menor, de 11.38%; a terceira etapa houve a maior perda de massa, 22.28%, na faixa de temperatura de 185.26-204.10°C, etapa essa onde ocorre a degradação de compostos importantes, estando assim compatível com o extrato que ocorreu na mesma faixa de temperatura, com uma perda de massa de 14.43%; as outras etapas representaram a continuidade do processo com perdas de massas menores.

Dessa forma foi possível constatar que o ácido cítrico e o citrato são compatíveis com o IFAV de *S. adstringens*, podendo assim ser utilizada a solução tampão citrato pH 4,0 na formulação proposta.

5 CONCLUSÃO

As infusões obtidas das folhas de *S. adstringens* obtiveram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados, especialmente frente às bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *K. pneumoniae* com valores de CIM menor do que 1mg/mL em todos os tamanhos de partículas, mostrando-se como potentes, inibidores do crescimento para esses microrganismos.

As infusões obtidas apresentaram concentrações significativas de taninos, flavonóides e polifenóis totais, ocorrendo uma variação inversamente proporcional nas concentrações de todos os metabólitos quantificados em função do tamanho de partícula, podendo essas drogas vegetais ser diferenciadas pela quantificação desses compostos. A padronização das drogas vegetais obtidas de *S. adstringens* foi específica de acordo com o tamanho de partículas através dos dados térmicos e cinéticos obtidos com a TG e DTA e os dados de cromatografia. Isso foi evidenciado pela aplicação das técnicas de análise multivariada PCA e HCA nos dados obtidos, bem como da polidispersão do tamanho de partícula e morfologia por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Em relação ao IFAV, observou-se que os teores de metabólitos secundários foram maiores do que das drogas vegetais, devido à tecnologia de obtenção por *spray dryer*. A espectroscopia de infravermelho comprovou bandas de absorção características, indicando a presença de compostos químicos, bandas características de determinados grupamentos como metil, hidroxila, além de hidrocarbonetos e ligações carbono-oxigênio. Estes sugerem a presença na amostra de grupos funcionais como éter, ésteres e ácidos carboxílicos, indicativo de metabólitos responsáveis pela atividade antimicrobiana como polifenóis totais e taninos que se apresentaram com alto teor. Portanto, a aplicação dessas técnicas forneceu dados importantes que podem ser utilizados como parâmetro de controle de qualidade e reprodutibilidade das características de insumos vegetais apresentando assim, grande relevância.

Para que um ingrediente ativo seja eficaz quanto a sua natureza antimicrobiana contra determinado microrganismo, é necessário que sua potência esteja dentro dos limites estabelecidos, de modo que forneça eficácia, segurança e qualidade. Sendo assim, na realização do doseamento de potência antimicrobiana do IFAV obtido da folha de *S. adstringens* os resultados obtidos indicaram que o ensaio microbiológico do método de microdiluição ofereceu boa precisão, exatidão, bem como uma curva de calibração apropriada sendo efetiva para o doseamento microbiológico do extrato nebulizado. Além disso, com a aplicação do método

observou-se que o extrato possui uma potência similar ao padrão nos mesmos níveis de concentração, frente a *S. aureus* e *E. coli* e que se apresentaram dentro das especificações. A potência do IFAV foi superior a 90% mostrando-se assim bastante eficaz.

A toxicidade também é um dado importante e os resultados mostraram que tanto nos ensaios preliminares com *A. salina*, quanto à toxicidade aguda e *screening* hipocrático a toxicidade foi mínima bem como os efeitos depressores, ao contrário do que a literatura mostra com extrato de casca de *S. adstringens*.

Os estudos de compatibilidade extrato nebulizado/excipientes, por análise térmica mostraram que os excipientes Carbopol, propilenoglicol, ácido benzóico e solução tampão citrato pH 4,0 poderão ser utilizados na forma farmacêutica gel, pois apresentam indícios de compatibilidade com o IFAV.

Portanto, com o estudo realizado percebe-se a importância de trabalhos que mostrem os estudos de pré-formulação de um medicamento fitoterápico, bem como a padronização tanto das drogas vegetais quanto do insumo farmacêutico ativo vegetal, apontando indícios para o desenvolvimento de produtos de origem vegetal que tenha comprovada a sua qualidade, segurança e eficácia. Na literatura existem poucas pesquisas nesse sentido sobre o *S. adstringens* utilizando as folhas como candidata à fármaco. Além disso, a atual pesquisa pôde confirmar o uso popular de *S. adstringens* para o tratamento de infecções e uso em feridas, com evidências científicas, podendo-se não consumir apenas a casca e sim as folhas com grande potencial antimicrobiano e preservação da espécie. Pelo fato de IFAV de *S. adstringens* ter potência quase igual a gentamicina 80mg/mL e cefalotina 1000mg poderá ser utilizada como alternativa terapêutica em casos de resistência para tratar infecções.

Perspectivas futuras

Diante dos resultados obtidos e da premissa da formulação de um produto fitocosmético antimicrobiano, tem-se como perspectivas do presente trabalho:

- Desenvolver a formulação em gel com estudos de estabilidade preliminar e de longo prazo, avaliando periodicamente as características físico-químicas e microbiológicas do fitocosmético;
- Fazer teste de sensibilização dérmica *in vivo* da formulação;

- Avaliar a potência microbiológica da formulação com isolados clínicos;
- Avaliar a eficácia da formulação quanto à potência microbiológica.

REFERÊNCIAS

- AKKERMANS, S.; IMPE, J.F.V. Mechanistic modelling of the inhibitory effect of pH on microbial growth. **Food Microbiology**, v. 72, p. 214-219, 2018.
- ALBERTON, J. R. et al. Caracterização farmacognóstica do Jambolão (*Syzygium cumini* L. Skeels). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 1, p.37-50, 2001.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 76–91, 2007.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.
- ALMEIDA, A. C., et al. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 40, n.1, p. 200-203, nov. 2009.
- ALMEIDA, N. F. et al. Estudo da reatividade de taninos de folhas e cascas de barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Scientia Forestalis**, v. 38, n. 87, p. 401-408, set. 2010.
- ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1224-1229, 2008.
- ALVES, R. R. N. et al. Utilização e Comércio de Plantas Medicinais em Campina Grande, PB, Brasil, **Revista Electronica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 175-198, 2007.
- ARAGÃO, C. F. S. Aplicação da termogravimetria (TG) no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.) Menispermaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 60-61, 2002.
- ARAÚJO A. A. S. et al. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 269-277, 2006.
- ARAUJO, G. L. B. et al. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v.33, n.1, p.27-36, 2012.
- ARRANZ, J. C. E. **Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L. como premisa para su introducción en la medicina complementaria**. 2011. 186 f. Tese (Doctor em Ciencias de la Salud) - Universidad de Oriente Facultad de Ciencias Naturales, Santiago de Cuba, 2011.
- ARIF, T.; MANDAL, T. K.; DABUR, R. Natural products: Anti-fungal agents derived from plants Opportunity. **Natural Products in Medicinal Chemistry**, v.81, p.283–311, 2011.

ASADBEIGI, M. et al. Traditional effects of medicinal plants in the treatment of respiratory diseases and disorders: an ethnobotanical study in the Urmia. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.7, n. 1, p. 364-368, 2014.

AUDI, E. A. et al. Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 328-333, 2004.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677p.

ÁVILA, P. H. et al. Structure–activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.16, p. 9790–9794, 2008.

BACCARIN, T. et al. Influence of process conditions on physicochemical properties and antinociceptive activity in vivo of spray-dried *Rapanea ferruginea* Mez. stem bark extract. **Powder Technology**, v. 291, p. 66–74, abr. 2016.

BAUAB, T. M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.3, p. 395-404, 2006.

BENÍCIO, D. A.; NETO, V. Q.; SOUSA, J. G. de. Avaliação das propriedades físicoquímicas e da composição química parcial do óleo de sementes de Nim Indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.), cultivado no município de Patos – Paraíba. **Biofarma**, v.4, n.2, p. 22-33, 2010.

BENUCCI, I., et al. Inhibitory effect of ethanol, sulphur dioxide and proanthocyanidinic tannins on lysozyme antimicrobial activity in model wine. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73. p. 320-325, 2016.

BERG J. M. T. & LUBERT J. **Bioquímica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BERKEY, C.; BINIEK, K.; DAUSKARDT, R. H. *Screening* sunscreens: protecting the biomechanical barrier function of skin from solar ultraviolet radiation damage. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 39, 269–274, 2017

BERNARDES, et al. Quantificação dos teores de taninos e fenóis totais e avaliação da atividade antioxidante dos frutos de aroeira. **Vértices**, v. 13, n. 3, p. 117-128, 2011.

BÖER, T. M. et al. Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC-MS in the characterization of *tacrolimus*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 18–23, 2013.

BONA, E. A. M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.3, p.218-225, 2014.

BOTELHO, T. S.; LOURENÇO, F. R.; PINTO, T. J. A. Vancomycin microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 9, n. 2, p. 172-176, 2013.

BRANDÃO, D. O. et al. Model Analytical Development for Physical, Chemical, and Biological Characterization of *Momordica charantia* Vegetable Drug. **Journal of Analytical Methods in Chemistry** v. 16, doi: [10.1155/2016/7528297](https://doi.org/10.1155/2016/7528297).. 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC, nº 10, de 16 de março de 2010. **Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto a ANVISA.**

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução- RDC, nº 899, de 29 de maio de 2003.** Dispões sobre o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Consulta pública nº 35, 12 de junho de 2009.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 23 de julho de 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira.** Brasília: Anvisa, p.126, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 60 p., 2006.

BUNSUPA, et al. Lysine Decarboxylase Catalyzes the First Step of Quinolizidine Alkaloid Biosynthesis and Coevolved with Alkaloid Production in Leguminosae. **Plant Cell**, v. 24, n. 3, p. 1202-1216, 2012.

CAMELO, S. R. P. et al. Physicochemical Characterization and Quantification of Total Anthraquinones of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.3, p.2064-2070, 2012.

CAMPANA, E. H. et al. Avaliação das metodologias M.I.C.E.[®], Etest[®] e microdiluição em caldo para determinação da CIM em isolados clínicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Médica Laboratorial**, v.47, n. 2, 2011.

CARTAXO, N. A. de O. **Estudos com *Syzygium cumini* (L.) skeel: caracterização da matériaprima, perfil fitoquímico, citotoxicidade e atividade antimicrobiana sobre microrganismos associados ao biofilme dental.** 2014. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande- PB. 2014.

CAZEDEY, E.C.L.; SALGADO, H.R.N. A novel and rapid microbiological assay for ciprofloxacin hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n.5, p. 382–38, 2013.

CARVALHO A. C. B. Regulação brasileira em plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Fitos**, v.7, p.6-16, 2012.

CARVALHO, J. S. B. et al. Uso popular das plantas medicinais na Comunidade da Várzea, Garanhuns-PE. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 13, n.2, ISSN 1519-5228. 2013

CASADEBIAG, J. et al. Physicochemical and pharmacological properties of spray-dried powders from *Fraxinus excelsior* leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 26, p. 211-216, 1986.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug-excipient compatibility screening-Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 82–97, 2014.

CHANDRA, S.; MEJÍA, E. G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity and Quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p. 105–108, 2004.

CHAVES, T. P. et al. Evaluation of the Interaction between the *Poincianella pyramidalis* (Tul.)LP Queiroz Extract and Antimicrobials Using Biological and Analytical Models. **Plos one**, v. 11, n. 5, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0155532.

CLSI. **National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M27-A2.** Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition. 2.ed. Pennsylvania: NCCLS; 2002.

CLSI. **National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M7-A6. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico.** 6.ed. Pennsylvania: NCCLS; 2005. 81 p.

CLSI. **National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M27-A3.** Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition .3.ed. Pennsylvania: NCCLS; 2008.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** m100-s25th. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2015.

CLSI. **Normas de desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15°** Suplemento Informativo v.25, n.1, 2017.

CONDEA, N. C. de O. et al. *In vitro* antimicrobial activity of plants of the Amazon on oral biofilm micro-organisms. **Revista Odonto Ciência**, v. 30, n. 4, p.179-183, 2015.

CORDEIRO, C. H. G. et al. Abordagem etnobotânica na comunidade de Conceição-açu, Mato Grosso, Brasil. **Polibotânica**, v. 169-197, p. 169-197, 2011.

CORRÊA, N.M., et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.1, 2005.

CORREIA, L. P. et al. *Sideroxylon obtusifolium* herbal medicine characterization using pyrolysis GC/MS, SEM and different thermoanalytical techniques. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**, v.123, n.2, p.993-1001, 2015.

CORREIA, L. P. **Obtenção e Padronização Química e Bilógica de Pós de Plantas Medicinais de Diferentes Tamanhos de Partículas**. 2011. 115 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2011.

CORREIA, L.P. et al. Characterization of herbal medicine with different particle sizes using pyrolysis GC/MS, SEM, and thermal techniques. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**, v.111, p.1691–1698, 2013.

CORREIA, P.R.M.; FERREIRA, M.M.C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481-487, 2007.

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

COSTA, A. C. B. P. et al. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 2, p. 111-116, 2009.

COSTA C. A. R. de A. et al. The gabaergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 828-836, 2011.

COSTA, D. F. G. et al. Development and characterization of polymeric nanoparticles as Barbatimão (*Stryphnodendron obovatum*) standardized fraction carrier. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 89-92, 2013.

COSTA, M.A. et al. Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) for use as a pharmacological agent. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.58, n.2, p.330-335, 2010.

COSTA, R. S. et al. Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**, v.111, p.1959–1964, 2013.

DA COSTA, I. P. **Potenciais atividades de extratos de plantas medicinais do semiárido brasileiro para o desenvolvimento de medicamentos odontológicos**. 2018. 48f. . Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande –PB, 2018.

DAFALLE, N.A., et al. Development and validation of microbial bioassay for quantification of Levofloxacin in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.5, n.1, p.18–26, 2015.

DE LUCENA M.N.; MENDES M.M.; BRANDEBURGO M.I.H. **Neutralização dos principais efeitos enzimáticos e biológicos de peçonhas botrópicas brasileiras pelo extrato**

aquoso de *Stryphnodendron adstringens*. XII Seminário de Iniciação Científica. Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

DELGADO, M. N.; SOMAVILLA, N. S.; BÁO, S. N.; ROSSATTO, D. R. Testing the optimal defense hypothesis in *Stryphnodendron adstringens* (Fabaceae, Mimosoideae) leaves: the role of structure, number, position and nectar composition of extrafloral nectarines, **Plant Species Biology**, 2017. doi: 10.1111/1442-1984.12164.

DESOTI, V. C. et al. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do paraná. **Arquivo de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 15, n. 1, p. 3-13, 2011.

DIAS, E.G.E. et al. Qualidade e autenticidade de folhas de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*) oriundas de fornecedores de São Paulo, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n.2, 2013.

DINIZ, L. R. L. **Efeito das Saponinas Triterpênicas Isoladas de Raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke sobre a Função Renal**. 2006. 116 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia). Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil: Construindo a história dos produtos naturais, **Multiciência**, v.7, 2006.

ERMER, J.; JOHN H.; MILLER, M.; **Method Validation in Pharmaceutical Analysis**. 3ª Edição. Library, British, 2008.

ESHEL, G. et al. Critical Evaluation of the Use of Laser Diffraction for Particle-Size Distribution Analysis. **Soil Science Society of America Journal**, v. 68, n. 3, p. 736–743, 2004.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5 ed., Editora Atheneu, 2010.

FELLER, A. G.; ZIMMERMANN, C. E. P. Utilização do ultrassom estético na gordura localizada. **Revista Saúde Integrada**, v. 11, n. 21, 2018) – ISSN 2447-7079

FERNANDES, M. R. V. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 39–44, 2014.

FERNANDES, F. H. A. et al. Characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, p. 443–447, 2013.

FERNANDES, F. H. A. et al. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**, v.3, p. 2807-2913, 2012.

FIGUEIREDO A. L. **Pirólise termoquímica de pós da fibra de coco seco em um reator de cilindro rotativo para produção de bio-óleo**. 2011. 127 f. Dissertação de Mestrado (Ciência e Engenharia de Petróleo) -Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

FIORI, G. L. et al. Antimicrobial activity and rates of tannins in *Stryphnodendron adstringens* Mart. accessions collected in the Brazilian Cerrado **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 2193–2198, 2013.

FONSECA, F. N.; SILVA, A. H.; LEAL, L. K. A. M. *Justicia pectoralis* Jacq., Acanthaceae: Preparation and characterisation of the plant drug including chromatographic analysis by HPLC-PDA. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 871-877, 2010.

FRADE J. C. et al. Chemotaxonomic application of Py-GC/MS: Identification of lacquer trees. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v.89, p. 117-121, 2010.

FRANCIOSO, O. et al. TG-DTA, DRIFT and NMR characterisation of humic-like fractions from olive wastes and amended soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, n. 2, p. 408–17, 2007.

FRANCISCO, F.L., et al. Development, optimization and validation of a rapid colorimetric microplate bioassay for neomycin sulfate in pharmaceutical drug products. **Journal of Microbiological Methods**, v. 23, p. 1-30, 2014.

FULIAS, A et al. Thermal behaviour of procaine and benzocaine Part II: compatibility study with some pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Chemistry Central Journal**, v. 7, n.1, 2013.

GALLO, L. et al. A comparative study of spray-dried medicinal plant aqueous extracts. Drying performance and product quality. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 104, p. 681–694, dez. 2015.

GINDRI, A. L.; LAPORTA, L. V.; SANTOS, M. R. Controle microbiológico de drogas vegetais comercializadas na região central do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.3, p.563-570, 2012.

GIUFFRIDA, F. et al. Activity and thermal stability of antioxidants by differential scanning calorimetry and electron spin resonance spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1108-1114, 2006.

GLASENAPP, J.S. et al. Characterization of diversity and genetic structure in natural populations of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville by means of allozyme markers. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n. 2, 2014.

GOMES T. C. B. de L. *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.): **Caracterização, desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de flavonoides**. 2011. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

GOMES, F. S. L.; CARVALHO, D. V.; LIMA, E. D. R. P. Tratamento de feridas crônicas com coberturas oclusivas. **Revista Mineira de Enfermagem**, v.13, n. 1, p. 13-18, 2009.

GONÇALVES A. L. **Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais**. 2007. 209 f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Rio Claro, Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, São Paulo, 2007.

GOULART, S. L. et al. Anatomia do lenho de raiz, tronco e galho de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville), **Cerne**, v.21, n.2, 2015.

GUIMARÃES, C. Espectroscopia Raman e Infravermelho na molécula (4E)-4((E)-3-fenilalilidenomanino)-1,2-dihidro-2,3-dimetil-1-fenilpirazol-5-ona.2011. 123 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, Cuiabá, 2011.

GUIMARÃES G. P. et al. Thermoanalytical characterization of herbal drugs from *Poincianella pyramidalis* in different particle sizes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2017. doi:10.1007/s10973-016-6076-4.

GUIZZO, P. L. et al. Controle de Qualidade e triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas de *Morus nigra* L. (MORACEAE). Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas Aplicadas, v. 36, n. 2, p. 259-265, 2015. ISSN 1808-4532.

GUO, J., et al. Development of tannin-inspired antimicrobial bioadhesives. **Acta Biomaterialia**, v. 72, p. 35-44, 2018.

GUPTA, D.; DUBEY, J.; KUMA, M. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of some medicinal plants against selected common human pathogenic microorganisms. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.6, n.1, p.15-20, 2016.

GUZZI, S. **Desenvolvimento, Estudo de estabilidade e teste *in vivo* da formulação gel com extrato e fração enriquecida de *Kalanchoe Crenata* (Andrews) Haworth.** 2011. 128f. Dissertação Mestrado (Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina.Santa Catarina, 2011.

HASENACK, B. S. et al. Atividade Antibacteriana do Extrato Barbatimão sobre Cepas de *Staphylococcus Aureus* Isoladas de Secreções de Feridas Crônicas de Pacientes Ambulatoriais. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 10, n. 1, p. 13-18, 2008.

HOLANDA NETO M. A. **Aplicação da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial de uma droga vegetal.** 2013. 27f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, 2013.

HOLETZ, F.B. et al. *Screening* of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n.7, p. 1027-1031, 2002.

HUBERT, P., et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal – Part II. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p.70 – 81, 2007.

ISHIDA K. et al. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and Pigmentation. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.8, n.29, 2009.

JACKSON, C.; AGBOKE, A.; VICTOR NWOKE, V. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 9, p. 666-669, 2009.

JANAKI P., B. BHADRAIAH, P. ACHARYA, N. and SUBHASHINI, N. J. P., Synthesis and Antibacterial Activity of Novel Chalcone Derivatives of Apocynin. **Drug Design and Discovery**, v.10, p. 923-927, 2013.

JESUS, R. P. F. S. et al. Ação antibacteriana e antiaderente de *Pithecellobium cochliocarpum* (gomez) Macbr sobre microrganismos orais. **Odontologia Clínico-Científica (Online)**, v.9, n.4, 2010.

KAISER, S.; PAVEI, C.; ORTEGA, G. G. Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.3, 2010.

KANG, B. et al. Simultaneous thermogravimetry and differential thermal analysis for comparing burning characteristics between oleaginous and non-oleaginous microorganisms. **Thermochimica Acta**, v. 517, n. 1–2, p. 115–120, 2011.

KANTATI, Y. T. et al. Ethnopharmacological survey of plant species used in folk medicine against central nervous system disorders in Togo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 181, n. 2, p. 214–220, 2016.

KEDE, M..P.V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia Estética**. Ed. Atheneu. 1052, 2014.

KEMPFER, C. B. et al. Culturas de secreções de pele: estudo de prevalência e Sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital universitário. **Revista Saúde (Santa Maria)**, v. 36, n. 1, p.5766, jan./jun. 2010.

KHARCHOUFI, S. Antimicrobial and antioxidant features of ‘Gabsi’ pomegranate peel extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p.345-352, 2018.

KHULLER, N. The Biofilm Concept and Its Role in Prevention of Periodontal Disease. **Revista Clínica e Pesquisa em Odontologia**, v. 5, n. 1, p. 53-57, 2009.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 267–275, 2011

LEONEL, M. F. V.; SOARES, C. D. V.; SIQUEIRA, A. L. Comparison of pharmacopeial statistical methods applied in microbiological assay for antibiotics potency determination using parallel lines and three-dose level. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.48, n.3, 2012.

LI, Y. et al. Design, synthesis and antimicrobial activities of nitroimidazole derivatives containing 1,3,4 – oxadiazole scaffold as FabH inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.20, p.4316–4322, 2012.

LIM, H.P.; TEY, B.T.; CHAN, E.S. Particle designs for the stabilization and controlled-delivery of protein drugs by biopolymers: A case study on insulin. **Journal of Controlled Release**, v.186, p.11–21, 2014.

LIMA, M. F. P. et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – Revisão de literatura, v.21, n.1, p.32-39. **Revista UNINGÁ**, p. 2178-2571, 2015.

LIMA, T. C. D. de et al. Breve revisão etnobotânica, fitoquímica e farmacologia de *Stryphnodendron adstringens* utilizada na Amazônia. **Revista Fitos**, v. 10, n.3, p.220-372, 2016.

LIPNHARSKI, C., et al. Colonization by *S. aureus* increases the EASI and the number of appointments by patients with atopic dermatitis: cohort with 93 patients. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 88, n. 4, p. 518-21, 2013.

LIU, X. J. et al. Species classification and quality assessment of Chaihu (*Radix Bupleuri*) based on high-performance liquid chromatographic fingerprint and combined chemometrics methods. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 6, p. 961–969, 2011.

LOPES, C. V. G. **O conhecimento etnobotânico da comunidade quilombola do Varzeão, Dr. Ulysses (PR): no contexto do desenvolvimento rural sustentável**. 2010. 162 f. Tese (Doutorado em Agronomia / Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

LOPES, G. C. et al. Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, n.1, 2009.

LOURENÇO, F. R.; PINTO, T. J. A. Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, n.3, p.573–584, 2011.

LOURENÇO, F.R.; PINTO, T.J.A. Comparison of three experimental designs employed in gentamicin microbiological assay through agar diffusion. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 45, n. 3, 2009.

LOZIENE, K. et al. Chemical composition of the essential oil of different varieties of thyme (*Thymus pulegioides*) growing wild in *Lithuania*. **Biochemical Systematics and Ecology** v.31, p. 249-259, 2003.

LUNA, J.S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199-206, 2005.

MA, M. M.; MU, T. H. Effects of extraction methods and particle size distribution on the structural, physicochemical, and functional properties of dietary fiber from deoiled cumin. **Food Chemistry**, v.1, p.237-246, 2016.

MACHADO, F. L. S. et al. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.3, p.441-452, 2010.

MACHADO, H. et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, n. 4, v. 19, 1993.

MALHEIRO, L.F. et al. Infecções da pele e de tecidos moles na unidade de terapia intensiva: estudo retrospectivo em um centro terciário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.29, n.2, p. 195-205, 2017.

MARTINS E.R. et al. Teor de Taninos e Flavonoides em cascas e folhas de Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. **MG Biota**, v.2, n.4, 2009.

MARTINS, P. S. et al. Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em equinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p.1-7, 2003. Doi: 10.5380/avs.v8i2.4026.

MCLAUGHLIN, J.L.; SAIZARBITORI, T.C.; ANDERSON, J.E. Tres bioensayos simples para quimicos de productos naturales. **Revista de la Sociedad Venezolana Química**, v18, p. 13-18, 1995

MEDA, A. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in *Burkina Fasan* honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

MELO, S. F.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, LS. Evaluation of the antifungal potential of brazilian cerrado medicinal plants. **Mycoses**, v. 52, p. 511-517, 2009.

MENDIZÁBAL, C. D. M. **Caracterización fitoquímica y evaluación biológica de Solanum hartwegii (Nombre común lavaplatos)** 2011. 76 f. Tese (Química Farmacêutica) - Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias de Química y Farmacia. Guatemala, Guatemala, 2011.

MENDONÇA KF, CARNEIRO JKR, OLIVEIRA MAS. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso, hidroalcoólico e alcoólico de folhas de espécies da família Lamiaceae. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 4, 2018. DOI: <https://doi.org/10.26694/repis.v4i0.7072>.

MENDONÇA, R.S.C; RODRIGUES, G.B.O. Principais alterações dermatológicas em pacientes obesos. **Arquivo Brasileiro de Cirurgia e Diagnóstico**, v. 24, n.1, p. 68-73, 2011.

MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v.45, n.5, p.31-4, 1982.

MICHAEL, C. A.; DOMINEY-HOWES, D.; LABBATE, M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. **Front Public Health**, v. 2, n. 145, 2014. DOI: 10.3389/fpubh.2014.00145.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada.** Belo Horizonte: Editora UFMG, 2013. 297p.

MIRANDA, A. C. M. **Desenvolvimento de sistemas gastrorretentivos do tipo dome matrix contendo benzimidazol e estratégias para melhoria da solubilidade aquosa e redução da toxicidade.** 2016. 210f. Tese (Doutorado) Programa de Pósgraduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina. 2016.

MOREIRA, D. L.; GUARIM-NETO, G. Usos múltiplos de plantas do Cerrado: um estudo etnobotânico na comunidade Sítio Pindura, Rosário Oeste, Mato Grosso, Brasil. **Polibotânica**, n. 27, p. 159-190, 2009.

MURTI, K. et al. Exploration of Preliminary Phytochemical Studies of Seed of *Syzygium cumini*. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 12-14, 2012.

NARANG, AS; DESAI, D; BADAWAY, S. Physicochemical interactions in Solid dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 10, 2012.

NASCIMENTO, A. M. do et al. *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) proanthocyanidins quantitation by RP-HPLC. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, 2013.

NASCIMENTO, A. P. R. **Quantificação dos Taninos dos Vinhos por Transformada de Fourier dos Espectros no Infravermelho Médio (FTIR).** 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Viticultura e Enologia) - Universidade Técnica de Lisboa., Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2011.

NASCIMENTO, J. E. et al Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, p. 143-148, 2008.

NICOLI, P. M. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) - Coville].** 2006. 103 f. Dissertação (Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

NOGUEIRA, D. M. da S. Á. **Avaliação do efeito protetor de fluoretos associados ao polímero bioadesivo Carbopol no desgaste erosivo.** 2018. 141 f. Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

NOGUEIRA, J.C.R. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos vegetais em otite externa aguda. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.74, n.1, p.118-124, 2008.

NORIEGA P. et al. **Thermal Characterization of *Passiflora edulis* Sims. (Maracujá) by TG/DTG and DSC.** In: VII Congresso Brasileiro De Análise Térmica e Calorimetria (VII CBRATEC), 2010.

NUNES, K. M.; BARBOSA, W. L. R.; OZELA, E. F.; SILVA JUNIOR, J. O. C. Padronização da tintura de *Calendula officinalis* L. para seu emprego em formulações semi-sólidas fitoterápicas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 344- 350, 2009.

NUNES, L.C.C., et al. Desenvolvimento de gel vaginal contendo extrato de própolis vermelha. **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 93, n. 2, p. 179-185, 2012.

NUNES, R. S. et al. Thermal behavior of verapamil hydrochloride and its association with excipients. **Thermal Analysis Calorimetry**, v. 97, n. 349, 2009.

NWODO, U. U. et al. Assessment of *Tamarindus indica* Extracts for Antibacterial Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 6385-6396, 2011.

OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**. Paris: OECD, 2001.

OECD, ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline test 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test**, 2004.

OLIVEIRA E. J. et al. Usefulness of pyrolysis coupled to gas chromatography/mass spectrometry for evaluating the reproducibility of commercial samples of *Cymbopogon citratus* Stapf., Poaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n1, p. 93-9, 2010.

OLIVEIRA, D. R. de et al. Ethnopharmacological study of *Stryphnodendron rotundifolium* in two communities in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 124-132, 2014.

OLIVEIRA, L. S. et al. Plantas Medicinais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil – Metabólitos Secundários e Aspectos Farmacológicos. **InterSciencePlace**, v. 4, n.17, 2011.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos **OMS**. Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=816>. Acesso em 11 de Fevereiro de 2019.

ORLANDO, S.C. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão)**. 2005. Dissertação (Promoção à Saúde) – Universidade de Franca, Franca, SP, 2005.

OSTROSKY, E. A. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.2, p.301-307, 2009.

OTHMAN, M. et al. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, p. 161–166, 2011.

PAN, J. et al. Effect of Nitrogen and Fluorine Co-substitution on the Structure and Magnetic Properties of Cr₂O₃. **ChemPhysChem**, v.16, n.7, p.1502–1508, 2015.

PANIZZA, S. et al. *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius: Teor de tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. **Revista Ciências Farmacêuticas**, v. 10, p. 101-106, 1988.

PASSARETTI, T. et al. Eficácia do uso do Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*) no processo de cicatrização em lesões: uma revisão de literatura. **ABCS Health Sciences**, v. 41, n.1, p.51-54, .2016.

PEREIRA, L. L. S. et al. Atividade das glicosidases na presença de chá verde e de chá preto. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 516–518, 2010.

PEREIRA, Z. V. et al. Medicinal plants used by Ponta Porã community, Mato Grosso do Sul State. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 31, n. 3, p. 293-299, 2009.

PINHO, L. de et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**,v.42, n.2, p.326-331, 2012.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 780 p., 2010.

PRATA, V. M.; EMÍDIO, E. S.; DOREÁ, H. S. Aplicação de métodos quimiométricos na caracterização de charutos utilizando a extração por dispersão da matriz em fase sólida e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 53–58, 2011.

PUJOL, D. et al. Chemical characterization of different granulometric fractions of grape stalks waste. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 494–500, 2013.

RAZAFINDRAIBE, M. et al. Medicinal plants used by women from Agnalazaha littoral forest (Southeastern Madagascar). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, 2013.8 p.

REBECCA MA. et al. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 101-104, 2002.

REBECCA, MA, et al. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (*barbatimão*) on energy metabolism in the rat liver. **Toxicology Letters**. v. 143, n.1, p. 55-63, 2003.

RENISUS. Lista de Plantas Mediciniais do SUS, 2014. Disponível em: <<http://www.plantasmedicinaisfitoterapia.com/plantas-mediciniais-do-sus.html>>. Acesso em: 29 Janeiro 2019.

RODRIGUES, F. A.; BERTOLDI, A. D. Perfil da utilização de antimicrobianos em um hospital privado. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 1, n. 1, p. 1239-1247, 2010.

RODRIGUES, F. D.; SILVA, F. A. I. **Aspectos gerais sobre o extrato da casca do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) na cicatrização de feridas cutâneas**. Seminário apresentado a Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás-Goiânia, 2012.

ROMERO, C. D. et al. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, n.2, p.253–257, 2005.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2012.

RUBIOLO, P. et al. Headspace-Solid-phase Microextraction Fast GC in Combination with Principal Component Analysis as a Tool to Classify Different Chemotypes of chamomile flower-heads (*Matricaria recutita* L.). **Phytochemistry Analytical**, v. 17, p. 217-225, 2006.

SABINO, J. F. P.; REYES, M. M.; BARRERA, C. D. F.; SILVA, A. J. R. DA. Análise e discriminação de quimiotipos de *Lippia graveolens* H.B.K. da Guatemala por microextração em fase sólida, CG-EM e análise multivariada, **Química Nova**, v.35, n.1 São Paulo, 2012.

SALIH, M., et al. Lambert, Growth curve prediction from optical density data, **International Journal of Food Microbiology**, v.154, p.169–176, 2012.

SAMPAIO, P. S.; SANCHO, L. G.; LAGO, R. F. Implementação da nova regulamentação para prescrição e dispensação de antimicrobianos: possibilidades e desafios. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 26, n. 1, p. 15-22. 2018. DOI: 10.1590/1414-462X201800010185

SANDHAR, et al. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **Internationale Pharmaceuticas Scientia**, v.1, 2011.

SANTANA, C. P. **Desenvolvimento de comprimidos com atividade antimicrobiana a partir de extrato de *Ximenia americana* L.** 2016 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual da Paraíba.

SANTANA, C.P. et al. Compatibility study of dry extract of *Ximenia americana* L. and pharmaceutical excipients used in solid state. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.1, n.1, p.1–15, 2017.

SANTOS, C. Structural, textural and morphological characteristics of tannins from *Acacia mearnsii* encapsulated using sol-gel methods: Applications as antimicrobial agentes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 151, p. 26-33, 2017.

SANTOS, F.A. **Quimiometria aplicada à metabolômica de Aldama La Llave: Contribuições quimiotaxonômicas e fitoquímica direcionada baseada em inibição de ciclooxigase-1 e 5- lipoxigase.** 2014. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2014.

SANTOS, S.C. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p. 215-219, 2007.

SANTOS, V. R. et al. Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). **International Journal of Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2009.

SANTOS, W. B.; ARAUJO, M. G. S.; SILVA, J. C.; BERNARDO, T. H. L. Microbiota infectante de feridas cirúrgicas: análise da produção científica nacional e internacional. **Revista SOBECC**, v. 21, n. 1, p.46-51, 2016.

SAVIANO, A. M., et al. Rational development and validation of a new microbiological assay for linezolid and its measurement uncertainty. **Talanta**, v.127, p. 225–229, 2014.

SCALON, S. de P. Q. et al. Condicionamento fisiológico e níveis de sombreamento em sementes de barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* (Mart.) e *S. adstringens* (Mart.) Coville). **Revista árvore**, v.38, n. 1, 2014.

SCHMITT, P. O. **Influência de excipientes farmacêuticos sobre a Eficácia de sistemas conservantes**. 2015 91 f. Dissertação (Mestrado) Universidade do Vale do Itajaí, Mestrado em Ciências Farmacêuticas. 2015

SCHÖNTHAL, A. H. Adverse effects of concentrated green tea extracts. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, p. 874-885, 2011.

SEITÉ, S., et al. Importance of treatment of skin xerosis in diabetes. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.25, n.5, p. 607-9, 2011.

SHOHAIB, T. et al. Importance of Flavonoids in Therapeutics. Hygeia: **Journal for Drugs and Medicines**. v.3, n. 1, p.1-18, 2011.

SILVA, E. C. da; PAOLA, M. V. R. V. de; MATOS, J. do R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, 2007.

SILVA, M. C. D.; BOTELHO, J. R.; SOUZA, A. G. Estudo cinético do corante bixina por decomposição térmica dinâmica. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2., n.1, p.11-14, 2008.

SILVA, M. S. P. et al. Study Bioprospecting of Medicinal Plant Extracts of the Semiarid Northeast: Contribution to the Control of Oral Microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012. 6 pgs. doi: 10.1155/2012/681207.

SILVA, R. S. da. et al. Práticas populares em saúde: autocuidado com feridas de usuários de plantas medicinais. **Revista Enfermagem UERJ**, v. 22, n. 3, p. 389-395, 2014.

SILVA, S.A.M., et al. Análise da influência do agente umectante na estabilidade reológica e avaliação de cristais líquidos em formulações cosméticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.94, n. 3, p.199 – 210, 2013.

SILVÉRIO, F. O.; BARBOSA, L. C. A. A pirólise como técnica analítica. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p.1543-1552, 2008.

SIQUEIRA, Q. de F. C.; HIGINO, S. J. **Avaliação toxicológica crônica de garrafadas vendidas nas feiras livres da cidade de Caruaru-PE em camundongos**. XVI Congresso de Iniciação científica da UFPE, 2008.

SOARES, F. P.; FREIRE, N. M.; SOUZA, T. R. Avaliação farmacognóstica e da rotulagem das drogas vegetais boldo-do-chile (*Peumus boldus* Molina) e camomila (*Matricaria recutita* L.) comercializadas em Fortaleza, CE. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 468-472, 2015.

SOARES, S.P.; VINHOLISA, L.A.C.; SILVA, M.L.A. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental. **Revista Odonto Ciência**, v. 23, n. 2, p. 141-144, 2008.

SOLANO, A. G. R., et al., Development of agar diffusion method for dosage of gramicidin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, 2011.

SOLANO, A.G.R. **Desenvolvimento de Métodos Microbiológicos para doseamento de Gramicidina Matéria-Prima**. 2008, 262 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte –MG, 2008.

SOUZA, J. N. Obtenção de extratos padronizados a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) e avaliações biológicas in vitro. 2014. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

SOUZA, N.C. et al. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.41, n.4, p.293-299, 2003.

SOUZA, A.M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: Um tutorial, parte I. **Química Nova**.v. 35, n. 01, p. 223-229, 2012.

SOUZA, M. D.; FERNANDES, R. R.; CORETTE-PASA, M. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de São Gonçalo Beira Rio, Cuiabá, MT. **Revista Biodiversidade**, v. 9, n. 1, p.91-100, 2010.

SOUZA, T. M. et al. Avaliação da atividade anti séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p.71-75, 2007. ISSN: 1981-528X.

SOUZA, V.B.; FERREIRA, J.R.N. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.3, p. 217-222, 2010.

STORPIRTIS S. et al. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2009.

SVETAZ, L. et al. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 137–158, 2010.

SWAIN R.A., et al. A five-year review of necrotising fasciitis in a tertiary referral unit. **Annals of The Royal College of Surgeons of England**, v. 95. n.1, p.57-60, 2013.

THOMAZI, G.O.C.; BERTOLIN, A.O.; PINTO, M.D.S. **Atividade Antibacteriana *in vitro* do Barbatimão e da Mangabeira contra bactérias relacionadas às infecções do trato urinário.** Anais do I Seminário Internacional de Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia, 2010.

TITTA, B. et al. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.56, p.221–227, 2011.

TOLEDO, C. E de et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaa as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p 420–425, 2011.

TOLEDO, C. E. M. **Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) 2002. 115p. - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2002.

TRABULSI, LR. (2015). **Microbiologia**. 6^a.ed. São Paulo: Ed. Atheneu.

TRAORE, M. S. et al. The malária coinfection challenge: Na investigation into the antimicrobial activity of selected Guine na medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.174, p. 576–581, 2015.

TRAPLE, M. A. L. et al. Measurement uncertainty in pharmaceutical analysis and its application. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.4, n.1, p.1–5, 2014.

UARROTA, V. G. et al. Metabolomics combined with chemometric tools (PCA, HCA, PLS-DA and SVM) for screening cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots during postharvest physiological deterioration. **Food Chemistry**, v. 161, p. 67–78, 2014.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**. Rockville, 2001, 22p.

VERAS, G. et al. Classificação do biodiesel na região do visível. **Quimica Nova**. v. 03, n.2, p. 315-318, 2012.

VIEIRA, I. C. Avaliação da toxicidade e perfil fitoquímico de extratos de *Stryphnodendron adstringens* pelos métodos de *Artemia salina* e Cromatografia em Camada Delgada. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) 2014, 32 f. Faculdade Independente do Nordeste Fainor. 2014.

WANG L. et al. Application of pyrolysis-gas chromatography and hierarchical cluster analysis to the discrimination of the Chinese traditional medicine *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 90: p. 13-7, 2011.

WEBSTER, D. et al. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 140–146, 2008.

WESOŁOWSKI, M.; KONIECZYŃSKI, P. Thermal decomposition and elemental composition of medicinal plant materials—leaves and flowers: principal component analysis of the results, **Thermochimica acta**, v. 397, n. 1–2, p. 17, 2003.

APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NO JOURNAL OF THERMAL ANALYSIS AND CALORIMETRY

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry
<https://doi.org/10.1007/s10973-019-08047-5>



Investigation of thermal and kinetic behavior of the *Stryphnodendron adstringens* dry extract with antimicrobial activity

Nathália Alexandra de Oliveira Cartaxo-Furtado^{1,2}  · Deysiane Oliveira Brandão^{1,2} ·
Fernando José de Lima Ramos Júnior^{1,2} · Karla Monik Alves Silva^{1,2} · Rui Oliveira Macêdo^{1,2}

Received: 30 August 2018 / Accepted: 26 January 2019
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2019

Abstract

Stryphnodendron adstringens Coville (Fabaceae), popularly known as “barbatimão,” is a Brazilian Cerrado tree, rich in tannins. It is used as antinociceptive, in the treatment of vaginal inflammations and infections in general. The objective was to investigate the thermal, kinetic behavior and the antimicrobial activity of the dry extract of *S. adstringens*. The dry extract was obtained from the leaves of *S. adstringens* and submitted to the thermal characterization by thermogravimetry (TG), at different atmospheres and heating rates, and by kinetic degradation by Ozawa model. Furthermore, in order to evaluate the antimicrobial activity, the minimum inhibitory concentration of the dry extract against pathogenic microorganisms was obtained. The TG curves of the sample presented six stages of thermal decomposition in both atmospheres with the beginning of decomposition of compounds in the third stage, reaching up to 16.55% of mass loss, and the fourth