



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

LUCAS AMADEU GONZAGA DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS A PARTIR DE
Momordica charantia L. PARA TRATAMENTO PEDIÁTRICO DE
GEO-HELMINTÍASES**

RECIFE
2022

LUCAS AMADEU GONZAGA DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS A PARTIR DE
Momordica charantia L. PARA TRATAMENTO PEDIÁTRICO DE
GEO-HELMINTÍASES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos à saúde.

Orientador (a): Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Recife
2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Costa, Lucas Amadeu Gonzaga da
Desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos a partir de *Momordica charantia* L.
para tratamento pediátrico de Geo-Helmintíases / Lucas Amadeus Gonzaga da Costa.
– 2022.

90 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica,
Recife, 2022.
Inclui referências e anexos.

1. Farmacologia. 2. Plantas medicinais. 3. Doenças negligenciadas. I.
Rolim Neto, Pedro José (orientador). II. Título.

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-138

LUCAS AMADEU GONZAGA DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS A PARTIR DE
Momordica charantia L. PARA TRATAMENTO PEDIÁTRICO DE
GEO-HELMINTÍASES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos à saúde.

Data de Aprovação: 23/02/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto
(Orientador, Examinador Interno e Presidente da Banca)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer, mais uma vez, aos meus pais, pois sem eles qualquer ponto da minha existência e trajetória perderia sentido. Ao meu pai, Luciano, que mesmo longe e com dificuldades sempre se mostrou o maior exemplo de homem que posso ter na vida. Um homem que trabalha, que ama seus filhos, valoriza sua família e possui princípios éticos. À minha mãe, a maior mulher de todos os tempos, símbolo de determinação e de garra. Ama seus filhos, batalha em todos os aspectos de sua vida e valoriza as pessoas que ama. Vocês são minha pedra fundadora e meu marco zero.

Em segundo, gostaria de agradecer a meus irmãos e outros parentes que me acompanharam mais de perto seja desde que eu era um menino, seja de alguns anos pra cá em que venho descobrindo meu papel no mundo: ao meu irmão, Biel, que me ensinou e continua me ensinando muito; à minha irmã, Bela, que morro de saudades; à minha tia, Rossana, que está comigo sempre nos bons e maus momentos; às minhas primas, Ju e Gabi, que compartilham sempre bons momentos comigo; às minhas outras tias, pelo suporte; aos meus outros primos e parentes que aqui não foram mencionados. Ao meu avô, que nos deixou, mas deixou um grande legado que me marcará para sempre. Durante esse período infelizmente tive que me despedir da minha companheira, Nina, à qual sou muito grato por ter compartilhado todos esses anos.

Aos meus amigos de longa data que compartilhei mais de três anos no colégio: Larissa, Cecília e Paulo. A este último em especial por todos os momentos de dificuldade em que ajudamos um ao outro. Aos meus demais amigos que fiz durante a faculdade e atualmente considero como amigos para a vida: Asley, Aurylanne, Maria Clara, Thaís, Henrique, Patrícia, Dênis e George. George em especial por ter me aguentado e continuar me aguentando todo santo dia.

Aos meus amigos de laboratório, sem os quais aquele lugar se tornaria apenas trabalho. Quando falamos que o LTM é uma família, a razão é por podermos nos relacionar com pessoas tão incríveis, exemplos e suportes para nós, seja para experimentos, seja para experiências de vida. Inicialmente não poderia deixar de dar a exclusividade do grupo Melão, em especial às duas meninas que estão guardadinhas em meu coração: Camila e Aline, ambas mulheres fortes, pesquisadoras natas e

profissionais espetaculares. Em seguida preciso agradecer à minha antiga coorientadora, Myla, que até hoje é minha amiga e um exemplo a ser seguido. Aos demais pesquisadores do LTM como Luiz, Larissa Pereira, Maria Clara, Demis, Emerson, Lourenço, Natália, Widson, Taysa, Victor e Stéfani que sempre estão na luta do dia a dia e sempre ajudando uns aos outros.

Ao pessoal que fez parte do projeto do Melão, em especial à professora Larissa Rolim e a Tiago Feitosa, por terem sido fundamentais na condução de alguns dos experimentos desse trabalho.

Ao meu orientador, o Professor Pedro Rolim, pelo exemplo de líder, gestor, pesquisador, professor e pessoa a ser seguido. Se hoje estou no LTM há cerca de 5 anos, é pela determinação e inspiração que o senhor transmite a todos aquele que não só orienta, mas também auxilia.

A todos os demais professores e pesquisadores do Departamento de Ciências Farmacêuticas e outros ao qual fui bem recebido e que sempre irei bem receber. Aos professores que ministraram as disciplinas da pós-graduação e que, de algum modo, me fizeram crescer ainda mais. Também a todos os pesquisadores que antes de mim vieram e que me permitiram chegar aonde hoje estou.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FACEPE, pelo auxílio financeiro para condução das pesquisas e pela bolsa. À Universidade Federal de Pernambuco, terra de gigantes e mãe de um dos maiores acadêmicos de todos os tempos, Paulo Freire.

E às minhas cidades natais Recife e Olinda, berços da República.

“Abre alas que minha alegria quer passar!

Pois razão tem o poeta:

Mais que nunca é preciso cantar!”

(Expedito Baracho)

RESUMO

As geo-helmintíases são doenças negligenciadas que atingem mais de 1 bilhão de pessoas no mundo todo e, no Brasil, cerca de 70% da população em idade escolar, em que os casos podem ser ainda mais graves. O tratamento é realizado com o emprego de albendazol ou mebendazol, mas o amplo uso e distribuição estão levando à diminuição de eficácia e desenvolvimento de resistência anti-helmíntica. Novos medicamentos podem ser desenvolvidos para contornar o problema, com emprego plantas medicinais. O melão de São Caetano ou *Momordica charantia* L., apresenta atividades medicinais diversas, inclusive a anti-helmíntica, demonstrada em literatura. Dessa forma, o objetivo do trabalho é desenvolver formulações pediátricas para o tratamento de geo-helmintíases empregando *Momordica charantia* L.. Inicialmente foram obtidas e caracterizadas as drogas vegetais através de metodologias presentes na Farmacopeia Brasileira, sendo os extratos hidroalcoólicos produzidos através de maceração com etanol 70%. Os extratos secos foram obtidos por secagem em estufa e caracterizados quanto à higroscopicidade, solubilidade, perfil térmico e perfil fitoquímico. Além disso foram quantificados marcadores por CLAE-DAD e desenvolvido e validado um método colorimétrico para determinação de flavonoides totais. O extrato seco foi utilizado no desenvolvimento de formulações apresentadas como xarope para diabéticos e suspensão, sendo esta submetida a um delineamento experimental. As análises da droga vegetal apresentaram parâmetros aceitáveis, como índice de umidade e estabilidade térmica. Os extratos secos apresentaram alta higroscopicidade, baixa solubilidade, perfil térmico semelhante ao da droga vegetal e presença de metabólitos secundários de interesse, como taninos, alcaloides e saponinas. O doseamento através de CLAE-DAD apresentou baixos valores de isoquercetina e astragalina, mas a quantificação de flavonoides totais demonstrou valor superior para a classe. Os xaropes para diabéticos apresentaram sabor desagradável, enquanto uma das suspensões apresentou sabor agradável. A suspensão passou por um processo de otimização e a formulação escolhida apresentou ótimo sabor, pH de 7,32 e viscosidade de 78,4mPa.s. Dessa forma, a formulação desenvolvida apresenta-se como uma possível alternativa natural, economicamente viável e promissora para o tratamento de geo-helmintíases em crianças.

Palavras-chave: helmintíase; pediatria; *Momordica charantia*; medicamentos fitoterápicos; tecnologia farmacêutica.

ABSTRACT

Geohelminthiases are neglected diseases that affect more than 1 billion people worldwide and, in Brazil, about 70% of the school-age population, in which cases can be even more serious. Treatment is performed with the use of albendazole or mebendazole, but the widespread use and distribution are leading to a decrease in efficacy and the development of anthelmintic resistance. New drugs can be developed to circumvent the problem, using medicinal plants. The São Caetano melon, or *Momordica charantia* L., has diverse medicinal activities, including anthelmintic activity, demonstrated in the literature. This work aims to develop pediatric formulations for the treatment of geohelminthiases using *Momordica charantia* L.. Initially, the plant drugs were obtained and characterized through methodologies present in the Brazilian Pharmacopoeia, and the hydroalcoholic extracts were produced through maceration with 70% ethanol. The dry extracts were obtained using the conventional oven-drying method and characterized in terms of hygroscopicity, solubility, thermal profile and phytochemical profile. In addition, markers were quantified by HPLC-DAD and a colorimetric method for the determination of total flavonoids was developed and validated. The dry extract was used in the development of formulations presented as syrup for diabetics and suspension, which was submitted to an experimental design. The plant drug analysis yielded acceptable values for parameters such as moisture content and thermal stability. The dry extracts showed high hygroscopicity, low solubility, a thermal profile similar to that of the plant drug and the presence of secondary metabolites of interest, such as tannins, alkaloids and saponins. Assay through HPLC-DAD showed low values of isoquercetin and astragalin, but quantification of total flavonoids showed superior value for the class. Syrups for diabetics were not perceived as having a pleasant taste, opposed to the suspension. The suspension was submitted to an optimization process and the chosen formulation had an acceptable flavor, pH of 7.32 and viscosity of 78.4mPa.s. Thus, the developed product presents itself as a natural, economically viable and promising alternative for the treatment of geohelminthiases in children.

Keywords: helminthiasis; pediatrics; *Momordica charantia*; phytotherapeutic drugs; technology, pharmaceutical.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição global de doenças tropicais negligenciadas.....	21
Figura 2 – a) Folhas, talos e flores de <i>M. charantia</i> L.. b) Fruto e sementes de <i>M. charantia</i> L.....	26
Figura 3 – Estruturas das classes de flavonoides.....	29
Figura 4 – Estruturas químicas das momordicinas I (a) e II (b).....	30
Figura 5 – Resumo da metodologia de preparo da formulação LB I XD.....	43
Figura 6 – Fluxograma resumido do preparo da formulação LB II XS.....	47
Figura 7 – Histograma com as porcentagens de retenção das diferentes drogas vegetais nos tamises (abertura em μm).....	51
Figura 8 – Curvas de TG obtidas a partir das drogas vegetais do RJ (DV RJ), do PI (DV PI) e de PE (DV PE).....	53
Figura 9 – Extrato seco de <i>M. charantia</i> L.....	56
Figura 10 – Curvas de sorção de umidade dos extratos secos de <i>M. charantia</i> L.....	56
Figura 11 – Curvas de TG obtidas a partir dos extratos secos do RJ (EXT RJ), do PI (EXT PI) e de PE (EXT PE).....	58
Figura 12 – Absorbâncias encontradas para diferentes tempos de reação.....	62
Figura 13 – Absorbâncias encontradas para diferentes volumes de solução de cloreto de alumínio.....	63
Figura 14 – (a) Solução extrativa após complexação entre flavonoides e íons de alumínio. (b) Reação entre a quercetina e o cloreto de alumínio.....	63
Figura 15 – Perfil espectral na região do UV/Vis de diferentes soluções contendo extrato seco e agente revelador.....	64
Figura 16 – (a) Curva de regressão linear obtida a partir da leitura de extratos secos de <i>M. charantia</i> L. em reação seletiva para flavonoides totais. (b) Gráfico de dispersão de resíduos.....	64

Figura 17 – (a) Curva de regressão linear obtida a partir da leitura de padrão de queretina em reação seletiva para flavonoides totais. (b) Gráfico de dispersão de resíduos.....	65
Figura 18 – Formulação contendo ácido cítrico antes (a) e após (b) agitação.....	71
Figura 19 – Extrato seco de <i>M. charantia</i> L. disperso em mistura 1:1 de propilenoglicol e glicerina.....	72
Figura 20 – Formulação LB II XS.....	72
Figura 21 – (a) Gráfico de Pareto para a resposta da viscosidade. (b) Gráfico de Pareto para a resposta do pH.....	75
Figura 22 – Formulação LB II XS otimizada.....	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Reveladores e solventes empregados para cada classe de metabólito.....	38
Quadro 2. – Método de avaliação da intensidade dos resultados visuais.....	39
Quadro 3. – Triagem fitoquímica dos extratos.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gradiente empregado na análise cromatográfica de alta eficiência.....	39
Tabela 2 – Lote de Bancada 1 (LB I XD) a base de <i>M. charantia</i> do xarope para diabéticos.....	43
Tabela 3 – Lote de Bancada 2 (LB II XD) a base de <i>M. charantia</i> L. do xarope para diabéticos.....	44
Tabela 4 – Lote de Bancada 3 (LB III XD) a base de <i>M. charantia</i> L. do xarope para diabéticos.....	45
Tabela 5 – Lote de Bancada 1 (LB I XS) a base de <i>M. charantia</i> L. da suspensão.....	46
Tabela 6 – Lote de Bancada 2 (LB II XS) a base de <i>M. charantia</i> L. da suspensão.....	46
Tabela 7 – Parâmetros empregados no planejamento fatorial completo de dois níveis e três fatores.....	48
Tabela 8 – Caracterizações das drogas vegetais.....	49
Tabela 9 – Perfil térmico das drogas vegetais.....	53
Tabela 10 – Caracterizações dos extratos hidroalcoólicos.....	54
Tabela 11 – Valores de solubilidade para extratos secos de <i>M. charantia</i> L.....	57
Tabela 12 – Perfil térmico dos extratos secos.....	58
Tabela 13 – Teor de isoquercetina e astragalina em extratos secos de <i>M. charantia</i> L.....	61
Tabela 14 – Resultados do ensaio de precisão.....	65
Tabela 15 – Resultados da exatidão e recuperação da quercetina em amostras de extratos de <i>M. charantia</i> L.....	66
Tabela 16 – Resultados dos ensaios de robustez.....	67
Tabela 17 – Resultados do delineamento experimental.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a arranjo de diodos
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Decit	Departamento de Ciência e Tecnologia
DTN	Doença tropical negligenciada
MS	Ministério da Saúde
O	Oeste
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
S	Sul
SCTIE	Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos
U.A.	Unidades arbitrárias

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
mg	miligrama
mL	mililitro
kg	quilograma
°	grau
°C	grau Celsius
mm	milímetro
g	grama
µm	micrômetro
h	hora
M	molar
min	minuto
p/v	porcentagem peso/volume
rpm	rotações por minuto
nm	nanômetros
mPa.s	milipascal segundo
R ²	coeficiente de correlação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1	DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS.....	21
3.1.1	As Geo-helmintíases	22
3.1.1.1	Terapêutica disponível.....	23
3.1.1.2	Resistência anti-helmíntica.....	24
3.3	PLANTAS MEDICINAIS.....	24
3.3.1	Melão de São Caetano	25
3.3.1.1	Atividade anti-helmíntica.....	26
3.3.1.2	Toxicidade.....	27
3.3.1.3	Classes de metabólitos secundários em <i>M. charantia</i> L. com atividade anti-helmíntica.....	28
3.4	MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS E PRODUTOS TRADICIONAIS FITOTERÁPICOS.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL.....	32
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL.....	32
4.2.1	Determinação de matéria estranha	33
4.2.2	Determinação granulométrica	33
4.2.3	Determinação de substâncias extraíveis	33
4.2.4	Perda por dessecação	34
4.2.5	Cinzas totais, insolúveis em ácido e sulfatadas	34
4.2.6	Análises termogravimétricas	35
4.3	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO.....	35
4.4.	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO.....	36
4.4.1	Ensaio de higroscopicidade	36
4.4.2	Ensaio de solubilidade gravimétrica	37

4.4.3	Análises termogravimétricas	37
4.4.4	Análise fitoquímica	37
4.4.5	Doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a DAD	39
4.4.6	Desenvolvimento de metodologia analítica para doseamento de flavonoides totais	40
4.4.6.1	Validação do método analítico.....	41
4.5	DESENVOLVIMENTO INICIAL DAS FORMULAÇÕES	42
4.5.1	Xarope para diabéticos	42
4.5.2	Suspensão	45
4.5.3	Delineamento experimental	47
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL	49
5.2	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO	54
5.3	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO	55
5.3.1	Análises termogravimétricas	57
5.3.2	Análise fitoquímica	59
5.3.3	Doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a DAD	60
5.3.4	Desenvolvimento de metodologia analítica para doseamento de flavonoides totais	61
5.3.5	Validação do método analítico	63
5.4	DESENVOLVIMENTO INICIAL DAS FORMULAÇÕES	67
5.4.1	Xarope para diabéticos	68
5.4.2	Suspensão	70
5.4.3	Delineamento experimental	73
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXO A - COMPROVANTE DE CADASTRO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO	90

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas são um conjunto de enfermidades que atingem, de modo geral, pessoas com pouca visibilidade política e econômica, comumente restritas à determinadas regiões, como tropicais e subtropicais (KLOHE *et al.*, 2019). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, mais de 1,5 bilhões de pessoas são afetadas por tais doenças, e o número de óbitos pode chegar a 500.000 de pessoas por ano (OMS, 2010). Dentro desse grupo, formado por cerca de 20 doenças, há aquelas que são causadas por helmintos que possuem parte do seu ciclo parasitário nos solos, sendo chamadas de geo-helminthíases ou verminoses, como é o caso da ascaridíase, tricuriase, ancilostomíase e estrogiloidíase. São doenças de fácil profilaxia e que podem ser evitadas através de saneamento básico e higiene, estando associadas à municípios com baixos índices de desenvolvimento humano.

Somente ascaridíase, ancilostomíase e tricuriase afetam mais de 75 milhões de crianças abaixo de 5 anos e cerca de 420 milhões de crianças e adolescentes abaixo dos 20 anos 3, sendo, no Brasil, cerca de 70% da população escolar é afetada (BRASIL, 2017; HOTEZ; JOHN; LABEAUD, 2019). Além dos números chamarem a atenção, há também o fato de que crianças são mais propensas a serem infectadas e há maior tendência de gravidade no grupo. As infestações causadas por tais helmintos não somente alteram o desenvolvimento corporal e neural de crianças, mas podem causar uma série de outros sintomas, como diarreia, perda de peso excessiva, anemia, obstruções do trato gastrointestinal, entre outros, podendo até causar o óbito (BRASIL, 2016).

O tratamento pediátrico clássico é realizado através do uso dos mesmos medicamentos para o tratamento em adultos, ocasionalmente com alterações na dosagem e no regime de administração. Há, inclusive formas farmacêuticas em suspensão para o tratamento em crianças, como é o caso do mebendazol e albendazol, sendo esses medicamentos mais comumente utilizados (BRASIL, 2010). Outros tratamentos podem ser feitos, a depender da situação e os casos mais graves podem ser tratados através de cirurgias de remoção intestinal ou da vesícula biliar.

Um dos problemas associados a tais terapias clássicas é o surgimento de resistência parasitária aos fármacos utilizados. Já existem diversos relatos na literatura

de desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos empregados no âmbito da pecuária (SHALABY, 2013). Existem alternativas além do desenvolvimento de novas substâncias para superar o surgimento da resistência helmíntica, como é o caso de associações de diferentes fármacos e o emprego de produtos naturais.

O emprego de plantas com propósitos medicinais é algo que acompanha a humanidade desde a pré-história, sendo uma prática mantida até o século passado e ressurgindo frente a uma série de necessidades que a indústria de fármacos sintéticos não estava conseguindo suprir (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2005). Para o tratamento das helmintíases já existem diversos estudos que comprovam que seu emprego pode ser eficaz para o tratamento das mesmas.

Uma das espécies que já possui relato na literatura acerca de sua atividade anti-helmíntica é a *Momordica charantia* L. (OYSERMAN *et al.*, 2006), também conhecida como melão de São Caetano. É uma planta trepadeira comum em regiões de florestas pluviais e característica de diversas regiões do mundo, como leste africano, América do Sul e sudoeste da Ásia. Existem relatos complementares de que possui atividade antibacteriana, antidepressiva, antidiabética, antifúngica, anti-inflamatória, etc, sendo os extratos das sementes, folhas e frutos os mais estudados com relação a atividade anti-helmíntica (JIRAUNGKOORSKUL; POOLPERM, 2017).

Tendo em vista que o uso da biodiversidade nacional deve ser incentivado, existem políticas de apoio ao emprego da mesma como alternativas terapêuticas do SUS, para fortalecimento do mesmo, como é o caso do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. O Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos submeteu e foi ganhador de um dos editais do referente programa através da chamada “CNPq/MS/SCTIE/Decit N° 19/2018-Fitoterápicos”, que fornece financiamento para pesquisa e desenvolvimento de produtos fitoterápicos. Dentro dessa perspectiva, o presente projeto de mestrado tem como foco desenvolver medicamentos pediátricos a base de *Momordica charantia* L. como formas farmacêuticas líquidas, para tratamento de geo-helmintíases.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver medicamentos fitoterápicos de uso oral para o tratamento de geohelmintíases no âmbito da pediatria contendo a *Momordica charantia* L..

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

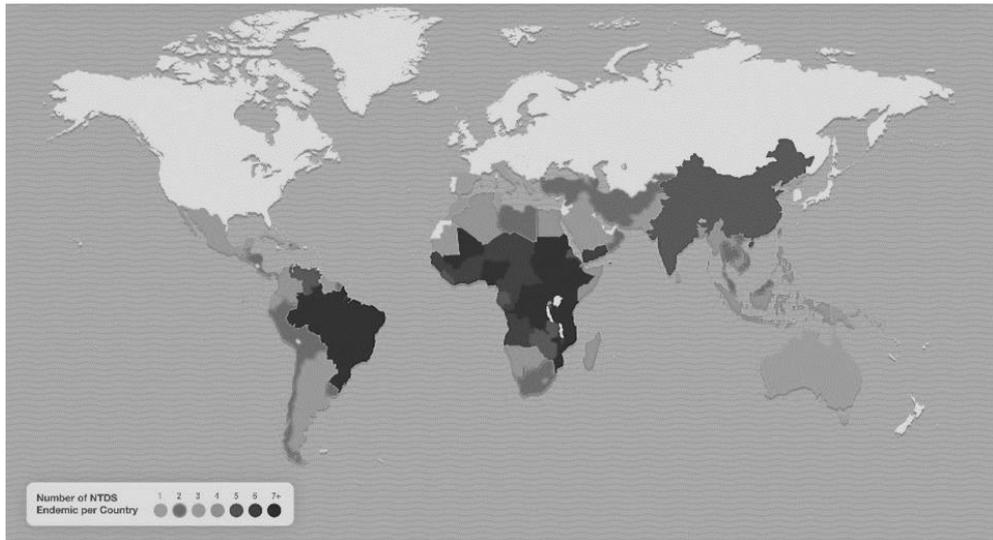
- Obter o material vegetal *Momordica charantia* L. em diferentes fornecedores regionais;
- Caracterizar a droga vegetal de acordo com os preceitos da RDC 26/2014 e Farmacopeia Brasileira 6ª edição;
- Obter e caracterizar os extratos hidroalcoólicos de *Momordica charantia* L.;
- Obter e caracterizar as propriedades físico-químicas dos extratos secos;
- Analisar perfil fitoquímico dos extratos secos de *Momordica charantia* L.;
- Realizar a quantificação de marcadores analíticos em extratos secos de *Momordica charantia* L.;
- Desenvolver e validar método analítico para quantificação de flavonoides totais em extratos secos de *Momordica charantia* L.
- Desenvolver e otimizar formas farmacêuticas líquidas de uso oral à base de *Momordica charantia* L..

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

As doenças tropicais negligenciadas, ou DTNs, são um grupo de doenças que afetam cerca de 2 bilhões de pessoas em todo mundo e possuem como característica principal a falta de incentivo para resolução e tratamento das mesmas (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020). Isso se deve ao fato de que a maioria dos países amplamente afetados estão situados nas regiões tropicais do mundo, ou seja, na América Latina, África e Sudeste da Ásia e que possuem suas populações já marginalizadas, sem poder econômico e político, como pode ser visto na figura 1 (DIMITRI, 2012; UC-NTD, 2019). Isso faz com que as pesquisas por parte das grandes indústrias farmacêuticas não foquem nesse perfil de doenças, pois as populações que fariam uso não possuem condições de custear o retorno desejável.

Figura 1. Distribuição global de doenças tropicais negligenciadas.



Fonte: Uniting to Combat Neglected Tropical Diseases.

Apesar da alta incidência, a maior parte das doenças possui um tratamento estabelecido e pode ser facilmente evitável (como pela implementação de medidas sanitárias básicas). Elas possuem a capacidade de gerar comorbidades que incapacitam e impedem as pessoas de continuarem trabalhando, o que gera ainda mais marginalidade das pessoas doentes e aprofunda o quadro de pobreza econômica

desses países (OMS, 2010). Também são doenças que possuem um forte viés social, pois algumas causam deformações que acabam interferindo nas relações pessoais dos pacientes e gerando estigma (HOFSTRAAT; VAN BRAKEL, 2016).

As doenças que compõe o grupo são causadas ou por parasitas, ou por bactérias, ou por vírus ou por fungos, sendo apenas uma delas não transmissível. Ao total são 20 doenças, como ascaridíase, tricuriase, ancilostomíase, esquistossomose, dengue, filariose linfática, doença de chagas, cisticercose, entre outras (OMS, 2010), podendo variar em quantidade de acordo com a instituição que classifica o grupo. Algumas dessas doenças são transmitidas através de vetores, como mosquitos, e as mudanças climáticas têm contribuído com a propagação delas (MITRA; MAWSON, 2017)

Algumas estratégias foram desenvolvidas pela Organização Mundial da Saúde para tratamento e controle de algumas dessas doenças, como é o caso da quimioprofilaxia preventiva, na qual as pessoas recebem o tratamento antes de qualquer diagnóstico ser feito, com base de que vivem em áreas endêmicas (TURNER *et al.*, 2021). Alguns estudos demonstram a efetividade dessa abordagem, mas ela possui impacto direto sobre o tratamento convencional, que será abordado posteriormente.

3.1.1 As Geo-helmintíases

Como o próprio nome sugere, as geo-helmintíases são um grupo de doenças causadas por helmintos que possuem parte do ciclo de vida no solo, com cada uma possuindo uma peculiaridade e ciclo específico. São um subgrupo das DTNs que engloba a ascaridíase, a tricuriase e a ancilostomíase, causadas pelos helmintos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Ancylostoma duodenale* ou *Necator americanus*. Estima-se que cerca de 1,5 bilhão de pessoas no mundo sofrem de pelo menos uma geo-helmintíase (OMS, 2021).

Os helmintos causadores dessas doenças pertencem ao filo Nematoda, apresentam ciclo monoxênico, são dioicos e a contaminação pode se dar através da ingestão de larvas infectantes presentes em ovos, para o caso da ascaridíase e tricuriase, ou através da penetração ativa da larva na pele, como é o caso da ancilostomíase (NEVES, 2005). Em ambos os casos há um fator de risco maior associado em

crianças, que tendem a permanecer mais tempo em contato com a terra e possuem um hábito de colocar a mão e outros objetos na boca, o que favorece sua contaminação.

Enquanto isso, no Brasil, há prevalência com valores que oscilam entre 2% e 36%, novamente sendo tais valores correlacionados com o nível de desenvolvimento humano do município, já que tais doenças se propagam com maior facilidade em locais com pouco ou nenhum saneamento básico. Esse valor se torna ainda mais preocupante quando se trata de populações em idade escolar: a prevalência pode chegar a 70% (BRASIL, 2017). Tal valor pode ser explicado através da pouca educação higiênica desenvolvida e maior contato com o solo.

Essas populações podem sofrer atrasos no desenvolvimento tanto físico quanto neurológico, por conta da diminuição do aporte nutricional causados pelos geo-helminthos (LIM-LEROY; CHUA, 2020). A ascariíase pode causar anemia, a tricuriíase quadros graves de diarreia e desinteria, enquanto a ancilostomíase um quadro conhecido popularmente como “amarelão”, em que o indivíduo tem a absorção de proteínas comprometida (DRAKE *et al.*, 2000; HOTEZ *et al.*, 2004, 2006).

3.1.1.1 Terapêutica disponível

O tratamento de geo-helminthoses pode ser realizado com derivados benzimidazólicos, como é o caso do albendazol e do mebendazol. Eles agem através de alguns mecanismos e podem variar de eficácia em função da espécie alvo, mas apresentam a capacidade de despolimerizar a tubulina presente nos microtúbulos do citoesqueleto, impedindo o transporte de vesículas e proteínas (para o albendazol), geram danos na cutícula do parasita, facilitação a resposta imunológica do corpo (para o mebendazol) e inibem a fumarato redutase, afetando diretamente o metabolismo energético (SPINOSA; GÓRNIK; BERNADI, 2011).

O albendazol possui duas formas farmacêuticas, o comprimido mastigável de 400mg e a suspensão oral de 40mg/mL. Ambos podem ser utilizados em crianças e alguns tratamentos podem ser feitos com a administração de uma única dose, o que facilita o processo (BRASIL, 2018). Já o mebendazol pode ser encontrado como comprimido de 100mg ou em suspensão de 20mg/mL. O tratamento é realizado de modo

a ser tomado um comprimido ou 5mL da suspensão duas vezes ao dia durante três dias (MEBENDAZOL, 2021). Um dos problemas é que tais medicamentos não podem ser utilizados por mulheres até o fim do primeiro trimestre de gravidez, pois apresentam certa genotoxicidade, nem em caso de amamentação.

3.1.1.2 Resistência Anti-helmíntica

Há uma discussão na literatura sobre a diminuição de eficácia e possível surgimento de resistência aos anti-helmínticos clássicos. Nesse contexto, Geerts, Coles e Gryseels (1997) apontaram para a crescente preocupação da disseminação de resistência aos anti-helmínticos utilizados na pecuária, alguns desses inclusive utilizados em humanos. Havia muita descrença na época de que os helmintos poderiam desenvolver resistência devido à maior complexidade estrutural e menor taxa de reprodução quando comparado a outros microorganismos, como bactérias e vírus. Nesse estudo eles demonstram que quantidades ascendentes de cepas de helmintos resistentes para os tratamentos comuns e apontaram que o tratamento em massa realizado era uma das razões para o surgimento da resistência.

Os mesmos autores elaboraram uma revisão de literatura agrupando diferentes casos suspeitos e confirmados de resistência em espécies de helmintos que infestam humanos, inclusive geo-helmintos (GEERTS; GRYSSELS, 2001). Mais recentemente o assunto vem ganhando pauta por conta da quimioterapia preventiva abordada pela OMS e estratégias de identificação, mitigação e possíveis controle já estão sendo debatidas, como é o caso do emprego de mais de um fármaco, testes com anti-helmínticos utilizados na veterinária e o desenvolvimento de novos fármacos com diferentes mecanismos de ação (SHALABY, 2013; VERCRUYSSSE *et al.*, 2011).

3.3 PLANTAS MEDICINAIS

Existem algumas alternativas que podem ser empregadas para o desenvolvimento de novos medicamentos, como síntese de novas moléculas, uso de fármacos já conhecidos para outras doenças e o emprego de plantas medicinais e seus

derivados. O emprego dos sintéticos apresenta alguns problemas como contaminação do solo e geração de muitos resíduos químicos. Dessa forma, plantas com propriedades medicinais se mostram como uma ótima alternativa na produção de novos medicamentos (OYSERMAN *et al.*, 2006). Elas já eram utilizadas antes do desenvolvimento dos anti-helmínticos sintéticos e ainda o são por pequenos pecuaristas em certas regiões (FRENCH, 2018).

É conhecido que as primeiras formas de tratamento para as doenças eram derivadas de origem natural, seja de plantas, animais ou produtos de origem mineral. O relato mais antigo conhecido sobre o uso de uma planta para terapêutica está datado como sendo de 5000 anos atrás, na Crescente Fértil, região de antigas civilizações mesopotâmicas (PETROVSKA, 2012). De acordo com a OMS, 85% da população mundial faz uso de plantas medicinais e no Brasil esse valor chega a 82% (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

No Brasil estima-se que há cerca de mais de 56000 espécies de plantas, o que torna a biodiversidade nativa e estrangeira que se adaptou ao país uma ferramenta econômica e de saúde (GUILIETTI *et al.*, 2005). Apesar disso, grande maioria permanece sem estudos padronizados de seus parâmetros de qualidade, cultivo e colheita, nem sua atividade biológica validada, o que torna difícil e complexo o processo de desenvolvimento para novos medicamentos, fitofármacos e fármacos semissintéticos (JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018).

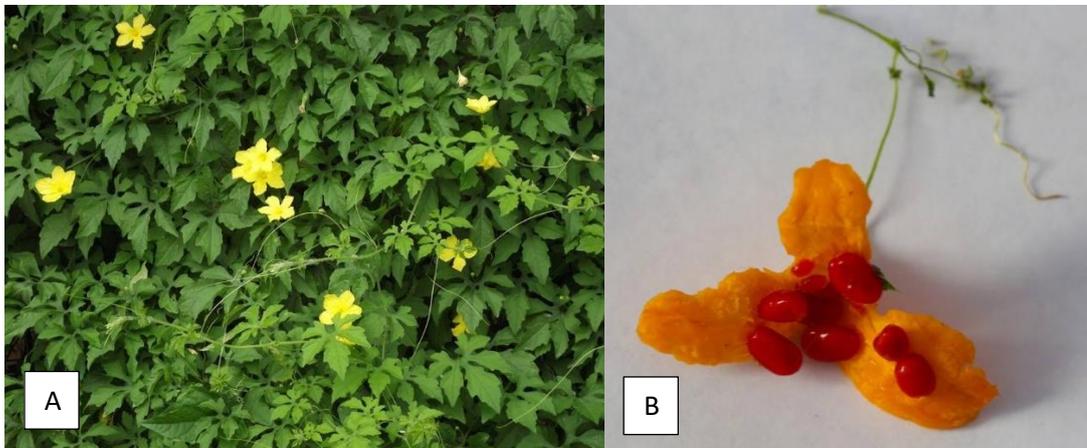
3.3.1 Melão de São Caetano

Momordica charantia L. é o nome científico para o popularmente conhecido melão de São Caetano ou melãozinho ou melão amargo, que pertence à família *Cucurbitaceae*, a qual fazem parte algumas plantas conhecidas, como abóbora, melancia e pepinos, além do melão comum (LIMA, 2010). Ele é uma planta trepadeira que tem sua origem na Ásia e que se espalhou com grande facilidade nas regiões tropicais, inclusive no Brasil.

Como pode ser visto na figura 2, apresenta folhas lobulares com característica dentada, sendo o gênero chamado de *Momordica* por aparentarem estarem “mordidas” (GUPTA *et al.*, 2011), finos caules rastejantes e verdes que podem se prender a

diferentes estruturas através de gavinhas, raízes do tipo axial, flores amarelas de longo pedúnculo e frutos alaranjados quando maduros, carnosos, com cristas longitudinais e preenchidos por sementes avermelhadas (JIRAUNGKOORSKUL; POOLPERM, 2017; ZOCOLER *et al.*, 2006).

Figura 2. a) Folhas, talos e flores de *M. charantia* L.. b) Fruto e sementes de *M. charantia* L..



Fonte: Voz do Campo (2020). Fonte: Autoria própria.

O melão de São Caetano é utilizado em diversas partes do mundo por conta de suas propriedades farmacológicas e seu uso tradicional, em especial a antidiabética (TAHIRA; HUSSAIN, 2014), a anti-inflamatória (CHAO *et al.*, 2014), a anti-helmíntica (OYSERMAN *et al.*, 2006) e outras.

3.3.1.1 Atividade anti-helmíntica

A atividade anti-helmíntica de *M. charantia* L. já é bem conhecida e explorada em diversas comunidades do mundo, como na África (BELOIN *et al.*, 2005) e sudeste asiático (FIROUS; MUHAMAD, 2018). Diversos estudos já foram conduzidos ao longo dos anos para avaliação dessa atividade, como o trabalho desenvolvido por Zahan e colaboradores (2020), em que extratos metanólicos das sementes foram testados em minhocas da espécie *Phertima posthuma* e apresentaram resultados comparáveis e melhores que o padrão de albendazol utilizado, a depender da concentração.

Um outro estudo, de Gandhi, Vadalía e Behzad, (2016) analisou os extratos metanólicos e aquosos dos frutos de *M. charantia* L., muito utilizados na medicina tradicional, sobre helmintos da espécie *Eisenia foetida*, obtendo resultados

promissores em ambos os casos. Nesses estudos também foram avaliadas diferentes frações extraídas com solventes de polaridade crescente e os resultados obtidos demonstraram bons valores para as frações de clorofórmio, indicando que compostos lipofílicos, como esteroides e alcaloides não protonados reforçam tal atividade.

No Brasil um trabalho desenvolvido na Paraíba por Gomes e colaboradores (2010) empregando dessa vez extrato etanólico das folhas, talos e frutos do melão obteve resultados promissores para o tratamento *in vivo* de nematódeos intestinais de caprinos. Um outro estudo de Chastity e colaboradores (2015) avaliou a atividade de extratos hidroalcoólicos das folhas sobre *Ascaris suum*, muito semelhante à *Ascaris lumbricoides* que infesta o homem e obteve resultados comparáveis ao controle positivo de palmoato de pirantel.

Os mecanismos de atividade anti-helmíntica de *M. charantia* L. ainda não foram completamente elucidados, bem como identificados quais são os principais metabólitos responsáveis por tal atividade. Apesar disso, os tanino, os flavonoides, os alcaloides e as saponinas possuem um papel chave, agindo cada grupo através de mecanismo específico (JIRAUNGKOORSKUL; POOLPERM, 2017).

3.3.1.2 Toxicidade

Apesar do apelo ao uso de plantas medicinais perpassar pela menor quantidade de efeitos adversos, esses ainda são presentes e precisam ser investigados. O melão de São Caetano não deve ser consumido por mulheres grávidas por ser abortifaciente, havendo relatos de sua utilização para evitar gravidez, bem como cautela de uso por pacientes passíveis de hipoglicemia, devido à sua atividade antidiabética (JIA *et al.*, 2017). De maneira geral, *M. charantia* L. se demonstra seguro para uso a depender da dose e regime posológico.

Ensaio de toxicidade aguda realizados em ratos do tipo Wistar utilizando extratos hidroalcoólicos de *M. charantia* L. se mostram seguros mesmo em altas doses, de até 2000mg/kg quando administrados por via oral, com alguns resultados negativos atribuídos a presença de etanol nos extratos, já que o aquoso se demonstrou seguro (LARGATO *et al.*, 2008). Já em estudo desenvolvido por Ponzi (2010) indicou níveis

de toxicidade leves e que atingiram o sistema nervoso central na dose de 4000mg/kg, apesar de ainda se demonstrar seguro e não letal.

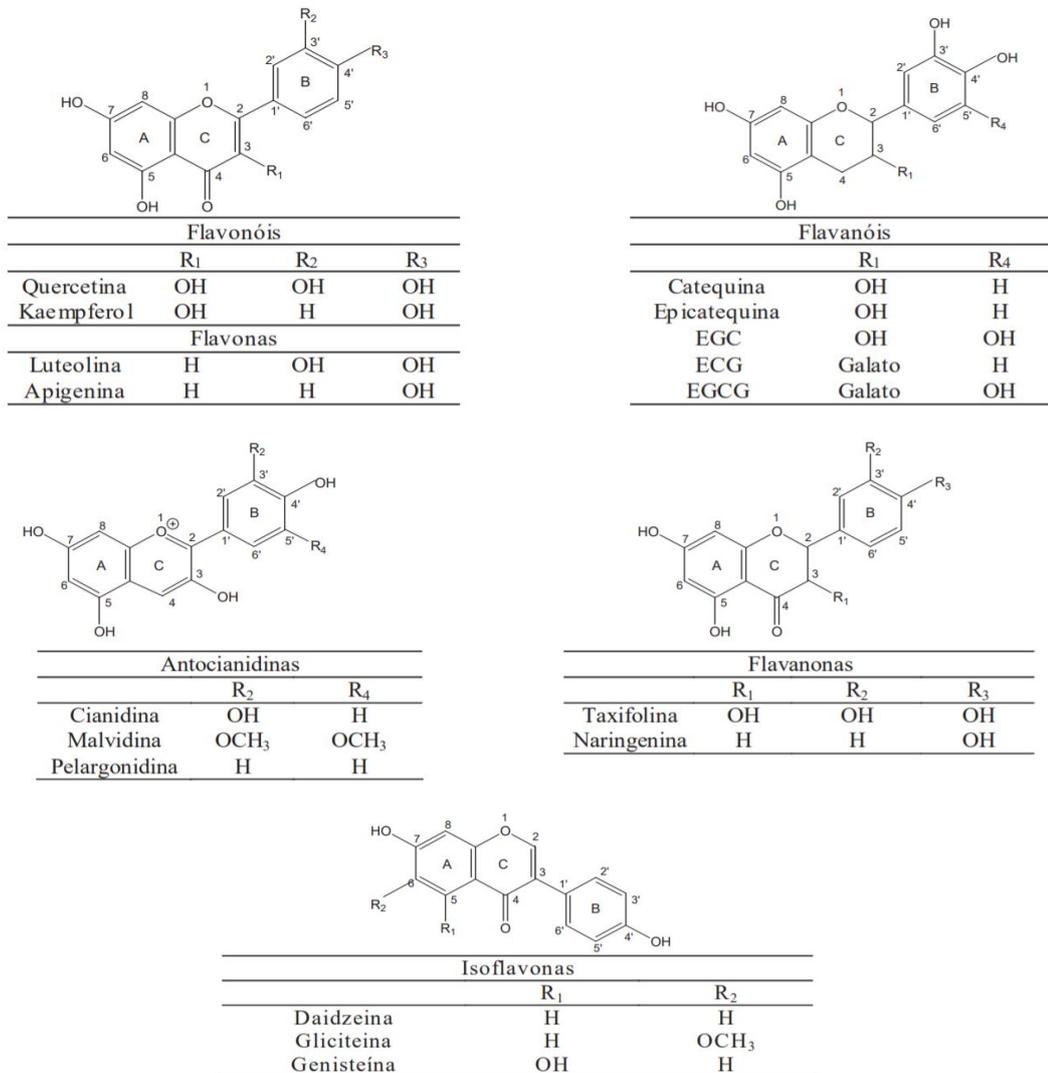
Alguns resultados a partir de estudos de toxicidade subcrônica, com administração de extratos em doses de 20mg/kg, duas vezes ao dia, durante 28 dias, em ratos do tipo Wistar, demonstraram que não há toxicidade nos órgãos estudados, como fígado e rins (VIRDI *et al.*, 2003). Apesar de estudos complementarem existirem, testes clínicos com medicamentos padronizados precisam ser realizados para determinar o nível de segurança do uso de extratos de *M. charantia* L..

3.3.1.3 Classes de metabólitos secundários em *M. charantia* L. com atividade anti-helmíntica

A atividade anti-helmíntica ainda não possui metabólitos específicos identificados em *M. charantia* L.. Apesar disso, o efeito pode ser causado pelo efeito de vários compostos presentes em derivados vegetais da planta. A literatura ressalta o papel de quatro dessas classes de metabólitos: os flavonoides, os taninos, os alcaloides e as saponinas.

Os flavonoides fazem parte do grande grupo de polifenóis ou compostos fenólicos, ou seja, compostos que apresentam diversos grupamentos fenólicos em sua estrutura, como é o caso de ácido fenólicos, lignanas e taninos (SILVA, 2018). Apresentam três anéis, sendo dois fenólicos, chamados, A e B, e um pirano heterocíclico ou pirona, chamado C, além de grupamentos hidroxila e, em quase sua totalidade nos materiais vegetais, açúcares (BECHO; MACHADO; GUERRA, 2009).

Eles são divididos em algumas classes de acordo com o grau de oxidação do anel C, sendo 6 grupos: antocianidinas, flavanóis, flavanonas, flavonas, flavonóis e isoflavonas. A estrutura de cada uma das classes pode ser observada na figura 3. No melão de São-Caetano, alguns derivados deles se apresentam de modo majoritário, como é o caso de quercetina, canferol (ou kaempferol), rutina e catequina (SHODEHINDE *et al.*, 2016).

Figura 3. Estruturas das classes de flavonoides.

Fonte: (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

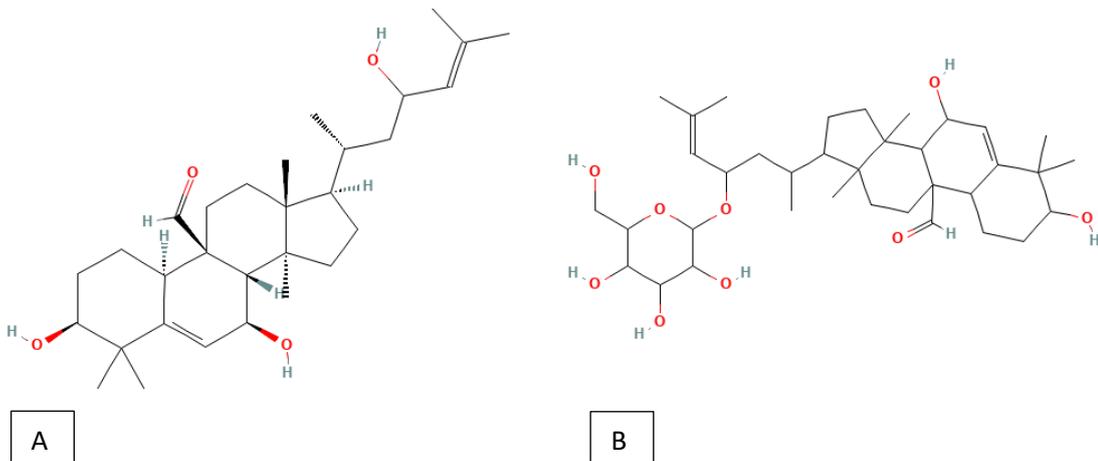
Os taninos são derivados de compostos fenólicos, apresentam um maior peso molecular e são classificados como hidrolisáveis ou condensados. Os taninos hidrolisáveis são formados a partir da esterificação de ácidos fenólicos, como gálico e elágico, com açúcares, tornando-os propícios a reações de hidrólise sob certas condições (MONTEIRO *et al.*, 2005). Já os taninos condensados são formados a partir da polimerização de flavan-3-ol (a catequina) e/ou de flavan-3,4-diol, sendo mais estáveis que os taninos hidrolisáveis e com capacidade de se ligar a proteínas, gerando reações de precipitação (COSTA *et al.*, 2008).

Os alcaloides são uma classe conhecida historicamente por suas propriedades farmacológicas variadas, como atividade neuromoduladora, antitumoral e

antioxidante. Existem diversos tipos de alcaloides presentes na natureza, sendo o principal ponto de classificação a presença de nitrogênio derivado do metabolismo secundário das plantas (BOTH, 2005).

As saponinas são moléculas que apresentam uma parte hidrofílica, composta por uma cadeia de tamanho variável de açúcares, e uma hidrofóbica, ou aglicona, composta por um esqueleto proveniente de triterpenos ou esteroides (MAN *et al.*, 2010). Isso confere às saponinas a capacidade de interagir com diferentes meios, diminuindo a tensão superficial da água, formando micelas e desestabilizando membranas celulares (MELZIG; BADER; LOOSE, 2001). Algumas saponinas presentes em *M. charantia* L. são conhecidas e estudadas, como é o caso das momordicinas I e II, presentes na figura 4.

Figura 4. Estruturas químicas das momordicinas I (a) e II (b).



Fonte: Pubchem.

3.4 MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS E PRODUTOS TRADICIONAIS FITOTERÁPICOS

O emprego de produtos com menor agressão ao meio ambiente, vindos de fontes renováveis e de origem natural têm aumentado nos últimos anos, inclusive dentro da área de cosméticos e medicamentos. Esse mercado, além dos fatores anteriormente citados, tem ganhado força também por conta da insatisfação de pacientes e

consumidores com os produtos tradicionais, seja em decorrência de eventos adversos ou por preço associado (KLEIN *et al.*, 2009).

Os medicamentos fitoterápicos são aqueles que fazem uso exclusivo de Insumo farmacêutico ativo vegetal e apresentem comprovações clínicas de segurança e eficácia, enquanto os produtos tradicionais fitoterápicos podem ter sua evidência de eficácia e segurança embasados em literatura técnico-científica, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2014). É fundamental que apresentem constância na sua qualidade.

Isso apresenta uma etapa fundamental no desenvolvimento de qualquer medicamento fitoterápico, pois o material vegetal precisa ser devidamente caracterizado em ordem de garantir que há padronização durante toda a produção (CHOUDHARY; SEKHON, 2011). Além das caracterizações farmacognósticas, que envolvem testes mais simples e abrangentes, como determinação de umidade, cinzas, granulometria, entre outros, é importante também que haja uma quantidade de ou marcadores ativos, que possuem sua atividade biológica comprovada para a indicação, ou de marcadores analíticos capazes de indicar o nível de metabólitos que ainda não possuem sua atividade biológica comprovada (BRASIL, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

A matéria-prima vegetal (MPV) foi obtida de diferentes fornecedores em diferentes períodos do ano e em horários não especificados. Os locais de coleta foram: Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco (latitude: -8.2794398° S e longitude: -35.0304219° O), Teresina, Piauí (latitude: $5,037178^{\circ}$ S e longitude: $42,792717^{\circ}$ O) e Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (latitude: $22^{\circ}54'23''$ S e longitude: $43^{\circ}10'21''$ O). Foram coletadas folhas e talos, não sendo utilizadas as raízes, frutos e flores. O material foi aspergido com etanol 70% e levado para a estufa de circulação a 40°C durante cerca de 72 horas. Uma vez seco, moído em moinho de facas tipo Willey SL-31 da marca SOLAB com malha mesh 10 (2mm), foi armazenado em recipientes sob proteção da luz e umidade e rotulado. Foi realizado o cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado sob o número A5ED852, como presente no anexo 1.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL

A droga vegetal foi caracterizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira, 6ª edição (BRASIL, 2019), sob os seguintes parâmetros: matéria-estranha, granulometria, substâncias extraíveis, perda por dessecação, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido e cinzas sulfatadas, todas em triplicata para significância estatística. A avaliação da diferença entre as médias dos resultados foi feita de acordo com análise de variância (ANOVA) fator único. Também foram realizadas análises através de termogravimetria.

4.2.1 Determinação de matéria estranha

A determinação de matéria estranha foi realizada levando-se em consideração a droga vegetal fragmentada. Inicialmente realizou-se a amostragem, distribuição da droga vegetal sobre superfície branca em formato quadrado e quarteamento, sendo dois quadrados diagonais entre si desprezados, repetindo-se o processo até obtenção da quantidade indicada (50g). A matéria-estranha foi identificada visualmente e com auxílio de uma lupa e posteriormente pesada, sendo seu resultado expresso em porcentagem com relação à amostra total.

4.2.2 Determinação granulométrica

A granulometria foi determinada através do uso de tamisador, empregando os tamises mesh 200 (75 μ m), 100 (150 μ m), 60 (250 μ m), 40 (425 μ m), 30 (600 μ m) e 20 (850 μ m). Foram adicionados 25g de amostra no tamis superior (mesh 20) e então deixado em agitação durante 15 minutos.

4.2.3 Determinação de substâncias extraíveis

O ensaio de substâncias extraíveis é realizado quando não existem ensaios químicos ou biológicos determinados para avaliação da atividade biológica de uma dada espécie/droga vegetal, como é o caso de *Momordica charantia* L. que, apesar de apresentar resultados de diferentes estudos, não apresenta resultados padronizados nem possui metodologia específica para avaliação desses dados. Inicialmente foi realizada a pesagem de 4,0g da droga vegetal em Erlenmeyer de 250mL com boca esmerilhada, adicionados 100mL de etanol 70% (mesmo solvente empregado na extração) e então deixado sob agitação durante 6h e em repouso por 18h. Após o período, a mistura foi filtrada em papel de filtro qualitativo, sendo 25mL do filtrado adicionado a pesa-filtros pesados, levados então à secura em banho maria e colocados em estufa de secagem a 105°C até peso constante. O resultado foi expresso em porcentagem em relação à droga vegetal.

4.2.4 Perda por dessecação

A perda por dessecação foi realizada através de método gravimétrico, em que foi realizada a pesagem de cerca de 1g de droga vegetal em pesa-filtros previamente dessecados e pesados, seguido da secagem em estufa entre 100°C e 105°C, até que a diferença sucessiva entre duas pesagens não ultrapasse 0,25% do peso da amostra. Os resultados foram expressos em porcentagem de água em relação ao peso de amostra inicial.

4.2.5 Cinzas totais, insolúveis em ácido e sulfatadas

As cinzas totais foram determinadas pesando-se 3g de droga vegetal em cadinhos de porcelana previamente dessecados e pesados, que seguiram para mufla a temperatura inicial de 200°C por 30 minutos. Houve aumento gradual da temperatura empregando 400°C por 60 minutos e enfim, 600°C por 90 minutos. Após o período, os cadinhos foram resfriados em dessecador de vidro para adição de 2mL de água com intuito de eliminar o carvão restante, seguindo para evaporação da água em banho maria e em chapa de aquecimento e, por último, incinerado. O processo foi realizado até que a diferença entre das duas pesagens não fosse superior a 1,0mg, sendo os resultados expressos em porcentagem em relação ao peso inicial da droga vegetal.

As cinzas insolúveis em ácido foram determinadas de modo inicialmente semelhante aos das cinzas totais, seguido da adição de 25mL de ácido clorídrico 2M por 5 minutos com vidro de relógio tampando a boca do cadinho. Tanto o vidro de relógio quanto o cadinho foram lavados com água sobre papel de filtro quantitativo faixa branca, sendo o mesmo seco em chapa de aquecimento e então levado à mufla a 500°C. O processo foi realizado até que a diferença entre das duas pesagens não fosse superior a 1,0mg, sendo os resultados expressos em porcentagem em relação ao peso inicial da droga vegetal.

As cinzas sulfatadas foram determinadas inicialmente pesando-se 1,0g da droga vegetal em cadinhos de porcelana previamente aquecidos e pesados, ao qual tiveram adição de ácido sulfúrico concentrado. A droga vegetal foi carbonizada em bico de Bunsen até evaporação completa do ácido, que foi novamente adicionado e

novamente evaporado, seguindo para a mufla, onde sofreu aquecimento gradual semelhante ao das cinzas totais, porém atingindo a temperatura de 800°C (200°C por 30 minutos, 400°C por 60 minutos, 600°C por 60 minutos e 800°C por 90 minutos). O processo foi realizado até que a diferença entre as duas pesagens não fosse superior a 1,0mg, sendo os resultados expressos em porcentagem em relação ao peso inicial da droga vegetal.

4.2.6 Análises termogravimétricas

Foram realizadas também análises termogravimétricas por TG/DTA (TA Instruments, Fisher) empregando atmosfera inerte de nitrogênio, fluxo de 100mL/min, razão de aquecimento de 10°C/min, massa de material vegetal de 5mg ± 0,05mg e intervalo de 10°C a 600°C.

4.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO

O extrato hidroalcólico foi obtido por maceração, de acordo com metodologia de Chastity e colaboradores (2015), com o solvente etanol 70% e tempo de maceração de 96h (4 dias). Devido à proporção empregada no preparo, de 1 parte de droga vegetal para 5 partes de solvente, em p/v (g/mL), e ao sistema de solvente utilizado, o extrato hidroalcólico é classificado como uma tintura simples (BRASIL, 2019). As caracterizações também foram realizadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira, 6ª edição e foram: grau alcoólico, pH, densidade relativa e resíduo seco. Todas as análises foram feitas em triplicata para garantia da significância estatística.

O grau alcoólico foi determinado através de alcoômetro de Gay-Lussac, em triplicata. O pH foi determinado através de pHmetro de bancada por potenciometria, também em triplicata. A densidade relativa foi realizada empregando um picnômetro de 25mL calibrado, ou seja, devidamente pesado enquanto vazio e após a adição de água purificada recentemente fervida e à temperatura de 20°C). Também foi realizada pesagem no picnômetro preenchido de extrato hidroalcólico a 20°C. O cálculo da densidade relativa foi feito através da seguinte equação:

$$\rho_{20} = 0,99820 \times d_{20}^{20} + 0,012$$

Onde, ρ_{20} é a densidade do extrato a 20°C; 0,099820 é a densidade da água a 20°C; d_{20}^{20} é a densidade relativa da substância em relação à água, ambas a 20°C; e 0,0012 é uma constante.

O resíduo seco foi determinado também através de método farmacopeico, pesando-se cerca de 2,0g do extrato hidroalcolico em um pesa-filtro previamente pesado. Este seguiu para banho maria até completa evaporação dos solventes e depois para a estufa de secagem a 105°C por 3 horas. Após o período e resfriamento em dessecador, realizou-se nova pesagem para determinação da porcentagem de resíduo seco em relação à massa inicial. Os resultados de resíduo foram avaliados de acordo com ANOVA fator único para verificar diferenças estatisticamente significantes entre os valores obtidos.

4.4. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO

O extrato seco foi obtido através de secagem em estufa de circulação, a 60°C, em bandejas de silicone, durante 8h, através de adaptação do método utilizado por Ferreira (2020). Foram realizadas as seguintes caracterizações: ensaio de higroscopicidade, ensaio de solubilidade gravimétrica, análise fitoquímica, doseamento de marcadores por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) e análise termogravimétrica por TG/DTA.

4.4.1 Ensaio de higroscopicidade

O ensaio de higroscopicidade foi realizado de acordo com Alves (2007). Resumidamente, realizou-se a pesagem de 500mg de amostra em pesa-filtros, que foram levados para dessecador a temperatura ambiente (25°C) sob atmosfera controlada com umidade relativa de 74%, empregando solução saturada de cloreto de sódio. Foram realizadas pesagens sucessivas de cada pesa-filtro durante os seguintes tempos: 1, 2, 3, 6, 8, 10 e 14 dias. Os resultados foram expressos em porcentagem de massa em relação ao peso inicial.

4.4.2 Ensaio de solubilidade gravimétrica

Já o ensaio de solubilidade gravimétrica foi realizado de acordo com metodologia de Eastman e Moore (1984). Inicialmente foi realizada a adição de 100mg de amostra em balão volumétrico de 10mL, com concentração final de 10mg/mL, sob agitação magnética constante por 10 minutos. Em seguida o conteúdo foi vertido para tubos Falcon, que foram centrifugados por 15 minutos a 3100rpm. Cinco mililitros do sobrenadante foram coletados e transferidos para placas de Petri previamente pesadas. Estas foram levadas a banho Maria até secura e então colocadas em estufa a 105°C por 5h, sendo novamente.

4.4.3 Análises termogravimétricas

As análises termogravimétricas por TG/DTA (TA Instruments, Fisher) foram realizadas empregando atmosfera inerte de nitrogênio, fluxo de 100mL/min, razão de aquecimento de 10°C/min, massa de extrato seco de 5mg \pm 0,05mg e intervalo de 10°C a 600°C (FERREIRA, 2020).

4.4.4 Análise fitoquímica

A análise fitoquímica foi realizada de acordo com metodologia de Wagner e Bladt (1996). As amostras foram solubilizadas de acordo com sua polaridade e uma alíquota de cada um dos extratos foi submetida às análises em placas de cromatografia em camada delgada da DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254. Os extratos foram aplicados a 1 cm da borda inferior com capilar de vidro e as placas eluídas com diferentes sistemas de solventes, a fim de identificar os principais grupos de metabólitos secundários. O quadro 1 sumariza quais as classes de metabólitos, os solventes utilizados e os agentes reveladores para cada classe.

Quadro 1. Reveladores e solventes empregados para cada classe de metabólito.

Classe química	Eluente	Revelador
Alcaloides	Tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10)	Dragendorff
Antocianinas	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Vanilina sulfúrica 5-10 min a 100°C
Antraquinonas	Éter de petróleo: acetato de etila: ácido fórmico (75:25:1)	H ₂ SO ₄ etanólico 10%
Derivados antracênicos	Acetato de etila: metanol: água (100:13,5: 10)	KOH etanólico 10%
Compostos fenólicos	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Cloreto férrico metanólico 1%
Cumarinas	Tolueno: éter (1:1 saturado com ácido acético 10%)	Vanilina sulfúrica 5-10 min a 100°C
Lignanas	Clorofórmio: metanol: água (70:30:4)	Vanilina fosfórica 5-10 min a 100°C
Mono, sesqui e diterpenos	Tolueno: acetato de etila (93:7)	Vanilina sulfúrica 5-10 min a 100°C
Naftoquinonas	Tolueno: ácido fórmico (99:1)	KOH etanólico 10%
Taninos condensados	Acetato de etila: ácido acético glacial: ácido fórmico: água (100:11:11:26)	Vanilina clorídrica 5-10 min a 100°C
Taninos hidrolisáveis	n-butanol: acetona: tampão fosfato pH 5,0 (40:50:10) (Xavier, 2001)	Sulfato ferroso amoniacoal (1%) ou cloreto férrico
Triterpenos e esteroides	Tolueno: clorofórmio: etanol (40:40:10)	Lieberman-Burchard 5-10 min a 110 °C
Saponinas	Clorofórmio: ácido acético: metanol: água (64:32:12:8)	Vanilina sulfúrica 5-10 min a 100°C
Xantinas	Acetato de etila: metanol: água (100:13,5:10)	Dragendorf

Fonte: Autoria própria.

Os resultados das análises foram expressos em níveis de intensidade como demonstrado no quadro 2.

Quadro 2. Método de avaliação da intensidade dos resultados visuais.

Grau de intensidade (concentração)	Critérios
Fortemente positivo	(+++)
Moderadamente positivo	(++)
Fracamente positivo	(+)
Ausente	(-)

Fonte: Autoria própria.

4.4.5 Doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a DAD

Levando em consideração os resultados das caracterizações (especialmente fitoquímicas) de cada extrato, foi realizada análise através de CLAE-DAD nos extratos secos obtidos a partir das drogas vegetais do Piauí e de Pernambuco. As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido da Shimadzu® com sistema de quatro bombas (LC-20AT), degaseificador (DGU-20^a), injetor automático (SIL-20^a), forno (CTO-20^a), detector DAD (SPD-M20) e controlador (CBM-20A). Os dados foram coletados e analisados através do software próprio Shimadzu® LC Solution 1.0.

Todas as análises foram conduzidas de acordo com metodologia adaptada a partir do trabalho de Demarque e colaboradores (2017). Resumidamente, as amostras foram submetidas a coluna cromatográfica C18 Supelco® de 25cm x 4,6cm x 5µm com uma pré-coluna acoplada e a fase móvel composta por dois solventes: o solvente A foi solução 0,1% de ácido fórmico em água ultrapurificada e o solvente B foi a acetonitrila. O sistema gradiente está conforme descrito na tabela 1, empregando fluxo de 0,4mL/min, volume de injeção de 100µL e temperatura de forno constante a 30°C. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 270nm.

Tabela 1. Gradiente empregado na análise cromatográfica de alta eficiência.

	Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
Gradiente	0-70	95 - 0	5 - 100
Isocrático	70-80	0	100
Gradiente	80-85	0 - 95	100 - 5
Isocrático	85-100	95	5

Fonte: Autoria própria.

Foram preparadas curvas de calibração empregando dois marcadores analíticos, a isoquercetina e a astragalina, com base em trabalhos anteriores do grupo. Ambas as soluções foram preparadas empregando metanol grau CLAE a concentração de 200µg/mL. As soluções de amostra de extrato seco foram solubilizadas em metanol grau CLAE a concentração de 1mg/mL. A solubilização de todas as soluções foi realizada através de sonicação por 5min.

A curva de calibração de isoquercetina foi realizada nas concentrações entre 0,4 e 7,4µg/mL, enquanto a curva da astragalina, entre 0,2 e 7,2µg/mL. Foram realizadas análises de regressão linear para avaliação do coeficiente de correlação (R^2) e determinação da equação da reta.

4.4.6 Desenvolvimento de metodologia analítica para doseamento de flavonoides totais

A metodologia é baseada no trabalho de Chang e colaboradores (2002). Resumidamente, foi empregado 0,5mL da solução contendo o extrato seco em etanol 70% ou o padrão de quercetina também solubilizado em etanol 70%, 1,5mL de etanol P.A., 0,1mL de solução aquosa de acetato de potássio 1M, 0,1mL de solução aquosa de cloreto de alumínio 10% e 2,8mL de água purificada. Após adição dos reagentes e agitação em vórtex por 1 minuto, a reação aconteceu por 30min, onde foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-Vis em varredura inicialmente. As análises foram feitas sob ausência de luz direta. Foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis da marca SHIMADZU® UVMINI-1240 PC e cubetas de quartzo de 10 mm de espessura e volume de 1 mL.

Amostras de extratos seco de PE foram solubilizadas em etanol 70% numa concentração de 7,5mg/mL, com auxílio de sonicação. A curva do padrão de quercetina foi preparada de modo similar, mas empregando concentrações de 80, 100, 120, 140 e 160µg/mL. Devido ao método realizar uma diluição na proporção de 1:10 das soluções de amostras e de padrão, a concentração final da amostra permaneceu em 0,75mg/mL e da curva em 8, 10, 12, 14 e 16µg/mL. Para aceitação da curva foi feita análise de regressão linear e o coeficiente de correlação R^2 só foi aceito com valor maior que 0,99.

Os fatores analisados para o desenvolvimento do método foram: escolha do comprimento de onda de leitura, tempo de reação e volume de solução de cloreto de alumínio. Para determinação do comprimento de onda, foram realizadas varreduras no espectrofotômetro que iam de 300 a 800nm. Para determinação do tempo de reação, foram analisados os tempos de 5min, 15min, 30min, 45min e 60min. Por último, para determinação do volume de solução de cloreto de alumínio, foram empregados os volumes de 50µL, 100µL, 500µL e 1000µL. A exceção das análises de varredura, todas as leituras foram realizadas no comprimento de onda de 411nm.

4.4.6.1 Validação do método analítico

Os parâmetros para a validação do método de quantificação de flavonoides totais através de espectrofotometria foram a seletividade, a linearidade, a repetibilidade, a precisão intermediária, a exatidão e a robustez, todos de acordo com os preceitos da RDC 166/2017 (BRASIL, 2017). Uma vez validado o método, foi realizada então a determinação da concentração de flavonoides totais no extrato seco.

A seletividade foi avaliada com sobreposição dos gráficos obtidos no espectrofotômetro. Foram feitas varreduras de 300 a 800nm utilizando a solução contendo o extrato sem o agente revelador utilizado (o cloreto de alumínio), a solução contendo o extrato com o agente revelador e apenas a solução do agente revelador diluída nos demais solventes empregados.

A linearidade do método na faixa de trabalho foi determinada através da avaliação de três curvas feitas a partir das soluções de extrato com cinco diferentes concentrações (200; 225; 250; 275 e 300µg/mL), englobando de 80% a 120% do valor do ponto central. Os resultados foram analisados estatisticamente para avaliação do coeficiente de correlação (R^2) por meio de regressão linear com o método dos mínimos quadrados, sendo aceitável o $R^2 > 0,99$.

A precisão do método foi avaliada de acordo com a repetibilidade, sendo preparadas, individualmente, seis soluções de extrato a uma mesma concentração (250µg/mL) para determinação da absorbância e concentração média.

A exatidão do método foi avaliada mediante a leitura de amostra em três diferentes níveis de concentração, o baixo, a 200µg/mL, o médio, a 250µg/mL, e o alto, a 300µg/mL, equivalentes a 80%, 100% e 120% da concentração determinada. As amostras foram enriquecidas com quercetina a uma concentração de 4µg/mL. Foi

avaliado o desvio padrão relativo e a taxa de recuperação, calculada com base na seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental} - 4}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

A robustez do método foi feita através da variação de três fatores: a luminosidade, a marca do solvente e o valor do pH. O valor do pH foi variado de 5,02 para 4,21 através da adição de ácido clorídrico 0,1M. Os ensaios foram feitos tais quais aos da exatidão e comparados através de análises estatísticas por meio do teste F.

4.5 DESENVOLVIMENTO INICIAL DAS FORMULAÇÕES

Devido à maior facilidade de serem administradas formas farmacêuticas líquidas em populações pediátricas, optou-se pelo desenvolvimento inicial de xaropes e suspensões. A primeira forma farmacêutica desenvolvida foi xarope, mais especificamente para diabéticos, pois o produto teria apelo para uma maior quantidade de pessoas. Todas as formulações foram armazenadas em frascos de vidro âmbar à temperatura ambiente.

4.5.1 Xarope para diabéticos

O xarope para diabéticos foi desenvolvido com base em trabalho de Lubi, Sato e Gaensly (2003). As porcentagens de cada composto da formulação podem ser vistas na tabela 2 e a metodologia de preparo pode ser observada na figura 5 foi dividida nas 5 etapas seguintes:

- a) Inicialmente foi preparada uma solução aquosa com o polímero escolhido para a formulação, a carboximetilcelulose sódica (CMC) cerca de 50mL de água purificada através de aquecimento a 50°C e agitação magnética constante, formando a 1ª Fase.
- b) O propilenoglicol levemente aquecido (a 40°C) foi utilizado separadamente para solubilizar o metilparabeno e o propilparabeno, compondo a 2ª Fase.
- c) Uma terceira fase foi preparada com a mistura de glicerina e sorbitol 70% sob aquecimento de 30°C, sob agitação magnética constante.

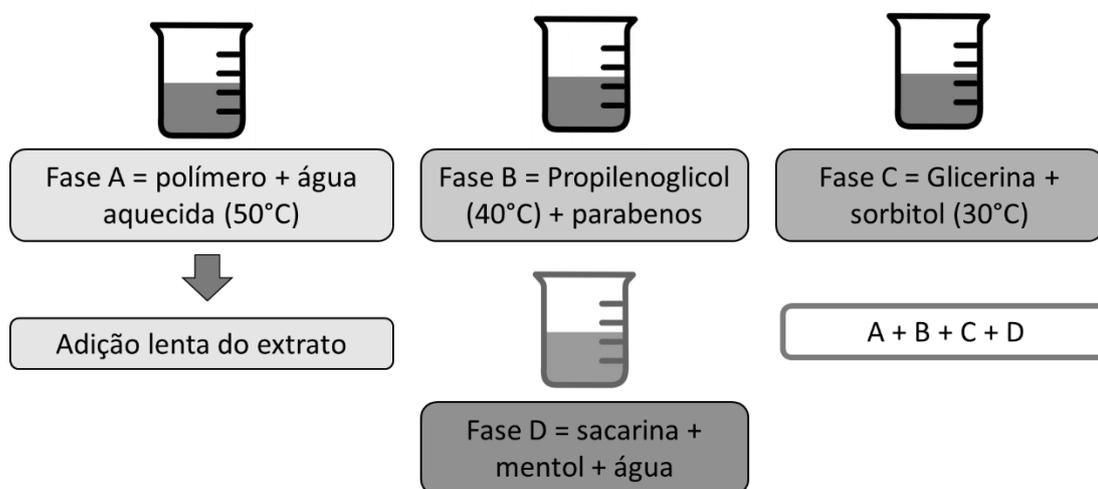
- d) Cerca de 20mL da água purificada foi adicionada numa quarta fase, composta também por sacarina sódica e essência de mentol, sob agitação constante.
- e) O extrato seco de *Momordica charantia* L. foi adicionado na solução contendo o polímero e então as demais fases foram adicionadas sob agitação constante e sem aquecimento até dispersão uniforme das partículas de extrato, com o volume final sendo completado com água purificada até 100mL.

Tabela 2. Lote de Bancada 1 (LB I XD) a base de *M. charantia* do xarope para diabéticos.

Componentes	Porcentagem (%)	Função
Extrato seco de <i>M. charantia</i> L.	1,60	Insumo farmacêutico ativo vegetal
Carboximetilcelulose sódica (CMC)	1,50	Espessante
Metilparabeno	0,18	Conservante
Propilparabeno	0,02	Conservante
Propilenoglicol	2,00	Cossolvente
Glicerina	2,50	Cossolvente e edulcorante
Sorbitol (solução a 70%)	5,00	Cossolvente e edulcorante
Sacarina	0,10	Edulcorante
Mentol (Solução a 10%)	0,10	Flavorizante
Água purificada	q.s.p.100,00 mL	Solvente

Fonte: Autoria própria.

Figura 5. Resumo da metodologia de preparo da formulação LB I XD.



Fonte: Autoria própria.

Foram realizadas então algumas modificações da formulação inicial, sumarizadas na tabela 3. Resumidamente o método de preparo permaneceu o mesmo, alterando-se apenas a concentração de sacarina (o dobro do inicial), a concentração de extrato seco (metade do inicial), a adição de ácido cítrico e NaCl como agentes mascarantes de sabor na 4ª Fase, baseado no fato que tanto o ácido cítrico quanto sais de sódio apresentam capacidade de mascaramento de sabor (MENNELLA; PEPINO; BEAUCHAMP, 2003; SOHI; SULTANA; KHAR, 2004), bem como testagem de 2 diferentes tipos de essência (chocolate e hortelã).

Tabela 3. Lote de Bancada 2 (LB II XD) a base de *M. charantia* L. do xarope para diabéticos.

Componente	Porcentagem	Função
Extrato seco de <i>M. charantia</i> L.	0,80	Insumo farmacêutico ativo vegetal
CMC	1,50	Espessante
Metilparabeno	0,18	Conservante
Propilparabeno	0,02	Conservante
Propilenoglicol	2,00	Cossolvente
Glicerina	2,50	Cossolvente e edulcorante
Solução de sorbitol 70%	5,00	Cossolvente e edulcorante
Sacarina	0,20	Edulcorante
NaCl	1,00	Mascarante de sabor
Ácido cítrico	1,00	Mascarante de sabor
Essência (chocolate ou hortelã)	0,10	Flavorizante
Água purificada	q.s.p. 100,00 mL	Solvente

Fonte: Autoria própria.

Visando novamente uma melhoria no sabor do xarope para diabéticos, foi testado suco de groselha concentrado no lugar da água purificada, remoção do ácido cítrico, aumento da concentração de propilenoglicol e solubilização do extrato no mesmo. A 4ª Fase teve alteração no volume de suco de groselha (o equivalente à água purificada) de 20mL para 10mL devido à adição de maior quantidade de propilenoglicol. As informações referentes a tal formulação estão sumarizadas na tabela 4.

Tabela 4. Lote de Bancada 3 (LB III XD) a base de *M. charantia* L. do xarope para diabéticos.

Componente	Porcentagem	Função
Extrato seco de <i>M. charantia</i> L.	0,80	Insumo farmacêutico ativo vegetal
CMC	1,50	Espessante
Metilparabeno	0,18	Conservante
Propilparabeno	0,02	Conservante
Propilenoglicol	25,00	Cossolvente
Glicerina	2,50	Cossolvente e edulcorante
Solução de sorbitol 70%	5,00	Cossolvente e edulcorante
Sacarina	0,20	Edulcorante
NaCl	1,00	Mascarante de sabor
Essência	0,10	Flavorizante
Água purificada	60,00mL	Solvente
Suco de groselha concentrado	q.s.p. 100,00 mL	Flavorizante e mascarante de sabor

Fonte: Autoria própria.

4.5.2 Suspensão

A segunda forma farmacêutica pensada foi o xarope simples de sacarose. A formulação passou por diversas modificações. A primeira formulação testada desse grupo está exposta na tabela 5. Seu método de preparo foi a quente (ROCHA *et al.*, 2008), de acordo com o método a seguir:

- a) Inicialmente foi adicionado à água quente (80°C) o metilparabeno e o propilparabeno, até completa solubilização;
- b) A sacarose foi adicionada aos poucos, sendo homogeneizada constantemente até solubilização;
- c) Após resfriamento, o extrato seco de *M. charantia* L. foi adicionado, também com homogeneização constante, seguido da adição do restante da água com a quantidade suficiente para 100mL.

Tabela 5. Lote de Bancada 1 (LB I XS) a base de *M. charantia* L. da suspensão.

Componente	Porcentagem	Função
Extrato seco de <i>M. charantia</i> L.	1,60%	Insumo farmacêutico ativo vegetal
Sacarose	85,00%	Edulcorante e espessante
Metilparabeno	0,18%	Conservante
Propilparabeno	0,02%	Conservante
Água purificada	q.s.p. 100,00 mL	Solvente

Fonte: A autoria própria.

Devido à baixa solubilidade do extrato seco, a forma farmacêutica ficou classificada como uma suspensão. Almejando melhoria no sabor da suspensão foi testada uma nova formulação, baseado em trabalho de Nema e colaboradores (2011), empregando também a dose mínima calculada. A formulação está retratada na tabela 6, o fluxograma com seu método de preparo na figura 6 e seu preparo foi realizado da seguinte forma:

- a) Inicialmente foi preparado o xarope simples com a adição da sacarose e água purificada com agitação contínua em agitador mecânico (600rpm) até obtenção de uma solução com aspecto de xarope.
- b) O citrato de sódio e o NaCl foram solubilizados em quantidade suficiente de água para adição no xarope base;
- c) Uma mistura contendo propilenoglicol e glicerina na proporção de 1:1 foi feita como cossolvente para dispersão homogênea do extrato seco da formulação com agitação magnética por 20min.
- d) A mistura de glicerina, propilenoglicol e extrato foi a última a ser adicionada a mistura, junto com a solução de mentol
- e) A formulação permaneceu em agitador mecânico para homogeneização a 600rpm por 10min.

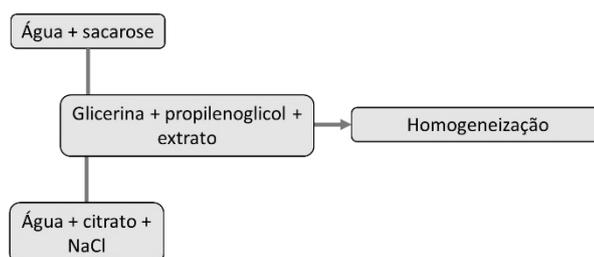
Tabela 6. Lote de Bancada 2 (LB II XS) a base de *M. charantia* L. da suspensão.

Componente	Porcentagem	Função
Extrato seco de <i>M. charantia</i>	0,80%	Insumo farmacêutico ativo vegetal

Citrato de sódio	1,00%	Agente tamponante e mascarante de sabor
NaCl	1,00%	Mascarante de sabor
Glicerina	20,00%	Cossolvente e edulcorante
Propilenoglicol	20,00%	Cossolvente
Essência de mentol	0,10%	Flavorizante
Xarope simples	q.s.p. 100,00 mL	Veículo

Fonte: Autoria própria.

Figura 6. Fluxograma resumido do preparo da formulação LB II XS.



Fonte: Autoria própria.

4.5.3 Delineamento experimental

A formulação final escolhida, a LB II XS, foi então submetida a um processo de otimização, de modo que a formulação com as melhores características fosse selecionada. O desenho do experimento foi do tipo fatorial completo com três fatores e dois níveis (2^3) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Os fatores avaliados foram concentração da mistura de cossolventes, concentração de citrato e tempo de agitação da formulação, enquanto a ordem de preparo das formulações foi feita de modo aleatorizado. A tabela 7 contém os fatores e níveis utilizados nos experimentos. Os parâmetros avaliados quantitativamente foram a viscosidade, determinada através de Viscosímetro Rotativo Laborana LAB-90-01-26, empregando o spindle 1 e velocidade de rotação a 39,9rpm; e o pH, determinado por pHmetro de bancada por potenciometria. Por último foi avaliado qualitativamente o sabor das formulações, sendo estabelecido um score de 1 a 3 (ruim, regular, ótimo).

Tabela 7. Parâmetros empregados no planejamento fatorial completo de dois níveis e três fatores.

Fatores de entrada	(-1)	(+1)
Concentração da mistura de cossolventes (%)	20,00	40,00
Concentração do citrato (%)	0,50	3,00
Tempo de agitação da formulação (min)	5	10

Fonte: Autoria própria.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram feitas em triplicata de modo a se garantir a significância estatística. Os gráficos e dados presentes em quadros foram gerados por intermédio dos softwares OriginLab® 8.5, MiniTab® 18 ou Microsoft Excel®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL

A droga vegetal obtida apresentou aspecto verde amarronzado, com aroma característico para todos os fornecedores. A escolha de diferentes fornecedores se deu em decorrência da necessidade de avaliação sobre as diferenças geográficas sobre os parâmetros de qualidade da droga vegetal, além de serem locais qualificados para a produção. A etapa de caracterização da droga vegetal é crítica do processo de produção e desenvolvimento de medicamentos e produtos tradicionais fitoterápicos, pois garante, através de testes de menor complexidade, que os parâmetros farmacognósticos estão sendo atendidos. A Farmacopeia Brasileira não possui monografia sobre *M. charantia* L., bem como nenhuma das outras farmacopeias principais do mundo. Alguns dos resultados de caracterização da droga vegetal estão sumarizados na tabela 8, a seguir.

Tabela 8. Caracterizações das drogas vegetais.

Caracterização	Droga vegetal de PE	Droga vegetal do PI	Droga vegetal do RJ
Matéria estranha	0,78%	0,12%	0,97%
Substâncias extraíveis \pm DP	16,40% \pm 0,0052	20,54% \pm 0,0028	17,10% \pm 0,0099
Índice de umidade \pm DP	11,03% \pm 0,005	10,87% \pm 0,001	12,48% \pm 0,001
Cinzas totais \pm DP	15,08% \pm 0,0087	13,99% \pm 0,0057	10,23% \pm 0,0017
Cinzas insolúveis em ácido \pm DP	0,46% \pm 0,0031	0,90% \pm 0,0019	0,23% \pm 0,0010
Cinzas sulfatadas \pm DP	19,18% \pm 0,0013	18,34% \pm 0,0054	13,95% \pm 0,0069

Fonte: Autoria própria.

A determinação de matéria estranha não somente garante que, a nível visual, não há presença de muitos contaminantes, como insetos, detritos e outras espécies vegetais, como também revela cuidados com a coleta e a seleção da matéria-prima (PATWEKAR *et al.*, 2015). É primordial que a porcentagem de matéria estranha esteja

a menos de 2% em relação à massa total analisada. Todas as drogas vegetais foram aprovadas devido aos baixos valores.

As substâncias extraíveis são utilizadas para espécies vegetais que não possuem um ensaio químico ou biológico específico para avaliação da atividade da droga vegetal em questão (BRASIL, 2019). A metodologia recomenda a utilização do solvente presente na monografia específica. Como não há, optou-se pela escolha do mesmo solvente empregado na extração, o etanol 70%. Os resultados indicam que há diferenças entre as médias das substâncias extraíveis do PI em relação às de PE e RJ (valor-p < 0,05). Pode haver correlação entre tais resultados e a quantidade de matéria-estranha observada na droga vegetal do PI, que possuía a menor quantidade.

A determinação da umidade também é fundamental para avaliação da qualidade da droga vegetal, já que a presença de muita água permite a atividade enzimática e a proliferação de microorganismos, como fungos e bactérias. Não há um valor específico presente na farmacopeia que englobe todas as recomendações, porém, de acordo com a OMS, o ideal varia em torno de 12%, o que pode ser observado em todas as drogas vegetais estudadas (BRANDÃO *et al.*, 2016; OMS, 2018). É importante que haja presença de água remanescente na droga vegetal para que haja a extração dos compostos posteriormente. No que se refere à diferença entre as drogas vegetais, a umidade da droga vegetal do RJ foi a que apresentou maior valor e estatisticamente significativa em relação às demais (valor-p < 0,05).

As cinzas totais refletem a parte inorgânica da planta, já que, através da incineração, o material orgânico é transformado e desprendido. Apesar disso os valores de cinzas totais podem variar em função da espécie, da parte da planta, da região de cultivo, das condições de cultivo e da época do ano (TAMBE *et al.*, 2012). Valores diferentes foram encontrados para cada droga vegetal, mas a droga vegetal do Rio de Janeiro apresentou os menores valores de cinzas totais quando comparada às demais drogas de modo estatisticamente significativo (valor-p < 0,05).

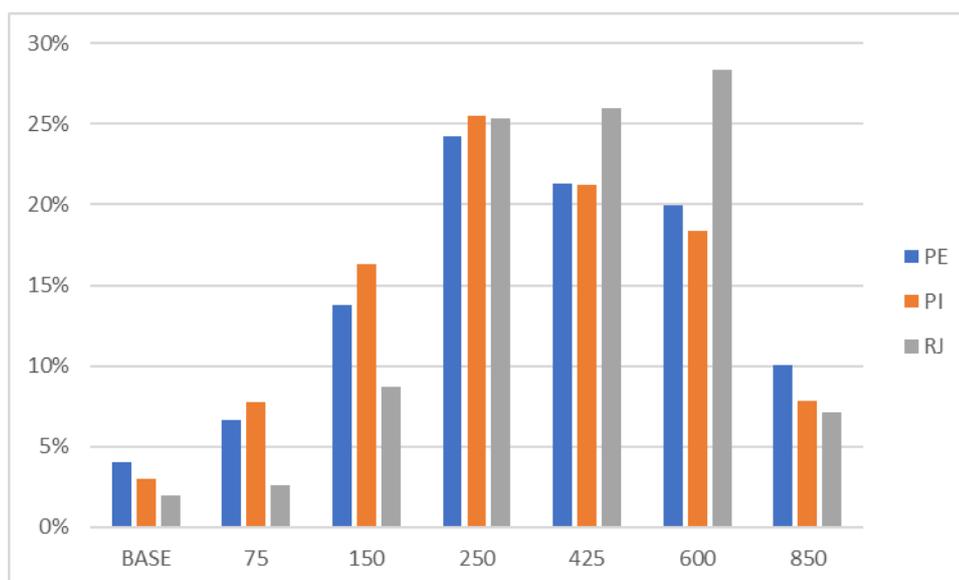
As cinzas insolúveis em ácido são as ditas cinzas não fisiológicas, por refletirem os constituintes contaminantes silicosos presente na droga vegetal, especialmente areia (BRASIL, 2019). Não houve correlação entre os níveis de cinzas insolúveis em ácido e as cinzas totais nas drogas vegetais estudadas e não há valores ideais para tais cinzas. Apesar disso é importante ressaltar que seus valores não devem ser muito elevados e podem ser indicativos de adulteração na droga vegetal. No que se refere

ao tratamento estatístico, os valores de cinzas insolúveis foram diferentes significativamente entre PE e PI (valor-p < 0,05), mas não entre PE e RJ e PI e RJ (valor-p > 0,05).

As cinzas sulfatadas empregam o ácido sulfúrico para fixar certos componentes da amostra, como carbonatos, cloretos e óxidos, que podem se perder durante a incineração através da metodologia de cinzas totais (BORGES, 2005). Por essa razão, os valores são superiores aos das cinzas totais, conforme observado em todas as drogas vegetais estudadas. Assim como nas cinzas totais, os valores de cinzas sulfatadas diferiram estatisticamente apenas entre a droga vegetal do RJ e as demais drogas (valor-p < 0,05).

No que se refere à granulometria, pode-se observar, através da figura 7 que a maior parte das partículas apresentavam tamanho maior que 250µm e menor que 850µm. Este resultado é positivo no sentido de que o processamento da droga vegetal foi eficiente em uniformizar o tamanho das partículas, o que pode garantir uma melhor uniformidade durante a extração.

Figura 7. Histograma com as porcentagens de retenção das diferentes drogas vegetais nos tamises (abertura em µm).



As análises termogravimétricas também foram feitas com o intuito de corroborar os resultados e compará-los com alguns presentes em literatura e os já realizado através das técnicas farmacopeicas. Todas as drogas vegetais apresentaram como primeiro evento a perda de água superficial, seguida da perda de água ainda ligada a droga vegetal e início da degradação inicial de alguns compostos orgânicos, a mais

significativa em termos de massa e que precede à formação das cinzas. Os eventos estão sumarizados na tabela 9 a seguir e os respectivos gráficos podem ser observados na figura 8.

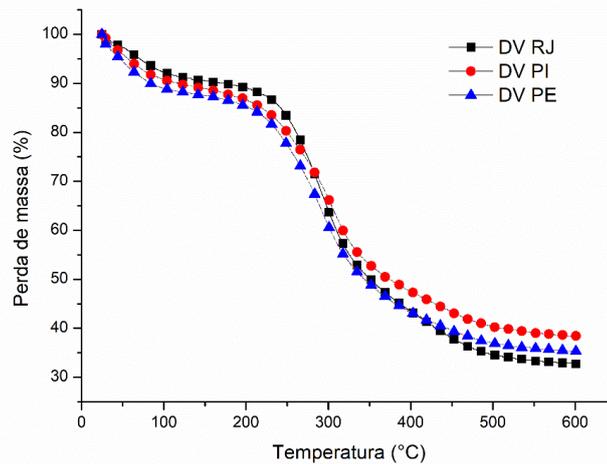
Tais resultados estão em consonância entre si e com resultados obtidos por Brandão e colaboradores (2016). Apesar disso, houve algumas leves divergências em relação aos resultados obtidos para o índice de umidade calculados, o que pode ser explicado através das variações intrínsecas às técnicas, variações na amostragem e, conseqüentemente, tamanhos de partícula.

Tabela 9. Perfil térmico das drogas vegetais.

Droga vegetal	Etapa 1 (desidratação/volatilização)			Etapa 2 (perda de água ligada e outros compostos voláteis)			Etapa 3 (decomposição)			
	Tonset (°C)	Tendset (°C)	Perda de massa (%)	Tonset (°C)	Tendset (°C)	Perda de massa (%)	Tonset (°C)	Tendset (°C)	Tpico (°C)	Perda de massa (%)
<i>M. charantia</i> -PE	39,49	110,44	9,67	188,78	213,18	3,60	257,59	357,31	300,98	46,61
<i>M. charantia</i> -PI	30,86	105,48	9,86	193,87	215,55	3,90	264,56	363,61	307,12	45,52
<i>M. charantia</i> -RJ	38,34	102,32	7,66	196,91	212,75	3,11	252,95	361,02	303,42	54,74

Legenda: Tonset = temperatura de início do evento térmico; Tendset = temperatura de fim do evento térmico; Tpico = temperatura de pico do evento térmico. Fonte: Autoria própria.

Figura 8. Curvas de TG obtidas a partir das drogas vegetais do RJ (DV RJ), do PI (DV PI) e de PE (DV PE).



Fonte: Autoria própria

5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO

Chastity e colaboradores (2015) realizaram um estudo empregando extrato hidroalcolico das folhas de *M. charantia* L. em helmintos da espécie *Ascaris suum*, a mesma que infesta porcos, muito semelhante biologicamente à *Ascaris lumbricoides*, responsável pela infestação em humanos (BARBOSA, 2015). Uma informação relevante é que ambas podem completar seu ciclo de vida em seres humanos, o que embasa a escolha do estudo para desenvolvimento do extrato hidroalcolico.

O método de maceração prova-se como uma metodologia simples que, apesar de maior tempo de extração, ainda possui um bom custo-benefício e não requer aparatos muito tecnológicos. O etanol 70% também é um solvente menos tóxico e com ótima capacidade de extração das principais classes de metabólitos de interesse para a atividade anti-helmíntica, como saponinas (MAJINDA, 2012), flavonoides (CHAVES *et al.*, 2020), taninos (FRAGA-CORRAL *et al.*, 2020) e alcaloides (YUBIN *et al.*, 2014).

A proporção de droga vegetal e solvente empregado foi feita com base no maior rendimento do processo após a secagem e obtenção do extrato seco. Um teste piloto foi conduzido com as proporções de 1:5, 1:10 e 1:20, sendo a primeira escolhida com base no seu resultado de resíduo seco. É esperado que a menor proporção forneça uma maior transferência de massa considerando um mesmo volume de extrato hidroalcolico devido a maior diferença de concentração entre o material vegetal e o solvente. O extrato apresentou aspecto verde intenso, provavelmente devido à presença de clorofila das folhas e talos, aroma característico e levemente adocicado. Os resultados das caracterizações realizadas nos extratos hidroalcolicos estão sumarizados na tabela 10.

Tabela 10. Caracterizações dos extratos hidroalcolicos.

Caracterização	Droga vegetal de PE	Droga vegetal do PI	Droga vegetal do RJ
Grau alcoólico	70,29°GL	70,28°GL	71°GL
pH	8,75 ± 0,017	7,91 ± 0,02	7,8 ± 0,015
Densidade relativa a 20°C	0,88003 ± 0,0008	0,8797 ± 0,0004	0,8785 ± 0,0003
Resíduo seco	3,70% ± 0,0009	3,40% ± 0,0004	2,23% ± 0,0005

Fonte: Autoria própria.

Os valores de grau alcoólico e de densidade de todos os extratos hidroalcóolicos obtidos foram muito próximos dos valores do solvente original, enquanto o pH manteve-se próximo a 8. Os resíduos secos apresentaram uma variação, sendo a o extrato hidroalcóolico do Rio de Janeiro aquele com o menor valor e tal dado foi primordial para escolha dos extratos que seriam utilizados nos ensaios seguintes, pois refletem diretamente no rendimento obtido pela secagem.

5.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO

A secagem do extrato hidroalcóolico para obtenção de um extrato seco, ao invés da utilização de um extrato concentrado na formulação se deu em decorrência de alguns fatores. A redução significativa do solvente empregado, melhoria na estabilidade para armazenamento e uma melhor condição para que os marcadores sejam padronizados (FERNANDES, 2013). Já em relação à escolha da secagem do extrato seco por estufa se deu pela simplicidade da técnica e o bom rendimento obtido com o processo, o mesmo valor obtido para o resíduo seco, em decorrência da semelhança entre as técnicas. Como será visto posteriormente, as classes de metabólitos secundários de interesse ainda permaneceram nos extratos secos.

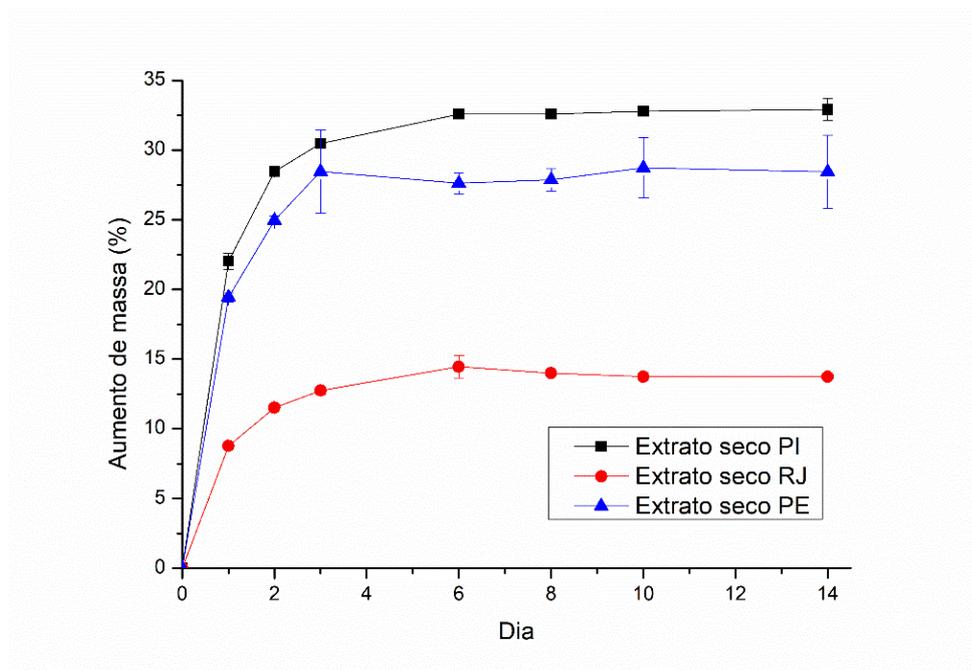
O extrato apresentou aspecto verde brilhante, como pode ser visto na figura 9 e odor característico e adocicado. Depois de armazenado, observou-se que absorvia muito rapidamente a umidade e não podia ser novamente seco em estufa, pois formava uma pasta dura caso submetido ao processo. Tendo em vista a necessidade de se avaliar as características higroscópicas do extrato e, conseqüentemente, predizer as condições ideais de armazenamento, foi conduzido um estudo de higroscopicidade sob umidade relativa próxima a 75%. Os resultados estão sumarizados na figura 10 e revelam que todos os extratos apresentam alta higroscopicidade. Esse fato pode se dar devido à presença de muitos grupamentos hidroxila presentes nos metabólitos secundários identificados na análise fitoquímica, bem como pela presença de açúcares no mesmo. O extrato que apresentou menor aumento de massa percentual foi o do Rio de Janeiro, cerca de 12,5%. Tais resultados corroboram que há necessidade de armazenamento específico para o extrato seco.

Figura 9. Extrato seco de *M. charantia* L..



Fonte: Autoria própria.

Figura 10. Curvas de sorção de umidade dos extratos secos de *M. charantia* L..



Fonte: Autoria própria.

O segundo ponto observado no extrato foi sua baixa solubilidade em água, mesmo com longo período de agitação. Devido à ausência de marcador ativo determinado para a atividade anti-helmíntica, optou-se pela realização de um estudo de

solubilidade empregando método gravimétrico. Através de tais resultados, pode-se ter uma noção da quantidade de sólidos solúveis em um solvente específico. Para o caso das formulações desenvolvidas, como o principal veículo era água, utilizou-se a mesma para o ensaio. Os resultados de solubilidade obtidos para cada um dos extratos estão sumarizados na tabela 11. De acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019), tais valores enquadram os extratos dentro da categoria de termos descritivos como pouco solúveis (1g da substância se dissolve em 100 a 1000 partes de solvente em mililitros), mas, através de análise estatística, pode-se concluir de que o extrato seco de PE apresenta maior solubilidade que os outros dois (valor-p <0,05). Esses resultados podem refletir a presença de substâncias lipofílicas ou de alto peso molecular presentes no extrato, como é o caso de ácidos graxos, terpenos, cumarinas e taninos, passíveis de extração através de etanol 70% (FICHAN; LARROCHE; GROS, 1998; FRAGA-CORRAL *et al.*, 2020; RAO; BABU; DESAI, 2014).

Tabela 11. Valores de solubilidade para extratos secos de *M. charantia* L..

	Extrato seco PE	Extrato seco PI	Extrato seco RJ
Solubilidade (mg/mL)	3,56 ± 0,06	2,93 ± 0,06	2,96 ± 0,23

Fonte: Autoria própria.

5.3.1 Análises termogravimétricas

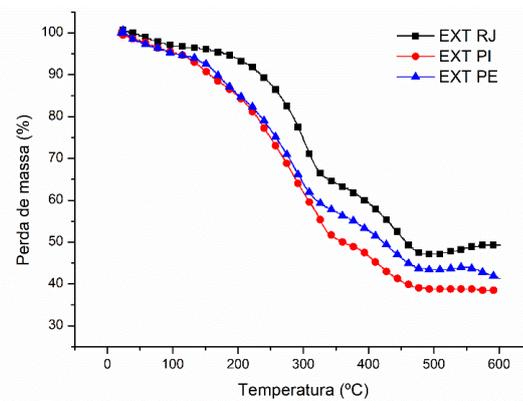
Reproduzindo o comportamento obtido pelas análises termogravimétricas das drogas vegetais, os extratos secos apresentaram perfis térmicos muito parecidos. Houve uma maior perda de massa, provavelmente em decorrência higroscopicidade do extrato seco, além de maior proximidade da etapa de desidratação de perda de água ligada e início da decomposição térmica. Os dados podem ser visualizados na tabela 12 e o perfil térmico na figura 11.

Tabela 12. Perfil térmico dos extratos secos.

Extrato seco	Etapa 1 (desidratação/volatilização)			Etapa 2 (perda de água ligada e outros compostos voláteis)			Etapa 3 (decomposição)			
	Tonset (°C)	Tendset (°C)	Perda de massa (%)	Tonset (°C)	Tendset (°C)	Perda de massa (%)	Tonset (°C)	Tendset (°C)	Tpico (°C)	Perda de massa (%)
<i>M. charantia</i> - PE	27,12	96,38	7,00	234,79	302,40	31,12	310,88	381,77	362,25	17,68
<i>M. charantia</i> -PI	39,23	109,23	5,53	227,58	306,51	34,62	326,85	372,20	356,60	19,53
<i>M. charantia</i> -RJ	39,46	85,89	4,14	250,35	314,98	28,25	337,00	367,84	380,85	20,26

Tonset = temperatura de início do evento térmico; Tendset = temperatura de fim do evento térmico; Tpico = temperatura de pico do evento térmico. Fontes: Autoria própria.

Figura 11. Curvas de TG obtidas a partir dos extratos secos do RJ (EXT RJ), do PI (EXT PI) e de PE (EXT PE).



Fonte: Autoria própria.

5.3.2 Análise fitoquímica

A presença de taninos foi inclusive confirmada através dos resultados da triagem fitoquímica dos três extratos secos. Todos os resultados estão presentes no quadro 3. As classes de metabólitos que possuem interesse para a atividade anti-helmíntica são os alcaloides, flavonoides, saponinas e taninos. Dessas quatro classes, os resultados da análise fitoquímica confirmaram a presença de três, os alcaloides, saponinas e taninos.

Quadro 3. Triagem fitoquímica dos extratos.

Classe de metabólitos	Extrato seco PI	Extrato seco RJ	Extrato seco PE
Alcaloides	+	+	+
Antocianinas	-	-	-
Antraquinonas	+++	+++	+++
Compostos fenólicos	+	+	+
Cumarinas	+	++	+
Derivados antracênicos	+	+	+
Lignanas	++	+	+
Mono, sesqui e diterpenos	+	+	+
Naftoquinonas	-	-	-
Saponinas	+++	+	++
Taninos condensados	-	-	-
Taninos hidrolisáveis	+	+	+
Triterpenos e esteroides	-	-	-
Xantinas	-	-	-

Legenda: (-) ausente; (+) fracamente positivo; (++) moderadamente positivo; (+++) fortemente positivo. Fonte: Autoria própria.

Os mecanismos pelos quais tais classes agem sobre os helmintos para gerar sua atividade ainda são desconhecidos, mas alguns já foram sugeridos em literatura. Os taninos provavelmente possuem atividade anti-helmíntica em decorrência da capacidade de interação de suas moléculas com proteínas da cutícula e do trato gastrointestinal de helmintos, além de possuírem capacidade de diminuir a migração de larvas (CHASTITY *et al.*, 2015; HOSTE *et al.*, 2015; JIRAUNGKOORSKUL; POOLPERM, 2017).

Os alcaloides já são amplamente descritos em literatura como agentes anti-helmínticos devido à suas propriedades neurotóxicas, alterando as propriedades de canais iônicos e diferentes receptores neuronais, além de poderem interagir com receptores de acetilcolina, causando paralisia muscular (BAURI; TIGGA; KULLU, 2015; WINK, 2012).

As saponinas presentes em *M. charantia* L. são uma das principais classes conhecidas por possuírem diversas atividades descritas, como é o caso das momordicinas I e II, karantina e momordicosídeos (JOSEPH; JINI, 2013). As atividades a ela atribuídas são principalmente por alterações causadas nas membranas celulares dos tegumentos de helmintos, o que causaria a criação de microporos, desestabilizando a membrana (BAURI; TIGGA; KULLU, 2015; MELZIG; BADER; LOOSE, 2001). O extrato seco do Rio de Janeiro apresentou uma menor intensidade de resposta para as saponinas, o que pode levar a uma menor higroscopicidade, já que os extratos com maiores quantidades de saponinas podem adsorver mais água em decorrência da alta presença de açúcares e, conseqüentemente, grupamentos hidroxilas. Além da menor resposta para saponinas, o extrato seco do RJ, apresentou menor resíduo seco e maior índice de umidade, além de possuir características específicas induzidas pelo fornecedor. Por essa razão, as análises seguintes só foram conduzidas com os extratos secos de PE e do PI.

5.3.3 Doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a DAD

A quarta classe de metabólitos de interesse para a atividade anti-helmíntica são os flavonoides. Assim como os grupos de metabólitos anteriores, não possuem mecanismo de ação bem definido, mas alguns meios são propostos em literatura, como inibição da cascata do ácido araquidônico e diminuição da motilidade larval (JI-RAUNGKOORSKUL; POOLPERM, 2017; WILLIAMS *et al.*, 2014). Como não foram conduzidos testes na triagem fitoquímica para essa classe em específico, apenas para uma classe mais abrangente, a dos compostos fenólicos, um estudo de CLAE-DAD foi conduzido. Através de análise exploratória por cromatografia líquida acoplada a espectrofotometria de massas (LC-MS), em outros estudos do grupo, foram

identificados dois marcadores de majoritários e de fácil obtenção na indústria de padrões: a iso-quercetina e a astragalina, ambos flavonoides.

A astragalina apresentou tempo de retenção de 33,81min e picos de absorção em 265nm e 384nm, enquanto a iso-quercetina, de 32,04min e em 201nm, 256nm e 354nm. As curvas de calibração geraram as seguintes equações de reta: $y=222509x+10056$ para a astragalina e $y=411105x+11519$ para a iso-quercetina, ambas com valores de $R^2=0,998$. A tabela 13 apresenta os resultados obtidos. De modo a complementar a informação obtida por CLAE-DAD, foi desenvolvido e validado um método para determinação de flavonoides totais em tais extratos.

Tabela 13. Teor de isoquercetina e astragalina em extratos secos de *M. charantia* L..

Extratos	Teor isoquercetina ($\mu\text{g/mL}$)	Teor Astragalina ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato seco PI	$3,70 \pm 0,48$	$4,63 \pm 0,11$
Extrato seco PE	$4,94 \pm 0,37$	$3,64 \pm 0,68$

Fonte: Autoria própria.

Os resultados, quando comparados com outras análises feitas em literatura, por HPLC, ainda são baixos. Diversos fatores podem influenciar esse processo, como método de extração, solvente empregado, local e época de colheita, entre outros. Um estudo de Shodehinde e colaboradores (2016) obteve, para extratos metanólicos das folhas, a concentração de 80,62mg/g de quercetina nas folhas e a astragalina e iso-quercetina não foram doseadas, um possível indicativo sobre o teor de isoquercetina. Com o intuito de se avaliar a quantidade total de flavonoides, também foi desenvolvido método para seu doseamento.

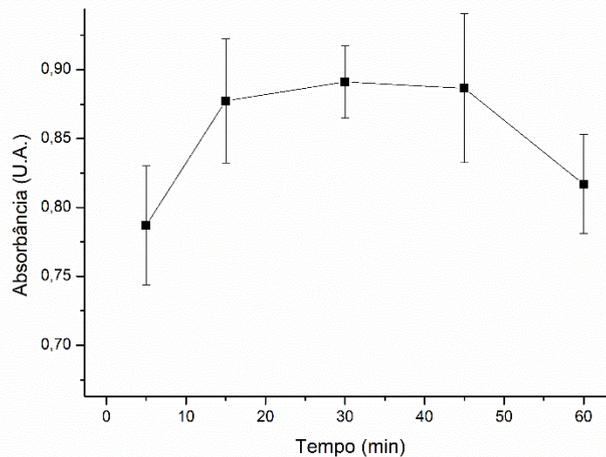
5.3.4 Desenvolvimento de metodologia analítica para doseamento de flavonoides totais

Apesar do método ser baseado em um trabalho já publicado, optou-se pela reprodução do mesmo e verificação das condições ideais antes de se partir para a validação analítica. O primeiro parâmetro que foi avaliado foi o comprimento de onda em que seria feita as demais leituras. O método de quantificação de flavonoides totais por colorimetria empregado utiliza cloreto de alumínio como agente revelador, já que

o alumínio se complexa com os grupamentos hidroxila em C3 e C5 e com o grupamento carbonila em C4, alterando a coloração (CHANG et al., 2002). O comprimento de onda máximo observado foi de 411nm, valor adotado para todos os demais ensaios.

O segundo parâmetro analisado foi o tempo de reação, que idealmente deveria apresentar o menor valor e maior absorbância. Como pode ser visto na figura 12, o tempo com maior absorbância foi o de 30min. Também foi levado em consideração valores menores de desvios-padrão.

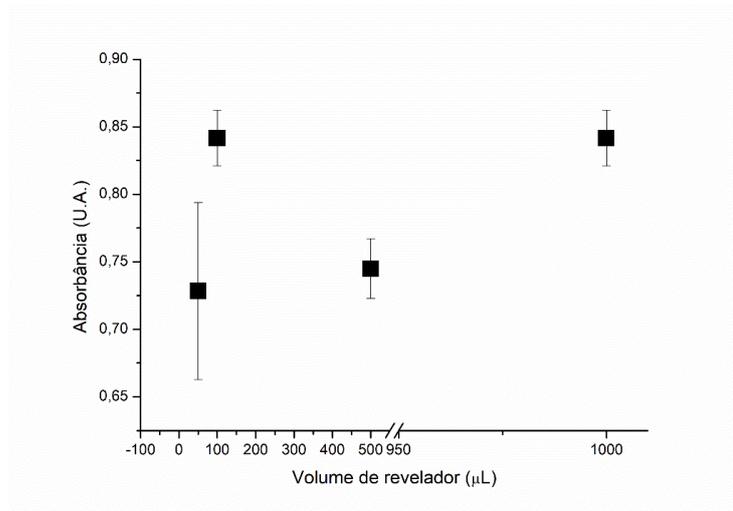
Figura 12. Absorbâncias encontradas para diferentes tempos de reação.



Fonte: Autoria própria.

O terceiro e último parâmetro analisado foi o volume da solução reveladora de cloreto de alumínio empregada. O volume ideal e fixado para as análises seguintes foi de 100 μ L devido a uma maior absorbância, menores valores de desvios-padrão e menor volume de reagente, como pode ser visto na figura 13.

Figura 13. Absorbâncias encontradas para diferentes volumes de solução de cloreto de alumínio.

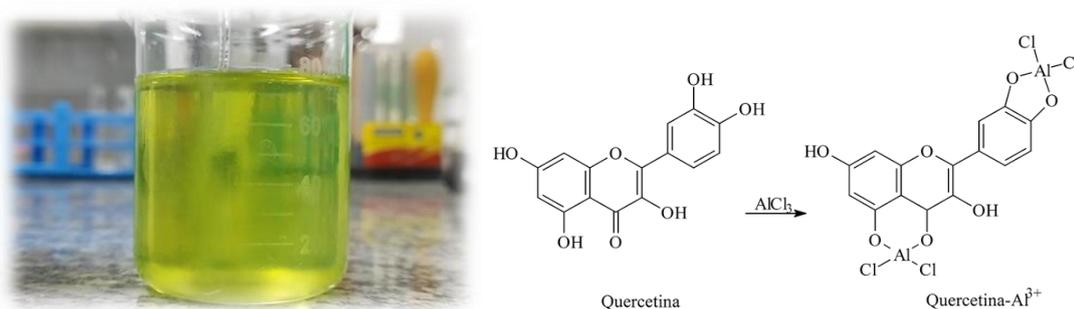


Fonte: Autoria própria.

5.3.5 Validação do método analítico

O primeiro parâmetro avaliado do método foi a seletividade e ele diz respeito a capacidade que o mesmo possui de distinguir o analito em questão de outros compostos e possíveis interferentes. O método é baseado na complexação dos íons de alumínio em solução acidificada com grupamentos hidroxila presentes e o grupamento cetona presente nos flavonoides, sendo o complexo formado de coloração amarelada (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). A figura 14a demonstra a coloração adquirida pela amostra após a complexação e a figura 14b a reação de complexação.

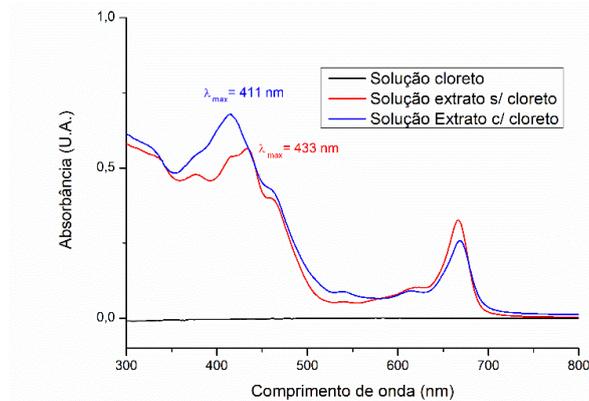
Figura 14. (a) Solução extrativa após complexação entre flavonoides e íons de alumínio. **(b)** Reação entre a quercetina e o cloreto de alumínio.



Fonte: Autoria própria; MABRY, MARKHAM, THOMAS (1970)

O gráfico contendo o perfil espectrofotométrico das soluções está presente na figura 15. Pode-se observar que, além do aumento da absorbância na região, também ocorreu um deslocamento da absorbância máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) de 433nm para um menor comprimento de onda, 411nm, indicando seletividade do método.

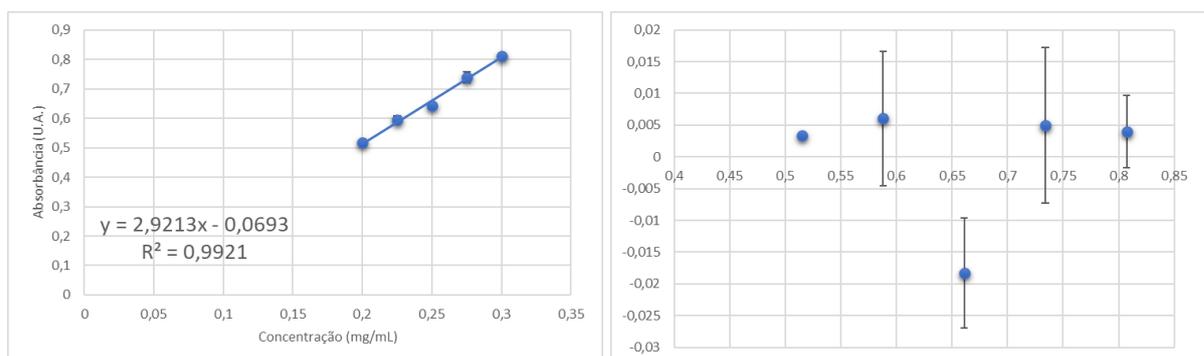
Figura 15. Perfil espectral na região do UV/Vis de diferentes soluções contendo extrato seco e agente revelador.



Fonte: Autoria própria.

A RDC 166/2017 preconiza que o método deve ser linear na faixa de trabalho, de modo que a resposta obtida seja proporcional à concentração da amostra. A determinação da linearidade do método é verificada através da análise do coeficiente de correlação (R^2) calculado a partir da regressão linear. Como pode ser visto na figura 16a, o extrato demonstrou resposta linear e coeficiente de correlação maior que 0,99. É importante salientar que as concentrações são do extrato seco e não de flavonoides totais. A análise de dispersão de resíduos também demonstrou dispersão dos mesmos ao redor de zero e resultados satisfatórios, como pode ser visto na figura 16b.

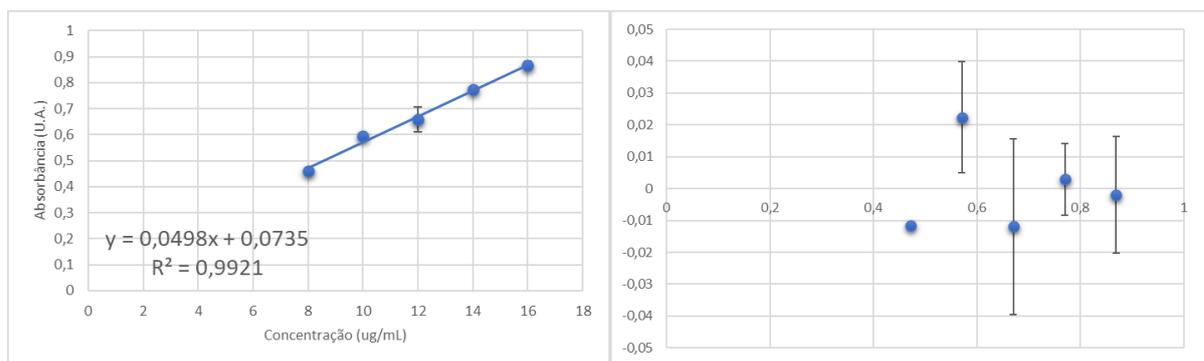
Figura 16. (a) Curva de regressão linear obtida a partir da leitura de extratos secos de *M. charantia* L. em reação seletiva para flavonoides totais. **(b)** Gráfico de dispersão de resíduos.



Fonte: Autoria própria.

Foi avaliada também a linearidade da resposta do padrão de quercetina utilizado, de modo a ser também gerada uma curva de calibração que serviria para estimar os resultados em miligramas equivalentes de quercetina. A curva e o gráfico de dispersão de resíduos estão presentes na figura 17a e 17b, respectivamente. Pode ser observado que novamente o coeficiente de correlação (R^2) foi maior que 0,99 e que os resíduos se distribuíram de modo adequado. A equação de reta gerada foi $y=0,0498x + 0,0735$.

Figura 17. (a) Curva de regressão linear obtida a partir da leitura de padrão de quercetina em reação seletiva para flavonoides totais. **(b)** Gráfico de dispersão de resíduos.



Fonte: Autoria própria.

A precisão do método reflete o quanto há proximidade entre os resultados obtidos e foi demonstrada através da repetibilidade, correlacionada com a variabilidade intracorridas. Os resultados podem ser vistos da tabela 14, onde o valor obtido para o desvio-padrão relativo foi satisfatório, já que o preconizado é que seja menor que 5%.

Tabela 14. Resultados do ensaio de precisão.

Amostra	A	B	C	D	E	F	Média	Desvio-padrão	Desvio-padrão relativo
Concentração (μ Eq de Quercetina/mL)	9,40	9,74	9,88	9,82	9,22	9,26	9,56	0,26	2,82%

Fonte: Autoria própria.

Já a exatidão demonstra a capacidade do método de indicar os valores corretos quando comparados com os teoricamente obtidos. Para a análise em questão, foram feitas as determinações de três concentrações fortificando a amostra com o padrão de quercetina, calculando-se a taxa de recuperação e se comparando os resultados com os teóricos. Os resultados podem ser visualizados na tabela 15. Todos os valores

de desvio-padrão relativos apresentaram-se abaixo do valor máximo, de 5%, e todas as taxas de recuperação apresentaram ótimos valores, compreendidos entre 80% e 110%. De acordo com a RDC 166/2017 da ANVISA não existem valores específicos para os limites de recuperação, mas alguns autores citam a quantidade de analito de interesse na amostra e, quanto menor a quantidade, maiores o intervalo de aceitação (BRITO, 2002). Devem ser levados também alguns fatores associados, como é o caso da natureza da amostra, que é uma matriz, e a própria variabilidade da matéria de análise, obtida a partir de fontes vegetais. A análise através de ANOVA fator único demonstrou que os valores de $F_{\text{calculado}}$ (3,22) foram menores que os do F_{tabelado} (7,70), não existindo diferença significativa entre os resultados.

Tabela 15. Resultados da exatidão e recuperação da quercetina em amostras de extratos de *M. charantia* L.. [] = concentração; DP = desvio-padrão; DPR = desvio-padrão relativo.

Nível (%)	[] teórica (µg/mL)	Amostra	[] experimental (µg/mL)	DP	DPR (%)	Recuperação
80	13,06	A	13,06	0,55	4,18%	103,93%
		B	12,84			
		C	13,94			
100	16,05	A	16,05	0,75	4,78%	102,31%
		B	16,25			
		C	14,76			
120	18,30	A	18,30	0,27	1,46%	101,01%
		B	19,08			
		C	19,48			

Fonte: Autoria própria.

A robustez do método é um indicativo sobre as condições limites sob o qual o método opera ainda em conformidade ao esperado. Foram escolhidos alguns parâmetros que poderiam interferir nos resultados, como é o caso da luminosidade, o solvente utilizado na solubilização das amostras de extratos secos e do padrão de quercetina e o pH. A tabela 16 sumariza os resultados encontrados. Em todos os casos os valores de $F_{\text{calculados}}$ foram menores que os de $F_{\text{tabelados}}$, o que indica que o método é robusto para as variações propostas.

Tabela 16. Resultados dos ensaios de robustez.

Variáveis	Nível (%)	[] média (µg/mL)	DPR	Recuperação (%)	Valores de F
Presença de luz	80	11,68	2,62%	86,0%	F _{calc.} = 1,80 F _{tab.} = 7,70
	100	15,55	1,22%	101,1%	
	120	18,17	2,05%	95,7%	
Solvente B	80	11,27	1,35%	81,4%	F _{calc.} = 1,26 F _{tab.} = 7,70
	100	14,64	3,98%	93,2%	
	120	17,88	0,26%	93,7%	
pH 4,21	80	12,07	3,37%	90,4%	F _{calc.} = 1,66 F _{tab.} = 7,70
	100	15,09	0,53%	97,1%	
	120	16,10	2,58%	81,7%	

Fonte: Autoria própria

Levando em consideração todos os resultados desenvolvidos ao longo da validação pode-se inferir que o método é seletivo, linear, preciso, exato e robusto dentro das condições especificadas. O extrato seco foi então doseado para determinação do teor de flavonoides totais e a concentração determinada foi de $46,81 \pm 4,07$ mgEqQ/g de extrato seco, onde mgEqQ é miligrama equivalente de quercetina.

5.4 DESENVOLVIMENTO INICIAL DAS FORMULAÇÕES

Conforme explicitado, a dose estimada para as formulações desenvolvidas foi baseada num trabalho que empregou mesma metodologia de extração e mesmo solvente. Também ocorreram algumas extrapolações de dados que não haviam sido informados no artigo, como proporção de droga vegetal e solvente e resíduo seco do extrato empregado nos experimentos. No estudo de Chastity e colaboradores (2015), os testes foram realizados com vermes de *Ascaris suum* in vitro e empregavam concentrações-teste de 20%, 40% e 80% de extrato em relação ao controle positivo, palmoato de pirantel. Como não houve diferenças significativas entre as doses de 40% e 80%, a dose de 40% foi escolhida. O cálculo para dose foi feito da seguinte forma:

- No estudo, o controle negativo (solução 0,9% de NaCl) foi adicionado ao local de testagem em um volume de 12,5mL;
- Admitiu-se que esse foi o volume padrão testado para os demais grupos;

- c) A concentração de 40% foi equivalente a 5mL de extrato líquido (40% de 12,5mL);
- d) Foi levado em consideração o rendimento de 3,40% como sendo o rendimento do extrato seco da referência utilizada, baseado nos valores do resíduo seco obtido do extrato hidroalcolico do PI, uma vez que não há dados no estudo destrinchando informações sobre o mesmo;
- e) O extrato do PI foi utilizado como padrão por possuir menor valor de resíduo seco que o extrato de PE, enquanto o do RJ foi descartado a partir das análises anteriores
- f) Nos 5mL de extrato fluido empregado no teste do estudo a quantidade teórica de extrato seria de 0,1719 g de extrato seco (o que representaria aproximadamente 0,2% se fosse adicionado diretamente a 100mL da formulação).
- g) Devido a alguns fatores, como: não haver estudos que correlacionem essa dose *in vitro* com alguma *in vivo* (extratos com as mesmas características), por haver presença de enzimas e meios que podem realizar a degradação de alguns dos compostos ao longo do trato gastrointestinal, bem como diferentes níveis de infestação pelos geo-helminthos, a dose foi aumentada, respeitando a toxicidade encontrada em outro estudo do grupo.
- h) Os valores de concentração empregados nas formulações testadas foram 4x maiores (0,8%) e 8x maiores (1,6%).

5.4.1 Xarope para diabéticos

Medicamentos que não causam mal ao público diabético têm ganhado atenção nos últimos tempos, acompanhando a indústria alimentícia, com quantidades cada vez maiores de produtos dietéticos, ou seja, livres de monossacarídeos ou dissacarídeos (VIGGIANO, 2003). Num primeiro momento isso facilita o acesso de tais produtos a pessoas diabéticas e engloba um número maior de pessoas passíveis de utilização do medicamento, sendo a razão pela qual inicialmente optou-se por uma formulação líquida com aspecto de xarope.

A primeira formulação testada, a LB I XD, foi desenvolvida com base nos estudos de desenvolvimento de xaropes para diabéticos com o emprego de extrato

concentrado de guaco, realizado por Lubi, Sato e Gaensly, (2003). Foi realizada uma avaliação de diversos polímeros no estudo, mas para os testes iniciais para a formulação LB I XD, foi utilizado um dos polímeros, a carboximetilcelulose (CMC), como agente doador de viscosidade principal. Foi utilizado o sistema conservante composto por propilparabeno e metilparabeno, de eficácia já bem estabelecida para formulações líquidas e semissólidas (HAMAN et al., 2015). Propilenoglicol, glicerina e a solução de sorbitol a 70% foram utilizados como doadores de viscosidade, edulcorantes e cos-solventes. A sacarina e a solução de mentol apresentaram-se como edulcorante e flavorizante, sendo este último empregado em decorrência da coloração esverdeada inicialmente desenvolvida pela formulação.

A LB I XD apresentou coloração esverdeada, aroma de mentol associado ao do extrato seco e um sabor amargo muito forte e adstringente. Tal sabor é característico de preparações que empregam *M. charantia* L., em decorrência das saponinas nelas presentes (JOSEPH; JINI, 2013). Além disso, houve muita dificuldade na solubilização do extrato, que persistentemente apresentou grumos mesmo após homogeneização contínua e tal fator poderia estar contribuindo para um aumento no amargor da formulação. Após um certo período de tempo em repouso houve a separação entre o extrato e a fase líquida, que obteve um tom amarelado.

A palatabilidade de medicamentos pediátricos é um ponto fundamental no seu desenvolvimento (BATCHELOR; MARRIOTT, 2015) e por isso a formulação foi repensada de modo a se diminuir o amargor, sendo esta nomeada LB II XD. Como a dose calculada foi inicialmente extrapolada para 8x o seu valor original, optou-se pela diminuição da mesma para metade, ou seja, 0,8% p/v da formulação total. Além disso a quantidade de sacarina foi aumentada de modo a melhorar o gosto açucarado, atrativo para crianças e foram adicionados dois agentes mascarantes de sabor amargo conhecidos, o ácido cítrico e o cloreto de sódio. Foram testadas duas essências, a de hortelã e a de chocolate, sendo esta última escolhida devido à mudança de coloração provocada pela presença do ácido cítrico, que passou a ser mais amarronzada. A presença do cloreto de sódio e do ácido cítrico e o aumento da sacarina melhoraram consideravelmente o sabor da formulação, mas o amargor ainda persistia muito forte e adstringente.

Uma última tentativa foi realizada no desenvolvimento do xarope de diabéticos, sendo esta formulação nomeada LB III XD. O propilenoglicol teve sua concentração

aumentada para o máximo permitido, 25%, de acordo com o *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (ROWE; SHESKEY; WELLER, 2017), com o propósito de melhorar a solubilidade do extrato na formulação como um todo, sendo este adicionado junto aos parabenos no propilenoglicol já resfriado, apenas sob agitação contínua. O ácido cítrico foi removido e o cloreto de sódio apenas conseguiu manter a diminuição do amargor causada pela formulação anterior. Ao invés de água purificada como veículo, suco de groselha concentrado foi adicionado à mesma de modo a alterar as propriedades organolépticas, uma prática realizada em algumas farmácias de manipulação.

Apesar de todas essas alterações, a formulação ainda permaneceu com um sabor amargo forte e adstringente. A partir desse momento, decidiu-se que a formulação para diabéticos seria descartada em detrimento de uma formulação que empregasse como base o xarope de sacarose comum, com algumas modificações.

5.4.2 Suspensão

Devido à baixa solubilidade do extrato no meio, as seguintes formulações não podem ser consideradas xaropes, mas sim, suspensões. O primeiro método de preparo se baseou em trabalho de Rocha e colaboradores (2008), a qual utilizou sacarose como agente doador de viscosidade e edulcorante, o que resultou na formulação LB I XS, na esperança de que o sabor doce da base de xarope conseguisse mascarar o gosto. Houve pouca melhora em relação à formulação anteriormente desenvolvida e o sabor doce inicial acabou realçando o amargor. Apesar disso tal formulação possuía 1,6% (p/v) de extrato seco, o valor inicialmente pensado para a mesma.

A última formulação, a LB II XS, foi baseada num trabalho que desenvolveu um xarope que continha derivados de *Azadirachta indica* e de *Phyllanthus niruri* L., ambas plantas de gosto amargo (NEMA et al., 2011). A base de xarope de sacarose foi preparada separadamente e adicionada de citrato de sódio e cloreto de sódio previamente solubilizados. Optou-se pela troca do ácido cítrico pelo citrato de sódio em decorrência de uma avaliação preliminar empregando diferentes concentrações de ácido cítrico que causaram a separação permanente do extrato e alteração profunda na cor da formulação, um forte indicativo de instabilidade, como pode ser observado na figura 18. O extrato foi solubilizado numa mistura empregando propilenoglicol e glicerina na

proporção de 1:1 durante tempo especificado de modo a melhorar a dispersão das partículas do mesmo no produto final, que pode ser observado na figura 19, ambos com função de edulcorantes e cossolventes (ECCLES, 2020). O mentol novamente foi escolhido como flavorizante devido à coloração final da formulação, que pode ser observada na figura 20.

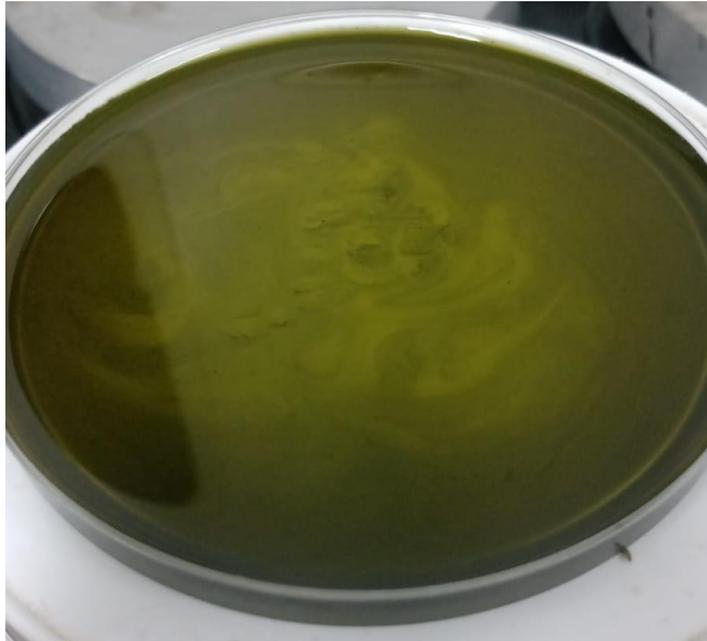
Tal formulação apresentou uma grande melhoria no sabor, que ficou significativamente menos amargo e adstringente, com os sabores adocicado e refrescante do mentol em evidência. Além da presença do citrato de sódio e cloreto de sódio, acredita-se que a solubilização prévia na mistura de glicerina e propilenoglicol, além do emprego de base de xarope simples foram todos fatores contribuintes para melhoria no sabor. A melhor dispersão das partículas de extrato na suspensão final poderia permitir que o líquido fosse deglutido de modo mais homogêneo, não deixando sabor residual muito forte. Após certo período de tempo, a formulação apresentou separação de fases menos acentuada e facilmente convertível com agitação leve, um bom indicativo da estabilidade. Tendo em vista todos esses resultados positivos, tal formulação foi selecionada para um estudo de otimização através de delineamento experimental.

Figura 18. Formulação contendo ácido cítrico antes (a) e após (b) agitação.



Fonte: Autoria própria.

Figura 19. Extrato seco de *M. charantia* L. disperso em mistura 1:1 de propilenoglicol e glicerina.



Fonte: Autoria própria.

Figura 20. Formulação LB II XS.



Fonte: Autoria própria.

5.4.3 Delineamento experimental

Visando otimização da formulação LB II XS, foi realizado um delineamento experimental do tipo planejamento fatorial completo que levou em consideração a concentração da mistura dos cossolventes empregados, visto que poderia haver interferência direta na dispersão do extrato seco na formulação, a concentração de citrato de sódio, que interferiria no sabor, e o tempo de agitação final da formulação, que poderia interferir na dispersão das partículas de extrato na suspensão. Foram avaliados o pH, a viscosidade e o sabor das formulações para determinação da formulação com o melhor perfil de resultados.

A tabela 17 sumariza os resultados obtidos para cada um dos ensaios feitos. Como pode ser visto, os valores de viscosidade variaram entre aproximadamente 65 e 105mPa.s. Tais resultados indicam que a suspensão apresenta viscosidade elevada, o que favorece a manutenção termodinâmica, estabilizando as partículas dispersas de extrato seco, além de possuir uma vantagem de permitir menos contato entre as partículas e as papilas gustativas da língua, diminuindo o amargor sentido. Por outro lado, também é importante que os valores estejam em faixas aceitáveis de viscosidade pois elevados valores podem desestabilizar a dispersão das partículas, formando uma fase difícil de ser ressuspensa (WEINER, 1986). Algumas outras formulações em forma de suspensão e xarope contendo extratos de plantas medicinais chegaram a valores de viscosidade próximos aos encontrados, inclusive uma contendo extrato alcoólico de *M. charantia* L., que apresentou valores de viscosidade entre próximos a 50mPa.s (COSTA *et al.*, 2015; DANDAGI *et al.*, 2008 OWUSU *et al.*, 2021).

Os valores de pH também se apresentaram ao redor da neutralidade, fator positivo especialmente se levado em consideração que o ácido cítrico conseguia, através da diminuição de pH, desestabilizar a formulação. Além disso, o pH ideal para formulações líquidas de uso oral são aqueles próximos a 7,0 (JONES, 2016). Pode ser observado que concentrações maiores de citrato de sódio aumentaram o pH, visto que ele é utilizado como agente tamponante e possui faixa de pH acima de 7,0 (HOWE; SHESKEY; WELLER, 2017).

A última resposta avaliada foi o sabor. De modo a se padronizar, estabeleceu-se que o sabor seria ruim (atribuído 0), regular (atribuído 1) e bom (atribuído 2), a título de comparação entre elas. Como a formulação tem apelo pediátrico, o sabor de demonstra como um parâmetro fundamental, pois afeta diretamente a adesão ao tratamento.

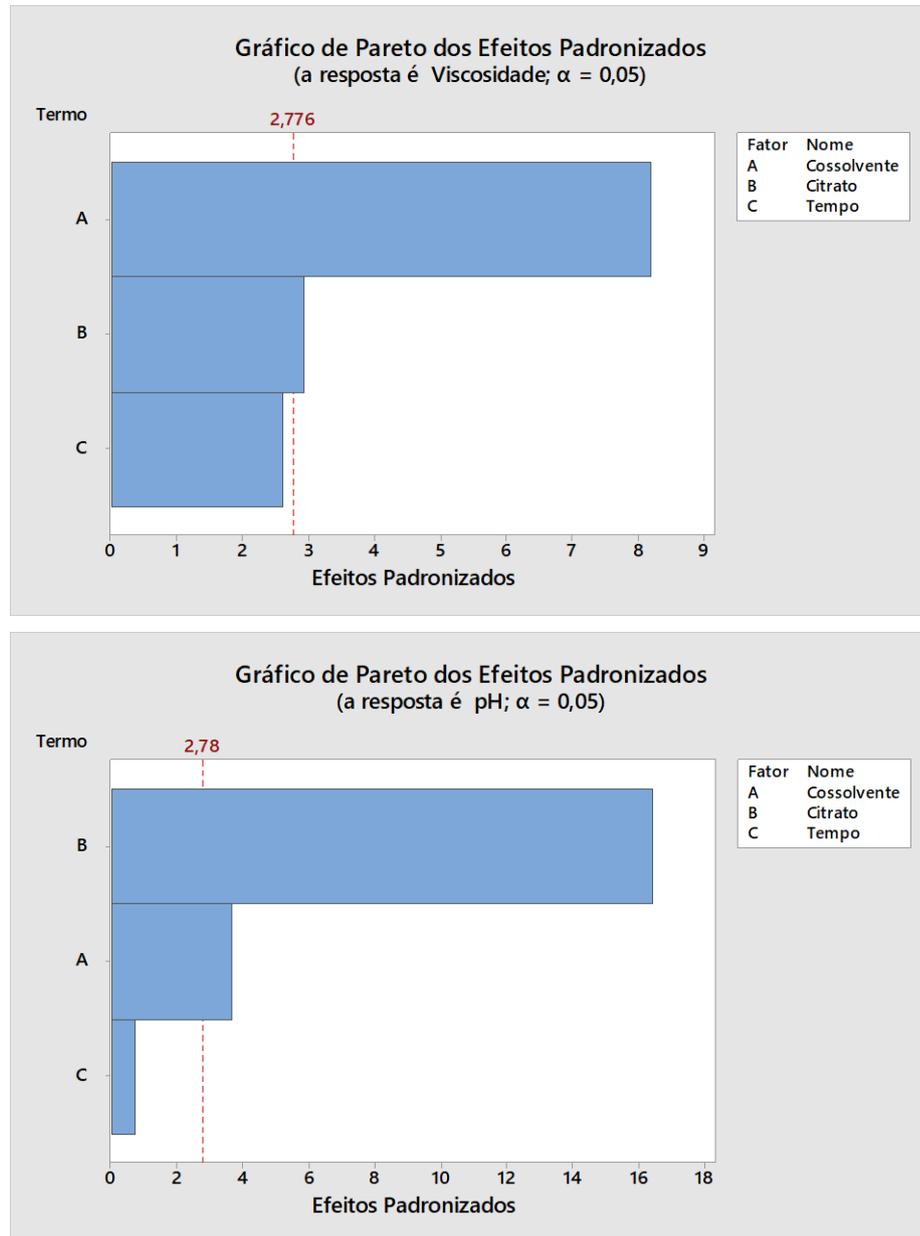
Tabela 17. Resultados do delineamento experimental.

Número do experimento	Cossolvente (%)	Citrato (%)	Tempo (min)	Viscosidade (mPa.s)	pH	Sabor
1	20	0,5	5	74,4	6,88	0
2	40	0,5	5	104,3	6,99	0
3	20	3	5	65,2	7,23	0
4	40	3	5	87,8	7,37	0
5	20	0,5	10	81,5	6,9	1
6	40	0,5	10	103,5	6,95	0
7	20	3	10	78,4	7,32	2
8	40	3	10	98,5	7,37	1

Fonte: Autoria própria.

As análises através dos gráficos de Pareto para as respostas de pH e viscosidade demonstraram que o tempo de agitação não influenciou, como pode ser visto na figura 21a e 21b. O pH foi mais afetado pela concentração de citrato em decorrência da concentração de cossolventes, visto que o citrato possui a capacidade tamponante. Quanto à viscosidade, ambos interferem, mas a concentração de cossolvente foi mais crítica, o que pode ser explicado pela alta densidade do propilenoglicol e da glicerina, de modo que, quanto maior sua concentração, maior a viscosidade.

Figura 21. (a) Gráfico de Pareto para a resposta da viscosidade. **(b)** Gráfico de Pareto para a resposta do pH.



Fonte: Autoria própria.

A formulação 7 se destacou das demais, sendo a escolhida como formulação final por, além disso, também possuir uma menor quantidade de cossolventes. Seu pH foi de 7,32 e sua viscosidade de 78,4mPa.s. A formulação pode ser vista na figura 22. O armazenamento foi realizado em frasco de vidro âmbar para evitar degradação a longo prazo de compostos fotossensíveis possivelmente encontrados no extrato. Tal qual a formulação LB II XS, apresentou aspecto viscoso, coloração verde escura intensa e sabor adocicado e refrescante, com um amargor residual no fundo da língua.

Figura 22. Formulação LB II XS otimizada.



Fonte: Autoria própria

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando em consideração os resultados obtidos das diferentes drogas vegetais, o trabalho desenvolvido mostra-se como um passo importante para realização de mais estudos comparativos com os resultados inéditos referentes às caracterizações farmacognósticas de *M. charantia* L.. As análises tornam possível a observação de que ocorreram diferenças significativas entre alguns parâmetros das drogas vegetais de PE, PI e RJ, o que sugere influência direta do local de cultivo e colheita, que precisa ser mais investigado, assim como a influência sazonal. O índice de umidade e o perfil termogravimétrico apresentam boa estabilidade para as drogas vegetais analisadas.

O extrato seco obtido apresentou perfil térmico semelhante ao da droga vegetal, com os eventos de decomposição se iniciando em menores temperaturas para os extratos secos, o que é esperado, visto que alguns compostos presentes na estrutura da droga vegetal não estão presentes no extrato. Apesar disso, não há indícios de instabilidade térmica do extrato seco. Os extratos secos apresentaram rendimento passível de produção em larga escala, alta higroscopicidade, requerendo condições específicas para o armazenamento, além de serem pouco solúveis em água. O perfil fitoquímico observado constatou que há presença dos principais metabólitos de interesse para a atividade anti-helmíntica, como saponinas, alcaloides e taninos. As análises por CLAE-DAD indicaram também a presença de alguns flavonoides, resultado que motivou o desenvolvimento e validação de um método de doseamento de flavonoides totais, que obteve sucesso e indicou quantidades ainda maiores de flavonoides totais.

As formulações passaram por um longo processo de desenvolvimento tecnológico devido às propriedades organolépticas dos extratos de *M. charantia* L., com sabor amargo e adstringente. A formulação LB II XS foi definida como a melhor tanto em questões de sabor quanto em relação a sua estabilidade macroscópica, apresentando xarope de sacarose, glicerina, propilenoglicol, cloreto de sódio, citrato de sódio e o extrato seco.

Objetivando otimização da mesma foi conduzido um delineamento experimental do tipo planejamento fatorial completo para otimização dessa formulação escolhida, de modo a serem também determinados alguns parâmetros como viscosidade

e pH. A formulação final apresentou uma quantidade menor de glicerina e propileno e uma concentração maior de citrato, que parece ter contribuído com o sabor da mesma. A viscosidade foi de 78,4mPa.s e o pH de 7,32, ambos ideais para administração por via oral. O sabor permaneceu com as mesmas características gerais da formulação LB II XS, mas foi observada diminuição no amargor residual, tornando-a ainda mais ideal para uso pediátrico.

Dessa forma, conclui-se que os extratos secos obtidos através de maceração hidroalcolica de *M. charantia* L. podem ser veiculados em formas farmacêuticas líquidas do tipo suspensão com boa estabilidade preliminar, viscosidade e pH ideal para administração e sabor agradável. Assim, o novo produto torna-se uma possível alternativa para o combate de geo-helmintíases em populações pediátricas, ainda sendo necessários estudos adicionais.

Como perspectivas, espera-se realizar estudos de sazonalidade com *M. charantia* L., realizar estudos de toxicidade com os extratos secos utilizados e estudos de eficácia em modelos animais com a formulação desenvolvida. Além disso também se almeja realizar estudos de estabilidade acelerada com a formulação desenvolvida e, mais ao futuro, transferir a tecnologia para a indústria e incorporar o produto desenvolvido no SUS.

REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, Diego-Abelardo *et al.*. Overcoming the global burden of neglected tropical diseases. **Therapeutic Advances In Infectious Disease**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-3, 2020.

ALVES, Cibele Cristina de Oliveira. **Pós obtidos da polpa de pequi (Caryocar brasiliense camb.) liofilizada**: higroscopicidade e microestrutura. 2007. 182 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007

AGOSTINE, Mário Griz Ângelo. Intérprete: Expedito Baracho. Frevo principalmente alegre. In: 20 Super Sucessos. Recife: Somax, 1999. Faixa 2.

BARBOSA, Fernando Sérgio. **Potencial Zoonótico da Ascariidose Humana e Suína**: Aspectos moleculares, morfológicos e filogenéticos das espécies. 2015. 94 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

NETO B. B., SCARMINIO, I. S., BRUNS R E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2ª ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2001.

BATCHELOR, Hannah K.; MARRIOTT, John F.. Formulations for children: problems and solutions. **British Journal Of Clinical Pharmacology**, [S.L.], v. 79, n. 3, p. 405-418, 2015.

BAURI, R. K.; TIGGA, Mary Nisha; KULLU, Singray Saleeb. A review on use of medicinal plants to control parasites. **Indian Journal Of Natural Products And Resources**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 268-277, 2015.

BECHO, Uliana Raso Marques; MACHADO, Hussen; GUERRA, Martha de Oliveira. Rutina: estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 21-25, 2009.

BELOIN, Nadine *et al.* Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 96, n. 1-2, p. 49-55, 2005.

BORGES, Daiani de Bem. **Comparação de metodologias analíticas para ensaios de pureza no controle de qualidade de matérias-primas farmacêuticas de origem vegetal**. 2005. 160 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

BOTH, Fernanda Lima. **Avaliação do perfil psicofarmacológico de psicotina isolada de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae)**. 2005. 177 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BRANDÃO, Deysiane Oliveira *et al.* Model Analytical Development for Physical, Chemical, and Biological Characterization of Momordica charantia Vegetable Drug. **Journal Of Analytical Methods In Chemistry**, [S.L.], v. 2016, p. 1-15, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe Técnico e Operacional**: v campanha nacional de hanseníase, verminoses, tracoma e esquistossomose. Brasília: Ministério da Saúde, 2017a. 17 p.

BRASIL, RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 24 jul. 2017b.

BRASIL, RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Regulamenta o registro de Medicamentos Fitoterápicos (MF) e o registro e a notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos (PTF). **Diário oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 14 mai. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília: Fiocruz, 2019. v. 1, 874p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia Prático para o Controle das Geo-helmintíases**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 33 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 444 p. (Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia prático para operacionalização da Campanha Nacional de Hanseníase, Verminoses, Tracoma e Esquistossomose 2016**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 50 p.

BRITO, Natilene Mesquita *et al.* Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, v. 12, n. 1, p 155-168, 2002.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F. *et al.* Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 1-10, 2005.

CHANG, Chia-Chi *et al.* Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal Of Food And Drug Analysis**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

CHAO, Che-Yi; SUNG, Ping-Jyun; WANG, Wei-Hsien; KUO, Yueh-Hsiung. Anti-Inflammatory Effect of *Momordica charantia* in Sepsis Mice. **Molecules**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 12777-12788, 2014.

CHASTITY, Canny Nur *et al.* The anthelmintics effect of *Momordica charantia* L. leaves and *Andrographis paniculata* ness. from Indonesia. **International Journal Of Ayurveda And Pharma Research**, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 33-39, 2015.

CHAVES, Jaísa Oliveira *et al.* Extraction of Flavonoids From Natural Sources Using Modern Techniques. **Frontiers In Chemistry**, [S.L.], v. 8, p. 1-21, 2020.

CHOUDHARY, Neeraj; SEKHON, Bhupinder Singh. An overview of advances in the standardization of herbal drugs. **Indian Journal Of Pharmaceutical Education And Research**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 55-70, 2011.

COSTA, C.T.C *et al.* Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 108-116, 2008.

COSTA, Mayre Aparecida Borges da *et al.*. Development, characterization and evaluation of the dissolution profile of sulfasalazine suspensions. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 51, n. 2, p. 449-459, 2015.

DANDAGI, P. M. *et al.*. Development and evaluation of hepatoprotective polyherbal formulation containing some indigenous medicinal plants. **Indian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 70, n. 2, p. 265, 2008.

DEMARQUE, Daniel P. *et al.* New cascarosides from *Rhamnus purshiana* and fragmentation studies of the class by ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, [S.L.], v. 31, n. 14, p. 1169-1174, 2017.

DIMITRI, Nicola. R&D investments for neglected diseases can be sensitive to the economic goal of pharmaceutical companies. **Drug Discovery Today**, [S.L.], v. 17, n. 15-16, p. 818-823, 2012.

DRAKE, L.J. *et al.* Geohelminth infections (ascariasis, trichuriasis, and hookworm): cognitive and developmental impacts. **Seminars In Pediatric Infectious Diseases**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 245-251, 2000.

EASTMAN, James E.; MOORE, Carl O.. **Cold-water-soluble granular starch for gelled food compositions background and summary of the invention**. Titular: A. E. Staley Manufacturing Company. US n. 4465702. Depósito: 1 nov. 1982. Concessão: 14 ago. 1984.

ECCLES, Ronald. What is the Role of Over 100 Excipients in Over the Counter (OTC) Cough Medicines? **Lung**, [S.L.], v. 198, n. 5, p. 727-734, 2020.

FERNANDES, Maurettedos Reis Vieira. **Padronização e avaliação biológica de extratos secos de *Psidium guajava* L. obtidos por spray drying**. 2013. 258 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

FERREIRA, Arisa dos Santos. **Obtenção de filmes mucoadesivos à base de *Thuja occidentalis* Linn como alternativa ao tratamento da candidíase oral**. 2020. 96 f. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

FICHAN, I.; LARROCHE, C.; GROS, J. B.. Water Solubility, Vapor Pressure, and Activity Coefficients of Terpenes and Terpenoids. **Journal Of Chemical & Engineering Data**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 56-62, 1998.

FIRDOUS, Jannathul; V, Bharathi; MUHAMAD, Noorzaid. Evaluation of anthelmintic activity of *Momordica charantia*, *Cucurbita pepo* L., and *Solanum torvum* based formulation and its phytochemical analysis using fourier transform infrared. **Asian Journal Of Pharmaceutical And Clinical Research**, [S.L.], v. 11, n. 7, p. 353, 2018.

FRAGA-CORRAL, Maria *et al.* Technological Application of Tannin-Based Extracts. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 614-640, 2020.

FRENCH, Katherine E.. Plant-Based Solutions to Global Livestock Anthelmintic Resistance. **Ethnobiology Letters**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 110-123, 2018.

GANDHI, Vinav; VADALIA, Jigna; BEHZAD, Mohaddesi. Phytochemical and in vitro anthelmintic activity of *Momordica charantia* Linn fruit extracts. **International Journal Of Research In Ayurveda & Pharmacy**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 123-127, 2016.

GEERTS, S.; COLES, G. C.; GRyseELS, B.. Anthelmintic resistance in human helminths: Learning from the problems with worm control in livestock. **Parasitology Today**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 149-151, 1997.

GEERTS, S.; GRyseELS, B.. Anthelmintic resistance in human helminths: a review. **Tropical Medicine And International Health**, [S.L.], v. 6, n. 11, p. 915-921, 2001.

GIULIETTI, Ana Maria *et al.* Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.

GOMES, Renata Valéria Regis Sousa *et al.* Ação antiparasitária in vitro dos extratos etanólicos de *Operculina hAMILTONII* (batata de purga) e *Momordica charantia* (melão de São Caetano) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos do semi-árido paraibano. **Acta Veterinaria Brasilica**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 92-99, 2010.

GUPTA, Madhu *et al.* *Momordica charantia* Linn. (Karela): Nature's silent healer. **International Journal Of Pharmaceutical Sciences Review And Research**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 32-37, 2011.

HAMAN, Camille *et al.* Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: a review. **Water Research**, [S.L.], v. 68, p. 1-11, jan. 2015.

HOFSTRAAT, Karlijn; VAN BRAKEL, Wim H.. Social stigma towards neglected tropical diseases: a systematic review. **International Health**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 53-70, 2016.

HOSTE, H. *et al.* Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 212, n. 1-2, p. 5-17, 2015.

HOTEZ, Peter J. *et al.*. Helminth Infections: Soil-transmitted Helminth Infections and Schistosomiasis. In: DT, Jamison *et al* (ed.). **Disease Control Priorities in Developing Countries**. 2. ed. Nova Iorque: Oxford University Press, 2006. p. 150-164.

HOTEZ, Peter J. *et al.* Hookworm Infection. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 351, n. 8, p. 799-807, 2004.

HOTEZ, Peter J.; JOHN, Audrey R. Odom; LABEAUD, A. Desiree. Pediatric tropical medicine: the neglected diseases of children. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 1-7, 2019.

HUBER, Lísia Senger; RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B.. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

JAMSHIDI-KIA, Fatemeh; LORIGOOINI, Zahra; AMINI-KHOEI, Hossein. Medicinal plants: past history and future perspective. **Journal Of Herbmed Pharmacology**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-7, 2018.

JIA, Shuo *et al.* Recent Advances in Momordica charantia: functional components and biological activities. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 18, n. 12, p. 2555, 2017.

JIRAUNGKOORSKUL, Wannee; POOLPERM, Sutthaya. An update review on the anthelmintic activity of bitter melon, Momordica charantia. **Pharmacognosy Reviews**, [S.L.], v. 11, n. 21, p. 31-34, 2017.

JONES, David S.. **Pharmaceutics - Dosage Form and Design**. 2. ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2016. 432 p.

JOSEPH, Baby; JINI, D. Antidiabetic effects of Momordica charantia (bitter melon) and its medicinal potency. **Asian Pacific Journal Of Tropical Disease**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 93-102, 2013.

KLEIN *et al.* Fitoterápicos: Um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, [S.L.], v. 3, n. 30, p. 241-248, 2009.

KLOHE, Katharina *et al.* The 2017 Oslo conference report on neglected tropical diseases and emerging/re-emerging infectious diseases – focus on populations underserved. **Infectious Diseases Of Poverty**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-10, 2019.

LARGATO *et al.* Toxicidad aguda oral y ensayos de irritación de extractos acuoso e hidroalcohólico de *Momordica charantia* L. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 1-9, 2008.

LIMA, Luiz Fernando Paiva. **Estudos taxonômicos e morfológicos em Cucurbitaceae brasileiras**. 2010. 245 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LIM-LEROY, A.; CHUA, Tock H.. Prevalence and risk factors of geohelminthiasis among the rural village children in Kota Marudu, Sabah, Malaysia. **Plos One**, [S.L.], v. 15, n. 9, p. 1-16, 2020.

LUBI, N. C.; SATO, M. E. O.; GAENSLY, F. Desenvolvimento de forma farmacêutica líquida de uso oral, isenta de substâncias glicogênicas, com extrato fluido de *Mikania glomerata* Sprengel - Asteraceae (guaco). **Revista Brasileira de Farmacognosia** [S.L.], v. 13, p. 43–46, 2003.

MABRY, Tom J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. 1ed. Berlim: Springer, 1970. 354 p.

MAJINDA, Runner R. T.. Extraction and Isolation of Saponins. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 415-426, 2012.

MAN, Shuli *et al.* Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 81, n. 7, p. 703-714, 2010.

MEBENDAZOL: Comprimido. Responsável técnico: Rander Maia. Belo Horizonte: Belfar, 2021. 1 bula de remédio Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351381776202012/>. Acesso em: 2 jan. 2022

MELZIG, M. F.; BADER, G.; LOOSE, R. Investigations of the Mechanism of Membrane Activity of Selected Triterpenoid Saponins. **Planta Medica**, [S.L.] v. 67, n. 1, p. 43–48, 2001.

MENNELLA, Julie A.; PEPINO, M. Yanina; BEAUCHAMP, Gary K.. Modification of bitter taste in children. **Developmental Psychobiology**, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 120-127, 2003.

MITRA, Amal K.; MAWSON, Anthony R.. Neglected Tropical Diseases: Epidemiology and Global Burden. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 1-15, 2017.

MONTEIRO, Julio Marcelino *et al.* TANINOS: UMA ABORDAGEM DA QUÍMICA À ECOLOGIA. **Química Nova**, [S.L.], v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

NEMA *et al.* Taste Masking in Syrup Containing Herbal Bitter Drugs: Formulation, Standardization and Stability. **International Journal Of Biomedical And Advance Research**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 103-116, 2011.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana**, 11^a ed, São Paulo: Atheneu, 2005. 497 p.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Genebra: OMS, 2010. 184 p.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Soil-transmitted helminth infections**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>. Acesso em: 25 nov. 2021.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO guidelines on good herbal processing practices for herbal medicines**. 1 ed. Genebra, Suíça: OMS, 2018. 72 p.

OWUSU, Fredrick W. A. *et al.* Formulation and In Vitro Evaluation of Oral Capsules and Suspension from the Ethanolic Extract of Cola nitida Seeds for the Treatment of Diarrhea. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2021, p. 1-7, 2021.

OYSERMAN, Daphna *et al.* Fitting in Matters. **Psychological Science**, [S.L.], v. 17, n. 10, p. 854-861, 2006.

PATWEKAR, Shailesh. L *et al.* Standardization of herbal drugs: An overview. **The Pharma Innovation Journal**, [S.L.], v. 4, n. 9, p. 100-104, 2015.

PETROVSKA, Biljanabauer. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, [S.L.], v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.

PONZI, Elizabeth Arruda Carneiro. **Avaliação da cicatrização de feridas em dorso de ratos com e sem laserterapia, determinação da toxicidade aguda e atividade antimicrobiana de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae)**. 2010. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

RAO, H. Surya Prakash; BABU, Mohan; DESAI, Avinash. Synthesis, characterization and spectroscopic properties of water soluble coumarins substituted with oligomeric alkoxy functions. **Rsc Advances**, [S.L.], v. 4, n. 22, p. 11064-11072, 2014.

ROCHA, Leandro *et al.* Mikania glomerata Spreng: desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 744-747, 2008.

ROWE, Raymond C; SHESKEY, Paul J.; WELLER, Paul J.. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 8. ed. London: Pharmaceutical Press, 2017. 1184 p.

SHALABY, Hatem A.. Anthelmintics Resistance; How to Overcome it? **Iranian Journal Of Parasitology**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 18-32, 2013.

SHODEHINDE, Sidiqat A. *et al.* Phenolic Composition and Evaluation of Methanol and Aqueous Extracts of Bitter Gourd (*Momordica charantia* L) Leaves on Angiotensin-I-Converting Enzyme and Some Pro-oxidant-Induced Lipid Peroxidation In Vitro. **Journal Of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 67-76, 2016.

SILVA, Cintia Pereira da. **Bioacessibilidade dos polifenóis do jatobá-do-cerrado (*Hymenaea Stigonocarpa* Mart.) e seus efeitos em genes relacionados à absorção de glicose em células Caco-2**. 2018. 109 f. Tese (Doutorado em Nutrição em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

SOHI, Harmik; SULTANA, Yasmin; KHAR, Roop K.. Taste Masking Technologies in Oral Pharmaceuticals: recent developments and approaches. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, [S.L.], v. 30, n. 5, p. 429-448, 2004.

SPINOSA, Helenice de Souza; GÓRNIAC, Silvana Lima; BERNARDI, Maria Martha. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 824p

TAHIRA, S; HUSSAIN, F. Antidiabetic Evaluation of *Momordica charantia* L Fruit Extracts. **West Indian Medical Journal**, [S.L.], p. 294-299, 2014.

TAMBE *et al.* Determination of ash values of some medicinal plants of Marathwada region in Maharashtra. **International Journal Of Pharmaceutical Research And Bio-Science**, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 337-346, 2012.

TEIXEIRA, A. H. *et al.* Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais no município de Sobral-ceará, Brasil. **SANARE**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 23–28, 2014.

TURNER, Hugo C *et al.* Are current preventive chemotherapy strategies for controlling and eliminating neglected tropical diseases cost-effective? **BMJ Global Health**, [S.L.], v. 6, n. 8, p. 1-14, ago. 2021.

UCNTD. **Briefing Document on Neglected Tropical Diseases**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://unitingtocombatntds.org/wp-content/uploads/2019/05/UNTC_briefing-doc_2019_3.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2019.

VERCRUYSSSE, Jozef *et al.* Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths? **International Journal For Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 14-27, 2011.

VIGGIANO, C. E. O produto dietético no Brasil e sua importância para indivíduos diabéticos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, [S.L.] v. 3, n. 1, p. 36–42, 2003.

VIRDI, J. *et al.* Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 88, n. 1, p. 107–111, 2003.

WAGNER, Hildebert; BLADT, Sabine. **Plant Drug Analysis: a thin-layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlim: Springer, 1996. 384 p.

WEINER, Norman. Strategies for Formulation and Evaluation of Emulsions and Suspensions: some thermodynamic considerations. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, [S.L.], v. 12, n. 7, p. 933-951, 1986.

WILLIAMS, Andrew R. *et al.* Direct Anthelmintic Effects of Condensed Tannins from Diverse Plant Sources against *Ascaris suum*. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 1-16, 2014.

WINK, Michael. Medicinal Plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, [S.L.], v. 17, n. 11, p. 12771-12791, 2012.

YUBIN *et al.* The extraction, separation and purification of alkaloids in the natural medicine. **Journal Of Chemical And Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 338-345, 2014.

ZAHAN, Sumyya *et al.* Evaluation of phytochemical and pharmacological properties of seeds of *Momordica charantia*. **Avicenna Journal Of Phytomedicine**, [S.L.], v. 10 n. 5, p. 1-12, 2020.

ZOCOLER, Analice Martins Daleffi *et al.* Contribuição ao Controle de Qualidade Farmacognósticodas Folhas e Caules de Melão-de-São Caetano (*Momordica charantia* L. - Cucurbitaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 1, n. 1, p. 22-27, 2006.

ANEXO A – COMPROVANTE DE CADASTRO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
 Cadastro nº A5ED852

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A5ED852**
 Usuário: **Universidade Federal de Pernambuco**
 CPF/CNPJ: **24.134.488/0001-08**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Momordica charantia

Título da Atividade: **ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS APLICADAS NO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTO FITOTERÁPICO À BASE DE Momordica charantia L. NO COMBATE À GEO-HELMINTÍASES**

Equipe

Pedro José Rolim Neto	Universidade Federal de Pernambuco
Larissa Araújo Rolim	Universidade do Vale do São Francisco
Rosali Maria Ferreira da Silva	Universidade Federal de Pernambuco

Data do Cadastro: **02/11/2018 13:31:43**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **13:32** de **02/11/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**