

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Desenvolvimento do produto seco por aspersão de**  
***Cecropia glazoui* Sneth. (Cecropiaceae)**

**GRAZIELA HEBERLÉ**

**PORTO ALEGRE, 2000**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Desenvolvimento do produto seco por aspersão de**  
***Cecropia glazioui* Sneth. (Cecropiaceae)**

Dissertação apresentada por  
**Graziela Heberlé** para obtenção do  
GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 13 de janeiro de 2000, perante a Comissão examinadora constituída por:

Prof<sup>a</sup>. Dr. ANA MARIA BERGOLD

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr. FERNANDA NERVO RAFFIN

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Dr. MIRIAM TERESINHA KNORST

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

H445d Heberlé, Graziela

Desenvolvimento do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* Sneth.. (Cecropiaceae). /Graziela Heberlé. - Porto Alegre : Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2000. - 188 p.; 33 tab., 44 fig., xxxiv. 36 anexos.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Cecropia glazioui*. 2. Cecropiaceae. 3. Embauba. 4. Validação. 5. Fitoterápicos. I. Petrovick, Pedro Ros. II. Título.

CDU : 615.453

Bibliotecárias responsáveis

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Margarida Maria C.F. Ferreira, CRB 10/480

Trabalho reprografado com auxílio da PROPG-UFRGS

Impressão realizada pela Gráfica da UFRGS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com suporte financeiro e bolsa de pesquisa concedidos pela CAPES.

**À *PEDRO ROS PETROVICK*, meu pai científico.**

*Gotas de orvalho  
deslizam brincando  
sobre o verde  
da folha  
a cura.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick, pela ótima orientação, pela compreensão, pelo grande exemplo profissional e por ter acreditado e apostado na minha capacidade.

Aos meus pais, Lovani e Astor e ao meu irmão Maximiliano, pelo carinho e pelo apoio em mais uma, dentre tantas escolhas.

À Marcos pelo carinho, pelo apoio e pela dedicação incansável.

À Helena e Leandro, pelo apoio e em especial à Leonardo, pela acessoria técnica da informática.

À Adriana, Bibiana, Patrícia, Stefani, Beatrice, Ana Paola, José Mário e Alexandre, pelo apoio e amizade. Em especial à Salete, pelas dicas da língua portuguesa e Lee Van pelo companheirismo em momentos de grandes dificuldades.

Às professoras Dr<sup>a</sup>. Lílian Auler Mentz e Dr<sup>a</sup>. Valquiria Linck Bassani, pela positiva influência nesta escolha, durante a orientação na iniciação científica.

Aos professores e colegas das disciplinas deste curso de Pós-Graduação, por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos professores Dr. Jorge Ernesto Mariath, Dr. José Carlos Germani, Dr. José Ângelo da Silveira Zuanazzi, ao mestrando Airano e à técnica Bibiana, pelo envolvimento na realização de algumas etapas deste trabalho.

À Letícia, pelo companheirismo e pela importante colaboração nos trabalhos experimentais.

Aos companheiros do LDG e afins: Ana, Angélica, Andréa, Claudia, Denise, Edison, Edyane, Francilene, Kellen, Luís Alberto, Karine, Melissa, Tatiane e Wellington pela convivência enriquecedora tanto no sentido profissional, quanto pessoal. Em especial à Raquel, à Míriam e ao Prof. Dr. George González Ortega pela atenção e pelas sugestões.

À Ana Lúcia e Airton, pela sincera amizade e pelo grande auxílio com o CLAE.

Aos funcionários, Alice, Luís, Sobral, Jairo, Marcos, Heloisa, Margarida, Norma e Maribete, em especial, pela constante disposição para ajudar.

À esta instituição, pelo ensino gratuito e de alta qualidade que conduziu toda a minha formação em nível superior, até o momento.

## SUMÁRIO

<b>Lista de tabelas.....</b>	<b>xvii</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>xxi</b>
<b>Lista de anexos.....</b>	<b>xxiv</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>xxvii</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>xxix</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xxxix</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Relevância do tema.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Objetivos.....</b>	<b>6</b>
1.2.2 Geral.....	6
1.2.3 Específicos.....	6
<b>1.3 <i>Cecropia glazioui</i> e outras espécies do gênero.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.1 Generalidades.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.2 <i>Cecropia glazioui</i>.....</b>	<b>10</b>
1.3.2.1 Botânica e etnobotânica.....	10
1.3.2.2 Farmacologia e etnofarmacologia.....	13
1.3.2.3 Toxicologia.....	17
1.3.2.4 Química.....	18
1.3.2.5 Agronomia.....	19
<b>1.3.3 Outras espécies do gênero.....</b>	<b>20</b>
1.3.3.1 Botânica e etnobotânica.....	20
1.3.3.2 Farmacologia e etnofarmacologia.....	23
1.3.3.3 Toxicologia.....	26



1.3.3.4 Química.....	27
<b>1.4 Qualidade microbiológica.....</b>	<b>29</b>
<b>1.5 Validação.....</b>	<b>31</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1.1 Matéria-prima.....</b>	<b>37</b>
2.1.1.1 Material vegetal.....	37
2.1.1.2 Matéria-prima vegetal.....	37
2.1.1.3 Adjuvante.....	37
<b>2.1.2 Reagentes, soluções e substância referência.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1.3 Aparelhos e equipamentos.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1.4 Outros materiais.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2 Metodologia.....</b>	<b>40</b>
<b>2.2.1 Caracterização do material vegetal.....</b>	<b>40</b>
2.2.1.1 Caracterização macro e microscópica.....	40
2.2.1.2 Perda por dessecação .....	40
<b>2.2.2 Caracterização da matéria-prima vegetal.....</b>	<b>41</b>
2.2.2.1 Caracterização macro e microscópica.....	41
2.2.2.2 Perda por dessecação .....	41
2.2.2.3 Análise granulométrica.....	41
2.2.2.4 Determinação do teor de extrativos.....	42
2.2.2.5 Análise cromatográfica.....	42
2.2.2.5.1 Cromatografia em camada delgada.....	42
2.2.2.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	43
2.2.2.5.3 Avaliação do comportamento da matéria-prima vegetal em relação a sorção de umidade frente ao armazenamento.....	44

<b>2.2.3 Análise microbiológica da matéria-prima.....</b>	<b>44</b>
2.2.3.1 Análise microbiológica da matéria-prima vegetal.....	44
2.2.3.2 Análise microbiológica do adjuvante.....	45
<b>2.2.4. Desenvolvimento e caracterização do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> Sneth.....</b>	<b>45</b>
2.2.4.1 Preparação da solução extrativa para a produção do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	45
2.2.4.2 Determinação do residuo seco.....	45
2.2.4.3 Desenvolvimento do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> ....	46
2.2.4.4 Caracterização do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	47
2.2.4.4.1 Caracterização visual.....	47
2.2.4.4.1.1 Avaliação das características macroscópicas.....	47
2.2.4.4.1.2 Análise das partículas por microscopia eletrônica.....	47
2.2.4.4.2 Determinação do teor de umidade.....	47
2.2.4.4.3 Análise granulométrica do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	47
2.2.4.4.4 Determinação dinâmica do fluxo.....	48
2.2.4.4.5 Determinação do ângulo de repouso.....	49
2.2.4.4.6 Determinação da densidade bruta e de compactação.....	50
2.2.4.4.7 Determinação do fator de Hausner.....	50
2.2.4.4.8 Determinação do índice de compressibilidade.....	51
2.2.4.4.9 Determinação da compactabilidade.....	51
2.2.4.4.10 Comportamento em ambientes com umidades relativas controladas...	52
2.2.4.4.11 Análise cromatográfica.....	52
2.2.4.4.11.1 Cromatografia em camada delgada.....	52
2.2.4.4.11.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	53

<b>2.2.5. Análise microbiológica do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i></b> .....	53
<b>2.2.6 Validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência</b> .....	53
2.2.6.1 Exatidão.....	53
2.2.6.2 Precisão.....	54
2.2.6.2.1 Repetibilidade.....	54
2.2.6.2.2 Precisão intermediária.....	54
2.2.6.3 Especificidade.....	55
2.2.6.4 Linearidade e faixa de confiança.....	55
2.2.6.5 Robustez.....	56
2.2.6.6 Limite de quantificação.....	57
<b>3. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b> .....	59
<b>3.1 Caracterização do material vegetal</b> .....	61
<b>3.2 Desenvolvimento e caracterização do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i></b> .....	71
<b>3.3 Validação do método por cromatografia desenvolvido para o doseamento e a caracterização da solução extrativa aquosa e do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i></b> .....	90
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	109
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b> .....	113
<b>ANEXOS</b> .....	129

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites máximos preconizados para contaminação microbiana em produtos derivados de plantas para uso interno e matéria-prima vegetal pré-tratada para uso em infusos, chás ou formas de uso tópico.....	30
Tabela 2. Programa de constituição da fase móvel em função do tempo.....	43
Tabela 3. Parâmetros da operação de secagem e proporção de adjuvante de secagem para a obtenção e seleção do produto seco nebulizado de <i>Cecropia glazioui</i> .....	46
Tabela 4. Variações no gradiente para avaliação da robustez. Alterações no percentual de acetonitrila na composição da fase móvel acetonitrila: solução aquosa de ácido acético 5 %.....	57
Tabela 5. Aspectos dos tricomas característicos das folhas de algumas espécies de <i>Cecropia</i> , encontradas ao sul da Amazônia .....	64
Tabela 6. Granulometria da droga vegetal seca e após moída.....	65
Tabela 7. Dados estatísticos para a comparação entre os métodos de perda por dessecação em estufa e balança com sistema de secagem por infravermelho.....	66
Tabela 8. Dados estatísticos para a comparação entre a matéria-prima vegetal de <i>Cecropia glazioui</i> antes e após secagem.....	67
Tabela 9. Parâmetros relacionados ao desempenho do sistema cromatográfico.	69
Tabela 10. Rendimento da operação de secagem por aspersão e umidade residual dos extratos secos produzidos.....	72
Tabela 11. Resultados da avaliação dos dados da análise granulométrica realizada pelos diversos métodos.....	80
Tabela 12. Dados referentes às análises do comportamento do produto seco nebulizado de <i>Cecropia glazioui</i> , quanto ao fluxo, acomodação das partículas e densificação.....	80
Tabela 13. Parâmetros relacionados ao desempenho do sistema cromatográfico .....	85
Tabela 14. Alteração de massa percentual no produto seco nebulizado de <i>Cecropia glazioui</i> nas umidades relativas de 26 , 70 e 99%.....	88

Tabela 15. Resultados do teste recuperação para a solução extrativa aquosa.....	91
Tabela 16. Resultados do teste recuperação para o produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	91
Tabela 17. Dados estatísticos para a comparação da equivalência entre a porcentagem de recuperação da solução extrativa aquosa e do extrato seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	92
Tabela 18. Intervalos de confiança calculados para a solução extrativa aquosa	92
Tabela 19. Intervalos de confiança calculados para o produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	92
Tabela 20. Dados da análise de variância da regressão linear do teste de recuperação para a solução extrativa aquosa.....	93
Tabela 21. Dados da análise de regressão linear do teste de recuperação para a solução extrativa aquosa.....	93
Tabela 22. Dados da análise de variância da regressão linear do teste de recuperação para o produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	93
Tabela 23. Dados da análise de regressão linear do teste de recuperação para o produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	94
Tabela 24. Resultados dos testes de repetibilidade e precisão intermediária para o padrão, solução extrativa aquosa e produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> com relação às áreas médias dos picos.....	95
Tabela 25. Resultados dos testes de repetibilidade e precisão intermediária em valores absolutos para o padrão, solução extrativa aquosa e produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	95
Tabela 26. Dados da análise de variância da regressão linear da curva padrão de isovitexina.....	99
Tabela 27. Dados da análise de regressão linear da curva do padrão.....	100
Tabela 28. Dados da análise de variância da regressão linear da curva da solução extrativa aquosa de <i>Cecropia glazioui</i> por cromatografia líquida de alta eficiência.....	103
Tabela 29. Dados da análise de regressão linear da curva da solução extrativa aquosa de <i>Cecropia glazioui</i> .....	103

Tabela 30. Dados da análise de variância da regressão linear da curva do extrato seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> por cromatografia líquida de alta eficiência.....	104
Tabela 31. Dados da análise de regressão linear da curva do extrato seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	104
Tabela 32. Dados sumarizados da análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel no nível inferior e superior e da variação do fluxo para 1,1 e 1 ml/min na área do pico.....	106
Tabela 33. Dados sumarizados da análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel no nível inferior e superior e da variação do fluxo para 1,1 e 1 ml/min na altura do pico.....	106

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia de um embaubal ( <i>Cecropia glazioui</i> ).....	9
Figura 2. Mapa com a distribuição geográfica da <i>Cecropia glazioui</i> .....	11
Figura 3. Detalhe da copa de <i>Cecropia glazioui</i> .....	12
Figura 4. Representação estrutural da isovitexina.....	18
Figura 5. Equipamento utilizado para determinação de fluxo de sólidos.....	49
Figura 6. Equipamento utilizado para determinação do ângulo de repouso.....	50
Figura 7. Excicata da <i>Cecropia glazioui</i> apresentando a folha na face adaxial e abaxial e as infrutescências.....	61
Figura 8. Fotomicrografia da face adaxial da lâmina foliar de <i>Cecropia glazioui</i> mostrando a distribuição dos tricomas epidérmicos.....	62
Figura 9. Fotomicrografia da face abaxial da lâmina foliar de <i>Cecropia glazioui</i> mostrando a maior concentração de tricomas epidérmicos sobre as nervuras.....	62
Figura 10. Fotomicrografia dos tricomas da face adaxial do tipo simples unicelular curto.....	63
Figura 11. Fotomicrografia dos tricomas da face abaxial do tipo simples unicelular longo.....	63
Figura 12. Fotomicrografia da droga vegetal cominuída salientando os enovelados do pó.....	64
Figura 13. Curva de retenção e passagem da análise granulométrica da droga vegetal moída.....	65
Figura 14. Cromatografia em camada delgada da solução extrativa aquosa de <i>Cecropia glazioui</i> .....	68
Figura 15. Cromatografia líquida de alta eficiência da solução extrativa aquosa de <i>Cecropia glazioui</i> e do padrão de isovitexina.....	69
Figura 16. Representação gráfica do controle do comportamento da matéria-prima vegetal, durante o período de 504 dias de armazenamento, através da perda por dessecação.....	71

Figura 17. Representação gráfica da relação entre o fluxo de alimentação do fluido de secagem com o rendimento líquido dos produtos secos por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> Sneth. nas condições de processamento testadas.....	73
Figura 18. Fotografia apresentando o aspecto da planta rasurada, cominuída e do produto seco por aspersão.....	74
Figura 19. Eletromicrografia do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> (3500X).....	75
Figura 20. Eletromicrografia do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> evidenciando aspecto de partícula com ruptura e interior oco (8500 X).....	75
Figura 21. Eletromicrografia de partícula do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> evidenciando a estrutura de superfície porosa (12000X).....	76
Figura 22. Representação gráfica da distribuição granulométrica do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> Sneth.....	77
Figura 23. Curva de distribuição granulométrica do produto seco por aspersão em função da frequência acumulada percentual.....	77
Figura 24. Representação da análise granulométrica do produto seco por aspersão através da rede de distribuição RRSB.....	78
Figura 25. Curva de distribuição granulométrica do produto seco por aspersão em função da frequência acumulada percentual em escala de probabilidade x linear.....	79
Figura 26. Escoamento dinâmico do produto seco por aspersão <i>Cecropia glazioui</i> .....	83
Figura 27. Cromatografia em camada delgada comparativa entre os extratos secos de <i>Cecropia glazioui</i> , produzidos por aspersão, sob as condições 1, 2, 3, 4, 5 e 6, utilizando-se como padrão a isovitexina	84
Figura 28. Cromatografia líquida de alta eficiência do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> e do padrão isovitexina.....	85
Figura 29. Cromatografia líquida de alta eficiência da solução extrativa, do produto seco por aspersão e do padrão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	86
Figura 30. Aspecto do produto seco por aspersão após produção e quando submetido à umidades relativas de 26, 70 e 99 %, no quinto dia de exposição.....	87



Figura 31. Representação gráfica da sorção de umidade do produto seco por aspersão nas umidades relativas de 26 , 70 e 99 %.....	89
Figura 32. Crescimento de fungos no produto seco por aspersão submetido à UR de 99 %.....	89
Figura 33. Cromatografia líquida de alta eficiência da isovitexina apresentando o espectro de varredura no UV para o pico de interesse.....	96
Figura 34. Cromatografia líquida de alta eficiência da solução extrativa apresentando o espectro de varredura no UV para o pico de interesse.....	97
Figura 35. Cromatografia líquida de alta eficiência do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> , apresentando o espectro de varredura no UV para o pico de interesse.....	97
Figura 36. Cromatograma da solução extrativa aquosa, apresentando os espectros de varredura no UV, correspondentes à região mediana e extremidades do pico de interesse.....	98
Figura 37. Cromatograma do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> , apresentando os espectros de varredura no UV, correspondentes à região mediana e extremidades do pico de interesse.....	98
Figura 38. Curva padrão de isovitexina.....	99
Figura 39. Distribuição de resíduos para a curva padrão de isovitexina.....	101
Figura 40. Faixa de confiança ao longo da curva padrão de isovitexina.....	101
Figura 41. Curva de regressão linear da solução extrativa aquosa de <i>Cecropia glazioui</i> em cromatografia líquida de alta eficiência.....	102
Figura 42. Distribuição de resíduos para a regressão linear da curva da solução extrativa aquosa de <i>Cecropia glazioui</i> .....	103
Figura 43. Curva de regressão linear para o extrato seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> em cromatografia líquida de alta eficiência.....	104
Figura 44. Distribuição de resíduos para a regressão linear da curva do extrato seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	105

## LISTA DE ANEXOS

Figura I. Laudo agrônômico com informações do fornecedor sobre a matéria prima vegetal.....	131
Tabela I. Perda por dessecação da matéria-prima vegetal em estufa a 105°C.....	132
Tabela II. Distribuição granulométrica determinada por difração de raio laser através do Coulter ®.....	133
Tabela III. Granulometria do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> Sneath. determinada por microscopia ótica.....	133
Tabela IV. Resultados da análise de variância dos resultados para os testes de repetibilidade e precisão intermediária, para o padrão.....	133
Tabela V. Resultados da análise de variância dos resultados para os testes de repetibilidade e precisão intermediária, para a solução extrativa aquosa.....	134
Tabela VI. Resultados da análise de variância dos resultados para os testes de repetibilidade e precisão intermediária, para o produto seco por aspersão.....	134
Tabela VII. Dados dos espectros de varredura no UV, de 200 a 400 nm, obtidos ao longo do pico de interesse no cromatograma da solução extrativa aquosa para a comprovação da sua homogeneidade.....	134
Tabela VIII. Dados da varredura no UV, de 200 a 400 nm, das fatias obtidas ao longo do pico de interesse no cromatograma do produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> , para a comprovação da sua homogeneidade.....	135
Tabela IX. Dados da curva padrão de isovitexina.....	135
Tabela X. Resultados de resíduos da curva padrão de isovitexina.....	136
Tabela XI. Dados da curva de regressão linear da solução extrativa aquosa de <i>Cecropia glazioui</i> .....	136
Tabela XII. Dados da curva do extrato seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	137

Tabela XIII. Análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel na área do pico do padrão de isovitexina, no nível inferior.....	137
Tabela XIV. Análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel na área do pico do padrão de isovitexina, no nível superior.....	137
Tabela XV. Análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel na área do pico de interesse, para a solução extrativa aquosa de <i>Cecropia glazioui</i> , no nível inferior.....	138
Tabela XVI. Análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel na área do pico de interesse, para a solução extrativa aquosa de <i>Cecropia glazioui</i> , no nível superior.....	138
Tabela XVII. Análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel na área do pico de interesse, para o produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> , no nível inferior.....	138
Tabela XVIII. Análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel na área do pico de interesse, para o produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> , no nível superior.....	139
Tabela XIX. Análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel na altura do pico do padrão de isovitexina, no nível inferior.....	139
Tabela XX. Análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel na altura do pico do padrão de isovitexina, no nível superior.....	139
Tabela XXI. Análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel na altura do pico de interesse, para a solução extrativa aquosa de <i>Cecropia glazioui</i> , no nível inferior.....	140
Tabela XXII. Análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel na altura do pico de interesse, para a solução extrativa aquosa de <i>Cecropia glazioui</i> , no nível superior.....	140
Tabela XXIII. Análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel na altura do pico de interesse, para o produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> , no nível inferior.....	140
Tabela XXIV. Análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel na altura do pico de interesse, para o produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> , no nível superior.....	141

Tabela XXV. Análise estatística da influência da variação do fluxo para 1,1 ml/min na área do pico do padrão de isovitexina.....	141
Tabela XXVI. Análise estatística da influência da variação do fluxo para 1,0 ml/min na área do pico do padrão de isovitexina.....	141
Tabela XXVII. Análise estatística da influência da variação do fluxo para 1,1 ml/min na área do pico de interesse, para a solução extrativa aquosa de <i>Cecropia glazioui</i> .....	142
Tabela XXVIII. Análise estatística da influência da variação do fluxo para 1,0 ml/min na área do pico de interesse, para a solução extrativa aquosa de <i>Cecropia glazioui</i> .....	142
Tabela XXIX. Análise estatística da influência da variação do fluxo para 1,1 ml/min na área do pico de interesse, para o produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	142
Tabela XXX. Análise estatística da influência da variação do fluxo para 1,0 ml/min na área do pico de interesse, para o produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	143
Tabela XXXI. Análise estatística da influência da variação do fluxo para 1,1 ml/min na altura do pico do padrão de isovitexina.....	143
Tabela XXXII. Análise estatística da influência da variação do fluxo para 1,0 ml/min na altura do pico do padrão de isovitexina.....	143
Tabela XXXIII. Análise estatística da influência da variação do fluxo para 1,1 ml/min na altura do pico de interesse, para a solução extrativa aquosa de <i>Cecropia glazioui</i> .....	144
Tabela XXXIV. Análise estatística da influência da variação do fluxo para 1,0 ml/min na altura do pico de interesse, para a solução extrativa aquosa de <i>Cecropia glazioui</i> .....	144
Tabela XXXV. Análise estatística da influência da variação do fluxo para 1,1 ml/min na altura do pico de interesse, para o produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	144
Tabela XXXVI. Análise estatística da influência da variação do fluxo para 1,0 ml/min na altura do pico de interesse, para o produto seco por aspersão de <i>Cecropia glazioui</i> .....	145

## ABREVIATURAS

*PCG*: produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui*;

*SEA*: solução extrativa aquosa;

$\Delta T$ : variação entre a temperatura de admissão do fluido a ser secado e, temperatura de saída do produto seco por aspersão;

*CDG*: curva de distribuição granulométrica;

*dm*: diâmetro médio de partícula;

*S*: amplitude de distribuição granulométrica;

*Vf*: velocidade de fluxo.

## RESUMO

O produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* Sneth. (PCG) foi desenvolvido a partir da seleção de uma entre as diversas combinações de parâmetros de secagem. A matéria-prima vegetal foi caracterizada através da análise macro e microscópica. A avaliação química qualitativa foi realizada através de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a análise quantitativa por CLAE, foi desenvolvida e validada a metodologia de gradiente em fase reversa, utilizando como marcador a isovitexina, flavonóide relatado para a espécie. A droga seca moída foi analisada com relação ao seu comportamento frente às condições de armazenamento e carga microbiológica. Para a caracterização da solução extrativa aquosa foram empregadas as técnicas cromatográficas desenvolvidas para a matéria-prima vegetal, sendo validada a metodologia quantitativa por CLAE. Para a obtenção do PCG em torre de secagem por aspersão foram avaliados a influência do fluxo de alimentação, a temperatura de admissão do fluido de secagem, a temperatura de saída do produto, o rendimento da operação e a umidade residual do produto final. O PCG foi caracterizado qualitativamente através do perfil cromatográfico por CCD e CLAE, seguindo o protocolo desenvolvido nos passos anteriores, além da realização do controle microbiológico. Na CCD, foi constatada a similaridade dos perfis cromatográficos da solução extrativa e do PCG, indicando a estabilidade no ciclo de transformação. A análise microbiológica demonstrou que o produto apresenta boa qualidade microbiológica, estando de acordo com os limites preconizados. O método desenvolvido por CLAE demonstrou-se eficiente, apresentando boa resolução para o pico de interesse tanto na análise da matéria-prima vegetal como de produtos derivados. Esse método foi validado quanto à especificidade, à precisão, à linearidade, à exatidão e à robustez. Os parâmetros validados e o desempenho do sistema foram satisfatórios, indicando que o método é adequado para a análise qualitativa e quantitativa em todas as fases do processamento.

**UNITERMOS:** extrato seco por aspersão, *Cecropia glazioui*, desenvolvimento, caracterização, CLAE, validação.

## **ABSTRACT**

### **DEVELOPMENT OF A SPRAY-DRIED EXTRACT FROM *CECROPIA* *GLAZIOUI* SNETH. (CECROPIACEAE)**

A *Cecropia glazioui* Sneth. Spray-dried extract (PCG) was developed taken into account the combination of several operational drying parameters so as analytical procedures suitability. The plant raw material was submitted to macro and microscopic analysis. The qualitative chemical evaluation was performed by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). For quantitative purpose a gradient reversed phase HPLC method was developed, using isovitexin, previously described for this plant, as chemical marker. The milled dry leaves were analyzed concerning for their storage behavior and microbiological status. The same chromatographic techniques (TLC and HPLC) used for plant raw material were used in order to evaluate the quality of the aqueous extractive solution and PCG. Spray-drying parameters for the PCG development as feeding rate, drying fluid admission and emission temperature so as PCG drying yield and residual moisture were considered. The resulting PCG was characterized through TLC and HPLC, following the further improved methodologies. Comparative TLC analysis between plant raw material, aqueous extractive solution and PCG showed the maintenance of the same chromatographic profile, indicating the suitability of the selected technological steps. Microbiological analysis conformed the established official tests. The developed HPLC method demonstrated to be efficient, showing high resolution for the peak of interest of raw material, extractive solution and spray-dried extract. Validation techniques, regarding specificity, accuracy, linearity, precision and robustness, expressed the adequacy of the HPLC method for qualitative and quantitative purposes.

**KEYWORDS:** *Cecropia glazioui*, spray-dried extract, technological development, HPLC, validation.

---

## INTRODUÇÃO



## 1.1 Relevância do tema

A *Cecropia glaziovii* Sneth. Cecropiaceae foi escolhida para este estudo por estar incluída no Programa de Pesquisa em Plantas Medicinais da Central de Medicamentos, por ser amplamente utilizada pela população como hipotensora, cardiotônica, diurética, antidiabética, na asma e na bronquite (NICOLAU *et al.*, 1988) e por apresentar atividade hipotensora comprovada em humanos, assim como resultados promissores em testes de toxicidade aguda e crônica (BRASIL, 1996).

As ações cardiovasculares da planta em questão vêm sendo amplamente pesquisadas nos últimos dez anos (LAPA, 1997, BARETTA *et al.*, 1998a), uma vez que a hipertensão é o maior fator de risco para o desenvolvimento de complicações sérias que afetam o coração, o cérebro, os rins e o sistema vascular, resultando em altos índices de morte e incapacidade. Na maior parte dos países onde têm sido realizadas pesquisas, 15 a 20 % da população adulta examinada apresenta pressão arterial elevada (CHALMERS, 1998). No Brasil, cerca de 14 milhões de habitantes são hipertensos (SILVEIRA JR *et al.*, 1999).

Uma das alternativas de tratamento é o emprego de medicamentos e entre estes também podem ser considerados os produtos fitoterápicos. Tais produtos, para serem aceitos como agentes terapêuticos válidos, necessitam, além da comprovação de sua eficácia e segurança, do estabelecimento de critérios de qualidade adequados ao seu emprego. Esses requisitos devem ser assegurados quando da transformação da matéria-prima vegetal em uma forma farmacêutica. Portanto, a escolha desse insumo deve basear-se em conhecimentos multidisciplinares, que possibilitem seu emprego farmacêutico (PETROVICK *et al.*, 1997).

São raras as informações sobre a fitoquímica dessa planta, já tendo sido isoladas a isovitexina (DELLA MONACHE, 1988) e a metenamina (TORRES *et al.*, 1991).

Por outro lado, as pesquisas agrônômicas, em um estágio mais avançado, demonstram a viabilidade do plantio racional, incluindo até mesmo o cultivo de

plantas clonadas (MAGALHÃES,1997), o que pode garantir o seu fornecimento industrial.

A otimização de uma forma farmacêutica empregando produtos derivados de plantas medicinais pode trazer como vantagens a redução de efeitos deletérios, quando são isoladas frações que apresentam toxicidade, o aumento da estabilidade dos componentes ativos e a reprodutibilidade da dose. Além disso, facilita ao paciente o acesso a esses medicamentos quando a planta medicinal não está disponível. Entre os produtos derivados estão os extratos totais ou parciais, líquidos ou secos. Os produtos secos podem ser elaborados através de diversas metodologias, dentre as quais se destaca a secagem por aspersão, pois apresenta importantes vantagens tecnológicas, se comparada a outros métodos de secagem. Esses produtos apresentam características pré-definíveis através da otimização da operação de secagem e da formulação do fluido a ser seco.

As partículas de produtos secos por aspersão apresentam pequeno diâmetro e são aproximadamente esféricas. Dependendo do processamento podem ser ocas, possuindo, conseqüentemente, baixa densidade. Em geral, a superfície é porosa, o que favorece a molhabilidade. Esses fatores são influenciados pela presença de adjuvantes na formulação (MASTERS, 1976; BROADHEAD *et al.*, 1992; CARVALHO *et al.*, 1996; LIST e SCHMIDT, 1989; TEIXEIRA, 1996).

Os produtos secos por aspersão podem ser considerados como forma farmacêutica final ou como produto intermediário no ciclo de obtenção de outras formas farmacêuticas. Em ambos os casos, o estabelecimento de metodologias e parâmetros de qualidade vão influir no sucesso de sua adequação como um medicamento.

A qualidade total de um medicamento engloba a qualidade das matérias-primas, dos demais insumos do ciclo do processamento e do processo como um todo. Tratando-se de produtos fitoterápicos, a complexidade de composição da matéria-prima vegetal obriga o emprego de metodologias adequadas, com a finalidade de avaliar suas características químicas, físico-químicas, físicas, organolépticas,

microbiológicas, biológicas e tecnológicas. A portaria n.º 6 / 95 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde preconiza os ensaios e testes necessários para a petição de registro de produtos fitoterápicos no Brasil (BRASIL, 1995), estando orientada pelas normativas traçadas pela Organização Mundial da Saúde (WORLD, 1998) e adequadas às exigências de caráter internacional (FISCHER *et al.*, 1996; PETROVICK, 1999; MARQUES, 1999).

Sob esse aspecto, a validação de processos ou métodos analíticos é de crescente importância e tem como objetivo assegurar as suas qualidades (SWARTZ e KRULL, 1997). A validação torna-se ponto crucial para os métodos analíticos destinados à avaliação de amostras complexas, como no caso de matérias-primas de origem vegetal e produtos fitoterápicos. Trabalhos de dissertação envolvendo o tema validação são realizados, desde 1997, no Laboratório de Desenvolvimento Galênico no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul ( DE SOUZA, 1997; MARTINS, 1998; LINDEN, 1998; DA SILVA, 1999), consolidando e aprimorando essa linha de pesquisa.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.2 Geral**

Desenvolver produto seco por aspersão (PCG) de *Cecropia glazioui* Sneth. Cecropiaceae.

### **1.2.3 Específicos**

Caracterizar a matéria-prima vegetal;

Caracterizar o produto seco por aspersão (PCG) de *Cecropia glazioui* Sneth., desenvolvido;

Avaliar as características tecnológicas do PCG;

Desenvolver método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para a qualificação e quantificação da matéria-prima vegetal, de produtos intermediários, do PCG e de seus derivados;

Validar o método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvido.

### 1.3 *Cecropia glazioui* e outras espécies do gênero

#### 1.3.1 Generalidades

O nome vulgar mais empregado no Brasil, embaúba, é de origem Tupinambá (*mba-yp-a*) o que significa “árvore oca”. A variação na pronúncia dos nomes (ambahú, ambaí, ambaíba, imbaúba, umbaúba, etc.) deve-se ao fato de o colonizador europeu não possuir em seu vernáculo nenhuma palavra que se iniciasse com um fonema nasal, o que resultava na assimilação de um som diverso daquele emitido pelo indígena, ou seja, um “a”, “e”, “i”, ou “u” (ANDRADE, 1981).

Segundo ANDRADE (1981), *o nome Cecropia, escolhido por Loeffling em 1758, para denominar as embaúbas, é muito sugestivo. A mitologia nos leva à antiga Ática (Atenas), onde um rei, meio-homem, meio-serpente, governava com sabedoria. Este rei chamado Cécrope, para defender a cidade, mandou construir uma fortaleza a qual denominou Cecrópia. Se compararmos a cidadela de Cécrope, cheia de soldados prontos a combater, com a embaúba, cheia de formigas prontas a atacar quem quer que as importune, concordaremos com a felicidade da escolha do nome genérico Cecropia para estas plantas.*

ANDRADE (1981), em seu levantamento bibliográfico, comenta a associação das embaúbas com formigas. A *Azteca alfari* é considerada a formiga de *Cecropia* por excelência, encontrando-se distribuída do México ao Paraguai e Argentina. As formigas das embaúbas cortam as extremidades de trepadeiras que porventura sobem em sua planta hospedeira; isto ajudaria a árvore a manter uma posição emergente no dossel da floresta. Nesse estudo foi defendida a tese de que as formigas *Azteca* reduziriam o ataque de animais herbívoros à planta.

O embaubal, segundo o cientista Jacques Huber que viveu longos anos na região amazônica, constitui uma verdadeira mata ao longo das margens dos rios da Amazônia, atingindo em 5 a 10 anos a sua altura máxima, que varia entre 10 e 15

metros. Os embaubais situados na terra firme do vale amazônico ali ficaram desde quando, nos idos geológicos, ela era simplesmente várzea. Assim as cecrópias, que são heliófilas, devem ter lutado, durante milênios, para não serem vencidas pela sombra espessa das matas virgens (PIO CORRÊA, 1978).

Praticamente todas as partes da embaúba eram e ainda são utilizadas com diversas finalidades. Em tempos mais remotos, o caule das embaúbas servia aos aborígenes para a obtenção de fogo, que, para tanto, giravam fortemente e em sentido contrário dois pedaços roliços da madeira. Os Carafbas o utilizavam na confecção de alguns instrumentos musicais, por ser o caule oco ou fistuloso. Mais recentemente, no interior de Minas Gerais, os caules novos eram ainda empregados à guisa de calhas para conduzir águas. As folhas das cecrópias, por serem muito ásperas, são utilizadas como lixas para madeira. A casca, por sua vez, é utilizada na indústria de curtume e como fonte de fibra para estopa e para o fabrico de cordas. O tronco é útil na construção de jangadas e flutuadores, a madeira na fabricação de caixotes, palitos de fósforo, lenha e carvão próprio para pólvora e a polpa da madeira na obtenção de celulose (PIO CORRÊA, 1978).

O gênero *Cecropia* é constituído especialmente por árvores ou arbustos dióicos, providos de caule oco, com septos transversais nos ramos jovens, sustentando a copa com aspecto de candelabro (fig. 1). Possuem estípula espatácea terminal desenvolvida, decídua, intrapeciolar, encerrando uma folha jovem, inflorescências e sucessivos brotos terminais. As folhas são grandes e, geralmente, arredondadas, lobos com a venação pinada, proeminente na página inferior. As inflorescências são axilares, em amentos com um pedúnculo comum, protegidas por uma bráctea espatácea caduca. As flores de ambos os sexos, possuem perigônio tubular, inteiro ou bipartido, em sua porção distal, dois estames, filetes retos, anteras grandes, exsertas, estigma capitado, penicilado ou peltado. O óvulo é basal e subortopo. O fruto é aquênio de endocarpo crustáceo, tuberculado ou liso. O endosperma está presente. Os cotilédones são achatados, a radícula relativamente longa e o embrião reto (ANDRADE, 1981).



Figura 1. Fotografia de um embaubal (*Cecropia glazioui*)<sup>1</sup>

São plantas higrófilas. As árvores podem variar em sua altura de 8 a 25 m. O caule e os ramos são fistulosos. Suas cavidades são septadas e, na grande maioria das espécies, ocupadas por formigas agressivas, que se alimentam dos corpúsculos de Müller, que nascem em cima dos nós e são macios e bastante nutritivos. A mimercofilia das *Cecropiae* é um fenômeno que tem atraído a atenção de vários pesquisadores. Morrison deu a esse fenômeno o nome de *trofobiose*, admitindo haver uma relação muito estreita entre a planta e o inseto. Aquela proporciona à formiga abrigo e alimentação, e o inseto, em troca, defende-a dos inimigos naturais (PIO CORRÊA, 1978).

Os brotos tenros, ainda encartuchados, servem de alimento ao bicho-preguiça, sendo as espécies mais comuns *Bradypus tridactylus*, que ocorre ao sul do Brasil, e *Choloepus didactylus*, que ocorre ao norte do Brasil. Por esse motivo é também conhecida pelo nome popular de “árvore da preguiça” (SANTOS, 1945).

<sup>1</sup> Agradecimentos a Edison Luis Santana Carvalho, pela fotografia.

BERG (1978a) discute o problema da posição correta da *Conocephaloideae*, uma subfamília da *Moraceae* no sistema de Engler (ENGLER *apud* BERG, 1978a)<sup>2</sup>, transferida para a *Urticaceae* por Corner (CORNER *apud* BERG, 1978a)<sup>3</sup>, que pode ser solucionado de forma satisfatória, designando-a para a família a ser chamada *Cecropiaceae*. Para tal, fez uma comparação entre *Moraceae*, *Urticaceae* e *Cecropiaceae* e apresentou uma chave para a ordem *Urticales* a qual pertencem essas famílias.

BERG (1978b) cita o gênero *Cecropia* Loefling, composto possivelmente de 100 espécies, das quais 70 da região andina, já foram descritas como sendo pertencentes à família *Cecropiaceae*. O autor apresenta as características morfológicas desse gênero, bem como as dos outros cinco gêneros pertencentes à família, que totaliza 180 espécies.

Dos seis gêneros que compõem a família, que raramente ocorre em altitudes maiores que 2000 m, *Myrianthus* e *Musanga* ocorrem na África tropical, *Poikilospermum*, na região Indo-Malásica, e *Pourouma*, *Cecropia* e *Coussapoa* são neotropicais (KUBITZKI *et al.*, 1993).

BERG (1996) desenvolveu um estudo com o objetivo de solucionar problemas na identificação de material de *Cecropia* ao sul da Amazônia, estimular coleções em áreas críticas e firmar a taxonomia do grupo das cinco espécies investigadas (*C. glazioui*, *C. hololeuca*, *C. pachystachya*, *C. palmata* e *C. saxatilis*).

### 1.3.2 *Cecropia glazioui*

#### 1.3.2.1 Botânica e etnobotânica

A *Cecropia glazioui* Sneathlage é conhecida popularmente como embaúba-vermelha ou pelos nomes populares citados anteriormente que são extensivos às outras

<sup>2</sup> ENGLER, G. H. A. In Engler e Prantl, Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Ulmaceae - Moraceae - Urticaceae: Leipzig, v. 3, n. 1, p. 59-118, 1889 *apud* BERG, C. C. *Cecropiaceae* a New Family of the Urticales. *Taxon*, v. 27, n. 1, p. 39-44, 1978.

<sup>3</sup> CORNER, E. J. H. The Classification of *Moraceae*. *Gard. Bull.* Singapore. v. 19, p. 187-252, 1962 *apud* BERG, C. C. *Cecropiaceae* a New Family of the Urticales. *Taxon*, v. 27, n. 1, p. 39-44, 1978.



espécies. Seu nome botânico específico foi dado em homenagem a Auguste François Marie Glaziou (CARAUTA, 1996).

*Cecropia glazioui* é uma planta da família Cecropiaceae, cujo gênero está distribuído em regiões tropicais, penetrando raramente em zonas secas (PIO CORRÊA, 1978). BERG (1996) apresenta um mapa com a distribuição geográfica dessa planta no sudeste, sul e nordeste do Brasil (fig. 2).

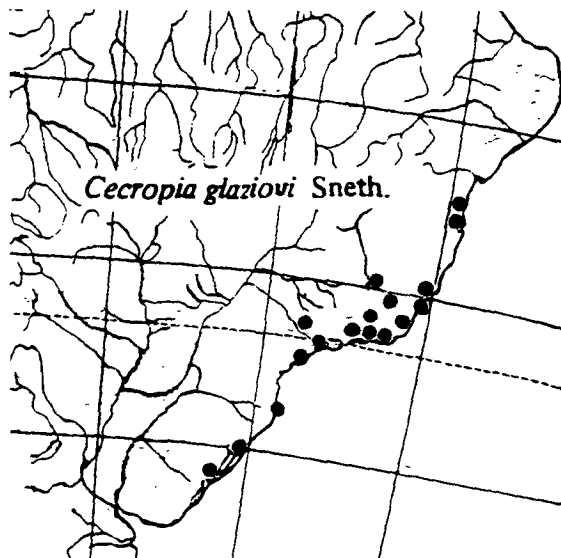


Figura 2. Mapa com a distribuição geográfica da *Cecropia glazioui*

BERG (1996) descreve a espécie da seguinte forma: *Mesofanaerófita às vezes com pequenas raízes escora. Folhas arredondadas, com 25 a 70 cm de diâmetro, sobcoriáceas, com 8 a 12 segmentos, incisões até 1/2 a 5/6. Segmentos oblongos e lanceolados, muitas vezes subobovados a oblanceolados, com o ápice arredondado a curtamente-acuminado (fig. 3); página superior áspera com pêlos rígidos; página inferior densamente pubérola nas nervuras principais e as aréolas com diminutos pêlos aracnóideos, os pêlos aracnóideos longos ficam restritos à margem. Parte livre do segmento mediano com 10 a 15 pares de nervuras laterais, retas, às vezes ramificadas, unindo-se abaixo da margem. Pecíolo com 55 cm de comprimento, piloso, com triquílios na base. Estípulas com 15 a 27 cm de comprimento, vermelho-escura a vinácea e às vezes esverdeada.*



Figura 3. Detalhe da copa de *Cecropia glazioui*<sup>4</sup>

*Inflorescências masculinas aos pares, pêndulas. Pedúnculo comum com 2 a 7 cm de comprimento e 3 a 5 mm de diâmetro, de piloso a glabro. Espata com 22 cm de comprimento, verde-clara, externamente pilosa e internamente glabra. Amentilhos em número de 4 a 12, com 8 a 22 cm de comprimento e 0,5 a 1,3 cm de diâmetro. Pedúnculo com 1 a 2 cm de comprimento, glabro a esparsamente hispido. Perigônio com pêlos aracnóides brancos abaixo do ápice.*

*Inflorescências femininas geralmente aos pares, pêndulas na maturação. Pedúnculo comum com 8 a 28 cm de comprimento e com 4 a 8 mm de diâmetro. Espata até 15 cm de comprimento, pilosa a glabra. Amentilhos em número de 4 a 8, com 7 a 28 cm de comprimento e 0,4 a 1 cm de diâmetro. Pedúnculo muito curto, até 0,5 cm de comprimento. Perigônio com ápice glabro e abaixo dele ocorrem pêlos aracnóides brancos. Estigma subpenicilado. Fruto elipsóide a oblongo, com cerca de 2 cm de comprimento. Número cromossômico:  $2n = 28$ .*

ALVES (1995) demonstrou que a poluição causa alterações na estrutura da madeira da *Cecropia glazioui*. Em 1996, KLUMPP e colaboradores constataram, em

<sup>4</sup> Agradecimentos ao Eng. Agrônomo Dr. Pedro Melillo de Magalhães, CPQBA-UNICAMP, pela fotografia.

um estudo realizado com as folhas da planta, coletadas em locais com diferentes características de poluição, do complexo industrial de Cubatão, que a quantidade de fluoreto era mais elevado próximo às fábricas de fertilizantes.

### 1.3.2.2 Farmacologia e etnofarmacologia

As folhas e brotos da *Cecropia glazioui* são utilizados na medicina popular na forma de chá, como hipotensora, cardiotônica, diurética, antidiabética, na asma e bronquite. Os resultados do estudo com o extrato bruto e frações semipurificadas, testados em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, sugerem que a planta contenha constituintes químicos que interajam com o músculo vascular, além de possuírem forte atividade anti-espasmódica, que poderia explicar, pelo menos em parte, seu uso medicinal como anti-hipertensiva (NICOLAU *et al.*, 1988).

Através de ensaios, utilizando-se camundongos e ratos, foi constatado que o extrato aquoso liofilizado diminui a motilidade espontânea de forma proporcional à dose, sendo o efeito reversível após 8 horas. Pela injeção endovenosa do extrato aquoso (1 a 5 mg/kg), a pressão arterial foi reduzida de 1,20 a 6,67 kPa (~9 a 50 mm Hg), proporcionalmente à dose. Essa redução não foi bloqueada por atropina, propranolol ou por vagotomia bilateral. A injeção endovenosa do extrato aquoso não alterou a resposta à norepinefrina ou acetilcolina. Os resultados obtidos confirmam a atividade hipotensora e indicam a presença, na fase aquosa, de constituintes antagonistas do fluxo do cálcio em musculatura lisa, provavelmente relacionados ao efeito hipotensor final (BORGES *et al.*, 1990).

O extrato bruto aquoso da *Cecropia glazioui* foi estudado farmacologicamente visando a comprovar o efeito do tratamento crônico por via oral na pressão arterial e a determinar os possíveis mecanismos envolvidos nesta ação. Para isso, o extrato foi purificado por partição água/butanol, fornecendo uma fração hidrossolúvel, a partir da qual foram isoladas cinco frações em placas preparativas, todas farmacologicamente ativas, permitindo os estudos em preparações *in vitro*. Os resultados indicam a presença no extrato aquoso de, pelo menos, uma substância com atividade antagonista

competitiva do influxo de íons cálcio na musculatura lisa, sugerindo que o mecanismo do extrato aquoso obtido das folhas de *Cecropia glazioui* está relacionado com a vasodilatação arteriolar, à semelhança dos bloqueadores de canais de cálcio usados amplamente na terapêutica humana (BORGES, 1992).

A fração semipurificada com *n*-butanol bloqueou a captação de cálcio e as contrações produzidas por este no músculo uterino liso despolarizado (CYSNEIROS *et al.*, 1994<sup>5</sup> e 1995<sup>6</sup> *apud* CYSNEIROS *et al.*, 1996). Foram realizados estudos desta fração sobre a secreção gástrica em camundongos, cujos resultados permitiram concluir que a mesma apresenta ação anti-secretora ácida gástrica. É provável que o mecanismo ocorra pelo bloqueio da enzima  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase, passo final comum às vias responsáveis pela regulação da secreção ácida gástrica (CYSNEIROS *et al.*, 1996).

O extrato aquoso liofilizado produziu hipotensão em ratos normotensos e em ratos com hipertensão induzida. Comprovado seu efeito hipotensor, o extrato foi purificado por partição em butanol, resultando em uma fração suficientemente purificada para estudo do mecanismo de ação em preparações isoladas. A fração butanólica forneceu quatro frações que foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa. A terceira fração foi novamente purificada fornecendo uma fração identificada por ressonância magnética nuclear como isovitexina. Foi constatado que as diferentes frações obtidas apresentam ações distintas. Os resultados indicaram que o extrato aquoso da *Cecropia glazioui* relaxa a musculatura lisa por dois mecanismos: bloqueio dos canais de cálcio tipo L dependentes de voltagem e por estimulação de receptores  $\beta_2$ . O bloqueio do influxo de íons cálcio em músculo liso

<sup>5</sup> CYSNEIROS, R. M.; NASSER, A. L. M.; LAPA, A. J. Purificação do composto responsável pelo bloqueio do influxo de cálcio presente na *Cecropia glazioui* Sneth. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 10, Serra Negra-SP, 1995. *Resumos*. São Paulo: FeSBE, 1995. p. 259. (res. 16.97) *apud* CYSNEIROS, R. M.; MESIA, S. V.; TERSARIOL, I. L. S.; LAPA, A. J. Evidências para a ação anti-secretora ácida gástrica da *Cecropia glazioui*, SNETH. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. *Programa e Resumos*. Florianópolis: 1996. p. 103. (res. F-083).

<sup>6</sup> CYSNEIROS, R. M.; NASSER, A. L. M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Substâncias moduladoras dos canais de cálcio voltagem-dependentes presentes na *Cecropia glazioui* Sneth. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, Fortaleza, CE, 1994 *apud* CYSNEIROS, R. M.; MESIA, S. V.; TERSARIOL, I. L. S.; LAPA, A. J. Evidências para a ação anti-secretora ácida gástrica da *Cecropia glazioui*, SNETH. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. *Programa e Resumos*. Florianópolis: 1996. p. 103. (res. F-083).

vascular pode levar à diminuição da resistência vascular periférica por redução da disponibilidade de íons cálcio necessários para o processo contrátil da fibra muscular lisa, causando queda da pressão arterial. A ação agonista sobre os adrenoreceptores  $\beta_2$  também produz diminuição da resistência vascular periférica, principalmente no músculo esquelético, por diferentes mecanismos. A isovitexina foi identificada como responsável pela ação  $\beta$ -adrenérgica, porém, a substância com atividade bloqueadora de cálcio ainda é desconhecida. Estas ações parecem atuar sinergicamente para a atividade hipotensora (CYSNEIROS, 1996).

O extrato aquoso da *Cecropia glaziovii*, quando administrado agudamente em camundongos, não causou ação depressora evidente do sistema nervoso central. Contudo, estudos utilizando a administração crônica devem excluir a participação dos efeitos centrais na atividade cardiovascular descrita para o extrato dessa planta (LAPA, *et al.*, 1997).

Ensaio realizados avaliaram os efeitos do extrato aquoso da *Cecropia glaziovii* em lesões gástricas, aguda e crônica e no esvaziamento gástrico em camundongos. Os mesmos demonstraram que o extrato aquoso das partes aéreas dessa planta, concentrado e liofilizado, apresenta atividade anti-úlceras, provavelmente relacionada à atividade anti-secretora ácida gástrica. O mesmo extrato acelerou o esvaziamento gástrico, mas não afetou a motilidade intestinal (CYSNEIROS *et al.*, 1998).

Foram analisados o efeito da atividade miorrelaxante do extrato na hipertrofia vesical produzida por litíase experimental em ratos e a reatividade farmacológica do músculo detrusor a colinomiméticos e colinolíticos. O resultado demonstrou não haver alteração no desenvolvimento da calculose ou na hipertrofia vesical, não sendo detectada alteração da afinidade dos receptores muscarínicos da musculatura vesical (DOMINGOS *et al.*, 1996).

A ação depressora do extrato aquoso bruto sobre o sistema nervoso central, quando administrado repetidamente, foi constatada através de um estudo, no qual foram tratados, cronicamente, camundongos adultos machos, via oral nas doses de 0,1; 0,3 e 0,6 g/kg – duas vezes ao dia, por 30 dias (BARETTA *et al.*, 1998 b).

Os resultados de um estudo da fração purificada por partição butanólica (0,1 g/kg, v. o., duas vezes ao dia), que é dez vezes mais ativa que o extrato aquoso, sobre comportamento de ratos Wistar fêmeas adultas normotensas em estro ou diestro, sugerem que o tratamento agudo tem efeito ansiolítico, independente da fase hormonal das ratas (ROCHA *et al.*, 1998).

Um perfil ansiolítico/antidepressivo foi sugerido para o extrato aquoso da *Cecropia glazioui* através dos resultados obtidos pela investigação da provável ação depressora do extrato aquoso no sistema nervoso central, em ratos Wistar fêmeas adultas normotensas ou com hipertensão induzida por L-NAME. Os testes comportamentais foram realizados, após tratamento agudo e crônico, com o extrato aquoso (BARETTA, 1998a).

Os resultados de um estudo realizado por ROCHA e colaboradores (1999), com o objetivo de verificar a existência de diferença na farmacocinética do extrato aquoso entre ratos e camundongos, indicaram que o extrato aquoso apresenta uma atividade ansiolítica em camundongos tratados com doses repetidas, da mesma maneira como obtido com doses repetidas em ratos. Entretanto, os resultados confirmaram que a farmacocinética do extrato aquoso é diferente entre as duas espécies de roedores.

A hipotensão causada pelo tratamento crônico de ratas normais e ratas hipertensas com extrato o aquoso de *Cecropia glazioui* foi diretamente relacionada à inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA) (EVANS *et al.*, 1999).

Em estudo comparativo entre o chá (infuso com 1 g de folhas jovens em 200 ml de água) de *Cecropia glazioui* e a clortalidona no tratamento da hipertensão leve e moderada, concluiu-se que o infuso apresenta capacidade hipotensora semelhante a 50 % do efeito produzido por clortalidona na dose de 50 mg/dia. Os agentes não induziram modificações significativas na frequência cardíaca nas posições estudadas (supina e ortostática). O efeito hipotensor produzido pelo infuso é mantido por longos períodos sem fenômenos de escape<sup>7</sup>.

<sup>7</sup> Protocolo Experimental para Avaliação da Eficácia Clínica da Planta *Cecropia glazioui* (Projeto CEME 565/83).

Foi observado efeito hipotensor significante da *Cecropia glazioui* em indivíduos com hipertensão arterial leve e moderada, através da administração de um chá (infuso) três vezes ao dia durante 6 semanas, preparado com 1 g em aproximadamente 150 ml de água fervente e abafamento durante cerca de 5 min. O teste foi realizado com 11 pacientes tanto na posição supina como ortostática, sendo que, na última, o efeito foi mais nítido<sup>8</sup>.

### 1.3.2.3 Toxicologia

A administração do extrato aquoso da *Cecropia glazioui* a ratos Wistar demonstrou que a toxicidade aguda da planta é muito baixa. O tratamento crônico, até 3 meses, igualmente não demonstrou ação tóxica consistente. Também foi realizado estudo de toxicologia em cães com extratos liofilizados da *Cecropia glazioui*, através de tratamentos agudo, subagudo e crônico. Esses não produziram alterações patológicas persistentes que pudessem estar relacionadas inequivocamente ao tempo de tratamento com a planta estudada e às doses dos extratos administradas (LAPA, 1985).

O extrato semipurificado de brotos e folhas, testado via intra-peritoneal em camundongos, apresentou, igualmente, baixa toxicidade (NICOLAU *et al.*, 1988).

Estudos toxicológicos realizados com ratas tratadas cronicamente com doses vinte vezes maiores do que aquelas empregadas na medicina popular não revelaram alterações hematológicas, de bioquímica plasmática ou anatomopatológicas. Dando continuidade aos testes, foram analisados os efeitos do tratamento crônico de ratas com o extrato aquoso da *Cecropia glazioui* sobre a fertilidade e a capacidade reprodutora. Os resultados indicam que o tratamento crônico com o extrato aquoso da *Cecropia glazioui* não interfere na fertilidade e na capacidade reprodutora das ratas (TABATA *et al.*, 1992).

Para o estudo de toxicologia aguda da *Cecropia glazioui*, foi administrado chá (infuso) preparado com 1 g e 5 g da planta em aproximadamente 150 ml de água

<sup>8</sup> Relatório Parcial do Projeto CEME 565/83.

fervente com abafamento durante cerca de 5 min. Os resultados indicaram que o chá da planta não apresentou atividade hipotensora em pacientes normais. Durante o período de estudo e quando administrados agudamente, os infusos não provocaram efeitos deletérios em parâmetros clínicos, bioquímicos e eletrocardiográficos<sup>9</sup>.

Em estudo comparativo entre o chá (infuso com 1 g de folhas jovens em 200 ml de água) de *Cecropia glazioui*, administrado a cada 8 horas, e a clortalidona, no tratamento da hipertensão leve e moderada, não foram notadas modificações significantes nos parâmetros laboratoriais avaliados (hematológico completo, uréia, creatinina, urina tipo I, sódio, potássio, bilirrubina, fosfatase alcalina, proteínas totais, TGO, TGP, DLH, CPK, glicemia, ácido úrico, colesterol, triglicerídeos e eletrocardiograma). Foi demonstrado não apresentar efeitos tóxicos ou deletérios, mesmo quando administrada por períodos relativamente longos a 25 pacientes hipertensos. Pode-se, então, considerar essa dose do infuso segura para uso clínico<sup>10</sup>.

#### 1.3.2.4 Química

A partir do extrato metanólico de folhas e galhos jovens, com posterior partição com clorofórmio e purificação em coluna Sephadex LH 20, foi isolada isovitexina (fig. 4) (DELLA MONACHE *et al.*, 1988). A metenamina (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>) foi isolada do extrato aquoso das folhas (TORRES *et al.*, 1991).

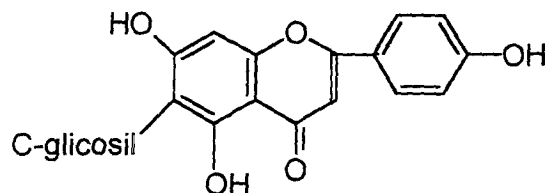


Figura 4. Representação estrutural da isovitexina (MABRY *et al.*, 1970)

A análise fitoquímica preliminar das folhas secas da *Cecropia glazioui*, sugeriu a presença de C-glicosídeos (WEHRMANN *et al.*, 1999a).

<sup>9</sup> Relatório Parcial do Projeto CEME 565/83.

<sup>10</sup> Protocolo Experimental para Avaliação da Eficácia Clínica da Planta *Cecropia glazioui* (CEME 565/83).



O extrato aquoso das folhas foi submetido a espectro de varredura no ultravioleta e comparado ao da apigenina, o que permitiu sugerir a presença desse composto flavonoídico na planta (WEHRMANN *et al.*, 1998).

O extrato aquoso liofilizado foi submetido a cromatografia em coluna, utilizando sistema de eluição de polaridade crescente. Nas frações coletadas foi demonstrada por CCD a presença de substâncias com comportamento cromatográfico semelhante à orientina e à isoorientina (WEHRMANN *et al.*, 1999b).

### 1.3.2.5 Agronomia

O cultivo experimental do vegetal demonstrou a viabilidade agrônômica sob condições não muito exigentes (MAGALHÃES, 1997). Foi desenvolvido um método viável para a reprodução da planta *in vitro*, através do qual a variação morfológica observada possibilitou a seleção de plantas com características adequadas, permitindo o cultivo de clones (ALVES *et al.*, 1992).

Para o cultivo da planta pelo CPQBA-UNICAMP, foi utilizada a técnica de propagação por sementes dos amentos florais da árvore feminina, que são menores, acinzentados e geralmente não caem das árvores. O rendimento da primeira colheita, aos 22 meses, em cultivo a pleno sol, produziu 1,2 toneladas de folhas e pecíolos secos, por hectare. O rendimento de massa foliar tende a aumentar nos cortes subseqüentes devido às ramificações da planta após a poda. As folhas podem ser colhidas anualmente, sendo cortadas juntamente com o pecíolo rente ao tronco principal. Ataques de inseto fitófago da família Crisomelidae (lagartas e adultos) podem causar danos nos ápices das folhas. Deve ser evitado o cultivo em locais de baixas temperaturas, que podem causar a “queima” das folhas. A secagem é crítica devido ao pecíolo que leva mais tempo para secar; assim, a secagem das folhas e pecíolos é completada em secadores com fonte adicional de calor a 40 °C. Na umidade ideal para o armazenamento, as folhas e pecíolos deverão estar quebradiços (MAGALHÃES, 1998).

### 1.3.3 Outras espécies do gênero

#### 1.3.3.1 Botânica e etnobotânica

##### *Cecropia catarinensis* Cuatr.

Foi descrita, pela primeira vez, a partir de material herborizado em Santa Catarina. Popularmente, é conhecida como embaúba-catarinense. A morfologia das folhas e amentos é bastante semelhantes a da *C. lyratiloba* e da *C. pachystachya*, diferindo desta apenas pelas lenticelas do caule muito esparsas e daquela pela estípula terminal alva. Ocorre nas regiões sudeste e sul do Brasil (CARAUTA, 1996).

##### *Cecropia hololeuca* Miq.

É conhecida popularmente como embaúba-prateada (do grego *holos* = todo e *leuca* = branco), alusão aos pêlos que dão um aspecto prateado às folhas. Ocorre nas regiões sul, sudeste e nordeste do Brasil (CARAUTA, 1996).

Encontra-se inscrita na Ph. Bras. I (1926), sendo suprimida na F. Bras. II (1959). A monografia da primeira edição descreve as características micro e macroscópicas, o emprego e a preparação do extrato fluido.

##### *Cecropia lyratiloba* Miq.

A *Cecropia lyratiloba* possui vários nomes vulgares, como embaúva, braço-de-preguiça, caixeta, embaúba, figueira-brava, imbaúva-brava e imbaúba-do-brejo (ANDRADE, 1981).

É também conhecida como embaúba-lirada devido à forma lirada dos lobos superiores de algumas folhas. Existem duas variedades, a *C. lyratiloba* var. *lyratiloba* e a var. *nana*. A *C. lyratiloba* var. *lyratiloba* é uma árvore com estípulas terminais rosadas e pilosas. A copa apresenta-se com vários grupos de ramificações candelabrifformes. A *C. lyratiloba* var. *nana* é um arbusto com estípulas terminais verde-claras. A copa é provida de apenas uma a três ramificações candelabrifformes. Ocorrem nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil (CARAUTA, 1996).

Nas primeiras observações, foi verificado que, à noite, ocorrem eventos importantes na determinação do nicho ecológico dessa pequena embaúba da restinga: reprodução, dispersão, predação por vários insetos e o pico de atividade das formigas simbiontes (ANDRADE, 1981).

*Cecropia obtusifolia* Bertol.

Essa planta cresce em áreas tropicais do México. É uma árvore de tamanho médio, com altura na faixa de 12 a 20 m, com um tronco fino e oco (MELLADO e LOZOYA, 1984, VIDRIO *et al.*, 1982).

*Cecropia pachystachia* Trec.

Popularmente conhecida como embaúba, imbaúba ou árvore da preguiça, é uma espécie de 4 a 7 m de altura, com tronco de 15 a 25 cm de diâmetro, nativa do Brasil. FERRO e colaboradores (1996) apresentam características anatômicas da folha, pecíolo e cascas caulinares, com o objetivo de identificar o vegetal fragmentado empregado medicinalmente.

BRANDÃO e STEHMANN (1996) realizaram um levantamento etnobotânico da espécie na região do Rio Piracicaba, Minas Gerais. Através desse estudo, foi constatado que apesar do forte impacto ambiental, devido à implantação do complexo siderúrgico, que conduziu a uma exploração irracional dos recursos desta região, essa espécie encontra-se entre as plantas medicinais mais utilizadas e preservadas pela população local.

*Cecropia peltata* L.

Em um trabalho sobre 21 espécies de árvores localizadas na floresta úmida do Rio Cataniapo (Venezuela), encontra-se a informação sobre o uso medicinal dessa planta, obtida através de indígenas e comunidades étnicas Piaro que cercam a zona de estudo desse vegetal. O levantamento foi realizado em todas as zonas navegáveis do rio (SUÁREZ, 1995).

A *Cecropia peltata* L. (= *Ambaiba peltata* Kuntze) é particularmente abundante na Índia Ocidental e na América Tropical, existindo, também, na ilha de São Tomé. De porte elevado, apresenta grandes folhas lobadas verde-escuras na face superior e prateadas na inferior. As populações indígenas americanas e indianas têm-lhe atribuído as mais diversas propriedades terapêuticas, além de a utilizarem na pequena indústria dos curtumes (PRISTA e ALVES, 1960).

No interior da *Cecropia peltata*, uma planta alta, verde e de caules ocos, vivem formigas que se abastecem de estruturas multicelulares chamadas corpos de Müller, nos quais estão estocados os plastídeos, que contêm o glicogênio. Um polissacarídeo desses plastídeos foi caracterizado, por métodos enzimáticos, como um polissacarídeo similar ao fitoglicogênio (MARSHALL e RICKSON, 1973).

PIO CORRÊA (1978) apresenta a descrição botânica, bem como nomes populares para as seguintes embaúbas: *Cecropia adenopus* Mart. (= *C. peltata* Vell.), *Cecropia bifurcata* Hub., *Cecropia cyrtostachya* Miq., *Cecropia humboldtiana* Klotsch. (= *C. peltata* Willd.), *Cecropia lyratiloba* Miq. (= *C. paludosa*, Warb.), *Cecropia obtusa* Trec., *Cecropia pachystachya* Trec., *Cecropia paraensis* Hub., *Cecropia peltata* L. (= *Ambaiba peltata* Ktze.), *Cecropia robusta* Hub., *Cecropia surinamensis* Miq. (= *C. peltata* G.F.W. Mey), *Cecropia distachya* Hub., *Cecropia ficifolia* Warb., *Cecropia hololeuca* Miq., *Cecropia leucocoma* Miq., *Cecropia palmata* Willd., (= *C. Burauniana*, Aladar Richter), *Cecropia concolor* Willd., *Cecropia scabra* Mart., *Cecropia sciadophylla* Mart., *Cecropia saxatilis* Sneth., *Cecropia laetevirens* Hub. e *Cecropia carbonaria* Mart. O autor cita ainda outras plantas que são popularmente chamadas embaúbas. São elas: *Pourouma acutiflora* Trec. (imbaúba-fruteira), *Pourouma acuminata* Mart. e *Pourouma bicolor* Mart. (imbaúba-puruma) e *Pourouma tomentosa* Mart. (= *P. retusa* Benth.) (imbaubatinga).

BERG (1978b) apresenta a descrição botânica de espécies encontradas na Amazônia brasileira, bem como seu hábito, dispersão, distribuição, mimercófilia, ecologia e uma chave para estas espécies. São elas: *Cecropia palmata* Willd., *Cecropia concolor* Willd., *Cecropia surinamensis* Miq., *Cecropia engleriana* Sneth.,

*Cecropia francisci* Sneth., *Cecropia dielsiana* Sneth., *Cecropia obtusa* Trec., *Cecropia ficilifolia* Sneth., *Cecropia distachya* Hub., *Cecropia membranacea* Trec., *Cecropia latiloba* Miq., *Cecropia ulei* Sneth., *Cecropia purpurascens* Berg, *Cecropia silvae* Berg e *Cecropia sciadophylla* Mart.

### 1.3.3.2 Farmacologia e etnofarmacologia

#### *Cecropia adenopus* Mart.

Através da avaliação do efeito do extrato bruto etanólico das folhas e suas frações, obtidas por partição em clorofórmio, em camundongos, foi constatada a inibição, preferencialmente, de interações imunológicas T-dependentes, de modo mais intenso pela fração clorofórmica do extrato bruto (GUERRA *et al.*, 1998).

#### *Cecropia obtusifolia* Bertol.

O extrato aquoso liofilizado das folhas de *Cecropia obtusifolia* apresentou efeito anti-hipertensivo quando da administração intravenosa em ratos hipertensos espontâneos. Foram testados ratos hipertensos espontâneos, pré-hipertensos SHR e normotensos. A diminuição na pressão arterial foi mais evidente no grupo dos ratos hipertensos espontâneos, sendo significativa em relação aos outros grupos. A diminuição da pressão arterial não foi acompanhada por variação da frequência cardíaca em nenhum dos grupos (SALAS *et al.*, 1987b).

Foi administrado extrato liofilizado da *Cecropia obtusifolia* em água, pela via oral (água de beber) a um grupo de ratos (fêmeas e machos) hipertensos espontâneos. Nos machos, não foram obtidas diferenças significativas na pressão arterial média e frequência cardíaca, após 4 semanas de ingestão dos extratos. Nas fêmeas, somente foram detectadas diferenças significativas na pressão arterial ao término da quarta semana, porém, não na frequência cardíaca (SALAS *et al.*, 1987a).

Foi demonstrado, em um estudo com ratos Wistar, que o extrato etanólico de *Cecropia obtusifolia* propicia a redução da pressão arterial (hipotensão), efeito que

demora a iniciar e apresenta longa duração, características estas desejáveis (VIDRIO *et al.*, 1982).

A planta é popularmente utilizada no México, na forma de infusão das folhas durante 5 a 8 dias, no tratamento de *diabetes mellitus*. MELLADO e LOZOYA (1984) realizaram um estudo, no qual cães normais e pancreatectomizados foram tratados com extrato aquoso da planta pela via intravenosa. Em ambos os grupos, foi observado um significativo decréscimo nos níveis de glicose no sangue, com simultâneo aumento na concentração de triglicérides. A insulina plasmática imunorreativa não demonstrou importante modificação. Concluiu-se, então, que a hipoglicemia obtida com o extrato não ocorre por estímulo das células beta-pancreáticas, o que foi confirmado pela hipoglicemia no grupo pancreatectomizado.

Ratos foram submetidos a teste de tolerância à glicose, utilizando-se o decocto das folhas (132 g/l durante 10 min), na dose de 4 ml/kg. Foi demonstrado que a *Cecropia obtusifolia* (guarumbo), entre outras plantas utilizadas no México no tratamento da *diabetes mellitus*, apresenta efeito hipoglicemiante evidente (RAMOS *et al.*, 1991).

Na Costa Rica, a *Cecropia obtusifolia* é utilizada no tratamento de hipertensão arterial, como diurético e com a finalidade de emagrecimento (SALAS *et al.*, 1987b).

Com a administração de extrato etanólico das folhas em ratos albinos normotensos, constatou-se o efeito da diminuição tardia e prolongada na pressão arterial. Foi notado, também, um efeito semelhante com o extrato aquoso administrado por via endovenosa (SALAS *et al.*, 1987b).

Com o objetivo de investigar a atividade diurética da *Cecropia obtusifolia*, foi realizado um estudo, utilizando-se o extrato aquoso das folhas, concentrado e posteriormente liofilizado, administrado por via oral em ratos albinos durante uma semana. O alto conteúdo de potássio nesse extrato poderia explicar, parcialmente, a ação diurética leve, porém, significativa. O efeito de perda de peso corporal, que é

estatisticamente significativo, poder-se-ia associar ao aumento da diurese sem alteração aparente na ingestão de água (HOWELL e MONTERO, 1996).

*Cecropia palmata* Willd.

As raízes e folhas dessa planta são usadas no combate à tosse, bronquite, coqueluche e no enfraquecimento do coração, sendo indicadas também contra leucorréia, gonorréia, disenteria e hipertensão (PINHEIRO *et al.*, 1998).

*Cecropia peltata* L.

Extratos dessa planta têm produzido efeito diurético, que foi demonstrado através de um leve aumento no fluxo urinário de ratos albinos, após a administração oral do extrato aquoso de suas folhas (CÁCERES *et al.*, 1987).

Foi avaliada a atividade citostática de extratos aquosos, alcoólicos e cetônicos da planta que cresce em Cuba, *Cecropia peltata*, conhecida como *yagruma*. Para tal, foi utilizado o método microbiológico de Kubas, usando-se o ascomiceto *Neurospora crassa*. A *Cecropia peltata* ficou entre as plantas que apresentaram melhores resultados. O extrato aquoso da planta não provocou inibição, entretanto, os alcoólicos apresentaram as seguintes inibições: 80,4 % e 86,9 % (1:1) para folhas e talos; 11,8 % e 3,3 % para folhas nas concentrações de 1:10 e 1:100 respectivamente e 5,2 % nas concentrações 1:10 e 1:100 para os talos. Os extratos cetônicos das folhas propiciaram 32,3 %; 46,2 % e 9,2 % de inibição para as três concentrações respectivamente e o extrato dos talos 35,4 %, para a concentração 1:1 (LOPEZ ABRAHAM *et al.*, 1979).

Posteriormente, estudos realizados em Cuba compararam os extratos aquoso, alcoólicos e cetônicos, avaliando as atividades antibacteriana e antitumoral de algumas plantas, entre elas, a *Cecropia peltata*. O extrato aquoso da planta apresentou 10 % de atividade antibacteriana. A atividade antitumoral, determinada para extratos etanólicos variou de 3,3 % a 80,4 %, dependendo da proporção da droga para solvente utilizada. Para os extratos cetônicos a atividade antibacteriana foi de 55 % e a atividade antitumoral variou de 9,2 % a 46,2 % (LOPEZ ABRAHAM *et al.*, 1980).

As cascas, assim como seus brotos (rebentos), são consideradas adstringentes e até emenagogas. As folhas têm sido aplicadas no tratamento de infecções pulmonares agudas, como antiasmático e como sedativo do sistema nervoso. GROSOURDY (GROSOURDY *apud* PRISTA e ALVES, 1960)<sup>11</sup> descreve que a ingestão do decocto origina um estado de depressão, relaxamento muscular e, particularmente, diminuição do ritmo cardíaco. Contudo, parece não se verificar efeitos cumulativos ou secundários, semelhantes aos observados pelo uso continuado de digitálicos. Por outro lado, foi verificado certo efeito diurético dos decoctos desta planta (PRISTA e ALVES, 1960).

VALERI e NARVÁEZ (VALERI e NARVÁEZ *apud* PRISTA e ALVES, 1960)<sup>12</sup> não puderam verificar qualquer ação antibiótica dos decoctos e infusos da planta, quando ensaiados *in vitro* sobre bactérias patogênicas do trato respiratório.

A administração do extrato liofilizado, a partir do extrato hidroalcolico, evaporado de raízes de *Cecropia peltata*, não promoveu modificações no inotropismo e no cronotropismo, em coração isolado de ratos, em nenhuma das doses empregadas (MARIN *et al.*, 1999).

### 1.3.3.3 Toxicologia

#### *Cecropia peltata* L.

VALERI e NARVÁEZ (VALERI e NARVÁEZ *apud* PRISTA e ALVES, 1960)<sup>13</sup> demonstraram que os decoctos e infusos de folhas da planta, cujas concentrações estavam entre 15 e 30 g/l, não eram tóxicos para a cobaia, quando injetados por via hipodérmica.

<sup>11</sup> GROSOURDY, R. *El médico botánico criollo*. 3 ed. Paris, 1864. p. 74 *apud* PRISTA, L. N.; ALVES, A. C. Estudo fitoquímico de cascas de *Cecropia peltata* L. Lisboa: *Garcia da Orta*, v. 8, n. 3, p. 615-628, 1960.

<sup>12</sup> VALERI, H.; NARVÁEZ, P. *Rev. Med. Vet. Parasitol.*, v. 10, p.105, 1950 *apud* PRISTA, L. N.; ALVES, A. C. Estudo fitoquímico de cascas de *Cecropia peltata* L. *Garcia da Orta*, v. 8, n. 3, p. 615-628, 1960.

<sup>13</sup> VALERI, H.; NARVÁEZ, P. *Rev. Med. Vet. Parasitol.*, v. 10, p.105, 1950 *apud* PRISTA, L. N.; ALVES, A. C. Estudo fitoquímico de cascas de *Cecropia peltata* L. *Garcia da Orta*, v. 8, n. 3, p. 615-628, 1960.



#### 1.3.3.4 Química

##### *Cecropia adenopus* Mart.

Para esse vegetal, a seguinte composição química já foi determinada: 1-docosanol, 1-hexacosanol, 1-tetracosanol, ácido araquídico, ácido beênico, ácido cerótico, ácido esteárico, ácido henecosanóico, ácido lignocérico, ácido margárico, ácido nonadenóico, ácido octosanóico, ácido pentacosanóico e ácido tricosanóico (NEIDLEN e KOCH, 1980b). Ácido aspártico, ácido glutâmico,  $\alpha$ -amirina, alanina, arginina, asparagina, glicina, isoleucina, prolina, serina, valina, filalanina,  $\beta$ -sitosterol, frutose, galactose, glicose e estigmast-4-en-3-ona também foram relatados (NEIDLEN e KOCH, 1980c).

RIBEIRO e MORS (1950) relatam a presença de mucilagem, que é composta de duas moléculas de ácido nanurônico e uma molécula de uma metil-pentose. Devido às possibilidades de sua aplicação, foi experimentado seu emprego como agente de cremagem do látex da seringueira.

NEIDLEIN e KOCH (1980a) descrevem o isolamento do óleo volátil de *Cecropia adenopus*, bem como cromatografia gasosa e análise espectroscópica de algumas substâncias. Os seguintes compostos foram identificados como os principais constituintes do óleo volátil: limoneno, naftaleno, 2-metilnaftaleno,  $\alpha$ -copaeno, geranilacetona,  $\delta$ -cadineno, calameno, hexa-hidrofarnesilacetona e farnesilacetona.

Em estudo fitoquímico, foi investigado o resíduo de um extrato metanólico das folhas do vegetal, no qual se revelou a existência de ácido clorogênico, orientina, isoorientina e dois outros C-glicosilflavonóides mais polares, com esqueletos de apigenina e luteonina, respectivamente, apresentando resistência à hidrólise ácida e fluorescência característica após revelação com difenilborilóxi-etilamina (XAVIER *et al.*, 1998).

*Cecropia catarinensis* Cuatr.

Da investigação dos extratos brutos de *Cecropia catarinensis*, foram obtidos os seguintes compostos triterpênicos: ácido acetilursólico; lupeol; ácido oleanólico; ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ -tri-hidróxi-urs-12-eno-28-óico e duas lactonas triterpênicas: 2 $\alpha$ -acetóxi-3 $\alpha$ ,19 $\alpha$ -di-hidróxi-11,12-epóxi-13,17-lactona e 3 $\alpha$ -acetóxi-2 $\alpha$ ,19 $\alpha$ -di-hidróxi-11,12-epóxi-13,17-lactona (MACHADO *et al.*, 1996).

Através de ponto de fusão, cocromatografia da aglicona e de seu derivado metilado, com amostras autênticas, assim como cromatografia comparativa da porção osídica, foi demonstrado que essa planta apresenta escopolina (7-glicosil-escopoletinosídeo) em seu caule, na faixa de 0,023 % (m/m) relativa ao vegetal seco (KERBER *et al.*, 1991).

*Cecropia lyratiloba* Miq.

Segundo MENDA (1976) essa *Cecropia* não possui óleo volátil, alcalóides, compostos cianogênicos, antraquinonas e saponinas. Apresenta carotenóides, esteróis (entre os quais o sitosterol), cerca de 0,5 % de taninos condensados e 0,22 % em flavonóides brutos, entre os quais foram identificados os flavonóides quercitrina e luteolina.

*Cecropia palmata* Willd.

Um estudo fitoquímico do extrato diclorometânico das folhas da planta levou ao isolamento de escoparona, ácido ursólico e 3,7,11,15,19,23-hexametil(*E*)-2-tetracosen-1-ol (PINHEIRO *et al.*, 1998).

*Cecropia peltata* L.

Através da análise fitoquímica da *Cecropia peltata*, foi detectada a presença de triterpenóides, compostos saponínicos, fenóis, taninos (catéquicos e pirogálicos) e ácidos fixos (BULHÕES *et al.*, 1976).

O estudo fitoquímico das cascas de *Cecropia peltata* permitiu concluir que são especialmente ricas em compostos de natureza esteroídica. Na fração éter de petróleo, encontrou-se um composto cristalino de natureza aldeídica. A extração por benzeno possibilitou a identificação do ácido ursólico. Nas cascas, existem compostos flavonoídicos no estado livre e sob a forma heterosídica. Ocorre ainda um outro composto heterosídico não flavonóide, nem esteróide, que libera uma única ose após a hidrólise ácida. As cascas dessa planta não têm qualquer valor como material tanante, pois a quantidade de taninos presente não ultrapassa 1,9 % (PRISTA e ALVES, 1960).

No levantamento bibliográfico realizado pelo Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da CEME, encontra-se a seguinte composição química: 8-metil-8-azabicyclo(1.2.3)octano,  $\alpha$ -D-glucano, ácido hambáico, ácido ursólico, esteróides, flavonóides, glicogênio, glicose, glicosídeos, saponina tóxica, similar à ambaina e taninos. Vários autores relatam a ausência de alcalóides no extrato de folhas e caule (BRASIL, 1996).

#### 1.4. Qualidade microbiológica

A presença de microrganismos em medicamentos pode causar malefícios diretos e indiretos ao usuário, além de interferir na estabilidade do produto. O controle da presença desses contaminantes torna-se, portanto, imprescindível, em produtos oriundos de plantas medicinais que podem carrear, já desde os insumos, esses agentes (WORLD, 1998).

O controle microbiológico em fitoterápicos é um parâmetro de qualidade, previsto na legislação, de grande importância, pois o ataque de microrganismos é um risco ao produto que pode ser invalidado devido à alterações físico-químicas e organolépticas. Esse fato merece atenção, especialmente pelo perigo potencial oferecido à saúde do usuário que espera encontrar nesse medicamento um meio de cura seguro e eficaz e não de veiculação de microrganismos. A portaria n.º 6/95 da SVS determina que seja realizada a pesquisa de contaminantes microbiológicos na matéria-prima vegetal e no produto fitoterápico conforme as recomendações da Farmacopéia Brasileira e da Organização Mundial da Saúde. Os limites para a

contaminação microbiana em fitoterápicos são preconizados pela OMS (WORLD, 1998).

No Brasil, estudos sobre a qualidade microbiológica de medicamentos fitoterápicos são realizados desde a década de 80. É de interesse de todos os países que se garanta a produção idônea desses medicamentos, por serem agentes terapêuticos de largo uso. Isso torna-se ainda mais relevante quando se considera, no caso dos países sul-americanos, o início da vigência do tratado do Mercosul que determina que a qualidade dos produtos deve atender a exigências de caráter internacional (FISCHER *et al.*, 1996).

Desse modo, a pesquisa de contaminantes microbiológicos, além de avaliar a qualidade das técnicas de cultivo, coleta, tratamentos prévios e armazenamento da matéria-prima vegetal, permite a adoção de medidas visando à manutenção, em níveis aceitáveis, da carga microbiológica quer seja nas matérias-primas, nos produtos intermediários ou no produto final (FARIAS, 1999).

A Organização Mundial da Saúde reconhecendo a necessidade desses cuidados, estabeleceu critérios de pesquisa dos contaminantes microbiológicos, bem como, os limites máximos de microrganismos para drogas vegetais (WORLD, 1998). Para tal, considerou-se a matéria-prima vegetal pré-tratada (A) e os produtos derivados de plantas para uso interno (B) (tab. 1).

Tabela 1. Limites máximos preconizados para contaminação microbiana em produtos derivados de plantas para uso interno (B) e matéria-prima vegetal pré-tratada para uso em infusos, chás ou formas de uso tópico (A)

<i>Microrganismos</i>	<i>Limite máximo (UFC/g)</i>	
	<i>A</i>	<i>B</i>
Aeróbicos	$10^7$	$10^5$
Fungos e leveduras	$10^4$	$10^3$
<i>Escherichia coli</i>	$10^2$	10
outros	$10^4$	$10^3$
<i>Salmonellae</i>	ausente	ausente

### 1.5. Validação

Os estudos de validação constituem parte essencial das Boas Práticas de Fabricação e Controle de Produtos Farmacêuticos (BRASIL, 1994), que devem ser conduzidos conforme protocolos definidos. Conforme as Boas Práticas para Fabricação e Controle de Produtos Farmacêuticos, o objetivo principal da validação analítica é assegurar que determinado procedimento analítico selecionado forneça resultados reprodutíveis e confiáveis e que seja adequado aos fins para os quais tenha sido planejado. Para tal, é necessário definir as condições nas quais o procedimento deverá ser utilizado e o propósito ao que foi planejado. Esses princípios deverão ser aplicados a todos procedimentos, sejam eles descritos ou não em farmacopéias (BRASIL, 1994). Internacionalmente, as normas foram sugeridas pela *International Conference on Harmonization* (ICH).

As exigências atuais para a qualidade das metodologias analíticas, bem como para a implantação das Boas Práticas de Fabricação e Controle, no campo das análises farmacêuticas, requerem normas estritas para a validação das mesmas (ALTESOR *et al.*, 1993). Essas normas foram definidas pela ICH no tópico Q2A, já em 1994, quando foram identificados os parâmetros necessários à validação de um método analítico e, em 1996, no tópico Q2B, onde foram definidos os dados experimentais que requerem essa validação. Atualmente, as diretrizes para a validação são apresentadas pela legislação brasileira na resolução 391/99 da ANVS, que fornece um guia para a realização da validação (BRASIL, 1999).

Nos Estados Unidos é exigido que os produtos farmacêuticos, antes de serem colocados no mercado, sejam aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA). Para tal, além de serem demonstradas a eficácia e a segurança, os vários processos e controles devem ser adequadamente controlados e validados (ANSEL *et al.*, 1999). Em 1995, o FDA publicou um guia para a validação de processos analíticos elaborado pela ICH que se preocupa com a harmonização de técnicas envolvidas no registro de produtos farmacêuticos. Esse guia apresenta uma discussão das características que devem ser consideradas durante a validação de procedimentos analíticos incluídos

como parte do registro de produtos farmacêuticos na União Européia, no Japão e nos EUA. Nele são discutidos os tipos de procedimentos analíticos e definidos os termos básicos como um meio de transpor as diferenças que ocorrem entre os vários compêndios e regulamentos existentes (UNITED STATES OF AMERICA, 1995).

No Brasil, a portaria nº. 6/95, bem como a portaria nº. 1029/98, determinam a necessidade da inclusão, nos documentos para a petição de registro, dos dados da validação de métodos de controle de qualidade que não sejam farmacopéicos, para o registro do produto fitoterápico junto ao Sistema de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1995, 1998).

A resolução 391/99 estabelece que a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 1999). Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade e especificidade adequados à análise. De acordo com a definição existente na USP 23, a validação assegura a credibilidade dos métodos durante o seu uso rotineiro (THE UNITED, 1995).

Considerando esses aspectos, a validação é compreendida em várias etapas, as quais nem sempre são aplicáveis na sua totalidade, o que irá depender do tipo de material e objetivo do procedimento.

Uma das etapas indispensáveis para a validação de metodologia analítica é a comprovação da exatidão. Esse parâmetro é definido como a medida de aproximação do resultado obtido, através do método em questão, com o valor real. A exatidão permite a medida da presença ou ausência de erro sistemático constante. Para tal, é necessário verificar a ausência tanto de interferências aditivas quanto de efeitos multiplicativos, devido à matriz de adjuvantes. Os resultados são comumente expressos como porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida de substância ativa na amostra (ALTESOR *et al.*, 1993; BRASIL, 1994; CHOW e LIU 1995).

A precisão é a medida da concordância entre resultados de um teste individual, aplicado à mesma amostra. São medidas de precisão do método os testes de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade conforme a ICH (INTERNATIONAL, 1996).

A repetibilidade e a reprodutibilidade expressam os extremos da variabilidade de um método, onde o mínimo de variação é representado pela repetibilidade e o máximo, pela reprodutibilidade, que detecta a variabilidade de resultados obtidos em diferentes laboratórios (FARRANT, 1997).

Em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a reprodutibilidade é medida pela constância do tempo de retenção e expressa como coeficiente de variação (WELLS, 1988).

A repetibilidade descreve a precisão do método, medida por repetições do procedimento pelo mesmo analista, sob mesmas condições operacionais e dentro de um curto período de tempo. É esperado que esse valor seja menor do que o da precisão intermediária. Na cromatografia líquida de alta eficiência, para injeções com seis repetições, o coeficiente percentual de variação máximo aceito é de 2 % (BRASIL, 1994; FARRANT, 1997; WELLS, 1988).

A precisão intermediária expressa o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos, como por exemplo, diferentes dias, analistas ou equipamentos (SWARTZ e KRULL, 1997, 1998).

A especificidade infere sobre a capacidade de medir, com exatidão e de forma específica, a concentração do analito na presença de outros componentes da matriz. A comprovação desse parâmetro em CLAE é constatada pela identidade e homogeneidade dos picos de interesse. Além disso, a exatidão na separação pode ser medida e documentada através da resolução, eficiência e fator cauda. Pode ser desenvolvida com auxílio de detector com arranjo de fotodiodos, através da comparação de espectros, verificando-se a homogeneidade do pico (INTERNATIONAL, 1996; SWARTZ e KRULL, 1997, 1998).

A análise de regressão linear estuda a relação funcional entre variáveis, estabelecida através de uma reta. O método dos mínimos quadrados é utilizado para a obtenção da melhor reta entre os pontos. A função matemática  $y = f(x)$  é expressa através da equação da reta de regressão  $y = a + bx$ . O coeficiente de regressão ( $r^2$ ) indica a utilidade de usar a regressão para se fazer ajustamentos ou previsões. Esse coeficiente deverá estar na faixa de aproximadamente 1 e, quanto mais próximo o valor for de 1, maior será a correlação entre as variáveis, sendo que a proximidade de zero indica que as mesmas não se correlacionam (RIBOLDI, 1995, FARRANT, 1997).

A robustez descreve a capacidade do método permanecer inalterado frente a variações pequenas, mas deliberadas, das condições experimentais, utilizando uma mesma amostra. São medidos os efeitos destas variações nos resultados e as medidas devem ser incluídas na documentação do método, de forma que esses parâmetros sejam adequadamente controlados. A robustez indica a confiabilidade do método, durante o seu uso normal. Esse parâmetro deve ser considerado durante a fase de desenvolvimento do método e depende do tipo de procedimento em estudo. Os resultados devem também serem incluídos na documentação do método para permitir seu controle (INTERNATIONAL, 1996; SWARTZ e KRULL, 1997, 1998; BRASIL, 1999).

A USP 23, além dos parâmetros acima definidos, inclui o de resistência. Entretanto, nas diretrizes da *International Conference on Harmonization* não existe um item específico para esse parâmetro, mas ele está incluído como parte da precisão, pois sua definição assemelha-se a da reprodutibilidade (SWARTZ e KRULL, 1998).

Após a validação, o método está pronto para ser transferido para outros laboratórios que poderão utilizá-lo. Durante o tempo de utilização, pode ser necessário, por uma razão ou outra, revalidá-lo. Contudo, não se faz necessária a validação total, devendo serem feitas determinações suficientes, conforme as necessidades e o uso de cada método (SWARTZ e KRULL, 1998).



---

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## **2.1 Material**

### **2.1.1 Matéria-prima**

#### **2.1.1.1 Material vegetal**

A droga vegetal utilizada constituiu-se de folhas de *Cecropia glazioui* Sneth., maduras e secas ao sol, fornecida pelo Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Os exemplares provêm de cultivo constituído de clones com idade de 6 anos<sup>14</sup>. A exsicata, composta das folhas e infrutescências, foi depositada e catalogada no herbário do Instituto de Ciências Naturais da UFRGS sob o ICN: 114319 .

#### **2.1.1.2 Matéria-prima vegetal**

A droga vegetal foi seca em estufa de ar circulante durante cinco dias, à temperatura de 30 °C e, após, foi armazenada em sacos de papel pardo e estes em tambor de papelão à temperatura ambiente e ao abrigo da luz solar direta. Parte dessa foi moída em moinho de facas dotado de tamis com saída de 1 mm de abertura de malha e, após, armazenada sob congelamento.

#### **2.1.1.3 Adjuvante**

Foi utilizado como adjuvante de secagem o dióxido de silício coloidal (Aerosil®200/Degussa), sem tratamento prévio.

---

<sup>14</sup> Agradecimentos ao Eng. Agrônomo Íllo Montanari Jr., CPQBA/UNICAMP, pelo relatório agrônômico (figura 1, anexos).

### 2.1.2 Reagentes, soluções e substância referência

Todos os reagentes utilizados possuíram, se não diferentemente especificado, grau de pureza pró-análise (p.a.):

- acetonitrila para cromatografia líquida de alta eficiência (OmniSolv<sup>®</sup>/En Science);
- ácido acético glacial (Synth);
- acetato de potássio (Synth);
- isovitexina (Extrasynthèse, lote: 98052804);
- *n* - butanol (Vetec);
- metanol para cromatografia líquida de alta eficiência (OmniSolv<sup>®</sup>/En Science);
- nitrito de sódio (Reagen);
- reagente natural A (difenilborilóxi-etilamida) (Rotichrom CH, art. 35315843-c/Roth);
- fosfato dibásico de sódio, dodecaidratado (QM<sup>®</sup>);
- polietilenoglicol 2000 fornecido por Delaware.

### 2.1.3 Aparelhos e equipamentos

- analisador de tamanho de partícula por difração a laser Coulter Multisizer IIe;
- aparelho de tamisação vibratório Retsch Retac 3D com tamises segundo a DIN 12791 série 4188;
- cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu composto por injetor – automático SIL-10A, controlador de gradiente de baixa pressão FCV-10AL, misturador de solventes SUS, bomba para cromatógrafo líquido LC-10AD; módulo de comunicação CBM-10A, detector UV/VIS SPD-10A, unidade de desgaseificação DGU-2A e programa de gerenciamento e avaliação CLASS LC-10;

- cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters composto por módulo de separação 2690, detector com arranjo de fotodiodos 996 e programa de gerenciamento e avaliação Millennium;
- espectrofotômetro Unicam 8625 UV/VIS;
- estereomicroscópio Wild M 7A com equipamento fotográfico Leitz acoplado;
- fluxômetro MQBAL.1 Microquímica;
- higrômetro de fio de cabelo;
- metalizador Joel Jee 4B - modelo JVG - IN;
- microscópio eletrônico de varredura Philips Série XL 20 Tipo PW 6620/00;
- microscópio Dialux 20EB com equipamento fotográfico Leitz acoplado;
- microscópio óptico Leitz;
- moinho de facas com abertura de malha de 1 mm Retsch SK1;
- prensa hidráulica manual Hafico, capacidade 5 l;
- sistema de determinação de perda por dessecação composto por balança analítica Mettler PM200 com sistema de secagem por infravermelho Mettler LP 16;
- termo-higrômetro digital TFA;
- torre de secagem por aspersão Büchi MSD 190 com aspersor de diâmetro 0,7 mm;
- volúmetro de compactação J. Engelsmann.

#### **2.1.4 Outros materiais**

- ágar caseína-soja (F. Bras. IV, 1988);
- ágar Mac Conkey (F. Bras. IV, 1988);
- água peptonada (F. Bras. IV, 1988);
- ágar Sabouraud-dextrose (F. Bras. IV, 1988);
- caldo de enriquecimento pH 7,2 (F. Bras. IV, 1988);
- coluna para cromatografia líquida de alta eficiência: dimetiloctadecilsilano 4 µm (3,9 x 150 mm) Nova-Pak C<sub>18</sub><sup>®</sup>, Waters;

- membranas filtrantes: Durapore 0,22  $\mu\text{m}$  (HP01300) para filtração das amostras e Durapore 0,45  $\mu\text{m}$  (HVLP 04700), Durapore 0,45  $\mu\text{m}$  (HVHP 04700) para filtração da fase móvel, Millipore;
- material de enchimento da pré-coluna: dimetiloctadecilsilano 37-50  $\mu\text{m}$  (Bondapak C<sub>18</sub><sup>®</sup> / Corasil, Waters);
- pré-coluna Waters P/N 084550, em aço inoxidável com diâmetro interno de 3,9 mm com capacidade para 400 mg de material de enchimento;
- placas para cromatografia em camada delgada sobre folha de alumínio, GF<sub>254</sub>, Al SilG/UV, Whatman, 4420222;
- tampão fosfato pH 7,2 (F. Bras. IV, 1988).

## **2. 2 Metodologia**

### **2.2.1 Caracterização do material vegetal**

#### **2.2.1.1 Caracterização macro e microscópica**

O material vegetal foi macroscopicamente caracterizado pela observação a olho nu e microscopicamente, através de estereomicroscópio e microscópio ótico. Para tal caracterização, foram realizadas fotografias da exsicata, fotomicrografias do material vegetal rasurado e cominuído e fotomicrografias dos tricomas encontrados nos fragmentos de lâmina foliar do material rasurado<sup>15</sup>.

#### **2.2.1.2 Perda por dessecação**

Amostras contendo cerca de 2 g de droga vegetal fragmentada foram exatamente pesadas em pesa-filtros, previamente tarados. Os pesa-filtros contendo as amostras foram colocados em estufa à temperatura de 105 °C durante 2 horas, resfriados por 30 minutos em dessecador e, então, pesados. Após esta pesagem foram recolocados na estufa à mesma temperatura por mais 1 hora, resfriados em dessecador

---

<sup>15</sup> Agradecimentos ao Prof. Dr. Jorge Ernesto Mariath e à técnica Bibiana Cassol, Dep. de Botânica - UFRGS, pelo uso do laboratório e equipamentos e pela orientação nesta análise.

por 30 minutos e, novamente, pesados. Esse procedimento foi repetido até que as amostras apresentassem peso constante (F. Bras. IV, 1988). Os resultados foram expressos em perda percentual de massa, através da média de três determinações.

Essa análise também foi realizada em balança com sistema de secagem por infravermelho à temperatura de 105 °C, na sensibilidade de 120 segundos, utilizando-se cerca de 5 g de droga vegetal. Os dois métodos foram estatisticamente comparados com o objetivo de verificar se ambos são equivalentes.

## **2.2.2 Caracterização da matéria-prima vegetal**

### **2.2.2.1 Caracterização macro e microscópica**

A matéria-prima vegetal foi caracterizada conforme o item 2.2.1.1.

### **2.2.2.2 Perda por dessecação**

Amostras contendo cerca de 2 g da matéria-prima vegetal foram exatamente pesadas em pesa-filtros, previamente tarados e seu teor de umidade residual determinado conforme o item 2.2.1.2.

### **2.2.2.3 Análise granulométrica (VOIGT, 1993; HELMAN, 1982)**

Amostras com 100 g da matéria-prima vegetal foram submetidas à passagem forçada por vibração através de tamises, previamente tarados, com abertura nominal de malhas de 0,635, 0,315, 0,250, 0,125, 0,080 e 0,053 mm. A operação foi realizada em tamisador vibratório, a 60 vibrações por minuto. Após 1 hora, as frações retidas nos tamises e no coletor foram pesadas.

Para a análise granulométrica, foram considerados os parâmetros de distribuição por classe granulométrica tais como: intervalo de abertura de malha, diâmetro granulométrico médio, fração retida, fração retida acumulada e fração de passagem. Os resultados representam a média de cinco determinações.

#### 2.2.2.4 Determinação do teor de extrativos (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)

Cerca de 1,0 g matéria-prima vegetal, exatamente pesado, acrescido de 100 g de água, foi levado à fervura durante 10 minutos. Após o resfriamento, completou-se a massa correspondente à água evaporada e filtrou-se, desprezando-se os primeiros 20 ml. Em pesa-filtros, previamente tarados, 20,0 g do filtrado foram evaporados à secura em banho de água, sob agitação constante. Os pesa-filtros foram colocados em estufa à temperatura de 105 °C, por 2 horas, resfriados em dessecador por 20 minutos, pesados e recolocados em estufa à mesma temperatura por mais 1 hora, resfriados e novamente pesados até a obtenção de peso constante. O teor de extrativos foi calculado segundo a equação (1), expressando a média de quatro determinações com três repetições.

$$TE = \frac{g \times FD \times 100}{m - (m \times pd / 100)} \quad (1)$$

Onde:

$TE$  = teor de extrativos (%; m/m);

$g$  = massa do resíduo seco (g);

$m$  = massa da droga (g);

$FD$  = fator de diluição, igual a 5;

$pd$  = perda por dessecação (%).

#### 2.2.2.5 Análise cromatográfica

##### 2.2.2.5.1 Cromatografia em camada delgada

A amostra de solução extrativa utilizada para esta análise foi preparada a partir de 66,7 g da matéria-prima vegetal, sobre os quais foram vertidos 1000 ml de água aquecida à temperatura de 95 °C. Após 5 minutos de contato, o marco foi separado em prensa hidráulica com auxílio de tecido de algodão branqueado com urdidura de 12 × 9 fios/cm<sup>2</sup>. O líquido resultante foi filtrado a vácuo, sobre algodão, obtendo-se o volume de 750 ml.

Em placa de gel de sílica GF<sub>254</sub>, foram aplicadas, paralelamente, a amostra e, como padrão, solução metanólica de isovitexina. Foi empregado como sistema de eluição *n* - butanol: água: ácido acético (30:10:10, V/V) (MABRY, 1970). A detecção foi feita sob luz UV, em 366 nm, após terem sido borrifados sobre a placa o reagente natural A a 0,5 % e, a seguir, a solução metanólica de polietilenoglicol 2000 a 30 % (m/V).

#### 2.2.2.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A amostra resultou da extração, por infusão, durante 5 minutos, de cerca de 1,0 g da matéria-prima vegetal, exatamente pesado, com 150 ml de água aquecida à temperatura de 95 °C. Após a filtração sobre algodão, a pressão reduzida, obteve-se 130 ml de solução extrativa. Aliquota de 5,0 ml dessa solução foi diluída com metanol em balão volumétrico de 10 ml e, posteriormente, filtrada através de membrana com tamanho de poro de 0,22 µm.

As condições cromatográficas consistiram em: injeção automática com volume de 20 µl, detecção no ultravioleta (340 nm), gradiente de acetonitrila e água destilada acidificada com ácido acético glacial (95: 5, V/V), em regime de eluição conforme a tabela 2.

Tabela 2. Programa de constituição da fase móvel em função do tempo

<i>Tempo (min)</i>	<i>Acetonitrila (%)</i>	<i>Água + ác. acético (95: 5, V/V)</i>
0,01	13	87
2,5	13	87
5	30	70
10	30	70
11	13	87



### **2.2.2.5.3 Avaliação do comportamento da matéria-prima vegetal em relação à sorção de umidade frente ao armazenamento**

O comportamento da matéria-prima vegetal após secagem em estufa de ar circulante na temperatura de 30 °C durante 5 dias, frente às condições de armazenamento foi avaliado através da umidade residual, em tempos não regulares, durante o período de armazenamento de 504 dias. A matéria-prima vegetal foi armazenada em sacos de papel pardo e esses em tambor de papelão à temperatura ambiente e ao abrigo da luz solar direta. A umidade residual foi determinada pelo método de perda por dessecação em balança com sistema de secagem por infravermelho conforme o descrito em 2.2.1.2.

## **2.2.3 Análise microbiológica das matérias-primas**

### **2.2.3.1 Análise microbiológica da matéria-prima vegetal**

Esta análise foi realizada através da contagem de microrganismos viáveis totais empregando-se o método de contagem em placa conforme a F. Bras. IV (1988) adaptado na preparação da amostra.

A matéria-prima vegetal moída foi amostrada e homogeneizada. Cerca de 5,58 g foram dispersos em 100 ml de tampão fosfato pH 7,2. Aliquota de 10 ml da dispersão foi diluída até 100 ml com água peptonada. Após 1 hora, foram tomados 200 µl, que foram esgotados em placas de Petri contendo 20 ml de meio de cultura ágar caseína-soja, para a identificação de bactérias e, para a identificação de fungos e leveduras, ágar Sabouraud-dextrose, a fim de quantificar a contaminação microbiana nas amostras. Aquele foi incubado durante 4 dias na temperatura de 30 a 35 °C e este foi incubado durante 7 dias na temperatura de 20 a 25 °C. Após a incubação, foram realizadas as contagens.

A análise qualitativa foi realizada para a amostra de matéria-prima vegetal empregando-se o método geral para pesquisa e identificação de patógenos. Para tal, foram transferidos cerca de 5,0 g da amostra, exatamente pesados, para frasco contendo 300 ml de caldo de enriquecimento pH 7,2. Após a incubação dessa

dispersão, durante 48 horas, foi transferida uma alçada para os meios ágar caseína-soja e ágar Mac Conkey<sup>16</sup>. As colônias crescidas foram submetidas a provas bioquímicas para a identificação microbiana<sup>17</sup>.

### **2.2.3.2 Análise microbiológica do adjuvante**

A análise microbiológica do adjuvante seguiu a mesma metodologia descrita em 2.2.3.1 para a análise quantitativa, sendo a amostra preparada pela dispersão de cerca de 1 g de dióxido de silício coloidal em 100 ml de tampão fosfato pH 7,2.

A análise qualitativa foi realizada identificando as colônias provenientes da contagem de microrganismos viáveis totais, através de provas bioquímicas (SNEATH, 1986).

## **2.2.4 Desenvolvimento e caracterização do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* Sneth. (PCG)**

### **2.2.4.1 Preparação da solução extrativa para a produção do PCG (HEBERLÉ *et al.*, 1998)**

Cada um dos vinte e quatro lotes de solução extrativa foi preparado a partir de 66,7 g da matéria-prima vegetal, sobre os quais foram vertidos 1000 ml de água aquecida à temperatura de 95 °C. Após 5 minutos de contato, o marco foi separado em prensa hidráulica com auxílio de tecido de algodão branqueado com urdidura de 12 × 9 fios/cm<sup>2</sup>. O líquido resultante foi filtrado a vácuo, sobre algodão, obtendo-se volume final de 750 ml.

### **2.2.4.2 Determinação do resíduo seco**

Este ensaio foi realizado em balança com sistema de secagem por infravermelho conforme o descrito em 2.2.1.2, utilizando-se 20 ml da solução extrativa

<sup>16</sup> Agradecimentos ao Prof. Dr. José Carlos Germani pela orientação e ao mestrando Airano Silveira e Silva, pela realização das análises, Setor de Tecnologia Bioquímica - UFRGS

<sup>17</sup> Agradecimentos à mestranda Nilza Limberger pela realização das provas bioquímicas, PPGMAA- UFRGS.

preparada conforme descrito no item 2.2.4.1. Os resultados foram expressos em percentagem ponderal de resíduo seco, pela média de três determinações.

### 2.2.4.3 Desenvolvimento do PCG

Em torre de secagem por aspersão, foram preparadas seis amostras de PCG, variando-se o percentual do adjuvante de secagem – dióxido de silício coloidal – bem como os parâmetros da operação de secagem, de acordo com o descrito na tabela 3.

O rendimento bruto da operação de secagem dos produtos foi calculado em relação à massa teórica, considerando-se os sólidos totais presentes nas soluções de nebulização. Os sólidos totais correspondem ao resíduo seco da solução extrativa, somado ao peso de Aerosil a ela acrescentado.

A umidade residual, o tempo de processamento e o rendimento líquido, calculado pelo rendimento bruto subtraído da umidade residual, foram os critérios de escolha dos parâmetros de secagem mais adequados para a obtenção do PCG.

Tabela 3. Parâmetros da operação de secagem e proporção de adjuvante de secagem para a obtenção e seleção do PCG

<i>Condições</i>	<i>Temperatura de admissão (°C)</i>	<i>Fluxo de alimentação (ml/min)</i>	<i>ΔT (°C)</i>	<i>Proporção do adjuvante de secagem (%) *</i>
1	145	5	47	20
2	167	7	54	20
3	150	5	64	20
4	167	4	44	20
5	157	3	36	30
6	170	7	56	30

\* Calculado com base no resíduo seco da solução extrativa, ΔT = diferença entre a temperatura de admissão e temperatura de saída.

## **2.2.4.4 Caracterização do PCG**

### **2.2.4.4.1 Caracterização visual**

#### **2.2.4.4.1.1 Avaliação das características macroscópicas**

As características macroscópicas foram avaliadas através da observação visual da cor e aspecto do pó.

#### **2.2.4.4.1.2 Análise das partículas por microscopia eletrônica**

A forma e o tamanho das partículas foram observados por microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram distribuídas sobre suportes de metal, com auxílio de fita adesiva de dupla face, e cobertas com um filme de ouro. As eletromicrografias foram obtidas em diversos aumentos. A metalização foi realizada no Departamento de Metalurgia da Escola de Engenharia<sup>18</sup> e as eletromicrografias no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### **2.2.4.4.2 Determinação do teor de umidade**

A umidade residual dos produtos secos por aspersão foi determinada por gravimetria, utilizando-se balança com sistema de secagem por infravermelho. Em suportes de alumínio, foram colocados cerca de 200 mg de cada produto seco por aspersão, nas condições de operação conforme o descrito em 2.2.1.2. Os resultados, expressos em percentual ponderal, representam a média de três determinações.

#### **2.2.4.4.3 Análise granulométrica do PCG (LIEBERMAN e LACHMAN, 1989, LANTZ, 1990, WELLS, 1988)**

A análise granulométrica do extrato seco foi realizada através da medida do diâmetro de Ferret de 540 partículas, em microscópio óptico, com ocular no aumento de dez vezes, provida de nônio graduado, utilizando-se objetiva com aumento de quarenta vezes. O nônio foi calibrado com auxílio de escala de 1 mm com 100

---

<sup>18</sup> Agradecimentos ao Departamento de Metalurgia desta Universidade, pela realização da metalização.

divisões. Nessas condições, cada divisão do nônio corresponde a 3,4  $\mu\text{m}$ . Os produtos secos por aspersão foram analisados a seco.

A distribuição granulométrica foi representada através de histograma e o diâmetro médio das partículas foi determinado matematicamente pela média aritmética (ZIMMERMANN, 1998) e graficamente, a partir dos dados obtidos através das curvas RRSB ( $d_m$ ) e de distribuição granulométrica do PCG em função da frequência acumulada percentual ( $d_{50\%}$ ). O desvio padrão geométrico (amplitude de distribuição ou padrão de distribuição) foi calculado através da linearização da curva de distribuição geométrica, utilizando-se a equação (2).

$$\delta = \frac{d_{84\%}}{d_{50\%}} \quad (2)$$

Onde:

$\delta$  = desvio padrão geométrico;

$d_{84\%}$  = diâmetro das partículas para frequência acumulada de 84 %;

$d_{50\%}$  = diâmetro médio de 50 % das partículas ( $\mu\text{m}$ ).

Outro método utilizado para a determinação do diâmetro médio de partícula empregou o equipamento para análise de tamanho de partículas por difração a laser, utilizando-se uma dispersão de PCG em isopropanol<sup>19</sup>.

#### 2.2.4.4.4 Determinação dinâmica do fluxo

O fluxo dos produtos secos por aspersão foi avaliado pelo escoamento dinâmico, através de um funil de polietileno, com diâmetro de carga de 10,3 cm, diâmetro de descarga de 1,7 cm e 8,5 cm de altura. As cinco determinações foram realizadas em equipamento dotado de módulo de descarga automático e interface para microcomputador para gerenciamento de dados (fig. 5). Os parâmetros avaliados foram a velocidade de fluxo e a curva que descreve o escoamento.

<sup>19</sup> Agradecimentos a empresa Biolife Comércio Ltda. pela cessão do aparelho e ao Sr. Nicolau R. Silveira pela análise.

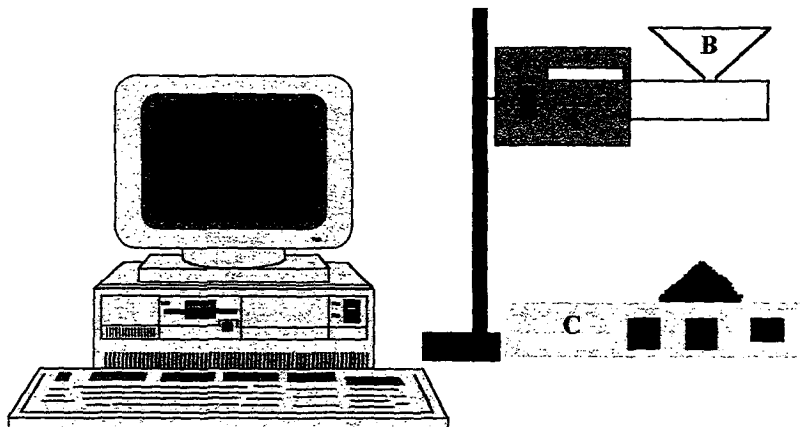


Figura 5. Equipamento utilizado para determinação de fluxo de sólidos. A: módulo de descarga automático, B: funil, C: balança

#### 2.2.4.4.5 Determinação do ângulo de repouso

O ângulo de repouso foi determinado pelo aparelho utilizado por PATHIRANA e GUPTA (1976) e modificado por GUTERRES (1990). O mesmo consiste em um cilindro de vidro móvel ajustado a uma base fixa, acoplado a um motor que, quando acionado, separa o cilindro da base pela ascensão do mesmo. Uma superfície vertical, dotada de planilha, foi utilizada para registro da sombra projetada pela incidência da fonte luminosa sobre o cone formado pelo pó, após a elevação do cilindro contendo a amostra (fig. 6). Foram realizadas 10 determinações utilizando-se 10 ml de PCG medidos em proveta. As medidas foram realizadas através do registro das sombras projetadas, segundo a equação (3):

$$\alpha = 0,5 (180 - b) \quad (3)$$

Onde:

$\alpha$  = ângulo de repouso (°);

$b$  = ângulo do ápice do triângulo (°).

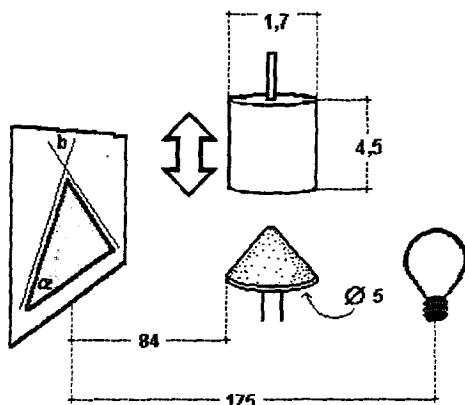


Figura 6. Equipamento utilizado para determinação do ângulo de repouso (dimensões em cm)

#### 2.2.4.4.6 Determinação das densidades bruta e de compactação (VOIGT, 1993; GUYOT *et al.*, 1995)

Cerca de 10 g do PCG foram exatamente pesados e transferidos para uma proveta de 50 ml com o objetivo de determinar a sua densidade bruta, a qual consiste na razão entre o peso do PCG e o volume livremente ocupado por este. A densidade de compactação foi determinada com auxílio de volúmetro de compactação. O pó contido na proveta foi submetido a 10, 500 e 1250 quedas. O ensaio foi continuado com séries de 1250 quedas até que a diferença entre duas leituras subsequentes fosse igual ou inferior a 1 ml. A densidade de compactação corresponde à razão entre o peso do PCG e o volume final ocupado por este. Os valores da densidade bruta e de compactação representam a média de três determinações.

#### 2.2.4.4.7 Determinação do fator de Hausner (WELLS, 1988)

O fator de Hausner (FH) foi determinado através do quociente entre as densidades de compactação e bruta do produto seco nebulizado, conforme a equação (4). O mesmo expressa a média entre os três resultados obtidos a partir dos valores individuais.

$$FH = \frac{dc}{db} \quad (4)$$

Onde:

$FH$  = fator de Hausner;

$dc$  = densidade de compactação (g/ml);

$db$  = densidade bruta (g/ml).

#### 2.2.4.4.8 Determinação do índice de compressibilidade (CARR, 1965)

O índice de compressibilidade (IC) foi calculado segundo a equação (5). Corresponde à média dos índices de compressibilidade calculados a partir dos valores individuais de densidades de compactação e bruta obtidos através de três determinações.

$$IC = \frac{dc - db}{dc} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

$IC$  = índice de compressibilidade (%);

$dc$  = densidade de compactação (g/ml);

$db$  = densidade bruta (g/ml).

#### 2.2.4.4.9 Determinação da compactabilidade (GUYOT *et al.*, 1995)

Em cada ensaio, utilizaram-se aproximadamente 10 g do produto seco para a determinação dos volumes compactados parciais após 10 e 500 quedas.

A compactabilidade (C) foi determinada pela diferença entre os volumes após 10 ( $V_{10}$ ) e 500 ( $V_{500}$ ) quedas, em volúmetro de compactação. O resultado corresponde à média de três valores de C calculados a partir dos valores individuais de três determinações, conforme a equação (6).

$$C = V_{10} - V_{500} \quad (6)$$



#### **2.2.4.4.10 Comportamento em ambientes com umidades relativas controladas**

Foi avaliado o comportamento dos nebulizados em ambientes de 26 %, 70 % e 99 % de umidade relativa. Para tanto, foram preparados 500,0 ml de soluções saturadas com depósito de sólido de acetato de potássio para umidade relativa de 26 %, de nitrito de sódio, para 70 % de umidade relativa e de fosfato dibásico de sódio, para 99 % de umidade relativa (DAVID, 1991 - 1992; MERCK, 1989). Essas soluções foram transferidas para dessecadores, nos quais a umidade relativa foi monitorizada através de termo-higrômetro digital, com precisão de  $\pm 5$  % na medição da umidade relativa e  $\pm 2$  °C na temperatura. Os dessecadores foram armazenados ao abrigo da luz solar e mantidos à temperatura constante de 22 °C.

Nos dessecadores foram colocados cinco pesa-filtros, previamente tarados e destituídos de tampa, contendo cerca de 300,0 mg do PCG exatamente pesados. Como controle foram utilizados três pesa-filtros vazios. A avaliação da sorção de água foi realizada por gravimetria, através de balança com sistema de secagem por IV, determinando-se a diferença de peso, inicialmente, após 24 horas e, posteriormente, a cada 48 horas, totalizando 17 dias de exposição.

Os resultados, que representam a média de cinco determinações, foram expressos em percentual ponderal do aumento ou diminuição de massa.

Na determinação do comportamento dos nebulizados frente à umidade, também, foram observadas as alterações das características macroscópicas dos mesmos.

#### **2.2.4.4.11 Análise cromatográfica**

##### **2.2.4.4.11.1 Cromatografia em camada delgada**

Foi realizada cromatografia comparativa entre os extratos secos produzidos, os quais foram diluídos qualitativamente em metanol.

O sistema cromatográfico e o de detecção foram os mesmos utilizados para a caracterização do material vegetal (item 2.2.2.5.1).

#### **2.2.4.4.11.2 Cromatografia líquida de alta eficiência**

O sistema utilizado foi o mesmo da caracterização do material vegetal anteriormente descrito no item 2.2.2.5.2. A amostra foi preparada a partir da dissolução de cerca de 0,3 g de PCG, exatamente pesados, em água, em balão volumétrico de 50 ml. Aliquota de 1,0 ml desta solução foi diluída com metanol, em balão volumétrico de 10 ml.

#### **2.2.5. Análise microbiológica do PCG**

Para esta análise, foram exatamente pesados cerca de 5,06 g do PCG e procedeu-se a análise conforme a técnica descrita no item 2.2.3. Para a análise qualitativa, as colônias crescidas foram repicadas para placas de Petri contendo meio seletivo para *Bacillus cereus* (SNEATH, 1986).

Os fungos que cresceram no PCG exposto à umidade de 99 % (ensaio descrito em 2.2.4.4.10) foram repicados para placas de Petri contendo ágar Sabouraud-dextrose e identificados através de microscópio óptico.<sup>20</sup>

#### **2.2.6. Validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (SWARTZ e KRULL, 1997; INTERNATIONAL, 1996; USP 23, 1995)**

##### **2.2.6.1 Exatidão**

A exatidão foi avaliada através da porcentagem de recuperação. Para tanto adicionaram-se à solução de extrato aquoso e à outra do produto seco, alíquotas de uma solução metanólica de isovitexina na concentração de 7 µg/ml.

<sup>20</sup> Agradecimentos à mestranda Maria Viviane G. Müller pela identificação dos fungos, PPGMAA - UFRGS.

A solução mãe de produto seco foi preparada, em balão volumétrico de 50,0 ml com água sob ultrassom a partir da dissolução de cerca de 0,3 g desse, exatamente pesados, durante 10 minutos. Quatro alíquotas de 2,0 ml da solução extrativa, preparada conforme descrito em 2.2.2.5.2, e de 1,0 ml da solução mãe do PCG, foram diluídas a 10,0 ml com metanol, sendo que a três alíquotas dessas soluções, foram adicionados, respectivamente, os volumes de 2,0 ml, 3,0 ml e 4,0 ml da solução de isovitexina.

### **2.2.6.2 Precisão**

#### **2.2.6.2.1 Repetibilidade**

Para avaliar a repetibilidade do método foram analisadas soluções do padrão, do extrato aquoso e do PCG, nas concentrações de 5,6 µg/ml, 0,6 ml/ml e 1,2 mg/ml, respectivamente.

A solução padrão foi preparada a partir da diluição de 4,0 ml, de uma solução mãe contendo 14 µg/ml de isovitexina, a 10,0 ml com metanol. A amostra de extrato aquoso foi resultante da diluição de 6,0 ml da solução extrativa, preparada conforme o descrito no item 2.2.2.5.2, a 10,0 ml com metanol. Para a preparação da amostra de PCG, 2,0 ml da solução mãe, preparada conforme 2.2.6.1, foram diluídos em metanol em balão volumétrico de 10 ml. As diluições das amostras foram realizadas de forma que as áreas do pico de interesse nas amostras de extrato aquoso, PCG e padrão, fossem aproximadas.

Os resultados foram expressos através do coeficiente de variação de sete repetições em termos absolutos, conforme FARRANT (1997).

#### **2.2.6.2.2 Precisão intermediária**

Foram analisadas amostras de padrão (5,6 µg/ml), extrato aquoso (0,6 ml/ml) e do produto seco (1,2 mg/ml) preparadas conforme o descrito no item 2.2.6.2.1.

Os cromatogramas foram realizados em intervalos de 24 horas, com sete repetições, durante três dias. Os resultados foram expressos através de coeficiente de variação e em termos absolutos, conforme FARRANT (1997).

### 2.2.6.3 Especificidade

Para esta análise, foram preparadas amostras de solução extrativa, PCG e isovitexina. A amostra de solução extrativa foi obtida pela diluição de 4,0 ml, de solução extrativa, preparada conforme o descrito no item 2.2.2.5.2, a 10,0 ml com metanol. A amostra de PCG foi preparada pela diluição de cerca de 0,34 g, exatamente pesados, a 25,0 ml com metanol. Alíquota de 1,0 ml dessa solução foi diluída até 10,0 ml com metanol. Para a preparação da amostra do padrão de isovitexina, partiu-se de uma solução mãe na concentração de 14 µg/ml. Para tanto, diluíram-se 8,0 ml da solução mãe a 10,0 ml com metanol.

A especificidade foi avaliada utilizando-se detector com arranjo de fotodiodos, comparando-se o espectro no UV do pico do padrão de isovitexina (11,2 µg/ml) ao correspondente em uma amostra de extrato aquoso (0,4 ml/ml) e outra de produto seco (1,35 mg/ml), verificando-se a identidade. A homogeneidade foi verificada pela comparação dos espectros obtidos por fatiamento do pico correspondente ao padrão nas amostras de extrato aquoso e do PCG<sup>21</sup>.

### 2.2.6.4 Linearidade e faixa de confiança

Foram realizadas curvas de calibração utilizando-se cinco concentrações do padrão de isovitexina, do extrato aquoso e do produto seco. As soluções de padrão foram preparadas a partir de uma solução mãe de isovitexina em metanol, na concentração de 14 µg/ml. Dessa solução foram tomadas alíquotas de 0,5, 2,0, 4,0 e 6,0 ml as quais foram diluídas a 10,0 ml com metanol. Obtiveram-se as concentrações de 0,7, 2,8, 5,6 e 8,4 µg/ml, além da própria solução mãe.

<sup>21</sup> Agradecimento ao Prof. Dr. José Ângelo da Silveira Zuanazzi (UFRGS) pela realização dos cromatogramas e espectros.

Para a obtenção das amostras do extrato aquoso, foram realizadas diluições de alíquotas de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 ml da solução extrativa, cuja preparação está descrita no item 2.2.2.5.2, a 10,0 ml com metanol. As cinco soluções do PCG foram obtidas a partir da diluição, em balão volumétrico de 5,0 ml, de alíquotas de 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 4,0 ml, provenientes da solução mãe preparada pela diluição de cerca de 0,25 g, exatamente pesados, a 50,0 ml com metanol.

As curvas de calibração foram submetidas à análise de regressão linear para a expressão dos resultados, os quais representam a média de três repetições para cada ponto da curva. A faixa de confiança ao longo da reta foi determinada pelos programas Sigmastat® e Sigmaplot®.

#### **2.2.6.5 Robustez**

A robustez foi avaliada através da análise, em triplicata, de amostras de padrão (5,6 µg/ml), conforme o descrito no item 2.2.6.2.1, de extrato aquoso (0,4 ml/ml), conforme o descrito no item 2.2.6.3 e do produto seco (1,8 mg/ml), partindo-se da diluição de 6,0 ml da solução mãe descrita no item 2.2.6.1, a 10,0 ml com metanol. Para tal, variou-se o fluxo da fase móvel, o qual foi alterado de 1,2 ml/min para 1,1 e 1 ml/min.

Os efeitos da variação na composição da fase móvel foram avaliados através de alterações no gradiente conforme a tabela 4. As amostras do padrão (5,6 µg/ml), do extrato aquoso (0,6 ml/ml) e do produto seco (1,2 mg/ml) foram preparadas conforme o descrito no item 2.2.6.2.1.

Tabela 4. Variações no gradiente para avaliação da robustez. Alterações no percentual de acetonitrila na composição da fase móvel acetonitrila: solução aquosa de ácido acético (95:5, V/V)

<i>Tempo (min)</i>	<i>Acetonitrila (%)</i>		
	<i>Nível</i>		
	<i>Superior</i>	<i>Normal</i>	<i>Inferior</i>
0	14	13	12
2,5	14	13	12
5	31	30	29
10	31	30	29
11	14	13	12

O efeito das variações citadas acima foi avaliado através de possíveis alterações nas áreas e alturas do pico da isovitexina (padrão) e do seu pico correspondente nas amostras.

#### 2.2.6.6 Limite de quantificação

Este parâmetro foi avaliado através do cálculo da DMS (diferença mínima significativa), ou seja, o valor que deve atingir a diferença entre médias para que seja considerada significativa (RIBOLDI, 1995; GRIMM e SCHEPKY, 1980). O DMS pode ser considerado como uma espécie de limite de quantificação pois é a resposta mínima que diferencia duas concentrações considerando-se as variações intrínsecas do método e do equipamento.

---

## **DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

### 3 1 Caracterização do material vegetal

O material vegetal empregado neste trabalho teve sua identidade certificada pelo centro de pesquisas agrônomicas responsável pelo desenvolvimento das tecnologias de clonagem e cultivo da planta, fato este altamente positivo na garantia da qualidade da matéria-prima. Juntamente com a droga vegetal, foi enviada a exsicata (fig. 7) e o relatório agrônomico onde se encontram os dados de plantio e coleta da planta (fig. I, anexos).

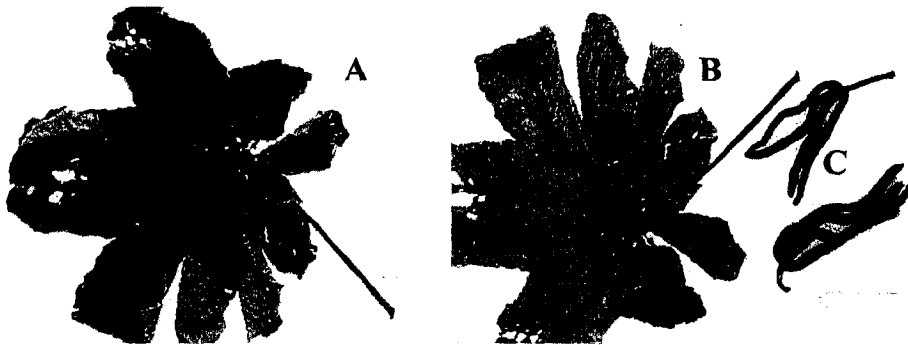


Figura 7. Exsicata da *Cecropia glazioui* apresentando a folha na face adaxial (A) e abaxial (B) e as infrutescências (C)

As folhas foram recebidas secas, quebradiças e parcialmente fragmentadas. Na face adaxial, apresentam cor verde escuro e, na abaxial, verde claro (fig. 7). Nas duas faces, estão presentes tricomas epidérmicos (fig. 8 e 9). A presença dessas estruturas poderia ser utilizada como parâmetro de distinção entre a espécie em estudo e outras do mesmo gênero, o que possibilitaria a diferenciação quando a matéria-prima é fornecida fragmentada, estado que dificulta a identificação botânica. Para tanto, avaliou-se na literatura a existência de análise comparativa botânica para espécies deste gênero (BERG, 1996, CARAUTA, 1996) (tab. 5).

Os tricomas identificados no material vegetal utilizado neste trabalho são simples, unicelulares e retrorsos, sendo curtos e hirsutos na face adaxial (fig. 10) e longos e vilosos na face abaxial (fig. 11). Tais estruturas não estão relatadas na literatura para outras espécies do gênero. Os tricomas curtos e hirsutos conferem



aspereza à lâmina foliar coincidindo com dados da literatura, entretanto, não foram identificados tricomas aracnóides diminutos, que deveriam estar presentes nas aréolas e aracnóides longos restritos à margem. Foram observados, porém, tricomas longos, unicelulares e abundantes na face abaxial, não descritos pela literatura. Essas considerações sugerem a necessidade de estudos mais aprofundados sobre elementos morfológicos e anatômicos objetivando-se a identificação inequívoca da *Cecropia glazioui* e a sua diferenciação das outras espécies do mesmo gênero.

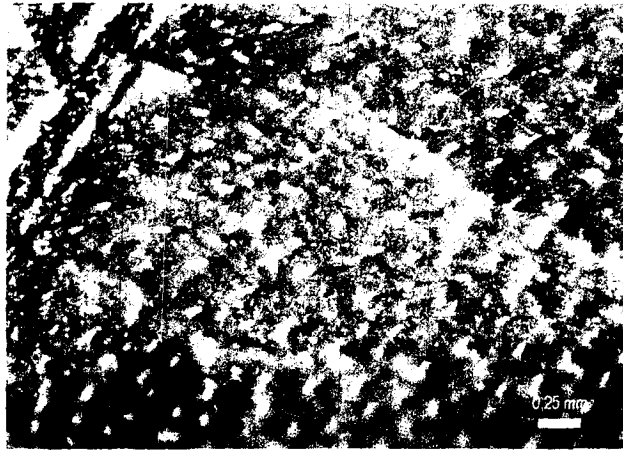


Figura 8. Fotomacrografia da face adaxial da lâmina foliar de *Cecropia glazioui* mostrando a distribuição dos tricomas epidérmicos



Figura 9. Fotomacrografia da face abaxial da lâmina foliar de *Cecropia glazioui* mostrando a maior concentração de tricomas epidérmicos sobre as nervuras

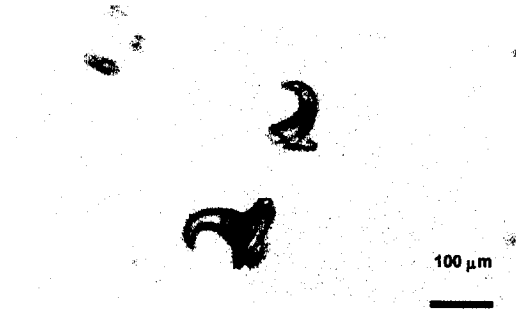


Figura 10. Fotomicrografia dos tricomas da face adaxial do tipo simples unicelular curto

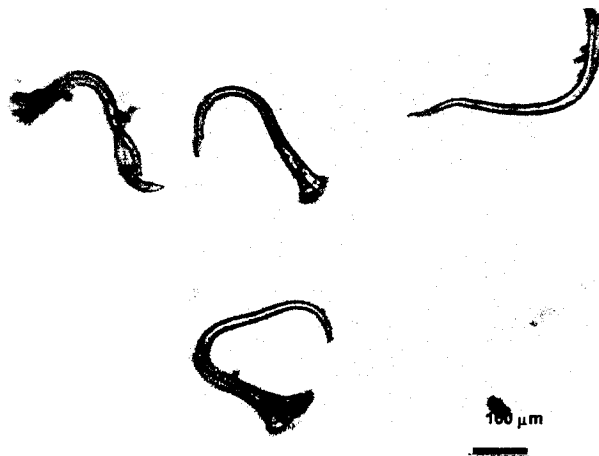


Figura 11. Fotomicrografia dos tricomas da face abaxial do tipo simples unicelular longo

Tabela 5. Aspectos dos tricomas característicos das folhas de algumas espécies de *Cecropia*, encontradas ao sul da Amazônia, relatados por BERG (1996) e CARAUTA (1996)

<i>Espécie</i>	<i>tricomas da lâmina foliar na face adaxial</i>	<i>tricomas da lâmina foliar na face abaxial</i>
<i>Cecropia glazioui</i> Sneth.	pêlos rígidos	densamente pubérula nas nervuras principais, aréolas com diminutos aracnóideos, os aracnóideos longos são restritos à margem
<i>Cecropia hololeuca</i> Miq.	aracnóideos brancos, densos ou bastante esparsos	aracnóideos densos
<i>Cecropia lyratiloba</i> Miq.	curtos e rígidos	velutino
<i>Cecropia pachystachya</i> Trec.	–	longos, curtos e aracnóideos
<i>Cecropia palmata</i> Willd.	uncinados e retos, miúdos a curtos, e pêlos pluricelulares e pardos	aréolas e margem com indumento aracnóideo branco
<i>Cecropia saxatilis</i> Sneth.	–	aracnóideos brancos e densos

O aspecto das folhas moídas revela além de um pó fino, composto de fragmentos de tecido da lâmina foliar e fibras, a formação de enovelados fibrosos, lembrando pequenos fragmentos de algodão (fig. 12).



Figura 12. Fotomicrografia da droga vegetal cominuída salientando os enovelados do pó

Os resultados da análise granulométrica por tamisação se encontram na tabela 6. Demonstram que a classe granulométrica predominante está entre 0,635 e 0,315 mm. A presença de material acima de 0,635 mm é devida aos enovelados, cuja formação é acentuada durante a tamisação. Através dos dados desta mesma análise foram obtidas as curvas de retenção e passagem acumuladas (fig. 13). O diâmetro médio de 0,350 mm foi determinado por extrapolação do ponto de interseção das curvas. Esse valor qualifica as partículas como moderadamente finas, conforme a especificação da Organização Mundial da Saúde (WORLD, 1998).

Tabela 6. Granulometria da droga vegetal seca e após moída

GC (mm)	$\Delta m$ (mm)	m (mm)	F %	R %	P %
Acima de 0,635	—	—	15,10	15,10	84,90
0,635 – 0,315	0,320	0,4750	39,74	54,80	45,20
0,315 – 0,250	0,065	0,2825	15,00	69,80	30,20
0,250 – 0,125	0,125	0,1875	17,50	87,30	12,70
0,125 – 0,080	0,045	0,1025	4,90	92,20	7,80
0,080 – 0,053	0,027	0,0665	7,10	99,30	0,70
0,053 – coletor	0,053	0,0265	0,72	100,00	0,00

\* GC (mm): classe granulométrica,  $\Delta m$ : intervalo de abertura de malha, m: abertura média de malha, F%: fração retida, R %: fração retida acumulada, P %: fração de passagem.

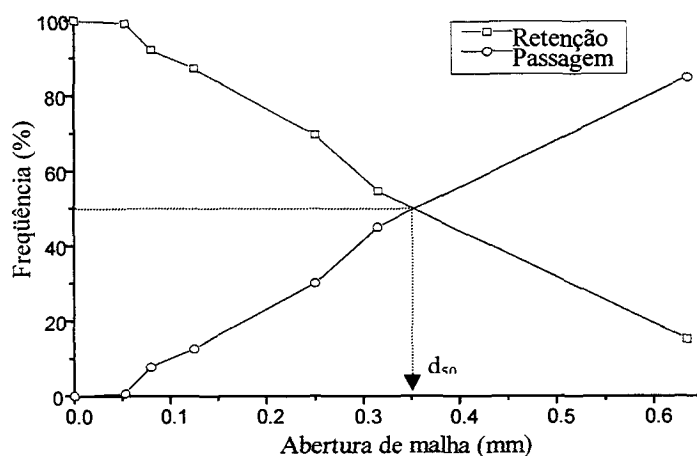


Figura 13. Curva de retenção e passagem da análise granulométrica da droga vegetal moída

A umidade residual na planta rasurada antes da secagem foi de 11,53 %  $\pm$  0,157 (1,36 %). Já na planta rasurada, após secagem em estufa de ar circulante, na temperatura de 30 °C, durante 5 dias, foi de 10,56 %  $\pm$  0,118 (1,12 %) e, após moagem, foi de 8,24 %  $\pm$  0,158 (1,92 %). Esses valores, tanto para a droga rasurada como para a cominuída, encontram-se dentro dos limites farmacopeicos que estão normalmente na faixa de 8 a 14 % para drogas vegetais (ZHI-CEN, 1980).

A equivalência entre os métodos de determinação da perda por dessecação da F. Bras. IV (1988) e o da balança com sistema de secagem por infravermelho foi testada utilizando-se a planta rasurada após secagem, através do teste de hipóteses, utilizando-se a estatística t (FARRANT, 1997). Os resultados demonstram que não há diferença significativa entre os métodos para um nível de significância de 0,05 (tab.7). A similaridade dos métodos foi estatisticamente comprovada, entretanto, o segundo método apresenta a vantagem de ser de menor tempo de execução.

Tabela 7. Dados estatísticos para a comparação entre os métodos de perda por dessecação em estufa e balança com sistema de secagem por infravermelho

	<i>Estufa</i>	<i>IV</i>
<i>Média</i>	10,7976	10,8613
<i>Variância</i>	0,0320	0,0104
<i>Observações</i>	6	6
<i>Variância agrupada</i>	0,0212	
<i>gl</i>	10	
<i>t calculado</i>	-0,7581	
<i>P(T&lt;=t) bi-caudal</i>	0,4658	
<i>t crítico bi-caudal (<math>\alpha = 0,05</math>)</i>	2,2281	

A eficiência do processo de secagem foi de 8,41 %. A significância dessa operação foi avaliada através do teste de hipóteses utilizando-se a estatística t, comparando-se a umidade residual do material vegetal recebido com a do material seco em estufa de ar circulante. As umidades residuais das amostras foram determinadas com uso de balança com sistema de infravermelho. Através dos resultados, foi possível identificar a diferença significativa entre o material vegetal antes e após a secagem para um nível de significância de 0,05 (Tab.8). Assim sendo, conclui-se que a secagem em estufa de ar circulante a 30 °C por 5 dias foi eficiente.

Tabela 8. Dados estatísticos para a comparação da eficiência da secagem do material vegetal de *Cecropia glaziovii*

	<i>Antes da secagem</i>	<i>Após a secagem</i>
<i>Média</i>	11,5304	10,5633
<i>Variância</i>	0,0244	0,0140
<i>Observações</i>	3	3
<i>Variância agrupada</i>	0,0192	
<i>G1</i>	4	
<i>t calculado</i>	8,5424	
<i>P(T&lt;=t) bi-caudal</i>	0,0010	
<i>t crítico bi-caudal (<math>\alpha = 0,05</math>)</i>	2,7764	

Apesar de a secagem ter sido eficiente, poderia ser, neste caso, dispensável, considerando-se que a matéria-prima vegetal foi fornecida com teor de umidade aceitável. Dessa forma, seria reduzido o custo de processamento gerado pelo gasto de energia e tempo de operação.

A determinação do teor de extrativos objetivou a caracterização da matéria-prima. A inexistência de faixas de aceitação para esse parâmetro de qualidade, importante no aspecto de qualificação e adequação tecnológica da matéria-prima, impede momentaneamente uma análise mais detalhada do material vegetal empregado, sugerindo a realização de estudos que contemplem a variabilidade relacionada com a origem geográfica e época de coleta. Neste trabalho, o teor de extrativos empregando água como solvente foi de  $22,33 \% \pm 1,02$  (CV = 4,58 %).

A avaliação da qualidade química visou a presença de flavonóides, especialmente a isovitexina, anteriormente relatada para a espécie (DELLA MONACHE, 1988). As condições de separação por cromatografia em camada delgada foram desenvolvidas no sentido da obtenção de um perfil cromatográfico seletivo, empregando-se a isovitexina como padrão de referência, que fosse possível auxiliar tanto na análise da matéria-prima, dos produtos intermediários e do produto final quanto no controle do processamento tecnológico.

Entre os vários sistemas propostos pela literatura (DE SOUZA, 1997; MABRY, 1970), foi selecionado o sistema de eluição *n* - butanol: água: ácido acético (30:10:10 V/V) (MABRY, 1970), que proporcionou a separação de uma mancha de coloração

laranja de comportamento semelhante ao do padrão de isovitexina, cujo Rf calculado foi de 0,69 (fig. 14). Sob luz UV, foi também observada uma mancha, de cor azul, de Rf superior a do padrão, outra inferior de cor azul esverdeado e uma segunda de coloração laranja, de Rf inferior a esta última. O comportamento da fluorescência depende da estrutura molecular. As fluorescências laranja sugerem a presença de glicosídeos de flavonas, como no caso da isovitexina, e flavonóis, que apresentam, em geral, fluorescência laranja e amarelo esverdeado. A fluorescência azul pode sugerir a presença de ácidos carboxílicos fenólicos, como, por exemplo, o ácido clorogênico e o ácido cafêico (WAGNER, *et al.*, 1984).

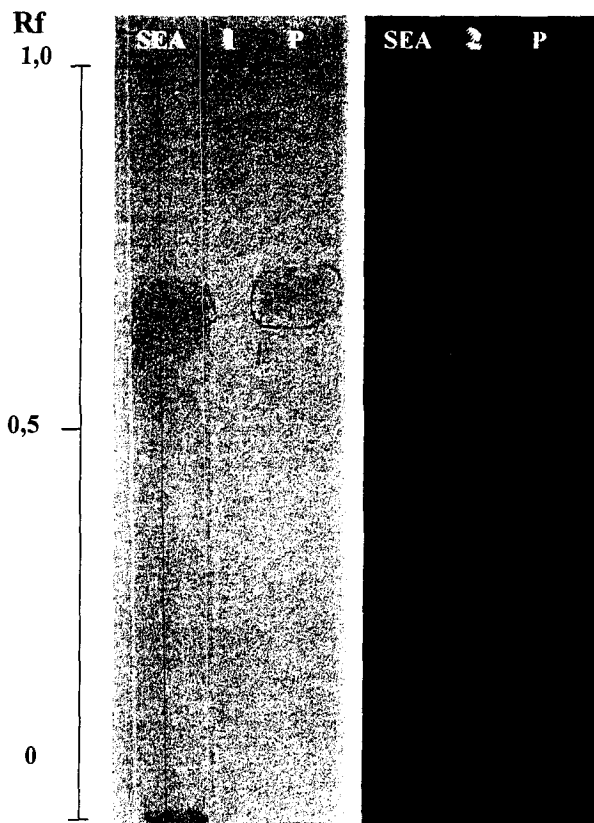


Figura 14. Cromatografia em camada delgada da solução extrativa aquosa (SEA) de *Cecropia glazioui*, utilizando-se como padrão a isovitexina (P) e as seguintes condições: placa de gel de sílica GF<sub>254</sub>, *n* - butanol: água: ácido acético (30:10:10 V/V), reagente natural A 0,5 %, a solução metanólica de polietilenoglicol 2000 a 30 % (m/V), observada diretamente (1) e sob luz UV, em 366 nm (2)

As condições de separação para a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram otimizadas visando as avaliações qualitativa e quantitativa de componentes presentes na droga vegetal e no produto tecnologicamente dela derivado. A CLAE em fase reversa mostrou-se adequada para tanto.

O cromatograma, apresentado na figura 15, indicou a existência de cinco picos majoritários, com tempos de retenção (TR) de 1,6, 3,0, 4,9, 6,7 e 8,5 min. O terceiro pico possui o mesmo tempo de retenção que o da isovitexina. Esse pico foi avaliado quanto à sua utilização em análise quantitativa. Os parâmetros de eficiência encontram-se descritos na tabela 9.

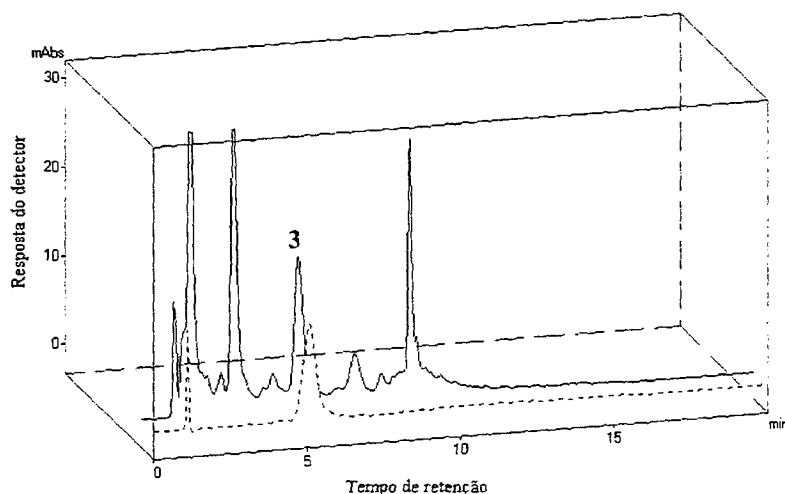


Figura 15. Cromatografia líquida de alta eficiência da solução extrativa de *Cecropia glazioui* (—), e do padrão de isovitexina (5,6 µg/ml) (---)

Tabela 9. Parâmetros relacionados ao desempenho do sistema cromatográfico

Pico	TR	A	k'	Rs	N	$\alpha$
<i>Padrão</i>	4,890	338789	3,42	—	666	—
<i>Amostra (pico 3)</i>	4,975	425150	3,71	1,23 <sup>a</sup> 1,12 <sup>p</sup>	1289	1,26 <sup>a</sup> 1,31 <sup>p</sup>

\* TR: tempo de retenção bruto (min), A: área (mAbs-s), k': fator de capacidade, Rs: resolução, N: número de pratos teóricos,  $\alpha$ : seletividade, a: valor relacionado ao pico imediatamente anterior, p: valor relacionado ao pico imediatamente posterior.



O fator de capacidade ( $k'$ ), que informa sobre o desempenho das condições cromatográficas, classifica o sistema como de ótima performance em termos de resolução máxima por unidade de tempo, já que se situa na faixa de  $1 < k' < 5$  (KIRKLAND e SNYDER, 1979).

A seletividade ou fator de separação ( $\alpha$ ) também pode ser considerada adequada para o pico em questão, pois se enquadra na especificação  $\alpha - 1 \geq 0,1$ . A separação foi, portanto, seletiva tanto em relação ao pico imediatamente anterior quanto ao imediatamente posterior (KIRKLAND e SNYDER, 1979).

A adequabilidade do sistema para a análise quantitativa do pico com  $TR \cong 5,1$  min pode ser comprovada pela interpretação da resolução ( $R_s$ ) em relação aos picos imediatamente adjacentes. Os valores calculados, superiores a 1, garantem que a sobreposição dos picos é inferior a 2 %. O primeiro aproxima-se de 1,25, valor que define a separação completa (KIRKLAND e SNYDER, 1979; WELLS, 1988). Esse valor diminui em relação ao pico imediatamente posterior, entretanto, esta diminuição não compromete a separação e a avaliação quantitativa.

O método desenvolvido propiciou o doseamento da matéria-prima vegetal, realizado a partir da solução extrativa aquosa, resultando na concentração de  $1,561 \pm 0,018$  (1,178 %) mg de isovitexina em 1 g de droga vegetal.

O comportamento da matéria-prima vegetal, após secagem em estufa de ar circulante na temperatura de 30 °C, durante 5 dias, frente às condições do armazenamento, está representado pela figura 16, cujos dados encontram-se na tabela I dos anexos. O armazenamento foi feito em sacos de papel pardo, colocados em tambor de papelão, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz solar direta.

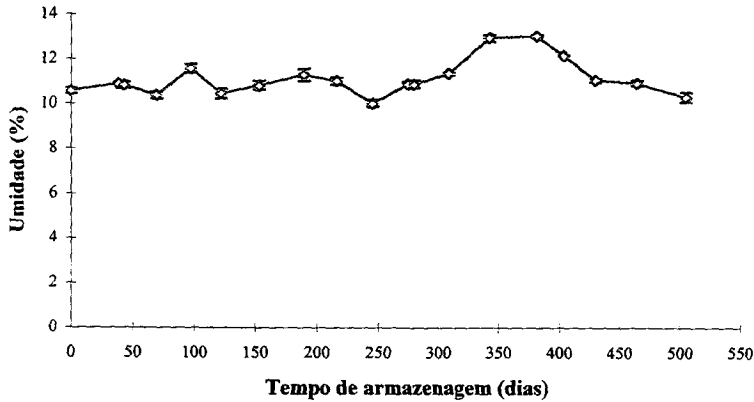


Figura 16. Representação gráfica do controle do comportamento da matéria-prima vegetal, durante o período de 504 dias de armazenagem, através da perda por dessecação

Observando-se os dados apresentados na tabela I dos anexos e figura 16, percebe-se que não ocorreram alterações importantes nos teores de umidade residual e estes mantiveram-se abaixo do limite máximo, de 14 %, preconizado para drogas vegetais (ZHI-CEN, 1980). Verifica-se, desta forma, que as condições de armazenamento foram adequadas.

### 3.2 Desenvolvimento e caracterização do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* (PCG)

Objetivando a decisão de escolha das condições de operação para a obtenção do produto seco por aspersão (tab. 3, p.44), foram considerados alguns fatores como a umidade residual e o rendimento líquido do produto final, bem como, o tempo de processamento.

Os rendimentos da operação de secagem e a umidade residual dos extratos secos produzidos para cada condição de operação encontram-se descritos na tabela 10.

Tabela 10. Rendimento da operação de secagem por aspersão e umidade residual dos extratos secos produzidos

<i>Condições</i> <sup>*1</sup>	<i>Rendimento bruto</i> (%)	<i>rendimento líquido</i> (%) <sup>*2</sup>	<i>umidade residual</i> % ± s (CV %)
1	45,17	41,52	3,65 ± 0,433 (11,86)
2	64,00	60,93	3,07 ± 0,102 (3,33)
3	48,60	44,23	4,37 ± 0,701 (16,05)
4	38,00	33,62	4,38 ± 0,569 (12,95)
5	41,32	36,93	4,39 ± 0,647 (14,72)
6	67,60	64,20	3,40 ± 0,499 (14,68)

\*<sup>1</sup> As condições de secagem estão descritas na tabela 3 da página 44.

\*<sup>2</sup> Rendimento líquido (%) = rendimento - umidade residual.

A presença de adjuvante de secagem decorre do baixo teor de substâncias presentes na solução extrativa, altamente influenciado pela técnica de preparação (HEBERLÉ *et al.*, 1998). Experimentos com outras plantas medicinais, realizados neste laboratório, demonstraram a eficiência do dióxido de silício coloidal na operação de secagem por aspersão. Assim, foi testada a influência de concentrações de 20 e 30 % do adjuvante, calculadas em relação ao resíduo seco.

O aumento da concentração do dióxido de silício coloidal no fluido de secagem demonstrou não ser o fator decisivo sobre os resultados (tab. 10, condições 5 e 6). Entretanto, foi observado que esse aumento proporcionou uma menor adesão do fluido de secagem às paredes da torre de secagem, fato que pode ter aumentado o rendimento líquido do produto obtido nas condições 6 (tab. 10, condições 2 e 6) em relação ao obtido sob as condições 2. Considerando-se que as condições 2 e 6 são muito semelhantes (tab. 3, p. 44), com exceção da concentração de adjuvante, o aumento dessa concentração de 20 % para 30 % (m/m) resultou em um acréscimo de 5,37 % no rendimento líquido. As condições 6 foram consideradas tecnologicamente vantajosas face a menor aderência do produto nas paredes da torre de secagem.

A influência dos fatores operacionais pode ser visualizada na figura 17. É possível constatar que há uma tendência de aumento no rendimento do produto seco por aspersão com o aumento do fluxo de alimentação, associado a maiores temperaturas de admissão do fluido de secagem.

Além de seguirem essa tendência, os produtos processados sob as condições 2 e 6 apresentaram valores de umidade residual inferiores aos demais (tab. 10, fig. 17), embora essa possa ser influenciada por outros fatores além de fluxo de alimentação e temperatura, como, por exemplo, pela umidade relativa do ar que alimenta o atomizador.

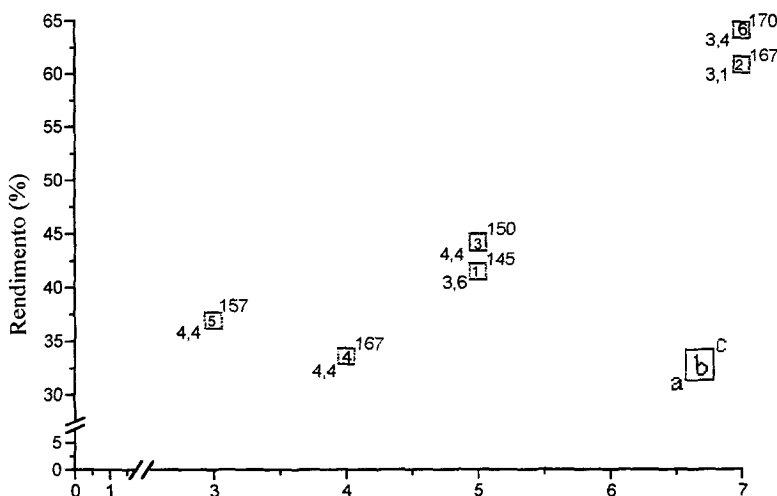


Figura 17. Representação gráfica da relação entre o fluxo de alimentação do fluido de secagem com o rendimento líquido obtido dos produtos secos por aspersão de *Cecropia glazioui* Sneth, nas condições de processamento testadas (b) com suas correspondentes temperaturas de admissão do fluido de secagem (c) e umidades residuais (a)

A avaliação desses resultados (tab. 10, fig. 17) sugere uma tendência de relação direta entre o fluxo de alimentação e a temperatura de secagem.

Considerando essa avaliação, o fluxo de aspersão escolhido foi o de 7 ml/min, proporcionando a maior velocidade de processamento, associado à temperatura de secagem de 170 °C, fornecendo o maior rendimento e baixa umidade residual. O PCG resultante apresentou-se como um pó fino, solto e leve, de coloração mostarda (Fig.18).

A umidade residual do PCG, após a mistura dos lotes produzidos, foi de 3,19 %. Esse teor de umidade encontra-se abaixo do limite máximo de 4 % preconizado pela Farmacopéia Brasileira IV (1988) e citado por LIST e SCHMIDT (1989).

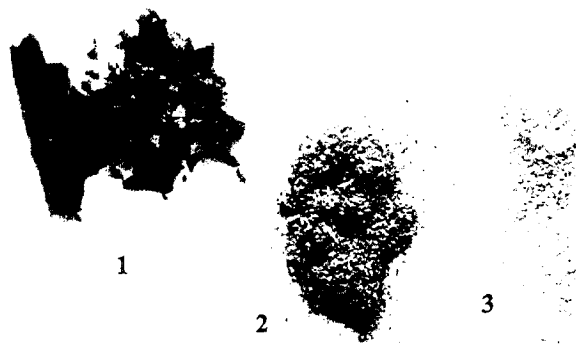


Figura 18. Fotografia apresentando o aspecto da planta rasurada (1), cominuída (2) e do PCG (3)<sup>22</sup>

Através das eletromicrografias (fig. 19, 20 e 21) por microscopia de varredura percebe-se que as partículas do extrato se apresentam na forma esférica, com partículas de dióxido de silício coloidal na sua superfície ou proximidade. São de superfície rugosa e ocas, com diâmetros variados, o que pode ser observado na figura 19.

<sup>22</sup> Agradecimentos ao Prof. Dr. Airton Monza da Silveira pela realização da fotografia.

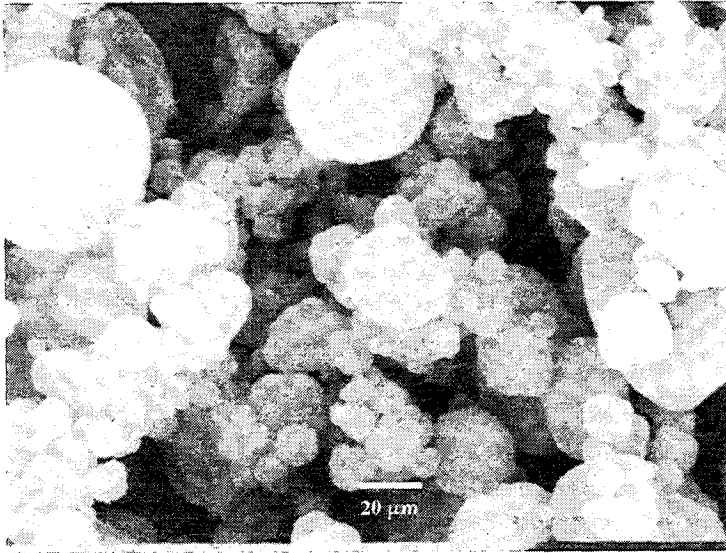


Figura 19. Eletromicrografia do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* (3500X)

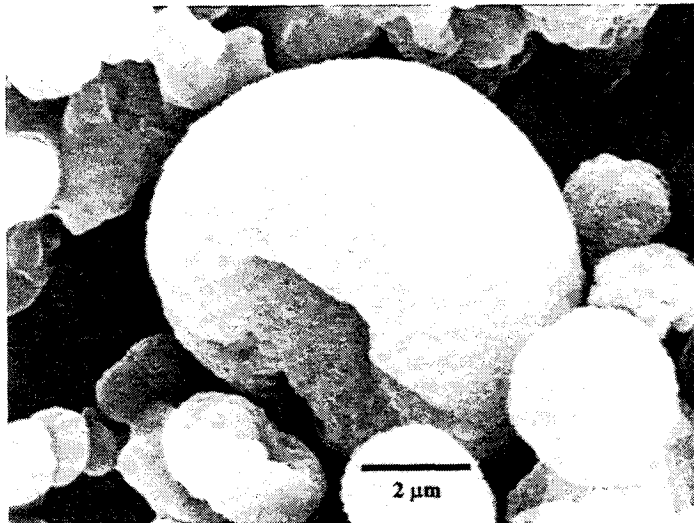


Figura 20. Eletromicrografia do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* evidenciando aspecto de partícula com ruptura e interior oco (8500 X)

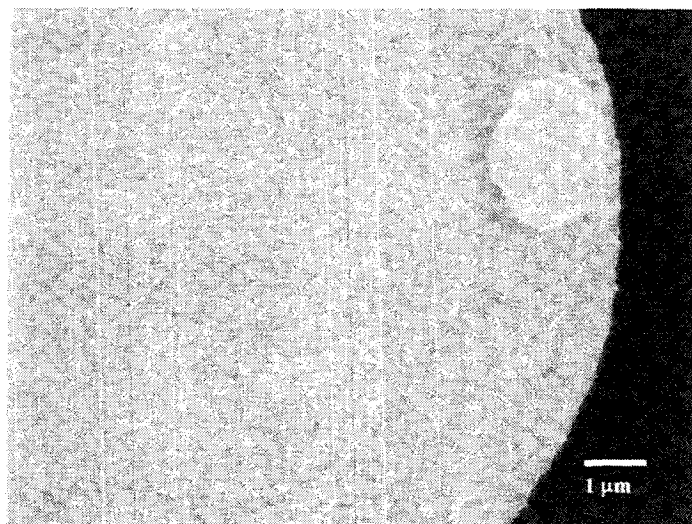


Figura 21. Eletromicrografia de partícula do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* evidenciando a estrutura de superfície porosa (12000X)

A análise granulométrica por microscopia ótica do PCG foi realizada através da medida do diâmetro de Ferret e forneceu os dados apresentados na tabela III dos anexos e representados graficamente pela figura 22. A maior parte das partículas (80 %) do PCG estão entre 1,7 e 8,5  $\mu\text{m}$ , sendo que 56,5 % estão na faixa de 5,1 a 8,5  $\mu\text{m}$ . Esse pó caracteriza-se como finíssimo de acordo com a F. Bras. IV (1988). Existem várias metodologias para a análise dos dados obtidos por microscopia ótica, como as curvas de distribuição granulométrica (fig. 23 e 25), a rede de distribuição (fig. 24), entre outros. A comparação desses resultados torna-se difícil pelas divergências entre os valores, que são apresentadas na tabela 11.

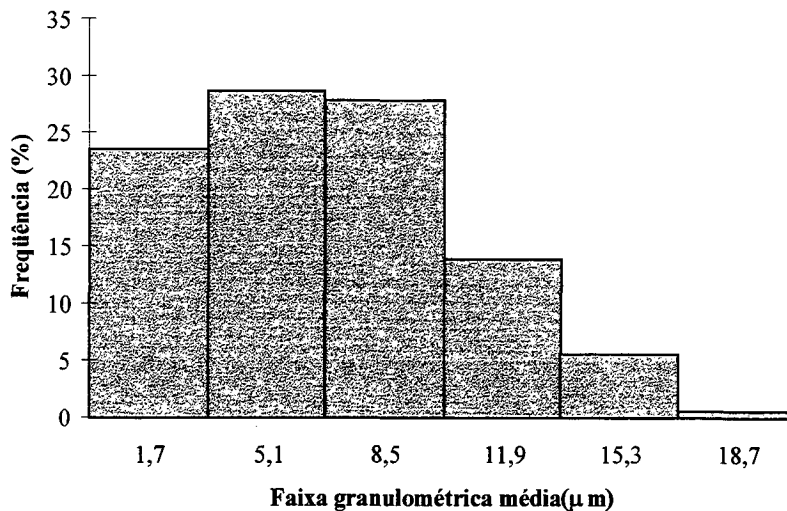


Figura 22. Representação gráfica da distribuição granulométrica do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* Sneth.

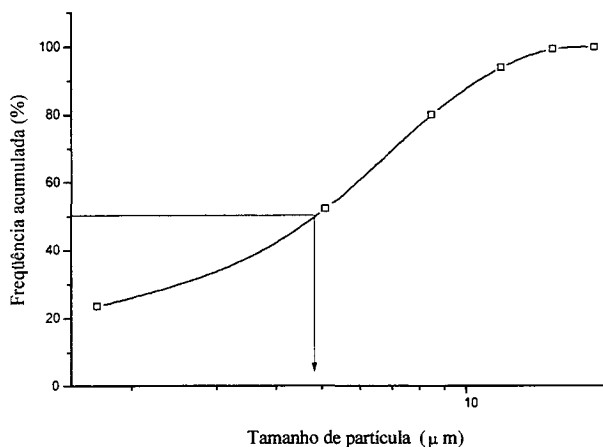


Figura 23. Curva de distribuição granulométrica do produto seco por aspersão em função da frequência acumulada percentual



O tamanho médio de partícula e amplitude de distribuição foram determinados através da rede de probabilidade RRSB, apresentada abaixo (fig. 24).

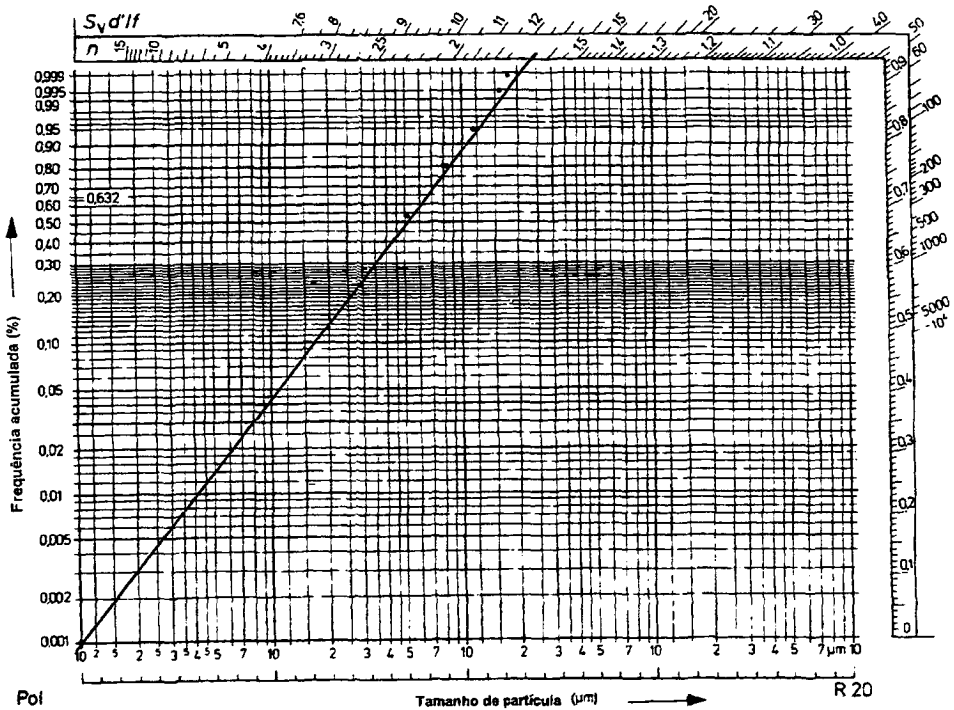


Figura 24. Representação da análise granulométrica do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* através da rede de distribuição RRSB

Segundo STRICKER (1987), para a análise de produtos nebulizados é mais adequado o uso de métodos de distribuição normal. Para a caracterização, pode-se empregar a rede de probabilidade estimando-se a mediana ( $dm$ ) e o parâmetro de distribuição ( $n$ ) ou amplitude de distribuição granulométrica ( $S$ ).

Conforme WELLS (1988), é possível calcular o desvio padrão geométrico através da linearização da curva de distribuição geométrica por escala de probabilidade, no eixo das abscissas, e a escala logarítmica, no eixo das ordenadas. Nesse caso, a linearização não ocorreu, tornando-se possível com a utilização da escala de probabilidade, no eixo das abscissas, e da escala linear no eixo das ordenadas (fig.

25). Os resultados, entretanto, foram idênticos nas duas curvas, podendo-se utilizar as duas formas de escalas na curva de distribuição granulométrica para a determinação.

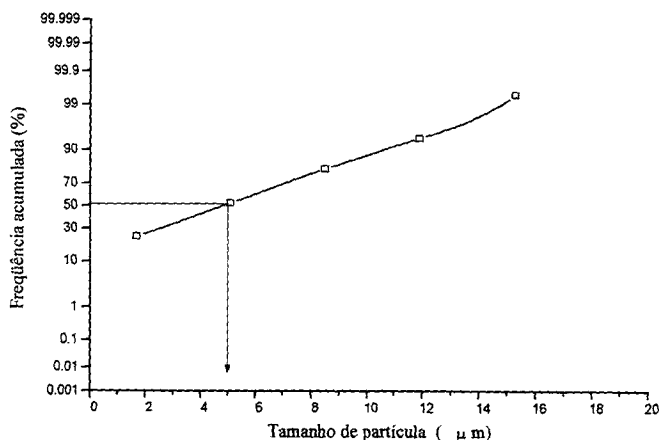


Figura 25. Curva de distribuição granulométrica do produto seco por aspersão em função da frequência acumulada percentual em escala de probabilidade x linear

O diâmetro médio de partícula foi obtido por extrapolação da melhor reta que descreve a distribuição dos pontos obtidos pela plotagem dos dados de frequência acumulada e do tamanho de partícula na rede RRSB. O diâmetro médio das partículas, bem como a amplitude de distribuição granulométrica, foram também calculados por diversos métodos.

Entre os vários métodos para a determinação do tamanho de partículas, foi utilizada a difração de raio laser, cujos resultados se assemelham aos obtidos por microscopia (tab. II, anexos e tab. 11). Contudo, esse método agrega um alto custo inicial devido ao valor do equipamento.

Os diferentes métodos fornecem diâmetros médios muito semelhantes com exceção do método da curva de distribuição granulométrica (CDG), que resulta em um diâmetro médio inferior, diferindo em aproximadamente  $2\ \mu\text{m}$  dos demais. Os resultados dos dados analisados pelos diversos métodos, encontram-se na tabela 11.

Tabela 11. Resultados da avaliação dos dados da análise granulométrica realizada pelos diversos métodos

<i>Método</i>	<i>dm (μm)</i>	<i>s</i>
<i>Aritmético</i>	6,83	± 4,02
<i>CDG (linear x log)</i>	4,83	± 1,93
<i>CDG (probabilidade x linear)</i>	4,81	± 1,91
<i>RRSB</i>	6,80	± 1,65
<i>Coulter</i>	8,31	± 2,24

\* *dm*: diâmetro médio das partículas; *s*: amplitude de distribuição granulométrica, CDG: Curva de distribuição granulométrica.

WELLS (1988) descreve como pós com ampla faixa granulométrica aqueles que apresentam desvio padrão geométrico  $\geq 2$  e, com tipicamente estreita aqueles com valores próximos à 1,5. Conforme essa especificação, a faixa granulométrica do PCG é considerada ampla pelo método aritmético e difração a laser e estreita pelos métodos RRSB e CDG.

A definição dos próximos passos do processamento tecnológico de materiais particulados está condicionada ao seu comportamento de fluidez, que é influenciado pelas características de composição e de estrutura desses materiais. Assim, as informações fornecidas pela análise granulométrica, associadas àquelas que avaliam as propriedades de movimentação e densificação (tab. 12), permitem esta avaliação.

Tabela 12. Dados referentes às análises do comportamento do produto seco por aspersão quanto às suas propriedades de movimentação, acomodação e densificação

	<i>db (g/ml)</i>	<i>dc (g/ml)</i>	<i>FH</i>	<i>IC %</i>	<i>C (ml)</i>	<i>α</i>	<i>Vf (g/s)</i>
<i>Média</i>	0,239	0,426	1,782	43,875	11,333	40	23,36
<i>s</i>	0,001	0,010	0,039	1,225	0,289	4,18	0,27
<i>CV %</i>	0,602	2,271	2,201	2,791	2,547	10,46	1,18

\*Densidade bruta (*db*) e de compactação (*dc*), fator de Hausner (*FH*) índice de compressibilidade (*IC*), compactabilidade (*C*) e ângulo de repouso ( $\alpha$ ) e velocidade de fluxo (*Vf*).

O PCG, por apresentar baixa densidade, é um pó leve, quer em estado solto ou após o alcance da estabilidade do seu sistema de empacotamento. Tal característica pode ter sido influenciada pela presença do adjuvante de secagem. O dióxido de silício coloidal, quando contido em produtos secos por aspersão, confere-lhes uma menor densidade. Conforme observado por CARVALHO (1997), parece não haver uma relação direta entre a concentração adicionada e o parâmetro medido.

A diferença entre  $d_b$  e  $d_c$  pode dar uma indicação sobre o comportamento do sistema de empacotamento e o fluxo de um material sólido particulado. Quanto maior essa diferença, teoricamente, melhor será o fluxo e menos estável seu sistema de empacotamento (EHRHARDT e SCHINDLER, 1980).

O índice de compressibilidade (IC), assim como o fator de Hausner (FH), são dados que permitem a avaliação da estabilidade de empacotamento de um material particulado. Valores baixos de IC e FH configuram pós com maior estabilidade de empacotamento, o que contribui para menores ângulos de repouso. O IC é, também, considerado um método indireto para avaliação do fluxo. O valor de IC encontrado para o PCG é superior a 40, o que caracteriza pós com fluxo extremamente pequeno (JONES, 1977).

Outra informação pertinente à avaliação do fluxo, além do tipo de sistema de empacotamento, é dada pelo FH. Esse fator, além de depender da metodologia empregada para a determinação das densidades, é influenciado pelo coeficiente de fricção interparticular, pelo tamanho e pela forma das partículas. O fluxo será maior quanto menor for o seu valor.

O  $\alpha$  depende, essencialmente, da força de fricção entre as partículas do pó, influenciando as características de fluxo e a estabilidade de empacotamento. O valor do ângulo de repouso depende do método de medida utilizado, mas, de forma geral, podem ser usados os seguintes valores como uma orientação: valores menores que 25° caracterizam um fluxo excelente; entre 25° e 30°, fluxo bom; entre 30° e 40°, fluxo aceitável e acima de 40°, muito pobre (WELLS, 1988). Em geral, extratos secos por

aspersão apresentam valores altos de  $\alpha$ , indicando que têm elevado atrito interparticular e fluxo pobre. Tais características podem estar relacionadas ao pequeno tamanho de partícula, à grande superfície específica e ao tipo de superfície das partículas do pó. O valor de  $\alpha$  determinado para o PCG o caracteriza, igualmente, como possuidor de fluxo de aceitável a pobre.

A compactabilidade (C) permite quantificar a característica de densificação de um pó e prever seu comportamento em passos tecnológicos subsequentes. Valores de C superiores a 20 ml implicam dificuldades potenciais tanto em nível de enchimento, decisivo para cápsulas e comprimidos, quanto em capacidade de compressão (GUYOT, *et al.*, 1995). O valor de C encontrado para o PCG foi bastante inferior a 20 ml, sugerindo que este produto não possui dificuldades potenciais relacionadas ao enchimento ou à capacidade de compressão. Contudo, para uma maior consistência dessa informação, são necessários mais estudos, considerando-se que o valor de C obtido para o PCG, aproximou-se do encontrado por DE SOUZA (1999) para o extrato seco nebulizado de *Maytenus ilicifolia* que foi considerado inadequado para a produção de comprimidos por compressão direta, mesmo na presença de adjuvantes.

A curva de escoamento em função do tempo (fig. 26) expressa o fluxo dinâmico do PCG. A velocidade de fluxo (tab. 12), dada pela razão entre a massa do pó e o seu tempo de escoamento, é descrita por uma equação polinomial de quinta ordem com coeficiente de correlação de 0,9995.

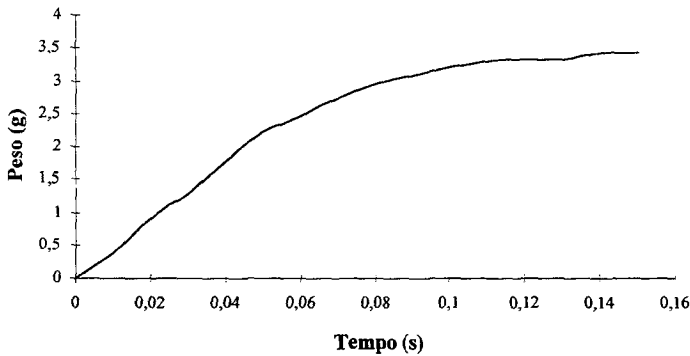


Figura 26. Escoamento dinâmico do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui*

A forma convexa do gráfico define o tipo de fluxo nucleado. Esse tipo de fluxo se caracteriza pela ação das forças coesivas interparticulares que ocasionam a montagem e desmontagem periódica e contínua de pontes internas (EHRHARDT e SCHINDLER, 1980).

Após essa análise, o PCG pode ser qualificado como um material particulado finíssimo, de baixa densidade, com fluxo pobre do tipo nucleado e com sistema de empacotamento instável. Isso sugere que seja realizada a sua mistura com adjuvantes adequados ao seu processamento posterior, no caso de compressão ou encapsulamento.

A análise cromatográfica em camada delgada do PCG foi empregada com o objetivo de verificar a estabilidade química frente às condições da operação de secagem por aspersão. Através da comparação do perfil cromatográfico, número e intensidade das manchas do PCG (fig. 27) com o do extrato aquoso (fig. 14) percebe-se que não ocorre o aparecimento de novas manchas nem alteração nas demais características das manchas existentes, indicando a manutenção da qualidade do PCG. Para as amostras dos extratos secos por aspersão obtidos em todas as condições de secagem testadas (tab. 10), foram constatadas as manchas de coloração laranja de

comportamento semelhante ao do padrão de isovitexina, cujo Rf calculado foi de 0,69 (fig. 14).

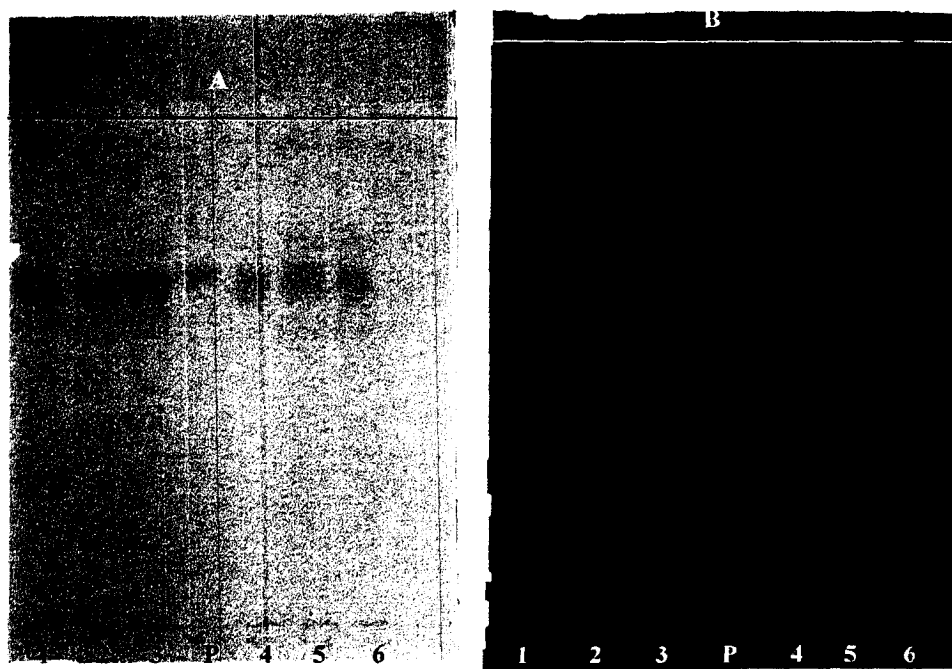


Figura 27. Cromatografia em camada delgada comparativa entre os extratos secos de *Cecropia glazioui*, produzidos por aspersão, sob as condições 1, 2, 3, 4, 5 e 6, utilizando-se como padrão a isovitexina (P) e o seguinte sistema: placa de gel de sílica GF<sub>254</sub>, *n* - butanol: água: ácido acético (30:10:10 V/V), reagente natural A 0,5 %, a solução metanólica de polietilenoglicol 2000 a 30 % (m/V), observada sob luz UV, em 366 nm

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada como método de caracterização e doseamento do PCG utilizando-se, como referência, a solução padrão de isovitexina (fig.28).

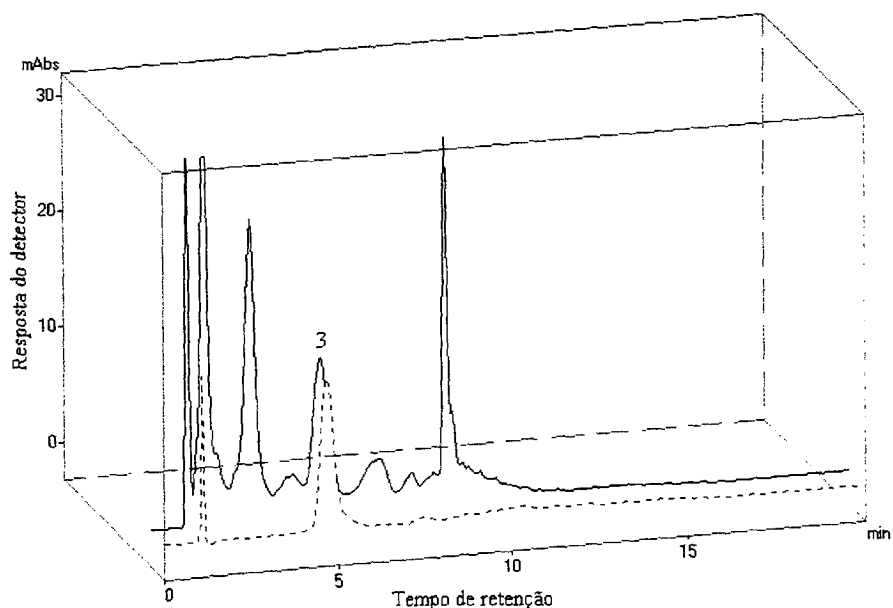


Figura 28. Cromatografia líquida de alta eficiência do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* (—) e do padrão de isovitexina (7 µg/ml) (---)

Os parâmetros que definem a eficiência do sistema se encontram descritos na tabela 13. Em conformidade com o anteriormente discutido sobre a caracterização da matéria-prima vegetal por CLAE, o fator de capacidade situa-se na faixa que define o sistema como de ótimo desempenho em termos de resolução máxima, por unidade de tempo. A seletividade, também, aqui, pode ser considerada adequada, tanto em relação ao pico imediatamente anterior quanto ao imediatamente posterior ao pico de interesse.

Tabela 13. Parâmetros relacionados ao desempenho do sistema cromatográfico

Pico	TR (min)	A (mV·s)	k'	Rs	N	$\alpha$
<i>Padrão</i>	4,633	410111	3,20	—	686	—
<i>Amostra</i>	4,635	358710	3,42	0,70 <sup>a</sup>	801	1,26 <sup>a</sup>
<i>(pico 3)</i>				1,84 <sup>p</sup>		1,40 <sup>p</sup>

\* TR: tempo de retenção bruto, A: área, K': fator de capacidade, Rs: resolução, N: número de pratos teóricos,  $\alpha$ : seletividade, a: valor relacionado ao pico imediatamente anterior, p: valor relacionado ao pico imediatamente posterior.



Em termos de resolução, observando-se o desempenho do sistema cromatográfico obtido com a solução extrativa aquosa e o apresentado na tabela 13, verifica-se que houve a diminuição neste valor em relação ao pico imediatamente anterior ao de interesse como consequência da diminuição do número de pratos teóricos. Isso se deve, provavelmente, ao desgaste da coluna que foi utilizada por um longo período. Verifica-se que os valores de  $k'$  e  $\alpha$  não sofreram alterações importantes, conseqüentemente, esse fato parece não comprometer a separação e a viabilidade de quantificação.

Comparando-se os cromatogramas da solução extrativa aquosa e o do PCG (fig. 29) nota-se, no cromatograma do PCG, a reprodução do perfil cromatográfico obtido para a solução extrativa bem como dos picos majoritários com tempos de retenção brutos de 1,5, 2,8, 4,6, 6,1 e 8,4 min. Verifica-se que a razão entre os tempos de retenção do pico 3 e os outros quatro picos majoritários é mantida. O mesmo não ocorre em se tratando da comparação entre as áreas, em que a relação se mantém nos picos 1, 2 e 3 alterando-se nos picos 4 e 5, que apresentaram suas áreas aumentadas.

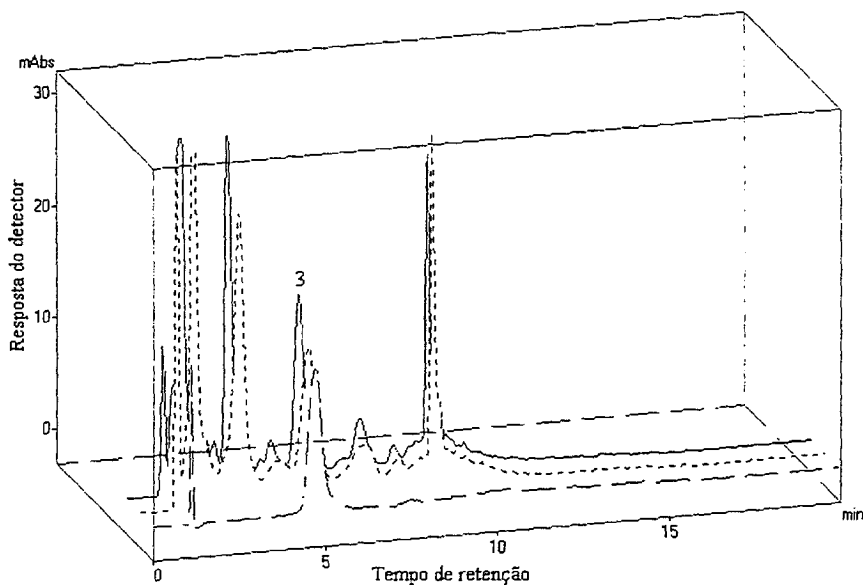


Figura 29. Cromatografia líquida de alta eficiência da solução extrativa aquosa (—), do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* (---) e do padrão (· · ·)

O método por CLAE desenvolvido possibilitou o doseamento do PCG, que resultou na concentração de  $5,036 \text{ mg} \pm 0,037$  (0,727 %) de isovitexina em 1 g de produto.

A avaliação do comportamento de extratos secos frente à umidade ambiental teve como objetivo verificar a estabilidade do produto, prevendo seu comportamento nas condições ambientais ideais para a produção, armazenamento e transporte.

O experimento foi realizado durante 17 dias, entretanto, foi interrompido para as amostras submetidas a 99 % de umidade relativa (UR), pois elas apresentaram crescimento de fungos ao completarem 7 dias de exposição, mesmo quando realizada a repetição deste ensaio.

A textura do PCG bem como sua coloração mantiveram-se inalteradas na umidade relativa de 26 %. Entretanto, após cinco dias de exposição às umidades relativas de 70 e 99 % houve alteração da coloração e da textura do extrato. O PCG exposto à umidade relativa de 70 % apresentou alteração gradual de cor, até atingir a coloração marrom claro, e sua consistência tornou-se levemente pastosa e aderente no quinto dia. Ao submeter-se o PCG à umidade relativa de 99 %, observou-se que este alterou sua coloração para marrom escuro, sendo essa alteração também gradual, mas não homogênea, iniciando-se pelo aparecimento de pequenos pontos escuros, após 24 horas de exposição, e aumento de tamanho desses pontos até chegar à homogeneidade, no quinto dia. A sua consistência tornou-se pastosa e mais aderente que no caso anterior, formando-se uma massa compacta (fig. 30).

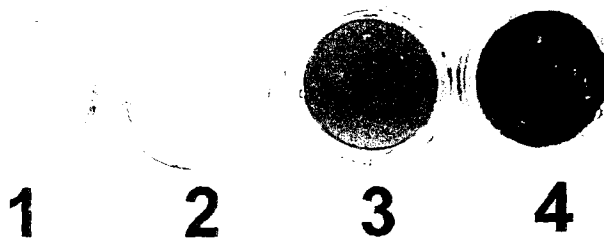


Figura 30. Aspecto do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* após produção (1) e quando submetido às umidades relativas de 26 (2), 70 (3) e 99 % (4), no quinto dia de exposição

A sorção de umidade percentual determinada por gravimetria está representada na tabela 14 e, graficamente, através de isotermas de sorção de água na figura. 31. Observa-se que, para o PCG exposto à UR de 26 %, o peso do PCG se mantém constante. Para o PCG observado na UR de 70 %, percebe-se absorção de umidade nas primeiras 24 horas, provocando alteração do seu peso em 13,46 %, fato que se mantém praticamente constante, sendo o coeficiente de variação 1,85 %, no decorrer dos 17 dias. Com o PCG exposto à UR de 99 %, ocorre absorção crescente de umidade, entretanto, não se pode prever o momento em que a absorção se torna constante, pois o aumento crescente de massa pode estar relacionado ao crescimento de fungos. Tal fato levou a interrupção do experimento (fig. 32).

Tabela 14. Alteração de massa percentual no produto seco nebulizado de *Cecropia glaziovii* (PCG) nas umidades relativas de 26 , 70 e 99 %

<i>Tempo de exposição (dias)</i>	<i>Alteração de massa (%) Umidade ambiental</i>		
	<i>26 %</i>	<i>70 %</i>	<i>99 %</i>
1	0,180	13,457	45,531
3	-0,051	13,393	76,032
5	0,006	13,080	94,408
7	0,004	13,079	108,152*
9	0,238	12,780	
11	-0,005	12,781	
13	-0,119	13,201	
15	-0,005	13,062	
17	0,112	12,889	

\*Crescimento visível de fungos.

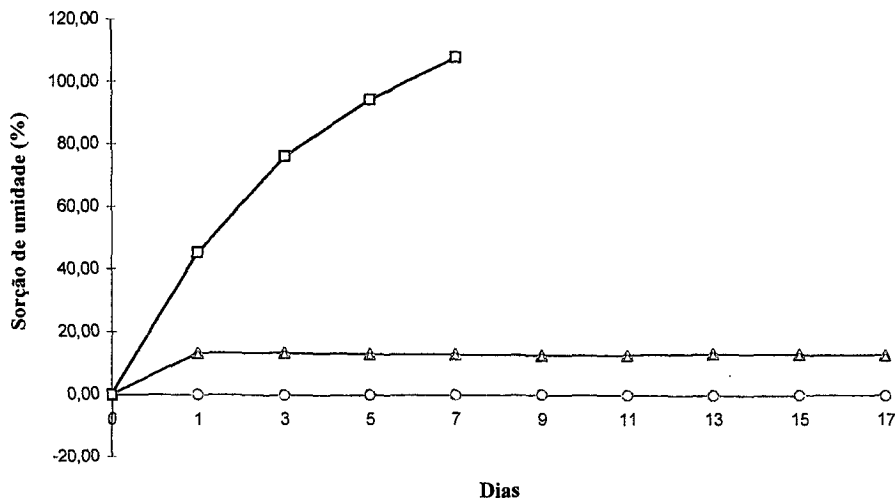


Figura 31. Representação gráfica da sorção de umidade do PCG nas umidades relativas de 26 (○), 70 (△) e 99 % (□)

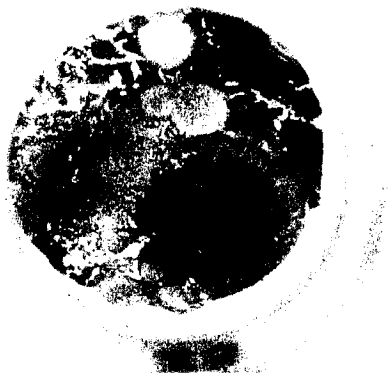


Figura 32. Crescimento de fungos no produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* submetido à UR de 99 %

O crescimento microbiano ocorrido no PCG, quando submetido à UR de 99 % (fig. 32), foi identificado como causado pelo fungo *Trichothecium sp*, cuja presença não foi detectada no mesmo sob condições normais de armazenamento. Isso indica a possibilidade de contaminação ambiental.

A análise microbiológica da matéria-prima e do produto (PCG) foi realizada em conformidade com a legislação. Os resultados foram interpretados utilizando-se os limites preconizados (WORLD, 1998, DEUTSCHLAND, 1989), que se encontram na tabela 1 (p. 29).

O número de microrganismos encontrados na matéria-prima vegetal, na qual foi identificado o *Staphylococcus epidermidis*, foi de  $10^2$  UFC/g e no PCG foi menor que  $10^2$  UFC/g. Esses valores estão abaixo dos limites máximos aceitáveis, além disso, não foi detectada a presença de patógenos.

Para o dióxido de silício coloidal foram identificados *Bacillus brevis* e *Staphylococcus epidermidis*, que são provavelmente decorrentes da manipulação e não se caracterizam como patógenos. Também foram encontradas hifas com esporos ( $10^2$  UFC/g). O total em microrganismos aeróbios ( $10^3$  UFC/g) encontra-se dentro do limite máximos aceitável de  $10^4$  UFC/g USP (1995) para matérias-primas e medicamentos destinados à administração por via oral.

### **3.3 Validação do sistema em CLAE desenvolvido para o doseamento e a caracterização da solução extrativa aquosa (SEA) e do produto seco por dispersão de *Cecropia glazioui* (PCG)**

Neste trabalho, o método analítico desenvolvido foi validado quanto à exatidão, à especificidade, à precisão, à linearidade e à robustez, conforme as diretrizes da ICH, as quais se assemelham à resolução 391/99 (BRASIL, 1999). A reprodutibilidade não foi avaliada, pois para esse estudo seria necessário a realização do protocolo experimental em um segundo laboratório.

Até o momento, nos trabalhos desenvolvidos abordando a validação, neste Programa de Pós-graduação, os parâmetros de especificidade e robustez ainda não haviam sido estudados. Nesse sentido, este trabalho vem acrescentar mais dados para o entendimento do que se constitui a validação de um método analítico.

Os resultados do teste de recuperação para a avaliação da exatidão encontram-se nas tabelas 15 e 16. Tais resultados foram avaliados através dos intervalos de confiança (tab. 18 e 19) e da análise de regressão linear simples (tab. 20, 21, 22 e 23) conforme o proposto por ALTESOR (1993) e CHOW (1995).

Tabela 15. Resultados do teste recuperação para a solução extrativa aquosa

<i>X</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>Y</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperação (%)	( <i>Y</i> - <i>X</i> )	$\Delta \%_X$
4,298	4,284	99,68	-0,014	-0,316
4,998	5,007	100,17	0,008	0,172
5,698	5,869	103,01	0,171	3,007

*X*: concentração teórica, *Y*: concentração medida,  $\Delta \%_X$ : diferença percentual relativa a *X*.

A análise do teste de recuperação apresentou, para a SEA, uma percentagem de recuperação média de 100,95 % ( $\pm 1,80$ ) que pode ser considerada como apropriada para uma matriz analítica complexa.

Tabela 16. Resultados do teste recuperação para o produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui*

<i>X</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>Y</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperação (%)	( <i>Y</i> - <i>X</i> )	$\Delta \%_X$
5,161	5,052	97,89	-0,109	-2,108
5,861	5,876	100,25	0,014	0,249
6,561	6,544	100,26	0,017	0,263

*X*: concentração teórica, *Y*: concentração medida,  $\Delta \%_X$ : diferença percentual relativa a *X*.

Empregando-se como matriz analítica o produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui*, obteve-se a percentagem de recuperação média de 99,47 % ( $\pm 1,37$ ).

A equivalência entre as porcentagens recuperadas da SEA e do PCG foi testada utilizando-se a estatística *t* (RIBOLDI, 1993, FARRANT, 1997), cujos resultados estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17. Dados estatísticos para a comparação da equivalência entre a porcentagem de recuperação da solução extrativa aquosa (SEA) e do extrato seco por aspersão (PCG) de *Cecropia glazioui* ( $\alpha = 0,05$ )

	SEA	PCG
Média	100,9533	99,4667
Variância	3,2324	1,8644
Observações	3	3
Variância agrupada	2,5484	
Gl	4	
t calculado	1,1406	
P(T<=t) bi-caudal	0,3177	
t crítico bi-caudal	2,7765	

Apesar de o valor de porcentagem de recuperação obtido para o PCG ser inferior ao obtido para a SEA, eles não se diferem estatisticamente (tab.17). Isso diminui a probabilidade de estar ocorrendo algum tipo de influência da matriz analítica do PCG, diferentemente da ocorrida com a SEA.

Analisando-se os intervalos de confiança calculados para o teste de recuperação da SEA e para o teste de recuperação do PCG é possível verificar a inclusão do valor 100 no intervalo de confiança (IC) para a porcentagem recuperada e do valor 0 no IC para a diferença percentual relativa à concentração teórica (tab.18 e 19). Dessa forma, o método é considerado exato (CHOW, 1995).

Tabela 18. Intervalos de confiança (IC) calculados para a solução extrativa aquosa

IC	Recuperação (%)	$\Delta \%_x$
Superior	102,61	2,61
Inferior	99,30	-0,70

$\Delta \%_x$ : diferença percentual relativa a concentração teórica.

Tabela 19. Intervalos de confiança (IC) calculados para o produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui*

IC	Recuperação (%)	$\Delta \%_x$
Superior	100,550	0,550
Inferior	98,386	-1,614

$\Delta \%_x$ : diferença percentual relativa a concentração teórica.

A exatidão foi também avaliada pela análise de regressão linear simples (tab. 20, 21, 22 e 23), correlacionando-se a concentração teórica com a concentração medida (CHOW, 1995; ALTESOR, 1993). A vantagem da utilização da regressão linear para a avaliação da exatidão reside no fato de que a quantidade recuperada estimada pode ser obtida a partir de uma determinada quantidade de substância ativa conhecida, adicionada à amostra, dentro de uma faixa de concentração usada em estudos de recuperação (CHOW, 1995).

Tabela 20. Dados da análise de variância da regressão linear do teste de recuperação para a solução extrativa aquosa

<i>Causas da variação</i>	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F<sub>calculado</sub></i>
<i>Regressão linear</i>	1	3,7612	3,7612	511,7932*
<i>Desvios da regressão</i>	7	0,0514	0,0073	
<i>Total</i>	8	3,8126		

\* Significativo para  $\alpha = 0,05$ ,  $F_{\text{critico}} = 5,59$ .

Tabela 21. Dados da análise de regressão linear do teste de recuperação para a solução extrativa aquosa

	<i>Coefficientes <math>\pm s</math></i>	<i>t<sub>calculado</sub></i>	<i>t<sub>0,05 (n-2)</sub></i>	<i>P*</i>
<i>Interseção (a)</i>	-0,595 $\pm$ 0,251	-2,367	2,365	0,05
<i>Inclinação (b)</i>	1,130 $\pm$ 0,050	22,623	2,365	8,35 $\times 10^{-8}$

\* P: nível mínimo de significância.

O coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) para a análise dos dados correspondentes à solução extrativa aquosa foi de 0,990.

Tabela 22. Dados da análise de variância da regressão linear do teste de recuperação para o produto seco por aspensão de *Cecropia glazioui*

<i>Causas da variação</i>	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F<sub>calculado</sub></i>
<i>Regressão linear</i>	1	3,4883	3,4883	1082,2770*
<i>Desvios da regressão</i>	7	0,0226	0,0032	
<i>Total</i>	8	3,5109		

\* Significativo para  $\alpha = 0,05$ ,  $F_{\text{critico}} = 5,59$ .



Tabela 23. Dados da análise de regressão linear do teste de recuperação para o produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui*

	<i>Coefficientes ± s</i>	<i>t calculado</i>	<i>t<sub>0,05 (n-2)</sub></i>	<i>P*</i>
<i>Interseção (a)</i>	-0,543 ± 0,195	-2,786	2,365	0,03
<i>Inclinação (b)</i>	1,088 ± 0,033	32,898	2,365	6,21 × 10 <sup>-9</sup>

\*P: nível mínimo de significância.

O coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) para a análise dos dados correspondentes ao PCG foi de 0,994.

Conforme os resultados da análise de regressão linear apresentados nas tabelas 20, 21, 22 e 23, os coeficientes de regressão linear para o teste de recuperação da solução extrativa bem como do PCG, foram significativos. Além disso, nos dois casos houve a aprovação nos testes de normalidade e de homocedasticidade (CHOW, 1995). Sendo assim, o modelo de regressão linear foi adequado para descrever a relação entre a concentração teórica e a concentração recuperada.

A precisão do método foi avaliada, neste trabalho, em relação à área do pico do padrão de isovitexina e pico de interesse da SEA e do PCG, através dos resultados de repetibilidade e precisão intermediária. O terceiro parâmetro de precisão, a reprodutibilidade, não foi validada devido às limitações metodológicas, pois seriam necessários estudos em colaboração com outros laboratórios (SWARTZ e KRULL, 1997, 1998). O guia para a validação de métodos analíticos contido na resolução ANVS 391/99 não prevê a realização de estudos da reprodutibilidade.

Tabela 24 Resultados dos testes de repetibilidade e precisão intermediária para o padrão, solução extrativa aquosa (SEA) e produto seco por aspersão (PCG) de *Cecropia glazioui* com relação às áreas médias dos picos

Parâmetro	Área média (mV·s) ± s (CV%)		
	Padrão	SEA	PCG
<b>Repetibilidade</b>			
1.º dia (n = 7)	339571,29 ± 1330,25 (0,39)	418339,71 ± 1201,77 (0,29)	359550,00 ± 3849,57 (1,07)
2.º dia (n = 7)	343870,71 ± 3616,00 (1,05)	420700,00 ± 2481,36 (0,59)	364864,86 ± 3259,10 (0,89)
3.º dia (n = 7)	349346,14 ± 912,60 (0,26)	427399,71 ± 1324,14 (0,31)	365504,86 ± 2597,71 (0,71)
<b>Precisão intermediária</b> (n = 21)	344262,71 ± 4637,34 (1,35)	422146,48 ± 4274,28 (1,01)	363306,57 ± 4139,70 (1,14)

Tabela 25 Resultados dos testes de repetibilidade e precisão intermediária em valores absolutos para o padrão, solução extrativa aquosa (SEA) e produto seco por aspersão (PCG) de *Cecropia glazioui*

Análito	Repetibilidade	Precisão intermediária
Padrão	6743,9148	15743,8685
SEA	5209,3720	14680,1391
PCG	9663,2401	13154,4238

O método é preciso, pois o valor máximo encontrado, entre os resultados de repetibilidade e precisão intermediária em termos de coeficiente de variação percentual, foi de 1,35 % (tab. 24). Esse valor é baixo, considerando-se o limite máximo de aceitação de 5 % estabelecido por HEFENDEHL (1985) para matrizes complexas. Conforme o esperado, os valores dos coeficientes de variação da precisão intermediária foram maiores que os da repetibilidade para cada amostra. Isso se justifica pelo fato de que a precisão intermediária foi determinada através de repetições com intervalos de 24 horas e a repetibilidade por meio de repetições consecutivas. Dessa forma, a precisão do método é considerada validada.

Os resultados da análise de variância dos dados correspondentes aos testes de repetibilidade e de precisão intermediária, para o padrão, SEA e PCG (tab. IV, V e VI, anexos) demonstram que existem diferenças entre os valores obtidos em cada um dos três dias. Entretanto, isso não significa necessariamente falta de precisão, pois esta diferença torna-se preocupante em casos extremos, quando o valor do F calculado é altamente significativo, o que não ocorre nesse caso. Os valores, em termos absolutos, obtidos para a repetibilidade são inferiores aos de precisão intermediária (tab. 25), o que deve ocorrer normalmente com métodos precisos (FARRANT, 1997).

A especificidade foi comprovada pela identidade e homogeneidade do pico de interesse para o doseamento através da realização de espectros de varredura no ultravioleta para as amostras de solução extrativa e PCG comparados ao padrão puro.

Nas figuras 33, 34 e 35 observa-se que os espectros por varredura no UV para os picos de interesse nas amostras são idênticos ao da isovitexina. A homogeneidade desses picos foi comprovada através da realização dos espectros de varredura no UV, obtidos ao longo do pico representadas nos dados das tabelas VII e VIII dos anexos. As figuras 36 e 37 apresentam três espectros de varredura no UV que correspondem à região mediana e às extremidades dos picos.

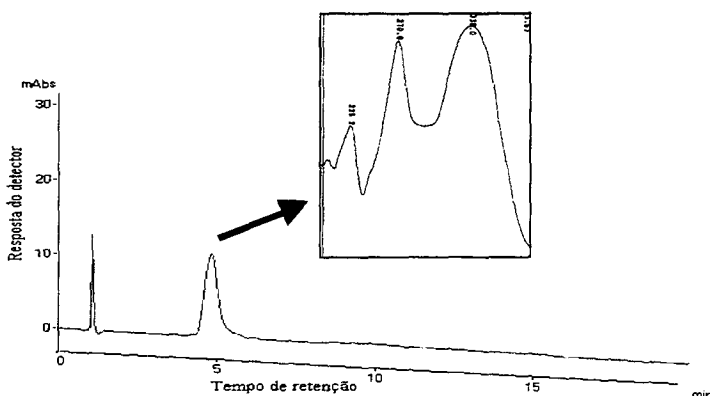


Figura 33. Cromatografia líquida de alta eficiência da isovitexina apresentando o espectro de varredura no UV para o pico de interesse

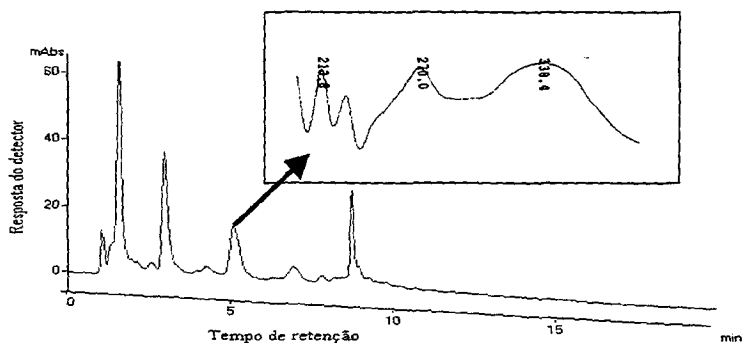


Figura 34. Cromatografia líquida de alta eficiência da solução extrativa aquosa apresentando o espectro de varredura no UV para o pico de interesse

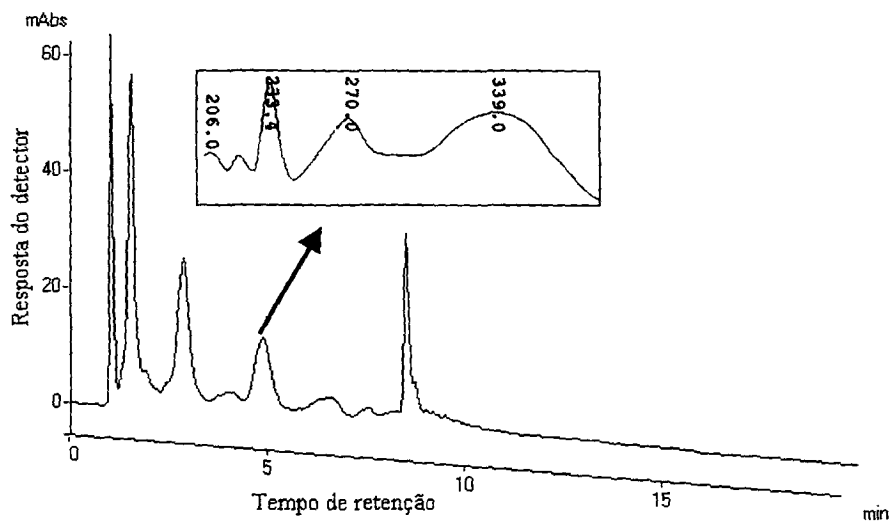


Figura 35. Cromatografia líquida de alta eficiência do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui*, apresentando o espectro de varredura no UV para o pico de interesse

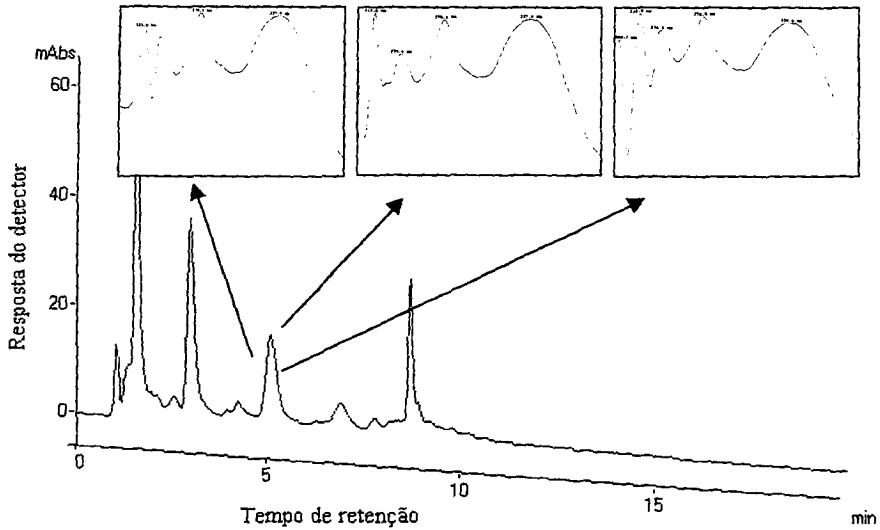


Figura 36. Cromatograma da solução extrativa aquosa, apresentando os espectros de varredura no UV, correspondentes às regiões mediana e extremidades do pico de interesse

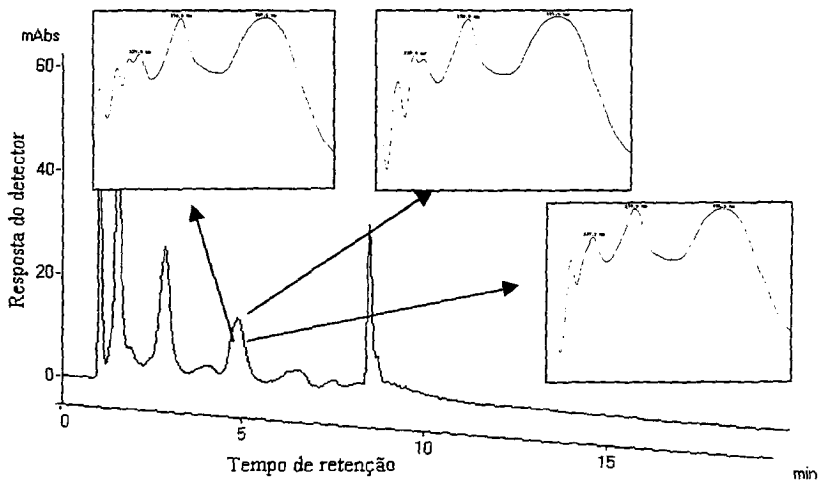


Figura 37. Cromatograma do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui*, apresentando os espectros de varredura no UV, correspondentes às regiões mediana e extremidades do pico de interesse

A análise de regressão linear foi empregada com a finalidade de verificar se a área e a concentração se correlacionam de forma linear. Para tal, foi utilizado o método dos mínimos quadrados. Os dados para a curva padrão de isovitexina submetida à análise de regressão estão representados na figura 38 e na tabela IX dos anexos.

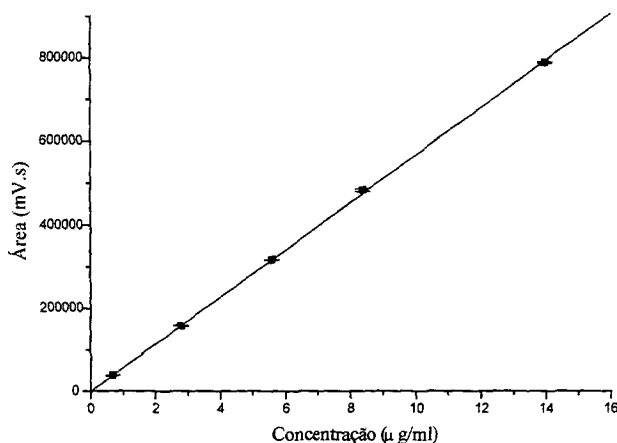


Figura 38. Curva padrão de isovitexina

A significância da linearidade foi verificada pela análise de variância para a regressão. Através dos resultados apresentados na tabela 26, verifica-se que o coeficiente de regressão linear é significativo, demonstrando obediência à linearidade na faixa de concentração empregada.

Tabela 26. Dados da análise de variância da regressão linear da curva do padrão de isovitexina

<i>Causas da variação</i>	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F calculado</i>
<i>Regressão linear</i>	1	$1,0369 \times 10^{12}$	$1,0369 \times 10^{12}$	55455,6117*
<i>Desvios da regressão</i>	13	243076241	18698172,4	
<i>Total</i>	14	$1,0372 \times 10^{12}$		

\* Significativo para  $\alpha = 0,05$ ,  $F_{\text{crítico}} = 4,67$ .

O coeficiente de regressão  $r^2$ , calculado pela regressão linear, foi de 0,9998 confirmando o observado acima.

A validade da regressão linear pode ser verificada pela análise dos resultados da estatística *t* para o ponto de interseção e inclinação da reta (tab.27). Para um nível de significância de 0,05, o ponto de interseção não se diferenciou estatisticamente de zero. Da mesma forma, o coeficiente de inclinação, testado no nível de significância de 0,05, diferiu de zero, o que comprova a significância do coeficiente de regressão linear.

A ocorrência ou não de erro sistemático constante pode ser confirmada através da análise do intervalo de confiança do ponto de interseção da reta (*ICa*). A inclusão do valor zero neste intervalo indicou a ausência do erro (tab.27) (FUNCK *et al.*, 1992).

O intervalo de confiança da inclinação da reta (*ICb*) (tab. 27) apresenta a 95 % de probabilidade ( $\alpha = 0,05$ ) de que o acréscimo verdadeiro na área a cada incremento de 1  $\mu\text{g/ml}$  esteja entre 56104,765 e 57143,698 mV.s (RIBOLDI e FERNANDES, 1995).

Tabela 27. Dados da análise de regressão linear da curva do padrão, descrita pela equação  $y = a + b \cdot x$  e com coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) de 0,9998

	<i>Coefficientes</i> $\pm s$	<i>IC</i>	<i>t</i> calculado	<i>t</i> <sub>0,05 (n-2)</sub>	<i>P</i> *
<i>Interseção</i> (a)	-575,526 $\pm$ 1881,840	-4640,992 a 3489,941	-0,306	3,182	0,76
<i>Inclinação</i> (b)	56624,232 $\pm$ 240,453	56104,765 a 57143,698	235,490	3,182	$5,51 \times 10^{-25}$

\**P*: nível mínimo de significância, *IC*: intervalo de confiança.

A adequabilidade do modelo para descrever o comportamento dos resultados de forma proporcional e linear à concentração de analito, para uma faixa de concentração definida, no método de doseamento em questão, pode ser constatada através da análise de resíduos (fig. 39 e tab. X, anexos). Observando-se a plotagem dos resíduos, verifica-se a ausência de estrutura definida, sendo assim os dados não assumem nenhuma tendência. Esse resultado é indicador de uma variância constante, ou seja, da homocedasticidade ( $P = 0,05$ ). A condição de que os resíduos são normalmente distribuídos foi satisfeita no teste de normalidade ( $P = 0,058$ ) (RIBOLDI e

FERNANDES, 1995). Dessa forma, verifica-se, que o modelo é adequado para descrever o comportamento dos resultados.

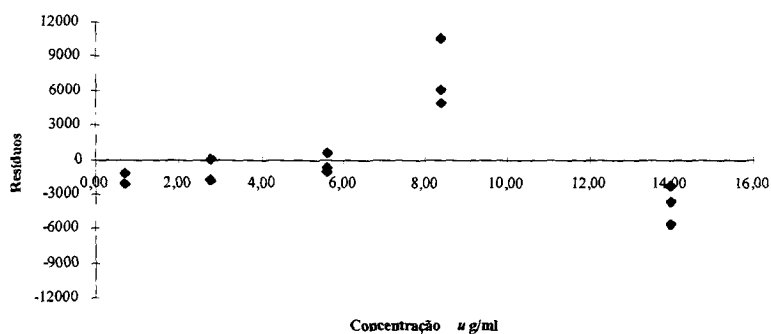


Figura 39. Distribuição de resíduos para a curva padrão de isovitexina

A faixa de confiança ao longo da reta, que permite a escolha da faixa de concentração mais segura para o doseamento, está representada na figura 40. Essa faixa indica segurança ao longo de toda curva, sendo que fica ainda mais estreita na região de concentração entre 3 e 9 µg/ml.

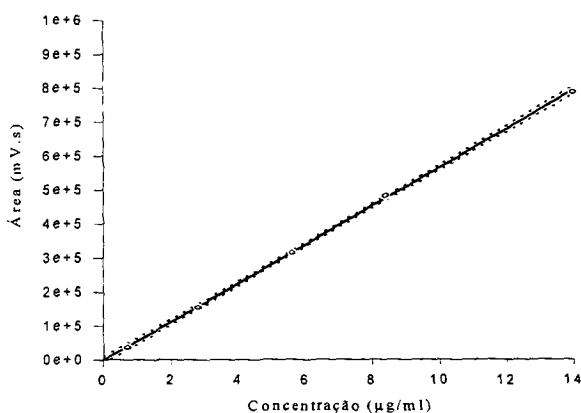


Figura 40. Faixa de confiança ao longo da curva padrão de isovitexina obtida por cromatografia líquida de alta eficiência



Foi igualmente realizada a análise de regressão linear para as amostras de SEA e PCG com o objetivo de verificar se o comportamento linear foi mantido e se ele se assemelhava ao do padrão.

Os resultados da regressão linear para as curvas da SEA e PCG, cujos dados para a sua plotagem estão apresentados nas tabelas XI e XII dos anexos, bem como a adequabilidade do modelo, são interpretados da mesma forma que os da regressão linear da curva padrão de isovitexina. Tanto para a SEA quanto para o PCG, o coeficiente de regressão linear foi significativo e o modelo mostrou-se adequado à interpretação dos dados. Através da análise desses resultados representados nas tabelas 28, 29, 30 e 31 e nas figuras 41, 42, 43 e 44, verifica-se que o comportamento tanto da SEA quanto do PCG é idêntico ao da curva padrão, o que fornece ainda maior segurança para a análise quantitativa.

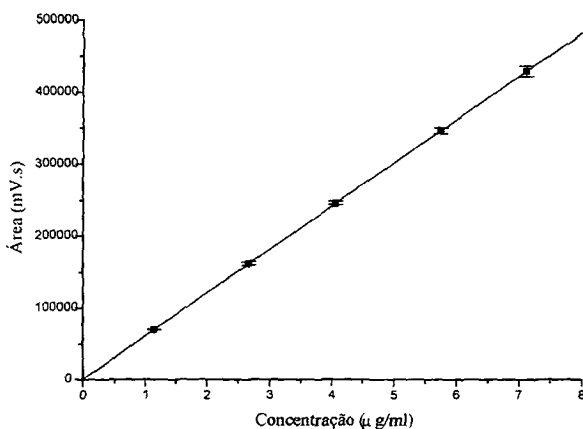


Figura 41. Curva de regressão linear para a solução extrativa aquosa de *Cecropia glazioui* obtida por cromatografia líquida de alta eficiência, considerando a área do pico de interesse

Tabela 28. Dados da análise de variância da regressão linear da curva da solução extrativa aquosa de *Cecropia glazioui* por cromatografia líquida de alta eficiência

<i>Causas da variação</i>	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F<sub>calculado</sub></i>
<i>Regressão linear</i>	1	$2,4575 \times 10^{11}$	$2,4575 \times 10^{11}$	18883,2504*
<i>Desvios da regressão</i>	13	169185548	13014272,9	
<i>Total</i>	14	$2,4592 \times 10^{11}$		

\* Significativo para  $\alpha = 0,05$ ,  $F_{\text{critico}} = 4,67$ .

Tabela 29. Dados da análise de regressão linear da curva da solução extrativa aquosa de *Cecropia glazioui*, descrita pela equação  $y = a + b \cdot x$  e com coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) de 0,9993

	<i>Coefficientes <math>\pm s</math></i>	<i>IC</i>	<i>t<sub>calculado</sub></i>	<i>t<sub>0,05 (n-2)</sub></i>	<i>P*</i>
<i>Interseção (a)</i>	-0,002 $\pm 2045,962$	-4420,034 a 4420,030	$-9,677 \times 10^{-7}$	3,182	1,000
<i>Inclinação (b)</i>	60300,773 $\pm 438,818$	59352,765 a 61248,782	137,416	3,182	$6,039 \times 10^{-22}$

\* P: nível mínimo de significância; IC: intervalo de confiança;

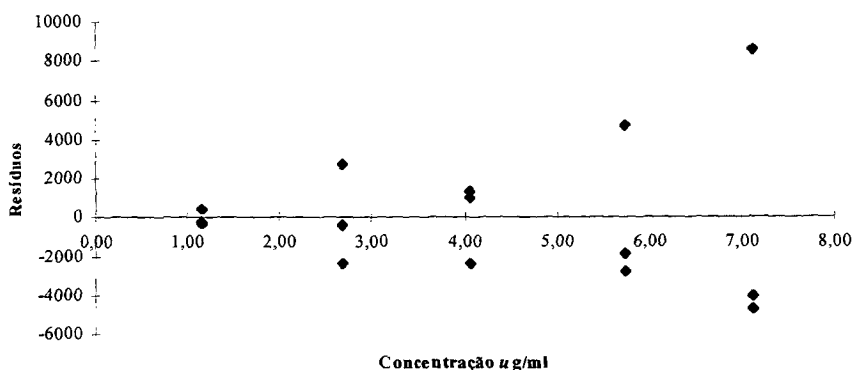


Figura 42. Distribuição de resíduos para a regressão linear da curva da solução extrativa aquosa de *Cecropia glazioui*

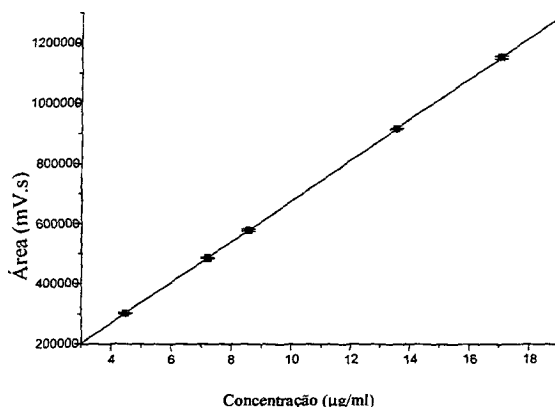


Figura 43. Curva de regressão linear para o produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* obtida por cromatografia líquida de alta eficiência, considerando a área do pico de interesse

Tabela 30. Dados da análise de variância da regressão linear da curva do extrato seco por aspersão de *Cecropia glazioui* por cromatografia líquida de alta eficiência

<i>Causas da variação</i>	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F<sub>calculado</sub></i>
<i>Regressão linear</i>	1	$1,4052 \times 10^{12}$	$1,4052 \times 10^{12}$	249094,69*
<i>Desvios da regressão</i>	13	73335895,6	5641222,74	
<i>Total</i>	14	$1,4053 \times 10^{12}$		

\* Significativo para  $\alpha = 0,05$ ,  $F_{crítico} = 4,67$ .

Tabela 31. Dados da análise de regressão linear da curva do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui*, descrita pela equação  $y = a + b \cdot x$  e com coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) de 1

	<i>Coefficientes <math>\pm s</math></i>	<i>IC</i>	<i>t<sub>calculado</sub></i>	<i>t<sub>0,05 (n-2)</sub></i>	<i>P*</i>
<i>Interseção (a)</i>	84,887 $\pm 1506,976$	-3170,736 a 3340,509	0,056	3,182	0,956
<i>Inclinação (b)</i>	67514,588 $\pm 135,274$	67222,345 a 67806,830	499,094	3,182	$3,168 \times 10^{-29}$

\* *P*: nível mínimo de significância; *IC*: intervalo de confiança.

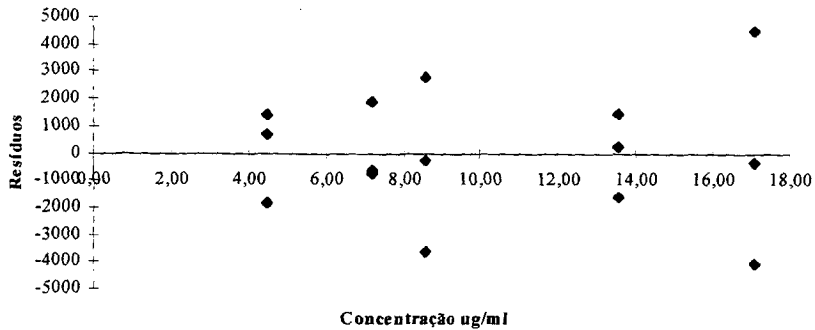


Figura 44. Distribuição de resíduos para a regressão linear da curva do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui*

A robustez do método foi avaliada através do efeito das variações no fluxo e composição da fase móvel nas áreas e alturas do pico do padrão de isovitexina e do pico de interesse nas amostras de SEA e PCG. As variações na composição da fase móvel foram efetuadas em um nível superior e um nível inferior, entretanto as variações no fluxo foram possíveis somente em níveis inferiores a 1,2 ml/min pois, acima desse valor era ultrapassado o limite máximo de pressão na coluna cromatográfica.

Essa avaliação, foi realizada pela análise da estatística *t*, testada no nível de significância de 0,05. Os resultados dessas análises, encontram-se nos anexos, representados nas tabelas XIII, XIV, XV, XVI, XVII e XVIII para as áreas, nas tabelas e XIX, XX, XXI, XXII, XXIII e XXIV para as alturas dos picos, em relação à fase móvel, e para a avaliação do efeito da variação no fluxo, nas tabelas XXV, XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX e XXX para as áreas e nas tabelas XXXI, XXXII, XXXIII, XXXIV, XXXV e XXXVI para as alturas. Essas tabelas estão sumarizadas nas tabelas 32 e 33 abaixo.

Tabela 32. Dados sumarizados da análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel no nível inferior e superior e da variação do fluxo para 1,1 e 1 ml/min na área do pico

<i>Pico</i>	<i>t calculado</i>			
	<i>Composição da fase móvel</i>		<i>Fluxo</i>	
	<i>Nível inferior</i>	<i>Nível superior</i>	<i>1,1 ml/min</i>	<i>1,0 ml/min</i>
<i>Padrão</i>	- 1,23	1,83	20,491*	41,036*
<i>SEA</i>	- 0,97	1,24	- 12,880*	- 39,398*
<i>PCG</i>	2,12	- 1,66	- 79,621*	- 75,390*

\* Diferença significativa para  $t_{0,05 (n-2)} = 2,776$ .

Tabela 33. Dados sumarizados da análise estatística da influência da variação da composição da fase móvel no nível inferior e superior e da variação do fluxo para 1,1 e 1 ml/min na altura do pico

<i>Pico</i>	<i>t calculado</i>			
	<i>Composição da fase móvel</i>		<i>Fluxo</i>	
	<i>Nível inferior</i>	<i>Nível superior</i>	<i>1,1 ml/min</i>	<i>1,0 ml/min</i>
<i>Padrão</i>	- 37776688*	20341293*	- 1	- 1
<i>SEA</i>	- 46,669*	45,255*	- 1	0,707
<i>PCG</i>	- 43*	15,5*	- 3,768 × 10 <sup>-14</sup>	0,707

\* Diferença significativa para  $t_{0,05 (n-2)} = 2,776$ .

A partir dos dados apresentados na tabela 32, comprova-se que as alterações na composição da fase móvel, tanto no nível inferior como no superior, não afetam significativamente as áreas dos picos. Já as variações de 8,33 % (1,1 ml/min) e 16,67 % (1 ml/min) no fluxo, em relação ao padronizado de 1,2 ml/min, causaram alterações estatisticamente significativas nas áreas.

Entretanto, os resultados que relacionam de forma estatística as alturas dos picos obtidas pelas variações no fluxo de 8,33 % (1,1 ml/min) e 16,67 % (1 ml/min) com as obtidas em fluxo normal de 1,2 ml/min demonstram que as alterações provocadas por ambas as variações não são significativas (tab. 33). Porém, as

variações testadas para a composição da fase móvel afetaram de forma significativa as alturas dos picos, tanto no nível inferior, como no superior.

Tanto o método que utiliza a área do pico de interesse, quanto o que utiliza a altura são utilizados para a análise quantitativa, entretanto a escolha depende do tipo de análise. Em geral, o método de medida da altura do pico é preferida quando não é possível o controle apropriado do fluxo, enquanto que a utilização da área é recomendada quando o controle adequado da fase móvel não é possível. Portanto para métodos por gradiente é recomendada a utilização da medida da área no lugar da altura do pico (SZEPESI, 1990). Essas considerações confirmam o observado na análise dos dados das tabelas 32 e 33.

Se ocorrem variações no fluxo, o método as suporta, dentro dos limites do equipamento, que em si é estável, o que se pode verificar no estudo de repetibilidade. O equipamento apresenta, para o fluxo, uma exatidão de  $\pm 2\%$  e uma precisão de  $\pm 0,3\%$ , e para a fase móvel, no caso de um gradiente, a exatidão é de  $\pm 1\%$  (SHIMADZU, 1996). Tudo indica que, para o método em questão, foram escolhidas variações muito drásticas no fluxo, pois trata-se de um gradiente cuja suscetibilidade a essas variações é muito maior e a precisão é menor do que em métodos isocráticos. Além disso com o método de gradiente ocorrem oscilações na linha de base que podem interferir na aquisição dos dados pelo programa computacional de avaliação (SNYDER *et al.*, 1988, SZEPESI, 1990).

Os resultados sugerem a realização de mais estudos sobre a robustez do método, para que sejam estabelecidos os limites de variação no fluxo que o método é capaz de suportar, em relação à área do pico.

Sugere-se a utilização da área do pico, método de escolha para a quantificação neste trabalho, como metodologia de doseamento. Considerando a escolha da área e a não utilização da altura do pico, faz-se necessário ressaltar que esse método não suporta variações maiores do que  $8,33\%$  no fluxo. Contudo é robusto para as variações efetuadas na composição da fase móvel.

O limite de quantificação, calculado pelo DMS, foi determinado neste trabalho como uma informação adicional, pois não está enquadrado nos requisitos preconizados (INTERNATIONAL, 1996; USP 23, 1995; SWARTZ e KRULL, 1997) para a validação do método analítico em questão, considerando-se que a sua finalidade são as análises qualitativa e quantitativa para matéria-prima vegetal, produtos intermediários, PCG e seus derivados.

O limite de quantificação para o método de doseamento pela área do pico, calculado através da diferença mínima significativa (DMS), na região de maior confiabilidade da curva do padrão de isovitexina, foi de 1212 mV.s. Esse dado fornece a informação de que para qualquer valor de área acima de 1212, a diferença é significativa para a quantificação. Se considerada toda a curva padrão, o DMS calculado foi de 2817,9 mV.s, correspondendo à concentração de 0,05 µg/ml de isovitexina. Para as curvas da SEA e do PCG os valores de DMS foram respectivamente 6891,5 e 9275,9 mV.s, correspondendo a 0,12 e 0,16 µg/ml. Esses valores não devem ser comparados entre si, pois as curvas foram efetuadas em diferentes faixas de concentração. Entretanto os valores de DMS obtidos, seguem uma lógica conforme a complexidade da matriz analítica.

---

**CONCLUSÕES**



#### 4. CONCLUSÕES

- Na caracterização botânica do material vegetal, identificou-se a presença de tricomas. Entretanto, esse fato não forneceu elementos satisfatórios para o estabelecimento de metodologia adequada para diferenciar a *Cecropia glazioui* de outras espécies do gênero.
- O sistema desenvolvido por cromatografia em camada delgada proporcionou a separação de uma mancha com comportamento idêntico ao do padrão de isovitexina, tanto para a matéria-prima vegetal, quanto para o produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* (PCG).
- A cromatografia líquida de alta eficiência, por gradiente em fase reversa, demonstrou a existência de um pico com o mesmo tempo de retenção do padrão de isovitexina e sistema com desempenho satisfatório tanto para a matéria-prima vegetal quanto para o produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui*.
- Para a produção do produto seco por aspersão, o fluxo de alimentação associado a temperatura de admissão do fluido de secagem foram as condições de operação que mais intensamente influenciaram o rendimento do produto e o tempo de processamento.
- As operações de extração e de secagem não alteraram os perfis cromatográficos obtidos para a matéria-prima, indicando a manutenção dos marcadores e, conseqüentemente, adequabilidade tecnológica.
- O produto seco por aspersão foi qualificado como um material particulado finíssimo, de baixa densidade, com fluxo pobre do tipo nucleado e sensível a ambientes com umidade relativa superior a 70 %.
- O método desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência foi validado com o objetivo de qualificar e quantificar a matéria-prima vegetal, os produtos derivados e extrato seco por aspersão da *Cecropia glazioui*.

---

**BIBLIOGRAFIA**

## 5. Bibliografia

- ALTESOR, C.; DOL, I.; KNOCHEN, M. Aplicación de técnicas estadísticas para la comprobación de la exactitud en el desarrollo de métodos analíticos farmacéuticos. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 13, n.1, p. 49-52, 1993.
- ALVES, M. N.; ILLG, R. D.; MAGALHÃES, P. M. de. Cultura de tecidos de *Cecropia glazioui*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, Curitiba, 1992. *Anais*. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1992. p. 212.
- ALVES, E. S. The Effects of the Pollution on Wood of *Cecropia glazioui* (Cecropiaceae). *Iawa Journal*, v. 16, n. 1, p. 69-80, 1995.
- ANDRADE, J. C. *Biologia da Cecropia lyratiloba* Miq. var. *nana*. *Andr. & Car. (Moraceae) na Restinga do Recreio dos Bandeirantes*. Rio de Janeiro: Curso de Pós-Graduação em Botânica, UFRJ, 1981. Dissertação (Mestrado)
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N.; ALLEN Jr., L. V. *Farmacotécnica: Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. São Paulo: Premier, 1999. [Trad. 6 ed. Norte-americana]
- BARETTA, I. P.; CYSNEIROS, R. M.; TANAE, M. M.; LIMA LANDMAN, M. T. R.; LAPA, A. J. Avaliação dos efeitos centrais da *Cecropia glazioui* Sneth em ratos normo e hipertensos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, Águas de Lindóia -SP, 1998. *Programa e Resumos*. 1998a. p. 88, (res. 01.189).
- BARETTA, I. P.; LAPA, A. J.; LIMA, T. C. M. Avaliação dos efeitos centrais após o tratamento repetido com a *Cecropia glazioui* Sneth em camundongos. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 12, Caxambu - MG, 1998. *Programa e Resumos*. 1998b. p. 191, (res. 12086).
- BERG, C. C. Cecropiaceae a New Family of the Urticales. *Taxon*, v. 27, n. 1, p. 39-44, 1978a.
- BERG, C. C. Espécies de *Cecropia* da Amazônia brasileira. *Acta Amazônica*, v. 8, n. 2, p. 149-182, 1978b.

- BERG, C. C. *Cecropia* (Cecropiaceae) no Brasil, ao sul da Bacia Amazônica. *Albertoa*, v. 4, p. 213-221, 1996.
- BORGES, A. C. R.; TORRES, L. M. B.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Atividade hipotensora do extrato aquoso e de frações semipurificadas da *Cecropia glazioui* SNETH. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 11, João Pessoa, 1990. *Livro de Resumos*. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 1990. p.4.98.
- BORGES, A. C. R. Mecanismo da ação hipotensora da *Cecropia glazioui* SNETH. São Paulo: Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Setor de Produtos Naturais da Escola Paulista de Medicina-UNIFESP, 1992. Dissertação (Mestrado em Ciências).
- BRANDÃO, M. G. I. ; STEHMANN, J. R. Levantamento preliminar das plantas medicinais na bacia do Rio Piracicaba, Minas Gerais. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. *Programa e Resumos*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996. p. 104, (res. B-047).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Central de Medicamentos. *Programa de Pesquisa em Plantas Mediciniais*. Brasília, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. *Boas Práticas para Fabricação de Produtos Farmacêuticos*. Brasília, 1994.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n°. 6 de 31.1.95. *Diário Oficial da União*, 6.2.1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n°. 1029 de 21.12.98. *Diário Oficial da União*, 23.12.1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 391 de 9.8.99. *Diário Oficial da União*, 10.8.1999.
- BROADHEAD, J.; ROUAN, S. K. E.; RHODES, C. T. The Spray-drying of Pharmaceuticals. *Drug Dev. Ind. Pharm.* v. 8, n. 11-12, p. 1162-1206, 1992.

BUNDESVEREINIGUNG Deutscher Apothekeverbände (Hrsg.) *Deutscher Arzneimittel - Codex*, Frankfurt: Govi-Deutscher Apotheker, 1986.

BULHÕES, G. de C. C.; SILVA, A. da M. e; SÁ, M. A. M. de Abordagem fitoquímica de plantas nativas do nordeste brasileiro parte II. *Anais do Departamento de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco*, Recife, v. 15, p. 39-44, 1976.

CÁCERES, A.; GIRÓN, L. M.; MARTÍNEZ, A. M. Diuretic Activity of Plants Used for the Treatment of Urinary Ailments in Guatemala. *J. Ethnopharmacol.*, v. 19, p. 233-245, 1987.

CARAUTA, J. P. P. Moráceas do estado do Rio de Janeiro. *Albertoa*, v.4, p. 145-193, 1996.

CARR, R. L. Evaluating Flow Properties of Solids. *Chem. Eng.* V. 72, n. 2, p. 163-168, 1965.

CARVALHO, E. L. S.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V. L.; GUTERRES, S. S.; PETROVICK, P. R. Extratos secos por nebulização de *Maytenus ilicifolia*: otimização de formulação. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996, Florianópolis. *Resumos*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996. p.73.

CARVALHO, E. L. S. *Desenvolvimento de extrato seco nebulizado de Maytenus ilicifolia Martius ex Reiss. (espineira-santa)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

CHALMERS, J. Advances in the Diagnosis and Treatment of Arterial Hypertension. *Drugs of Today*, v. 34, n. 6 p. 491-506, 1998.

CHOW, S-C.; LIU, J-P. *Statistical Design and Analysis in Pharmaceutical Science: Validation, Process Controls and Stability*. New York: Marcel Dekker, 1995.

CORRÊA JR., C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. *Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas*. Jaboticabal: FUNEP, 1994.

- CYSNEIROS, R. M.; MESIA, S. V.; TERSARIOL, I. L. S.; LAPA, A. J. Evidências para a ação anti-secretora ácida gástrica da *Cecropia glazioui*, SNETH. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. *Programa e Resumos*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996. p. 103. (res. F-083).
- CYSNEIROS, R. M. *Mecanismo da ação hipotensora do extrato aquoso e frações purificadas da Cecropia glazioui* SNETH. São Paulo: Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Setor de Produtos Naturais da Escola Paulista de Medicina-UNIFESP, 1996. Tese (Doutorado em Farmacologia).
- CYSNEIROS, R. M.; MESIA, V. S.; BEZERRA, G. B.; MARCHI, R. E. L.; SOUCCAR, C.; LIMA LANDMAN, M. T. R.; LAPA, A. J. Efeitos do extrato aquoso de *Cecropia glazioui* Sneth. em lesões gástricas, aguda e crônica, e no esvaziamento gástrico. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, Águas de Lindóia - SP, 1998. *Programa e Resumos*. 1998. p. 98, (res. 01.230).
- DA SILVA, W. B. *Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a matéria-prima vegetal e solução extrativa de Phyllanthus niruri L. (Euphorbiaceae)*. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- DAVID, R.L. (ed.) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 72 ed., Boca Raton: CRC, 1991-1992. p.15-21.
- DELLA MONACHE, F. Isolamento e identificação da isovitexina obtida de frações farmacologicamente ativas da *Cecropia glazioui*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 10, São Paulo, 1988, *Resumos...* São Paulo: Departamento de Psicobiologia e Departamento de Farmacologia da Escola Paulista de Medicina, 1988. (Res.5), painel 5/9.
- DE SOUZA, K. C. B. *Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de Passiflora edulis forma Flavicarpa*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

DEUTSCHLAND. Bundesgesundheitsamt. *Vorschläge zur Erarbeitung einer Monographie zum DAB*. Berlin, 1989. Mimeo. 1p.

DOMINGOS, C. D.; MONTEIRO, A. P. S.; VIEL, T. A.; GOMES, P.; SOARES, R. P.; LIMA-LANDMAN, M. T.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. Efeitos do extrato de *Cecropia glazioui* SNETH. na litíase vesical e na reatividade farmacológica de bexiga de ratos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. *Programa e Resumos*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996. p. 104, (res. F-088)

EHRHARDT, L.; SCHINDLER, E. Pharmazeutische Granulate. Optimierung der Verarbeitungseigenschaften. 3 Mitt. *Pharm. Ind.*, v.42, n. 1, p. 96-103, 1980.

EVANS, I. S.; CARDOSO, E. M.; LAPA, A. J.; LIMA-LANDMAN, M. T. R. Avaliação do efeito de plantas medicinais com ação hipotensora/anti-hipertensiva na atividade da enzima conversora (ECA). In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 14, Caxambu - MG, 1999. *Programa e Resumos*. 1999. p. 200, (res. 12081)

FARIAS, M. R. A avaliação da qualidade das matérias-primas vegetais. IN: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 1999. cap. 12, p.197-220.

FARMACOPÉIA Brasileira. 2 ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

FARMACOPÉIA Brasileira, 4 ed., São Paulo: Atheneu, 1988.

FARRANT, T. *Practical Statistics for the Analytical Scientist*. Cambridge:Royal Society of Chemistry, 1997.

FERRO, V. de O.; JORGE, L. I. F.; MARKMAN, B. E. O. Elementos histológicos característicos de *Cecropia pachystachia* In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. *Programa e Resumos*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996. p. 52, (res. B-024)

- FISCHER, D. C. H.; OHARA, M. T.; SAITO, T. Padrão microbiano em medicamentos não estéreis de uso oral. Enquadramento de produtos fitoterápicos. *Rev. Bras. Farmacog.*, v.1, p.29-55, 1996.
- FUNCK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. *Qualitätssicherung in der analytischen Chemie*. Weinheim: VHC, 1992.
- GRIMM, W.; SCHEPKY, G. *Stabilitätsprüfung in der Pharmazie*. Aulendorf: Cantor, 1980.
- GUERRA, R. N. M.; SOARES, S. M.; BATALHA, V.; RESENDE, A.; BRITO, M. R.; SILVA, M. N. M. Inibição de interações T dependentes em camundongos tratados com o extrato bruto ou frações das folhas de *Cecropia adenopus* Mart. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 12, Caxambu - MG, 1998. *Programa e Resumos*. 1998. p. 293. (res. 12132)
- GUTERRES, S. S. *Influência de adjuvantes sobre as características farmacêuticas de cápsulas de gelatina dura contendo hidroclorotiazida*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia, UFRGS, 1990. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
- GUYOT, J. C.; ARNAUD, P.; BECOURT, P.; CASSIERE, J. P.; CHULIA, D.; DUCHÊNE, D.; FERRAND, D.; GOUAIHARDOU, J.; LANGLOIS, C.; LEQUIEN, C.; MALFROID, F.; POURCELOT, Y.; RENOUX, R.; SEGOT, S.; TOURE, P. Commentaires relatifs aux méthodes générales d'analyse des formes orales solides récemment introduites dans les pharmacopées française et européenne. Rapport d'une commission SFSTP. *S.T.P. Pharma Pratiques*, v. 5, n. 6, p. 482-494, 1995.
- HEBERLÉ, G.; WHERMANN, L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de extratos aquosos de *Cecropia glazioui* SNETH. - Moraceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, Águas de Lindóia - SP, 1998. *Programa e Resumos*. 1998. p. 184, (res. 07.005).
- HEFENDEHL, F. W. *Anforderung an die Qualitätskontrolle pflanzlicher Arzneimittel*. Graz: Österreichische Pharmazeutische Gesellschaft, 1985.



HELLMAN, J. *Farmacotecnica teorica y practica*. 3. ed., Mexico: Continental, 1982. v.1.

HOWELL, R. V.; MONTERO, G. U. Actividad diurética de la *Cecropia obtusifolia* (Moraceae) em ratas albinas. *Rev. Biol. Trop.*, v. 44, n. 1, p. 93-96, 1996.

INTERNATIONAL Conference on Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology. ICHQ2A*. Geneve, 1995.

INTERNATIONAL Conference on Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Validation of Analytical Procedures: Methodology. ICHQ2B*. Geneve, 1996.

JONES, T. M. The influence of Physical Characteristics of Excipients on the Design and Preparation of Tablets and Capsules. *Pharm. Ind.*, v. 39, n. 5, p. 469-476, 1977.

KERBER, V. A.; SILVA, G. A. A. B.; MIGUEL, O. G.; MOREIRA, E. A. Investigação fitoquímica preliminar em *Cecropia catarinensis* Quat. Moraceae. *Trib. Farm.*, v. 57/59, n. 1,2,3, p. 28-30, 1991.

KIRKLAND, J. J.; SNYDER, L. R. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 2 ed., New York: Wiley, 1979.

KLUMPP, A.; KLUMPP, G.; DOMINGOS, M.; DA SILVA, M. D. Fluoride Impact on Native Tree Species of the Atlantic Forest Near Cubat o, Brasil. *Water Air Soil Pollution*, v. 87, n. 1-4, p. 57-71, 1996.

KUBITZKI K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V. *The Families and Genera of Vascular Plants*. Berlin: Springer, 1993.

LANTZ Jr, R. J. Size Reduction. In: LIEBERMAN, H.A.; LACHMAN, I.; SCHWARTZ, J.B. (ed.). *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker, 1990. v. 2, cap. 3.

- LAPA, J. A. *Estudos farmacodinâmicos e toxicológicos de algumas plantas escolhidas pela CEME. Toxicologia em ratos*. São Paulo: Setor de Produtos Naturais. INFAR-EPM. 1985.
- LAPA, J. A. Evaluation of the Central Effects of *Cecropia glazioui* Sneth. in Mice. In: WORLD CONGRESS FOR MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS FOR HUMAN WELFARE, 2, Mendoza, 1997. *Abstracts...*, Mendoza: ICMAP - ISHS - SAIPA, 1997. p. P-294.
- LIEBERMAN, H. A.; LACHMAN, I.; SCWARTZ, J. B. *Pharmaceutical dosage forms: Tablets*. 2ed. New York: Marcel Dekker, 1989. v. 1.
- LINDEN, R. *Desenhos estatísticos e metodologia de análise de superfície de resposta aplicados à obtenção de formas farmacêuticas de Passiflora edulis Sims*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. *Phytopharmaceutical Technology*. Boca Raton: CRC, 1989.
- LOPEZ ABRAHAM, A. M.; ROJAS HERNANDES, N. M.; JIMENEZ MISAS, C. A. Extractos de plantas con propiedades citostáticas que crecen en Cuba. *Rev. Cub. Med. Trop.*, v. 13, p. 97-104, 1979.
- LOPEZ ABRAHAM, A. M.; MISAS, C. A. J.; HERNANDES, N. M. R. Actividad biológica de extractos de plantas que crecen en Cuba: I. *Rev. Cub. Farm.*, v. 14, p. 259-265, 1980.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. (ed.), *The Systematic Identification of Flavonoids*. Berlin: Springer, 1970.
- MACHADO, E. C.; YUNES, R. A.; DELLA MONACHE, F. Triterpenos pentacíclicos da série ursano isolado de *Cecropia catarinensis* Quatretecas, Moraceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. *Programa e Resumos*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996. p. 177, (res. Q-035).

- MAGALHÃES, P. M. *O caminho medicinal das plantas*. Campinas: CPQBA-UNICAMP, 1997.
- MAGALHÃES, P. M. Agrotecnologia para o cultivo da Embaúba. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, Águas de Lindóia - SP, 1998. *Programa e Resumos*. 1998. p. 107, (res. 02.024).
- MARIN, R. M.; GAZOLA, R.; SILVA, G. A.; SINGI, G. Efeitos do extrato bruto de *Cecropia peltata* sobre o coração isolado de rato. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 14, Caxambu - MG, 1999. *Programa e Resumos*. 1999. p. 357, (res. 03039).
- MARQUES, L. C. Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 1999. cap. 14, p.259-289.
- MARSHALL, J. J.; RICKSON, F.R. Characterization of the  $\alpha$ -D-glucan from the Plastids of *Cecropia peltata* a Glucan - type Polysaccharide. *Carbohydrate Res.*, v. 28, p. 31-37, 1973.
- MARTINS, A. G. *Influência de fatores tecnológicos na avaliação analítica e farmacológica de extratos secos nebulizados de Maytenus ilicifolia Martius ex Reiss*. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- MASTERS, K. *Spray Drying*. 2 ed., New York: John Wiley, 1976.
- MELLADO, V.; LOZOYA, M. Effect of the Aqueous Extract of *Cecropia obtusifolia* on the Blood Sugar Normal and Pancreatectomized Dogs. *Int. J. Crude Drug Res.*, v. 22, n. 1, p. 11-16, 1984.
- MENDA, B. B. C. *Contribuição à análise química da Cecropia lyratiloba Miq. Moraceae*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Análise, Síntese e Controle de Medicamentos, UFRGS, 1976. Dissertação (Mestrado em Farmácia).