



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



ESTUDOS TECNOLÓGICOS PARA PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DE
Ocotea duckei Vattimo (LAURACEAE)

LAISLA RANGEL PEIXOTO

João Pessoa – PB
2023

LAISLA RANGEL PEIXOTO

**ESTUDOS TECNOLÓGICOS PARA PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DE
Ocotea duckei Vattimo (LAURACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração Farmacoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

COORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

**João Pessoa – PB
2023**



PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 368ª (trecentésima sexagésima oitava) Tese de Doutorado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Laisla Rangel Peixoto**, candidata ao Título de "Doutora" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica.

Às dezesseis horas (16h00) do dia trinta e um de agosto do ano dois mil e vinte e três (31/08/2023), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: meet.google.com/oju-kkwb-nzk, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Laisla Rangel Peixoto**, candidata ao Título de "DOUTORA" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica. Foram componentes da Banca Examinadora os pesquisadores: Iranildo José da Cruz Filho, Ph.D em Biotecnologia; Rodrigo Molina Martins, Ph.D em Ciências; Sócrates Golzio dos Santos, Ph.D em Farmacoquímica; Felipe Queiroga Sarmiento Guerra, Ph.D em Farmacologia e Fabiana de Andrade Cavalcante, Ph.D em Farmacologia. Sendo o primeiro, integrante do corpo de pesquisadores da Universidade Federal de Pernambuco, o segundo, integrante do corpo docente da UNIFACISA e os demais, integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, a Presidente da Banca, professora Fabiana de Andrade Cavalcante, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Laisla Rangel Peixoto**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "ESTUDOS TECNOLÓGICOS PARA PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DE *Ocotea duckei* Vattimo (LAURACEAE)". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de cinquenta minutos, a candidata foi arguida pelos Examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADA**. Em face da aprovação, declarou a Presidente, achar-se a examinada **Laisla Rangel Peixoto**, legalmente habilitada a receber o Título de "DOUTORA" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na Área de Concentração Farmacoquímica, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que a mesmo faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pela discente.

Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante (Presidente)

Prof. Dr. Rodrigo Molina Martins (Examinador) *Rodrigo M. Martins*

Prof. Dr. Iranildo José da Cruz Filho (Examinador)

Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos (Examinador)

Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra (Examinador)

Laisla Rangel Peixoto (Discente)



Documento assinado digitalmente

FABIANA DE ANDRADE CAVALCANTE OLIVEIRA

Data: 01/09/2023 13:51:47-0300

Verifique em <https://validar.if.gov.br>

Iranildo Cruz



Documento assinado digitalmente

SÓCRATES GOLZIO DOS SANTOS

Data: 12/09/2023 16:06:46-0300

Verifique em <https://validar.if.gov.br>



Documento assinado digitalmente

FELIPE QUEIROGA SARMENTO GUERRA

Data: 13/09/2023 09:13:48-0300

Verifique em <https://validar.if.gov.br>



Documento assinado digitalmente

LAISLA RANGEL PEIXOTO

Data: 16/09/2023 00:28:00-0300

Verifique em <https://validar.if.gov.br>

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na publicação Seção de Catalogação e Classificação

P379e Peixoto, Laisla Rangel.

Estudos tecnológicos para padronização do extrato seco de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) / Laisla Rangel Peixoto. - João Pessoa, 2023.
132 f. : il.

Orientação: José Maria Barbosa Filho.
Coorientação: Josean Fechine Tavares.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Plantas medicinais. 2. Família Lauraceae. 3. Gênero *Ocotea*. 4. *Ocotea duckie* Vattimo. 5. Extrato secos. I. Barbosa Filho, José Maria. II. Tavares, Josean Fechine. III. Título.

UFPB/BC

CDU 633.8(043)

LAISLA RANGEL PEIXOTO

**ESTUDOS TECNOLÓGICOS PARA PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DE
Ocotea duckei Vattimo (LAURACEAE)**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba. Área de concentração: Farmoquímica

Aprovado em:

PROF. DR. JOSÉ MARIA BARBOSA FILHO

(Orientador)

PROF. DR. IRANILDO JOSÉ DA CRUZ FILHO

(Membro Externo Titular)

PROF. DR. RODRIGO MOLINA MARTINS

(Membro Externo Titular)

PROF. DR. SOCRATES GOLZIO DOS SANTOS

(Membro Interno Titular)

PROF. DR. FELIPE QUEIROGA SARMENTO GUERRA

(Membro Interno Titular)

Dedico...

A **toda minha família**, pelo incentivo, carinho, companheirismo e exemplo de amor que me deram. Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus**, pela presença em minha vida, sempre me guiou, e foi o grande responsável por esta conquista.

Aos meus pais, **Ricardo Peixoto e Aurenny Rangel**, por sempre me apoiarem em todas as etapas da minha vida e pelo imenso amor que me deram! Sem vocês, este sonho não estaria sendo concretizado.

Às minhas queridas irmãs **Samantha, Samara e Larissa** pelo carinho e amizade ofertados à mim. Amo vocês!

Ao orientador **José Maria Barbosa Filho** e meus coorientadores **Josean** e em especial **Professor Fabio Santos Souza**, pelo aprendizado, atenção, disponibilidade e dedicação. Sou grata por me mostrar o caminho científico e por auxiliar no meu crescimento profissional e intelectual.

Aos técnicos de laboratório **Venâncio e Fabrício**, pela ajuda e contribuição ao trabalho.

Aos **colegas de turma** por terem dividido as experiências vividas na pós graduação.

Aos professores do **Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (UFPB)**, por terem compartilhado seus conhecimentos, pela dedicação, estímulo, apoio, ensinamentos e experiências transmitidos.

Agradeço as **Secretárias do Programa de Pós-Graduação, Carol e Nilmar**, pela paciência, dedicação, disponibilidade, carinho e atenção dedicados a todos os alunos.

Aos **professores da banca de qualificação e tese** pelo tempo disponibilizado e pela contribuição para enriquecimento do projeto.

Agradeço à **CNPQ** pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

PEIXOTO, Laisla Rangel, Universidade Federal da Paraíba, agosto de 2023. Estudos Tecnológicos para padronização do extrato seco de *Ocotea Duckei* Vattimo (LAURACEAE). Orientador: José Maria Barbosa Filho.

Ocotea duckei Vattimo, popularmente conhecida como “Louro-de-cheiro”, Louro-pimenta” e “Louro-canela” é um membro da família Lauraceae encontrada no Nordeste do Brasil. Popularmente, é utilizada no tratamento de neuralgia, dispepsia, anorexia e dor. Com relação aos seus constituintes, apresenta os lignoides langambina (IAN) e EPI- langambina (EPI-IAN) como os principais marcadores vegetais. Visando contribuir para o avanço do potencial farmacológico das espécies vegetais brasileiras, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver metodologias analíticas e processos tecnológicos para obtenção de extrato seco (ES) padronizados de *O. duckei*. Após a coleta, as partes aéreas do material botânico passaram por processo de secagem e trituração para a obtenção da droga vegetal (DV). Com isso, realizou-se a sua caracterização físico-química, sendo realizados os testes de granulometria, determinação da densidade, teor de umidade, determinação do potencial hidrogeniônico (pH), espectroscopia na região de infravermelho com transformada de fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA). Foi realizado estudos fitoquímicos, como processo extrativo líquido-líquido para obtenção de extratos e fases e executou-se técnicas cromatográficas para obtenção das substâncias majoritárias e outros compostos químicos. Além disso, através da fase clorofórmica e hexânica foi realizado o teste de toxicidade por *Artemia salina* da *O. duckei*. Para o desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação dos marcadores, seguiu-se com a preparação da amostra e padrão, HPLC e avaliação dos parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, efeito de matriz, exatidão e robustez. Para a realização dos estudos tecnológicos, a obtenção do ES foi feita através de um planejamento para a extração por maceração, comparando a relação gradiente do solvente EtOH a 30, 50, 70 e 96% e a proporção droga/solvente a 10, 20 e 30% e um planejamento fatorial 3² para a secagem por rotaevaporação, no qual a celulose e o aerosil foram empregados como adjuvantes de secagem. Os ES obtidos foram caracterizados por teste de densidade, ângulo de repouso, granulometria, TGA e DTA. O melhor ES obtido foi utilizado para desenvolver uma formulação farmacêutica sólida (cápsula). Como resultado deste trabalho, a DV foi classificada como pó grosso, apresentou propriedades de fluxo aceitável, como reafirmado pelo índice de compressibilidade (25%). Além disso, foi classificado como de fácil escoamento, baixo teor de umidade (5,8%) e valor médio do pH de 6,01. A presença das bandas no FTIR sugeriu a presença de grupos funcionais como amins, álcoois, ésteres, cetonas, ácidos carboxílicos indicando uma variedade de metabólitos secundários, tais como flavonoides, alcaloides, esteroides, lignoides e polifenóis. A análise do TGA da DV mostrou a ocorrência de três etapas de perda de massa e a análise da DTA mostrou três picos endotérmicos. O teste de toxicidade revelou um valor da CL₅₀ de baixa toxicidade. Através das técnicas cromatográficas, foi possível o isolamento de seis substâncias, sendo a IAN e EPI-IAN os compostos majoritários e os marcadores da *O. duckei*. O Extrato Etanólico Bruto (EEB) e os padrões (IAN e EPI-IAN) obtidos foram utilizados na validação do método analítico de acordo com os critérios da Conferência Internacional de Harmonização (ICH) e RDC 166, mostrando-se ser seletivo para os dois epímeros, linear na faixa de concentração de 5-25 µg/mL, preciso (CV ≤ 11%), exato (80-100%) e robusto, no qual a presente metodologia analítica pode ser aplicada no controle de qualidade de matérias-primas e produtos à base do EEB de *O. duckei*. Quanto ao

planejamento da extração, as análises dos extratos por HPLC apresentaram concentrações crescente dos dois marcadores com aumento da proporção droga/solvente (v/m) e da proporção Etanol/água (v:v). O sistema contendo 96% de etanol e 30% da DV apresentou a melhor concentração de IAN e EPI-IAN equivalente a 61,39 e 124,24 µg/mL, respectivamente. O Resíduo Seco (RS) apresentou resultado médio de 2,85%. Foram obtidos nove ES por rotaevaporação. De acordo com as características físico-químicas, os ES obtidos apresentaram propriedades de fluxo e compressibilidade insatisfatórias. Quanto ao ângulo de repouso foram classificados como bom e justo. O estudo de caracterização térmica com o ES mostrou perfis semelhantes quanto a alteração da razão, no qual a análise do TG mostrou a ocorrência de quatro etapas de perda de massa e a análise da DTA mostrou três picos exotérmicos. A cinética de degradação térmica foi determinada pelo método de Ozawa, apresentando ordem de degradação igual a um. O melhor ES foi classificado como fino e com baixa higroscopicidade. A caracterização analítica da DV e obtenção do ES por estudos tecnológicos são úteis no desenvolvimento de novos medicamentos, de forma que os resultados obtidos neste estudo poderão ser usados na transposição de escala e controle de qualidade de produtos originários das partes aéreas de *O. duckei*.

Palavras- chaves: *Ocotea*; Lauraceae; Validação; Extrato secos

ABSTRACT

PEIXOTO, Laisla Rangel, Federal University of Paraiba, August 2023. Technological studies for standardization of dry extract of *Ocotea Duckei* Vattimo (LAURACEAE). Advisor: José Maria Barbosa Filho.

Ocotea duckei Vattimo, popularly known as “Louro-de-cheiro”, “Louro-pimenta” and “Louro-canela” is a member of the Lauraceae family found in Northeastern Brazil. Popularly, it is used in the treatment of neuralgia, dyspepsia, anorexia and pain. With regard to its constituents, it presents the lignoids Yangambina (YAN) and EPI-Yangambina (EPI-YAN) as the main plant markers. Aiming to contribute to the advancement of the pharmacological potential of Brazilian plant species, the present work aimed to develop analytical methodologies and technological processes to obtain standardized dry extracts (DE) of *O. duckei*. After collection, the aerial parts of the botanical material underwent a drying and crushing process to obtain the plant drug (PD). With this, its physical-chemical characterization was carried out, being carried out the granulometry tests, determination of the density, moisture content, determination of the hydrogenionic potential (pH), spectroscopy in the infrared region with Fourier transform (FTIR), analysis thermogravimetry (TGA) and differential thermal analysis (DTA). A liquid-liquid extractive process was carried out to obtain extracts and phases and chromatographic techniques were performed to obtain the major substances and other chemical compounds. In addition, through the chloroform and hexane phase, the toxicity test for *Artemia salina* of *O. duckei* was performed. For the development of analytical methods for quantification of markers, sample and standard preparation, HPLC and evaluation of selectivity parameters, linearity, limits of detection and quantification, precision, matrix effect, accuracy and robustness followed. To carry out the technological studies, obtaining the dry extract (DE) was carried out through planning for extraction by maceration, comparing the gradient ratio of the EtOH solvent at 30, 50, 70 and 96% and the drug/solvent ratio at 10, 20 and 30% and a 3² factorial design for drying by rotary evaporation, in which cellulose and aerosil were used as drying aids. The DE obtained were characterized by density test, angle of repose, granulometry, TG and DTA. The best DE obtained was used to develop a solid pharmaceutical formulation (capsule). The DV was classified as a coarse powder, had acceptable flow properties, as confirmed by the compressibility index (25%). In addition, it was classified as easy drainage, low moisture content (5.8%) and average pH value of 6.01. The presence of bands in the FTIR suggested the presence of functional groups such as amines, alcohols, esters, ketones, carboxylic acids and indicates a variety of secondary metabolites such as flavonoids, alkaloids, steroids, lignoids and polyphenols. The TG analysis of the PD showed the occurrence of three stages of mass loss and the DTA analysis showed three endothermic peaks. Toxicity testing revealed a low toxicity LC₅₀ value. Through chromatographic techniques, it was possible to isolate six substances, with YAN and EPI-YAN being the major compounds and markers of *O. duckei*. The Crude Ethanol Extract (CEE) and the standards (YAN and EPI-YAN) obtained were used in the

validation of the analytical method according to the criteria of the International Conference on Harmonization (ICH) and RDC 166, proving to be selective for both epimers, linear in the concentration range of 5-25 µg/mL, precise (CV ≤ 11%), exact (80-100%) and robust, in which the present analytical methodology can be applied in the quality control of raw materials and BSE-based products from *O. duckei*. As for the extraction planning, the analyzes of the extracts by HPLC showed increasing concentrations of the two markers with an increase in the drug/solvent ratio (v/m) and the Ethanol/water ratio (v:v). The system containing 96% ethanol and 30% PD showed the best concentration of IAN and EPI-IAN equivalent to 61.39 and 124.24 µg/mL, respectively. The Dry Waste (DW) presented an average result of 2.85%. Nine DE were obtained by rotary evaporation. According to the physical-chemical characteristics, the DE obtained showed unsatisfactory flow and compressibility properties. As for the angle of repose, they were classified as good and fair. The thermal characterization study with DE showed similar profiles regarding the change in ratio, where the TG analysis showed the occurrence of four stages of mass loss and the DTA analysis showed three exothermic peaks. The thermal degradation kinetics was determined by the Ozawa method, presenting degradation order equal to one. The best ES being classified as thin and with low hygroscopicity. Analytical characterization of PD and obtaining DE through technological studies are useful in the development of new drugs, so that the results obtained in this study can be used in scale transposition and quality control of products originating from the aerial parts of *O. duckei*.

Keywords: *Ocotea*; Lauraceae; Validation; dry extract.

LISTA DE FIGURA

Figura 1	<i>Ocotea duckei</i> Vattimo-Gil.....	09
Figura 2	Mapa de registros de ocorrência da espécie <i>O. duckei</i>	10
Figura 3	Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier da droga vegetal de <i>O. duckei</i>	41
Figura 4	Curva Termogravimétrica (TG) e Curva Térmica diferencial (DTA) da droga vegetal de <i>O. duckei</i>	43
Figura 5	Iangambina (IAN) e Epi-iangambina (Epi-IAN)	44
Figura 6	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) - OD-1	45
Figura 7	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) na região de 4,50 – 6,60 ppm – OD-1.....	46
Figura 8	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) na região de 3,50 – 4,50 ppm – OD-1.....	46
Figura 9	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) na região de 1,0 – 3,40 ppm - OD- 1.....	47
Figura 10	Espectro de RMN ¹³ C APT (100 MHz, CDCl ₃) – OD-1.....	48
Figura 11	Epicatequina (OD-2).....	50
Figura 12	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância OD-2.....	51
Figura 13	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de OD-2 na região de 5,85 – 7,00 ppm.....	52
Figura 14	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de OD-2 na região de 3,70 – 4,65 ppm.....	52
Figura 15	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de OD-2 na região de 1,80 – 3,00 ppm.....	53
Figura 16	Espectro de RMN ¹³ C APT (100 MHz, CDCl ₃) de OD-2.....	54
Figura 17	Ocoteaduckeina A (OD-3).....	56
Figura 18	Ocoteaduckeina B (OD-4).....	58
Figura 19	N-metilcoclaurina (OD-5).....	60
Figura 20	Chromatograms of Standard (YAN) on Gemini NX 5U C18 110A Column in Methanol: 1% Formic Acid (70:30) (a); Acetonitrile: Water (50:50) (b); Acetonitrile: Water and Phosphoric Acid (50:50) (c). Standard chromatogram (YAN) on C18 NST 18	66

	column in Acetonitrile: Water (50:50) flow rate 1.25 mL/min (d); Acetonitrile: Water (45:55) flow rate 0.8 ml/min (e); Chromatograms of CEE sample on C18 NST 18 column in Acetonitrile: Water (45:55) flow 0.8 mL/min (f)	
Figura 21	Espectro de UV do padrão IAN de 15 µg/ml (a); padrão EPI-IAN de 15 µg/ml (b); marcador IAN (c) e EPI-IAN (d) presente na amostra de EEB de 20 µg/ml em coluna C18 NST 18 em ACN: Água (45:55) fluxo de 0,8 L/min	67
Figura 22	Extratos secos obtidos pela secagem com adjuntos tecnológicos.	79
Figura 23	Curvas TG do ES-8 da <i>O. duckei</i> em atmosferas de nitrogênio e β de 5,10,15 e 20 °C.min ⁻¹	84
Figura 24	Curvas DTA do ES-8 da <i>O. duckei</i> em atmosferas de nitrogênio e β de 10 °C.min ⁻¹	86
Figura 25	Curvas TG e DTA do ES-8 da <i>O. duckei</i> em atmosferas de nitrogênio e β de 10 °C.min ⁻¹	87

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1	Obtenção e particionamento do EEB de <i>Ocotea duckei</i>	24
Esquema 2	Marcha de Lignoides e Alcaloides de <i>Ocotea duckei</i>	25

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Metabólitos secundários do gênero <i>Ocotea</i>	06
Quadro 2	Lignoides isolados de <i>Ocotea duckei</i>	11
Quadro 3	Alcaloides isolados de <i>Ocotea duckei</i>	13

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Concentração letal média (CL ₅₀) da fase hexânica de <i>O. duckei</i>	61
Gráfico 2	Concentração letal média (CL ₅₀) da fase clorofórmica de <i>O. duckei</i>	61
Gráfico 3	Regressão linear das curvas de calibração (5,0 – 25,0 µg/mL) para IAN.....	70
Gráfico 4	Regressão linear das curvas de calibração (5,0 – 25,0 µg/mL) para EPI-IAN.....	70
Gráfico 5	Regressão linear das curvas de calibração para EEB fortificada - IAN.....	71
Gráfico 6	Regressão linear das curvas de calibração para EEB fortificada – EPI- IAN	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Método utilizado na cromatografia sob média pressão da fase clorofórmica de <i>O. duckei</i>	26
Tabela 2	Extratos obtidos por maceração da droga vegetal da <i>O. duckei</i> em relação a proporção do solvente e a proporção droga/solvente	33
Tabela 3	Níveis do desenho experimental para o estudo de método de secagem.....	35
Tabela 4	Matriz do planejamento fatorial 3 ² para secagem por rotoevaporação.....	35
Tabela 5	Percentual de massa da droga vegetal de <i>O. duckei</i> , retida em diferentes tamanhos de malhas.....	38
Tabela 6	Parâmetros obtidos no ensaio de propriedades de fluxo da droga vegetal de <i>O. duckei</i>	39
Tabela 7	Classificação do tipo de fluxo de um pó (USP 35, 2012b)	39
Tabela 8	Teor de umidade da droga vegetal de <i>O. duckei</i>	40
Tabela 9	Dados da curva termogravimétrica da droga vegetal de <i>O. duckei</i> .	43
Tabela 10	Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de OD - 1 (lamgambia e Epi-langambina)	44
Tabela 11	Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C (400 e 100 MHz, MeOD) de OD-2 (Epicatequina) em comparação aos dados obtidos por TELES, 2016, nas mesmas condições.....	50
Tabela 12	Dados espectrais de ¹ H e ¹³ C, em CDCl ₃ a 500 e 125 MHz da OD-3. Deslocamentos químicos em δ (δ_C e δ_H e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz.....	56
Tabela 13	Dados espectrais de ¹ H e ¹³ C, em CDCl ₃ a 500 e 125 MHz da OD-4. Deslocamentos químicos em δ (δ_C e δ_H e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz.....	58
Tabela 14	Dados de RMN ¹ H (200 MHz) e ¹³ C (50 MHz) de N-metilcoclorina e coclorina, em CDCl ₃ e C ₅ D ₅ N como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos em δ e constantes de acoplamento (J , entre parênteses)	60

Tabela 15	Adequabilidade da IAN e EPI-IAN de 15 µg/ml e dos marcadores presente na amostra de EEB de 20 µg/ml em coluna C18 NST 18 em Acetonitrila/ Água (45:55) fluxo de 0,8 mL/min.....	68
Tabela 16	Resultados da curva de calibração da IAN e EPI – IAN.....	70
Tabela 17	Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes – IAN.....	72
Tabela 18	Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes – EPI-IAN.....	73
Tabela 19	Dados da Precisão e Exatidão da IAN e EPI-IAN.....	74
Tabela 20	Dados da Robustez da IAN.....	75
Tabela 21	Análise das concentrações dos marcadores através da proporção droga/solvente e proporção etanol: água (v: v)	76
Tabela 22	Valores de resíduo seco para o extrato 30% DV-96% EtOH de <i>O. duckei</i>	77
Tabela 23	Quantidade de adjuntos de secagem quanto ao resíduo seco.....	78
Tabela 24	Características organolépticas das soluções extrativas de <i>O. duckei</i> com adjuvantes	79
Tabela 25	Densidade aparente e compactada dos extratos secos da <i>O. duckei</i>	81
Tabela 26	Dados de ângulo de repouso obtidos para os pós de extratos secos por rotaevaporação	82
Tabela 27	Análise da granulometria do ES-8.....	83
Tabela 28	Dados termogravimétricos do ES-8 da <i>O. duckei</i> em atmosferas de nitrogênio e β de 5,10,15 e 20 °C.min ⁻¹	84

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AcOEt	Acetato de etila
AM	Método alterado
APT	“Attached Proton Test”
AR	Ângulo de repouso
CC	Cromatografia em Coluna
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CLAE	Cromatografica de alta eficiência
CL ₅₀	Concentração Letal cinqüenta
d	Dupleto
DA	Densidade aparente
DC	Densidade compactada
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
dddd	Duplo duplo duplo dupleto
da	Densidade aparente
dc	Densidade compactada
DTA	Análise Térmica Diferencial
DV	Droga vegetal
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EC	Concentração experimental
EPI-IAN	Epl-langambina
ES	Extrato seco
EtOH	Etanol

FAT	Fração de alcaloides totais
FLT	Fração de lignoides totais
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
IAN	langambina
IC	Índice de compressibilidade
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
m	Multiplete
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MR	Massa de retenção
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
q	Quadruplete
R	Recuperação
RS	Resíduo seco
Rfs	Fatores de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto

sl	Simpleto largo
t	Tripleto
TC	Concentração teórica
tl	Tripleto largo
TGA	Análise Termogravimétrica
UM	Método inalterado
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	03
2.1 Plantas medicinais.....	03
2.2 Família Lauraceae.....	04
2.3 Gênero <i>Ocotea</i>	05
2.4 Espécie <i>Ocotea duckie</i> Vattimo.....	09
2.5 Compostos majoritários na <i>Ocotea duckei</i>	15
2.6 Aspectos envolvidos na padronização de extratos vegetais.....	16
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4 METODOLOGIA	20
4.1 Coleta do material botânico.....	20
4.2 Obtenção da Droga Vegetal (DV).....	20
4.3 Caracterização físico-química da DV.....	20
4.3.1 Granulometria.....	20
4.3.2 Determinação de densidade.....	21
4.3.3 Teor de umidade.....	21
4.3.4 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH) da droga vegetal.....	22
4.3.5 Espectroscopia na região de infravermelho com transformada de fourier (FTIR) da droga vegetal.....	22
4.3.6 Análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA)..	22
4.4 Obtenção dos compostos químicos.....	22
4.4.1 Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB).....	22
4.4.2 Particionamento do EEB.....	23
4.4.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>O. duckei</i>	26
4.4.3.1 Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>O. duckei</i>	26
4.4.3.2 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de <i>O. duckei</i> ...	27
4.4.3.3 Fracionamento cromatográfico da FLT de <i>O. duckei</i>	27
4.4.4 Análise e identificação estrutural.....	27
4.5 Bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach.....	28

4.6	Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação dos marcadores	29
4.6.1	Preparação de amostra e padrão.....	29
4.6.2	A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	30
4.6.3	Método de validação.....	30
4.6.3.1	Seletividade.....	30
4.6.3.2	Adequabilidade.....	31
4.6.3.3	Linearidade, LOD e LOQ.....	31
4.6.3.4	Efeito matriz.....	31
4.6.3.5	Precisão e Exatidão.....	32
4.6.3.6	Robustez.....	32
4.7	Estudos tecnológicos para desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas.....	33
4.7.1	Obtenção do Extrato Seco (ES).....	33
4.7.1.1	Obtenção do Resíduo Seco (RS).....	34
4.7.1.2	Secagem com adjuvantes tecnológicos.....	34
4.7.2	Caracterização dos ES obtidos.....	35
4.7.2.1	Determinação das densidades.....	35
4.7.2.2	Determinação do ângulo de repouso.....	36
4.7.2.3	Determinação da granulometria.....	36
4.7.2.4	Determinação da higroscopicidade.....	36
4.7.3	Caracterização térmica.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	Caracterização físico-química da droga vegetal (DV).....	38
5.1.1	Distribuição granulométrica da droga vegetal.....	38
5.1.2	Densidade da droga vegetal.....	39
5.1.3	Teor de umidade da droga vegetal.....	40
5.1.4	pH da droga vegetal.....	40
5.1.5	FTIR da droga vegetal.....	41
5.1.6	TGA e DTA da droga vegetal.....	42
5.2	Identificação estrutural dos compostos de <i>O. duckei</i>	43
5.2.1	Identificação estrutural de OD-1.....	43

5.2.2	Identificação estrutural de OD-2.....	49
5.2.3	Identificação estrutural de OD-3, OD-4 e OD-5.....	55
5.3	Bioensaio com Artemia salina Leach.....	61
5.4	Validação do método analítico.....	63
5.4.1	Seletividade.....	67
5.4.2	Adequabilidade.....	68
5.4.3	Linearidade, LOD e LOQ.....	68
5.4.4	Efeito matriz.....	71
5.4.5	Precisão e Exatidão.....	73
5.4.6	Robustez.....	74
5.5	Estudos tecnológicos para desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas.....	76
5.5.1	Obtenção do Extrato Seco (RS).....	76
5.5.1.1	Obtenção do Resíduo Seco (RS).....	77
5.5.1.2	Secagem com adjuvantes tecnológicos.....	78
5.5.2	Caracterização dos ES obtidos.....	79
5.5.2.1	Determinação das densidades.....	80
5.5.2.2	Determinação do ângulo de repouso.....	81
5.5.2.3	Determinação da granulometria.....	82
5.5.2.4	Determinação da higroscopicidade.....	83
5.5.3	Caracterização térmica.....	83
6	CONCLUSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, as plantas são utilizadas como fonte de medicamentos para o tratamento das enfermidades que acometem o homem, de modo a aumentar suas chances de sobrevivência através da melhoria da saúde (Lopes et al., 2015). A utilização de espécies vegetais com finalidade terapêutica para se prevenir, atenuar ou curar um estado patológico, é uma das mais antigas práticas aplicadas para fins medicinais (Rossato et al., 2012).

A riqueza da diversidade vegetal brasileira contribuiu para que a utilização das plantas medicinais seja considerada uma área estratégica para o país, que contém cerca de 23% das espécies vegetais existentes em todo o planeta. Pesquisas demonstram que, no Brasil, mais de 90% da população já fez uso de alguma planta medicinal (Magalhães, 2018).

A família Lauraceae é constituída por cerca de 50 gêneros e 3000 espécies, sendo caracterizada quimicamente pela presença de alcaloides, principalmente isoquinolínicos, aporfínicos e indólicos (Barbosa-Filho; Yoshida; Gottlieb, 1989); lignanas e neolignanas (Gottlieb; Yoshida, 1989) e óleos essenciais, formados em geral por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilprapanoides (Pino et al., 2005).

O gênero *Ocotea*, membro da família Lauraceae, possui aproximadamente 350 espécies que são utilizadas na medicina popular para o tratamento de infecções, picada de cobra, úlceras (*Ocotea caparrapi*), dor de cabeça (*Ocotea bullata*), febre, tosse (*Ocotea* species), cólicas menstruais (*Ocotea nicaraguensis*), diarreia (*Ocotea quixos*), dentre outras (Teles, 2014).

Ocotea duckei Vattimo é nativa da Mata Atlântica do Nordeste brasileiro e foi encontrada nos estados da Paraíba, Pernambuco, Ceará, Sergipe e Bahia e em áreas remanescentes da Floresta Atlântica (Santos, 2012). *Ocotea duckei* é popularmente conhecida como "louro-de-cheiro" e "louro-canela", sendo utilizada no tratamento de neuralgia, dispepsia, anorexia e dor (Villamizar, 2010).

Para validação de plantas potencialmente terapêuticas são necessárias investigações para estudar desde a relação medicina tradicional e popular; isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos; observação da estrutura/atividade e investigação farmacológica de extratos e/ou seus constituintes químicos isolados, até a operação de formulações para a produção de fitoterápicos (Magalhães, 2019).

A realização de estudos de estabilidade de produtos à base de plantas mostra-se como um desafio, uma vez que apresentam uma mistura complexa de componentes ativos com diferentes características físico-químicas. No entanto, são de fundamental importância para assegurar a qualidade, segurança e eficácia do produto final, uma vez que durante o processo de extração do material vegetal e de fabricação do medicamento fitoterápico, os componentes ativos podem sofrer alterações físicas e químicas, provenientes de fatores tais como: temperatura, luz, ar e umidade, tamanho de partícula, pH, natureza do recipiente de armazenamento, dentre outros, que podem influenciar na estabilidade (Sachan; Kumar, 2015).

Estudos do ponto de vista fitoquímico e farmacológico com esta espécie começaram no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), no início da década de 90, sob a coordenação do Prof. José Maria Barbosa Filho. Para essa espécie são relatadas várias lignanas, como iangambina, epiiangambina, sesartemina, episesartemina, siringaresinol, 4'-O-demetilepimagnolin A e (+)-4''-O-demetilepimagnolin A (Morais et al., 1996; Morais et al., 1998a). Nesses estudos, foram isolados três alcaloides benzilisoquinolínicos, sendo eles a reticulina (Morais et al., 1998b), coclaurina (Silva et al., 2002) e N-acetilnorjuzifina (Dias et al., 2003) e um alcaloide aporfínico descrito como laureliptina (Dias et al., 2003).

Diante desses achados, a realização deste trabalho justifica-se pela possibilidade da espécie *O. duckei* apresentar moléculas biotivas, demonstrando um grande potencial farmacológico. Além disso, poucos trabalhos relatam os processos tecnológicos para a padronização do extrato seco de *O. duckei*. Portanto, torna-se relevante investigar com maior clareza esses aspectos e realizar estudos para o desenvolvimento de medicamentos seguros e mais eficazes.

Com base nas informações apresentadas, o presente estudo objetivou o desenvolvimento de metodologias analíticas e processos tecnológicos para a obtenção de extratos secos padronizados a partir das partes aéreas de *O. duckei*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais são corriqueiramente utilizadas por diferentes culturas, visando o combate e controle de doenças e enfermidades. O uso das plantas na medicina provém desde os tempos das primeiras civilizações e, nos últimos anos, se apresenta como um importante campo científico, com vistas a contribuir com o processo de socialização dos diversos saberes presentes no meio sociocultural. Sabe-se que as plantas medicinais vêm ganhando espaço no meio acadêmico, seja por suas características terapêuticas, ou por sua influência nos saberes locais/sociais (Zonner et al., 2022).

As organizações públicas governamentais têm demonstrado interesse e reunido esforços para o estudo e desenvolvimento desse tema, uma vez que apresentam grande magnitude e possibilidade crescente de utilização desses recursos na prática terapêutica. (Macedo, 2016).

A partir de produtos naturais, são isoladas moléculas que servem como protótipos para o delineamento e planejamento de novos fármacos, assim como para a investigação de novas ações terapêuticas (Soares et al., 2021). Além disso, as plantas medicinais, como fontes de moléculas promissoras para o desenvolvimento de medicamentos, possuem menor custo quando comparado às pesquisas com moléculas sintéticas (Pedroso; Andrade; Pires, 2021).

A busca pelos medicamentos fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) está em constante crescimento (Saraiva, et. al., 2015), indicando que este aumento requer dos pesquisadores um maior empenho, no sentido de fornecer informações que visam comprovar a autenticidade das informações populares e incorporar compostos de origem vegetal ao arsenal terapêutico (Ekor, 2014).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) informa que algumas plantas medicinais já passaram por todas as etapas de pesquisa consideradas suficientes para comprovação de sua eficácia, permitindo que façam parte do arsenal medicamentoso do profissional de saúde (Silva, 2020).

2.2 Família Lauraceae

A família Lauraceae possui 52 gêneros e cerca de 3000 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (Alves et al., 2002). Entre estas, 346 podem ser encontradas na Amazônia brasileira, classificando a Lauraceae como a quinta família de maior ocorrência no bioma amazônico (Ter Steege et al., 2016) e como a quarta família com maior número de espécies (Beech et al., 2017).

No Brasil, existem 22 gêneros desta família, dos quais os mais expressivos são *Ocotea* e de *Nectandra*, conhecidas popularmente como canelas, loureiros ou embuias (Flores, 2022).

Na medicina popular, o uso de plantas aromáticas da família Lauraceae é bastante difundido, sendo empregadas no tratamento de infecções microbianas, inflamações, dores, eczemas, na regulação da fertilidade e envenenamento por picada de cobra (Lima, 2019).

Esta família apresenta grande importância científica e econômica, visto que, devido sua ancestralidade, geodistribuição, biodiversidade e quimiodiversidade, seus espécimes podem ser utilizados tanto no estudo do processo de evolução botânica como na confecção de diferentes bioprodutos para a indústria farmacêutica e alimentícia (Salleh; Ahmad, 2017). Entretanto, devido à exploração econômica e diversidade das espécies, observa-se grande número de espécies ameaçadas de extinção (Custódio et al., 2014).

Espécies da família Lauraceae apresentam vários grupos de metabólitos secundários, sendo, em sua maioria, compostos aromáticos que possuem relevância significativa para classificação quimiotaxonômica (Silva, 2018). Estudos apontam para a presença de neolignanas e lignanas, alcaloides aporfínicos e benzilisoquinolínicos, flavonoides, sesquiterpenos e pironas (Barbosa Filho et al., 1999; Giang et al., 2006; Garcez et al., 2005; Garcez et al., 1995; Garcez et al., 2011; Gottlieb & Yoshida, 1978).

Muitos desses compostos isolados são importantes por apresentarem atividades biológicas, entre as quais se destacam as atividades antioxidante e antimicrobiana (Souza et al. 2004, Antunes et al. 2006, Silveira et al. 2011, Yamaguchi et al. 2012). Algumas espécies merecem destaque por serem ricas em óleos essenciais que também apresentam propriedades biológicas variadas (Diaz et al., 1980; Bruni et al., 20004; Alcântara et al., 2010a; Alcântara et al., 2010b).

2.3 Gênero *Ocotea*

O maior gênero da família Lauraceae é *Ocotea*, com 428 espécies distribuídas na América tropical e subtropical, desde o México até a Argentina, sendo um dos principais representantes da família na Floresta Atlântica (Santos; Alves, 2012). O gênero está presente em todo o território nacional, possuindo 172 espécies registradas, das quais 49 estão no estado de São Paulo (Quinet et al., 2015).

Sua utilização pela indústria farmacêutica também é extensa, apresentando espécies com atividades biológicas promissoras para a confecção de fármacos, como por exemplo, atividade citotóxica, antioxidante, anti-inflamatória, antibactericida, antifúngica, anti-leshmaniose, anti-larvicida, antiplasmódica e antimalárica (Salleh; Ahmad, 2017).

Dentre as atividades farmacológicas descritas em algumas espécies do gênero *Ocotea*, destacam-se a antimalárica (Ballabeni et al., 2010); antibacteriana e antifúngica (Castro; Lima, 2011); relaxante muscular (Araújo, 2014); antioxidante (Ogundajoet et al., 2018) e antiinflamatória (Santos et al., 2019).

Este gênero mostra-se muito promissor pela presença de metabólitos que justificam as suas propriedades medicinais (Quadro 1). O fenilpropanoide mais comum no gênero é o safrol, constituinte principal do óleo de sassafrás obtido de *O. odorifera*, *O. pretiosa* e *O. fragrantissima* (Costa, 2000). Além disso, destacam-se as lignanas furofurânicas isoladas de *O. duckei* (Barbosa-Filho et al., 1999). Os terpenoides ocorrem com frequência no gênero, e na maioria das vezes, são constituintes típicos de óleo essencial. Também foram encontrados em extratos de folhas e cascas de espécies de *Ocotea* outros sesquiterpenos, principalmente com esqueletos eudesmânicos, calamenênicos e cadinânicos (Lordello et al., 2000).

A maioria dos flavonoides isolados até o momento em *Ocotea* são derivados das agliconas quercetina e de dihidroquercetina, sendo uma característica que parece ser comum para o gênero (Funazaki, 2006).

Os alcaloides constituem um grupo de substâncias bastante frequente em suas espécies, sendo os aporfínicos *strictu sensu* o grupo predominante (Zanin; Lordello, 2007). Além disso, foram identificados alcaloides isoquinolínicos, benzilisoquinolínicos, bisbenzilisoquinolínicos (Custódio; Veigas Junior, 2014).

Quadro 1. Metabólitos secundários do gênero *Ocotea*.

Espécies	Classe de metabólitos	Referências
<i>O. aciphylla</i>	Fenilpropanoides e Neolignanas	Felício et al., 1986. Romoff et al., 1984.
<i>O. acutangula</i>	Neolignanas	Vecchietti et al., 1981.
<i>O. atirrensis</i>	Alcaloides	Lopez et al., 1995a.
<i>O. brachybotra</i>	Alcaloides	Vecchietti et al., 1976. Vecchietti et al., 1977.
<i>O. brenesii</i>	Alcaloides	Lopez et al., 1996.
<i>O. bucherri</i>	Alcaloides	Roensch et al., 1983.
<i>O. bullata</i>	Neolignanas	Sehlapelo et al., 1993. Drewes et al., 1995. Zschocke et al., 2000.
<i>O. caesia</i>	Alcaloides	Vilegas et al., 1989.
<i>O. caniculata</i>	Fenilpropanoides	de Diaz et al., 1977.
<i>O. caparrapi</i>	Fenilpropanoides, Neolignanas, Alcaloides e Derivados do C ₆ -C ₁	Cuca Suarez, 1980. de Diaz e Diaz D, 1991.
<i>O. catharinensis</i>	Neolignanas	Haraguchi et al., 1983. Ishige et al., 1991. Lordello, 1996. Lordello et al., 1997.
<i>O. costulatum</i>	Neolignanas	da Silva et al., 1989.
<i>O. cymbarum</i>	Fenilpropanóides, Lignanas e Neolignanas	Andrei et al., 1988. de Diaz et al., 1980.

<i>O. duckei</i>	Lignanas e Alcaloides	Morais et al., 1996. Morais et al., 1998. Barbosa-Filho et al., 1999. da Silva et al., 2002.
<i>O. foetens</i>	Fenilpropanóides, Lignanas e Flavonoides	Kijjoa et al., 1994. Pino et al., 2004. Lopez et al., 1995B.
<i>O. fragrantissima</i>	Fenilpropanóides	Gottlieb, 1957.
<i>O. glaziovii</i>	Alcaloides	Gilbert, 1964. Casagrande e Ferrari, 1975.
<i>O. gomezii</i> <i>O. guianensis</i>	Fenilpropanóides e Alcaloides	Lopez et al., 1995a. de Diaz et al., 1977.
<i>O. holdridgeiana</i>	Alcaloides e Flavonoides	Castro e Ruiz, 1994. Vargas et al., 1996.
<i>O. insularis</i>	Alcaloides	Hasbun e Castro, 1993.
<i>O. leucoxylon</i>	Alcaloides	Goodwin et al., 1960. Ahmad e Cava, 1977. Zhou et al., 2000.
<i>O. macrophylla</i>	Alcaloides	Franca et al., 1975.
<i>O. macropoda</i>	Alcaloides	Cava et al., 1968. Cava e Venkateswarlu, 1971.
<i>O. meziana</i>	Alcaloides	Lopez et al., 1995a.
<i>O. minarum</i>	Fenilpropanóides, Lignanas, Alcaloides e Flavonoides	Garcez et al., 2005. Vecchietti et al., 1979.
<i>O. neesiana</i>	Fenilpropanóides	de Diaz et al., 1977.

<i>O. odorifera</i>	Fenilpropanóides	Lordello et al., 2000.
<i>O. opifera</i>	Fenilpropanóides	de Diaz et al., 1977.
<i>O. pichurim</i>	Alcaloides	Ferrari et al., 1971.
<i>O. porosa</i>	Neolignanas e Alcaloides	Aiba et al., 1976. Dias et.al., 1986. de Carvalho et al., 1988. Marques et al., 1992. David et al., 1994.
<i>O. pretiosa</i>	Fenilpropanóides e Derivados do C ₆ -C ₁	Mors et al., 1959. Mollan, 1961. Maia et al., 1987. Gottlieb e Magalhães, 1958.
<i>O. puberula</i>	Alcaloides	Jacobucci, 1954. Baralle et al., 1972. Baralle et al., 1973.
<i>O. pulchella</i>	Alcaloides	Botega et al., 1993.
<i>O. quixos</i>	Fenilpropanóides e Derivados do C ₆ -C ₁	Naranjo et al., 1981. Bruni et al., 2003.
<i>O. rodiaei</i>	Alcaloides	Grundon e McGarvey, 1960. Hearst, 1964.
<i>O. simulans</i>	Fenilpropanóides e Neolignanas	de Diaz, 1996.
<i>O. sp</i>	Fenilpropanóides	de Diaz et al., 1977.
<i>O. teleiandra</i>	Alcaloides e Derivados do C ₆ -C ₁	Naves et al., 1961. Vilegas e Gottlieb, 1992.
<i>O. usambarensis</i>	Lignanas	Carmalm, 1956.

<i>O. variabilis</i>	Alcaloides	Cava et al., 1972.
<i>O. vellosiana</i>	Alcaloides e Flavonoides	Garcez, 1995.
<i>O. venenosa</i>	Alcaloides	Kostermans et al., 1969.
<i>O. veraguensis</i>	Neolignananas	Crossley e Djerassi, 1962. Khan et al., 1987. Dodson et al., 1987.

2.4 Espécie *Ocotea duckei* Vattimo.

Ocotea duckei Vattimo, conhecida também como *Ocotea fasciculata* (Nees) Mez, é popularmente conhecida como “Louro-de-cheiro”, Louro-pimenta” e “Louro-canela”. Apresenta-se como uma árvore com 2 a 16 metros de altura com ramos cilíndricos lenticelados e acinzentados. Suas folhas são subopostas a verticiladas no ápice dos ramos, em geral arcuadas quando herborizadas e com face abaxial glabrescente a pubescente, coriáceas. Suas flores são monoclinas e seus frutos elipsóides, florescendo e frutificando ao longo de todo ano (Barreto, 1990) (Figura 1).

Figura 1. *Ocotea duckei* Vattimo-Gil

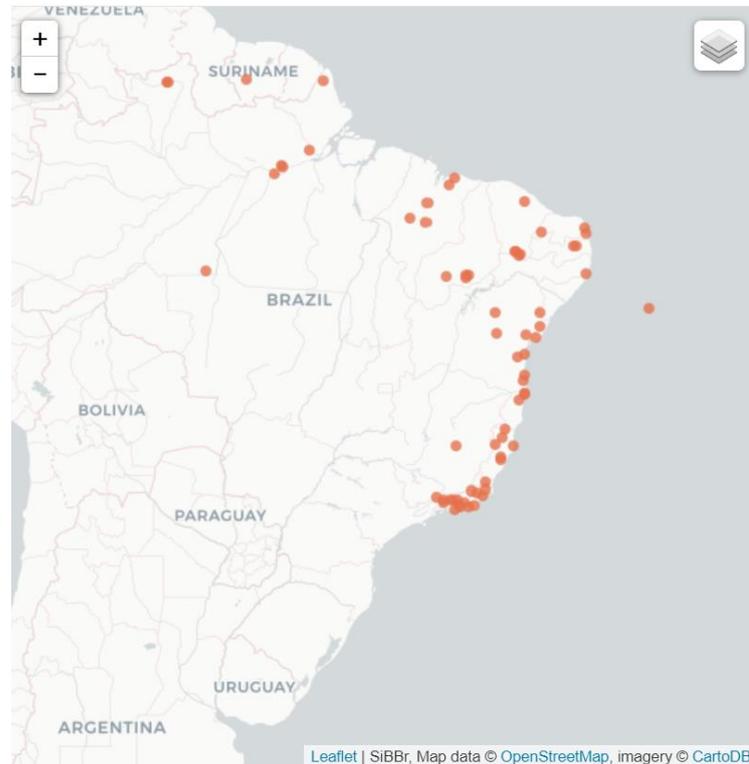


Fonte: Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17944>>. Acesso em: 17 de março de 2023.

Essa espécie é encontrada no Suriname, Guiana, Venezuela, Bolívia e no Brasil. No Nordeste brasileiro, ocorre em ambientes de restinga, florestas ombrófilas

e semidecíduais de terras baixas e submontana. Além disso, aparece na Caatinga nos estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e Sergipe (Santos, 2012) (Figura 2).

Figura 2. Mapa de registros de ocorrência da espécie *O. duckei*

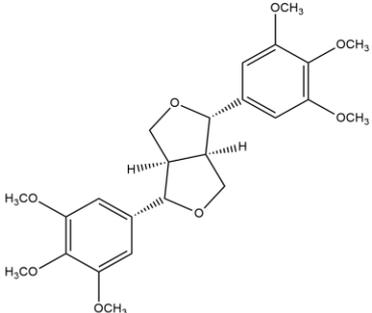
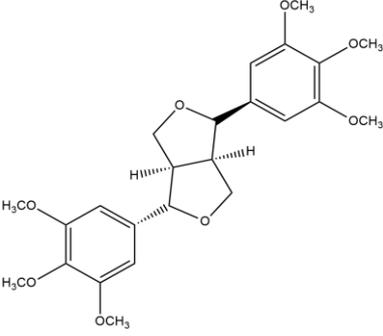
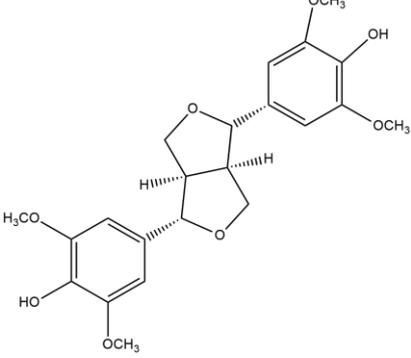
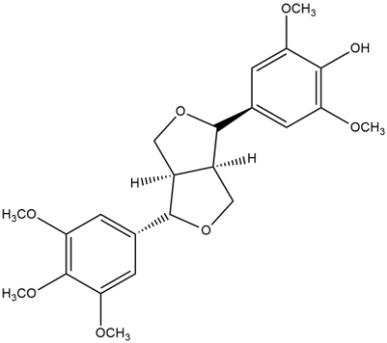


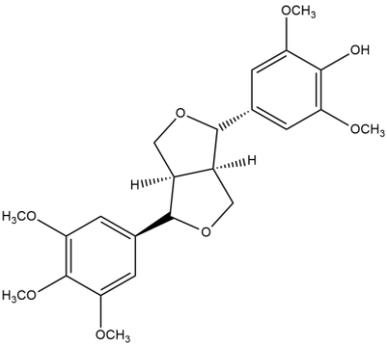
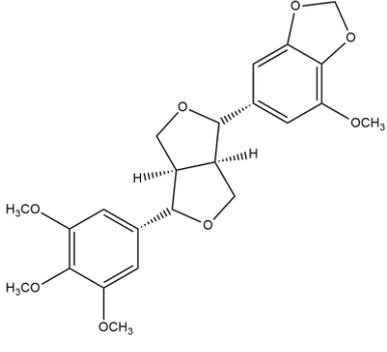
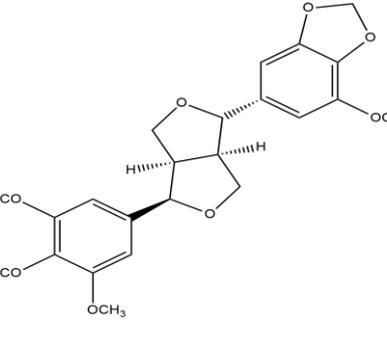
Fonte: Disponível em: < <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/290192>>. Acesso em: 17 de março de 2023.

A *O. duckei* é popularmente utilizada no tratamento de neuralgia, dispepsia, anorexia e dor (Villamizar, 2010). Estudos farmacológicos com a *O. duckei* demonstraram eficácia contra ácaros em método de fumigação, como também ação cardiovascular e antileishmanial (Moraes; Camara; Silva, 2017). Estudos realizados frente a ensaio antibacteriano demonstrou que o extrato etanólico bruto da *O. duckei* apresentou bioatividade para *S. aureus* (Antunes et al., 2006).

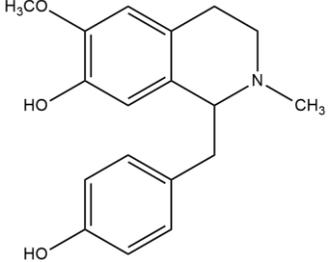
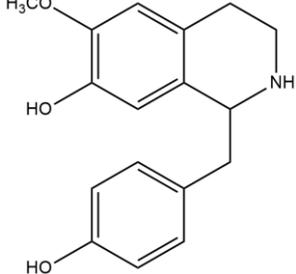
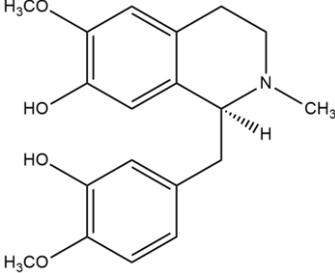
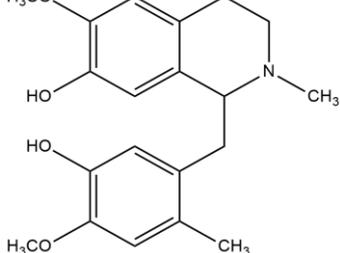
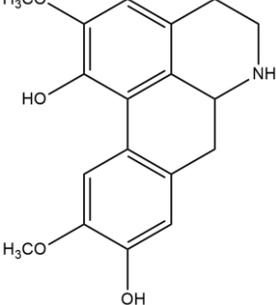
Para essa espécie, são relatadas várias lignanas como: iangambina, epiiangambina, sesartemina, episesartemina, siringaresinol, 4'- O-demetilepimagnolin A e (+) - 4''- O- demetilepimagnolin A (Morais et al., 1996; Morais et al., 1998a) (Quadro 2). Foram isolados três alcaloides benzilisoquinolínicos: reticulina (Morais et al., 1998b), coclaurina (Silva et al., 2002) e N-acetilnorjuzifina (Dias et al., 2003). Além disso, também foi isolado um alcaloide aporfínico, a laureliptina (Dias et al., 2003) (Quadro 3).

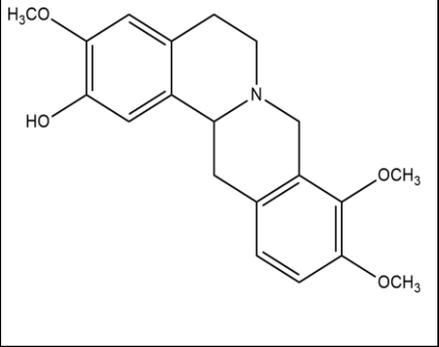
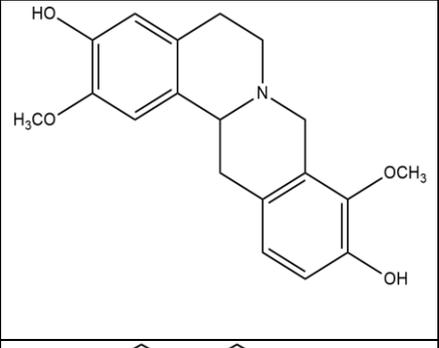
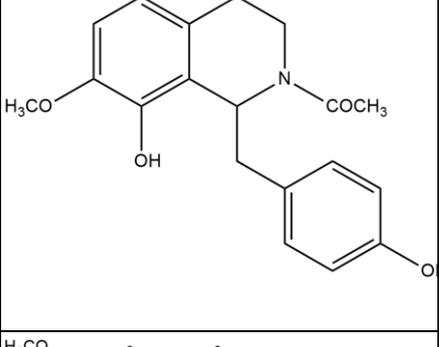
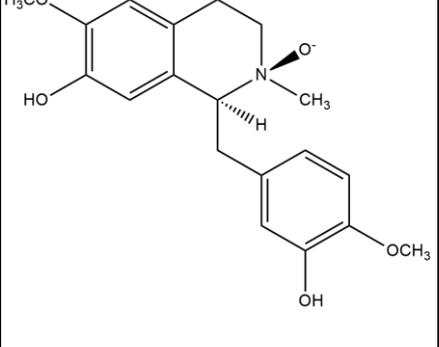
Quadro 2. Lignoides isolados de *Ocotea duckei*.

Estrutura	Nome	Classe
	langambina	Lignana Furofurânica
	Epi-langambina	Lignana Furofurânica
	Siringaresinol	Lignana Furofurânica
	(+)- 4''-O-dimetilepimagnolin A	Lignana Furofurânica

 <p>The structure shows a biphenyl lignan core. The left phenyl ring is substituted with three methoxy groups (H₃CO) at the 2, 3, and 4 positions. The right phenyl ring is substituted with a hydroxyl group (OH) and a methoxy group (OCH₃) at the 2 and 3 positions, respectively. The two rings are linked via a 4'-O-ether bridge. The central carbon atoms are shown with stereochemistry: a wedged bond to the left ring and a dashed bond to the right ring.</p>	<p>4'-O- Dimetilepiiangambina</p>	<p>Lignana Furofurânica</p>
 <p>The structure is similar to 4'-O-Dimetilepiiangambina, but the right phenyl ring is substituted with a methoxy group (OCH₃) at the 3 position and a furfuryl group at the 2 position. The furfuryl group consists of a furan ring fused to a five-membered ring containing an oxygen atom. The stereochemistry at the central carbon atoms is the same as in the first structure.</p>	<p>Sesartemina</p>	<p>Lignana Furofurânica</p>
 <p>The structure is similar to Sesartemina, but the furfuryl group on the right phenyl ring is attached at the 4 position instead of the 2 position. The stereochemistry at the central carbon atoms is the same as in the first structure.</p>	<p>Episesartemina</p>	<p>Lignana Furofurânica</p>

Quadro 3. Alcaloides isolados de *Ocotea duckei*

Estrutura	Nome	Classe
	Metilcocclaurina	Benzilisoquinolínico
	Cocclaurina	Benzilisoquinolínico
	Reticulina	Benzilisoquinolínico
	Metilreticulina	Benzilisoquinolínico
	Laureliptina	Aporfínico

	Tetrahydrocolumbamina	Tetrahidroprotoberberínicos
	Discretamina	Tetrahidroprotoberberínicos
	N-acetilmorjuzifina	Benzilisoquinolínico
	N-óxido de reticulina	Benzilisoquinolínico

A análise dos óleos essenciais extraídos de diversas partes de *O. duckei* mostrou que são formados por misturas complexas de monoterpenos e sesquiterpenos. O teor das folhas tem como componente majoritário, o trans-cariofileno. Os sesquiterpenos, α -humuleno e δ -selineno, também representaram um teor significativo. O fruto apresenta d-limoneno em concentrações elevadas. No caule, há predominância de β -eudesmol, enquanto na raiz o principal constituinte foi o elemol (Lacerda, 2004).

2.5 Compostos majoritários na *Ocotea duckei*

A iangambina (IAN) e seu epimêro epi- iangambina (EPI- IAN) são lignanas do tipo furofurânica, representando os maiores constituintes da *O. duckei* (Morais et al., 1999).

Os primeiros estudos realizados com a iangambina isolada da *O. duckei* foram relatados por Pachú et al. (1993), os quais sugeriram atividade depressora do sistema nervoso central, podendo atuar como anticonvulsivante e hipnótico-sedativo. Almeida e colaboradores (1995) avaliaram a ação analgésica, no qual a iangambina mostrou um efeito inibitório significativo do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético através de um teste que envolveu estímulo químico. A iangambina também apresentou atividade de inibidor seletivo do fator de agregação plaquetária (PAF) em choque anafilático (Castro-Faria-Neto et al., 1995; Araújo et al., 2001).

Outras pesquisas demonstraram que a iangambina possui efeito de indução de apoptose em células de tumor colorretal (Hausott et al., 2003); atividade sobre o sistema nervoso central (Sousa et al., 2005; Lima, 2005); atividade antiinflamatória e como inibidor da produção de óxido nítrico (Kim et al., 2009). Ensaio de mutagenicidade mostraram que a iangambina não apresentou potencial mutagênico. A iangambina isolada das folhas de *O. dukei*, em testes *in vitro* e *in vivo*, não mostrou ser citotóxica, genotóxica e mutagênica, bem como, apresenta um valor de DL₅₀ acima de 2000 mg/kg, sendo considerada de baixa toxicidade ou praticamente não tóxica para camundongos *Swiss*. (Marques et al., 2003).

Trabalhos realizados *in vitro* por Monte-Neto e colaboradores (2011) com parasitas das espécies de *Leishmania chagasi* e *L. amazonenses* mostraram que a iangambina apresenta uma significativa atividade antipromastigota e anti-amastigota em macrófagos murinos infectados com *L. chagasi*. Araújo et al. (2014) demonstrou que a iangambina induz efeitos hipotensivos e taquicárdicos em ratos normotensos.

As lignanas iangambina e epi-iangambina representam potenciais candidatas à terapêutica alternativa para Leishmaniose Cutânea (LC), uma vez que demonstraram efeito leishmanicida *in vitro*, acompanhada da redução da resposta inflamatória de macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, que são agentes etiológicos da LC no Brasil (Silva, 2022).

Poucos trabalhos relatam as atividades farmacológicas da epi-iangambina. Assim, torna-se relevante investigar com maior clareza esses aspectos e realizar

estudos de isômeros para o desenvolvimento de medicamentos seguros e mais eficazes.

2.6 Aspectos envolvidos na padronização de extratos vegetais

A transformação de uma planta em um medicamento deve priorizar a preservação da integridade química dos princípios ativos e, conseqüentemente, a ação farmacológica do vegetal, a fim de garantir a constância da ação biológica desejada. Para atingir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer estudos prévios relativos aos aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, e de desenvolvimento de metodologias analíticas (Klein et.al., 2009).

O desenvolvimento de um fitoterápico padronizado agrega um valor tecnológico no desenvolvimento da forma farmacêutica contendo plantas medicinais, além de garantir a qualidade e eficácia do medicamento. Para isto, inicialmente deve-se fazer um levantamento bibliográfico na literatura científica e popular, visando a droga vegetal e suas propriedades químicas e farmacológicas. Posteriormente, coleta-se um espécime da planta e prepara-se uma exsicata, seguindo-se com a identificação botânica e o registro em um herbário oficial (Fernandes, 2013).

Os medicamentos derivados de plantas medicinais estão largamente disponíveis no mercado sob formas fluídas tradicionais. No entanto, observa-se que a transformação de extratos vegetais em extratos secos vem sendo amplamente utilizada no desenvolvimento de fitoterápicos. Produtos na forma sólida possuem vantagens significativas em relação às formas líquidas convencionais, como maior concentração, estabilidade química, físico-química e microbiológica, facilidade de padronização, maior concentração de compostos ativos, facilidade de transporte, menor espaço para a armazenagem do produto e capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas (Fernandes, 2013).

A quiralidade deve ser considerada no planejamento e síntese de novos produtos farmacêuticos, uma vez que a disposição cinética e dinâmica estereosseletiva é afetada, pois ao administrar um fármaco quiral na forma de racemato, os dois enantiômeros podem sofrer os processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção de forma estereosseletiva, por meio de interações com alvos moleculares (relação estrutura-atividade/REA). Dessa forma, fármacos comercializados como racematos estão sendo exaustivamente estudados, na

tentativa de obter vantagens farmacológicas e econômicas sobre a produção do enantiômero em sua forma isolada (Oliveira, 2011).

Os estudos fitoquímicos compreendem as etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação de constituintes do vegetal, sobretudo aqueles originários do metabolismo secundário, responsáveis, ou não, pela ação biológica. Ressalta-se também a importância do estabelecimento de marcadores químicos, que são substâncias químicas características de determinada espécie vegetal, que são indispensáveis ao planejamento e monitoramento das ações de transformação tecnológica, bem como aos estudos de estabilidade dos produtos intermediários e finais (Abranches, 2015).

Os métodos analíticos permitem a avaliação da qualidade do produto fitoterápico, garantindo, assim, a constância de ação terapêutica e a segurança de utilização (Souza-Moreira et.al.,2010). A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Os parâmetros normalmente avaliados nos programas de validação de metodologia analítica são: exatidão (acuracidade), precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, robustez e teste de conformidade do sistema, além da seletividade e a sensibilidade do método. No Brasil, a validação de métodos analíticos é regulada pela ANVISA pela RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017, que entrou em vigor a partir de janeiro de 2018 (Brasil, 2017).

O desenvolvimento de métodos analíticos é necessário para controle da pureza enantiomérica de matérias-primas e produtos acabados de fármacos quirais. Além disso, os registros das agências regulatórias tornam compulsória a disponibilidade de técnicas enantiosseletivas para assegurar a composição estereoisomérica de substâncias quirais (Oliveira, 2012).

Torna-se necessário realizar estudos de estabilidade de produtos à base de plantas, com o intuito de assegurar a qualidade, segurança e eficácia do produto final e diminuir as alterações dos componentes ativos (Lombardo e Eserian, 2015). No Brasil, os testes de estabilidade de produtos farmacêuticos, para fins de determinação de prazo de validade, devem seguir as diretrizes estabelecidas no guia de estudo de estabilidade publicado pela RDC Nº 318, DE 6 DE NOVEMBRO DE 2019 (Brasil, 2019).

Deve-se salientar que a utilização segura das plantas medicinais está vinculada ao conhecimento adequado, de forma a não causar perda na efetividade dos princípios ativos existentes nas plantas, bem como evitar o risco de intoxicações geradas pelo uso indevido (Emiliano e Balliano, 2019).

Por tanto, faz-se necessário validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros, de modo que a autorização oficial de seu uso seja fundamentada em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aqueles que as utilizam seja suplantado pelos benefícios que possam delas advir (Simões; Schenkel; Gosmann, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver metodologias analíticas e processos tecnológicos visando à obtenção de extratos secos padronizados de *Ocotea duckei*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização organoléptica, identificação macroscópica e microscópica das drogas vegetais de *O. duckei*.
- Identificar e quantificar os marcadores químicos nos extratos de *O. duckei*.
- Desenvolver processos de extração para obtenção tecnológica de extratos secos a partir das partes aéreas de *O. duckei*.
- Realizar o teste de toxicidade por *Artemia salina* da *O. duckei*, através da disponibilidade do seu extrato.
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica por cromatografia para análise química das drogas vegetais e extratos de *O. duckei*.
- Padronizar e otimizar o método de secagem para obtenção do extrato seco (ES) de *O. duckei*, utilizando um planejamento experimental para estudar as variáveis do processo e suas influências no processo.
- Caracterizar por teste de densidade, ângulo de repouso, granulometria, Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) os extratos secos obtidos.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Coleta e identificação do material botânico

As partes aéreas de *O. duckei* foram coletadas no município de Santa Rita, estado da Paraíba, em três períodos. A primeira coleta foi realizada em maio de 2018, a segunda coleta em março de 2019 e a terceira em abril de 2022. A identificação botânica do material vegetal foi realizada pela Prof^a. Dra. Maria de Fátima Agra, do Centro de Biotecnologia (Cbiotec/UFPB). A exsicata desta espécie encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN/ UFPB) sob o código AGRA 4309. (SIGEN)

4.2 Obtenção da droga vegetal (DV)

O material vegetal (partes aéreas) das três coletas foi desidratado em estufa com ar circulante a temperatura de 40 °C durante 72 horas. Após secagem, foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico, obtendo-se 3 quilos, da primeira coleta, 3,8 quilos da segunda coleta e 16 quilos da terceira coleta, da droga vegetal.

4.3 Caracterização físico-química da DV

A caracterização físico-química foi realizada com a droga vegetal obtida da segunda coleta, realizada em março de 2019.

4.3.1 Granulometria

O ensaio de granulometria seguiu a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (2019). O procedimento utilizou 25 gramas da droga vegetal das partes aéreas da *O. duckei*, que foi submetida a uma série de tamises com abertura de malhas diferenciadas (1,18; 0,71; 0,35; 0,149; 0,074 MM) dotado de um vibrador (Bertel), durante 15 minutos. O tamanho das partículas foi analisado em triplicata e avaliado pela quantificação percentual de retenção do pó em cada tamis de acordo com a seguinte equação (1):

$$\% \text{ Retido pelo tamis} = P1 + P2 + P3 / 3 \times 100(1)$$

Onde:

P1, P2 e P3 = peso da amostra retida em cada tamis (g).

4.3.2 Determinação da densidade

A determinação da densidade seguiu o método descrito na Farmacopeia Brasileira (2019), na qual 10 gramas da droga vegetal das partes aéreas de *O. duckei* foram acondicionadas em uma proveta de 50 mL e submetidas a sucessivas quedas de até 500 vezes a uma altura de 20 cm. Com o volume inicial medido, calculou-se a densidade aparente (equação 2) e, após o processo, a densidade compactada (equação 3). A partir das densidades aparente (*da*) e compactada (*dc*), determinou-se o Fator de Hausner (FH) e o Índice de compressibilidade (IC), conforme a equação (4) e a equação (5), respectivamente (Aulton, 2005).

$$Da = \frac{Ma}{Va} \quad (2) \quad Dc = \frac{Ma}{Vc} \quad (3) \quad FH = \frac{Dc}{Da} \quad (4) \quad IC = Dc - Da/Dc \times 100(5)$$

Onde:

Ma = massa aparente;

Va = volume aparente;

Vc = volume compactado.

4.3.3 Teor de umidade

Dois gramas da droga vegetal foram transferidos para pesa-filtro (Cadinho) previamente dessecado e tarado. A amostra foi submetida a aquecimento em estufa a 105 °C durante 24 horas, com posterior resfriamento em dessecador e pesagem. Os resultados de três determinações foram avaliados em termos de porcentagem ponderal sobre a quantidade da amostra, utilizando a equação (6).

$$\% \text{ Perda} = Pu - Ps / Pa \times 100(6)$$

Onde:

Pa = peso da amostra (g).

Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação (g).

Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação (g).

4.3.4 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

Pesou-se em um béquer 5 gramas da droga vegetal e, em seguida, foi adicionada 50 mL de água destilada. A mistura foi submetida a rotação mecânica, de forma que as partículas ficassem suspensas. O eletrodo do pHmetro foi inserido ao béquer e esperou-se o equipamento estabilizar até obter um valor fixo.

4.3.5 Espectroscopia na região de infravermelho com transformada de fourier (FTIR)

A FTIR foi determinada utilizando um equipamento Spectrum 400 da Perkin Elmer. A técnica FTIR foi usada para analisar a droga vegetal, utilizando a faixa de varredura de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.3.6 Análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA)

A análise da droga vegetal foi obtida em termobalança modelo TGA-50H da Shimadzu (Quioto-Japão), sob a razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, em faixa de temperatura de 25 a 900 $^{\circ}\text{C}$, e em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1}). Foi utilizada uma massa de aproximadamente 7 mg da amostra, acondicionada em cadinho de alumina. Os cálculos de perda de massa foram realizados com auxílio do programa Taysys 60 da Shimadzu®.

4.4 Obtenção dos compostos químicos

4.4.1 Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB)

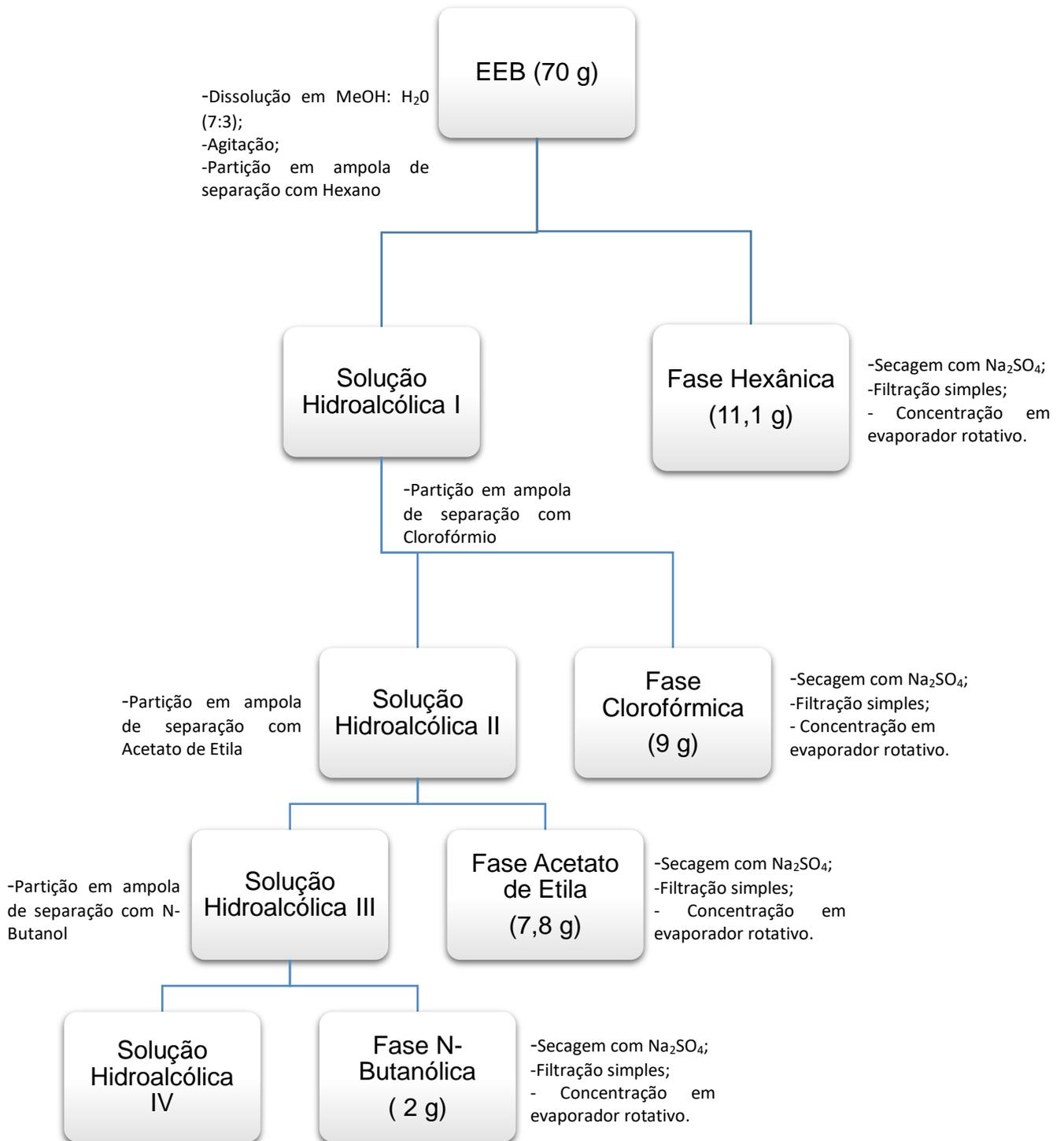
O material seco e pulverizado da primeira coleta (3 kg) foi submetido a maceração com etanol a 95%, em intervalos de 72 horas, em triplicata. Ao total foi

obtido cerca de 50 litros da solução extrativa resultante da maceração, a qual foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida, a uma temperatura média de 40°C, sendo obtido 273 gramas do Extrato Etanólico Bruto (EEB).

4.4.2 Particionamento do EEB

Uma alíquota do EEB da primeira coleta (70 g) foi dissolvida em 500 ml de MeOH:H₂O (7:3) e homogeneizada sob agitação mecânica por uma hora, para obtenção da solução hidrometanólica que foi submetida sequencialmente a um particionamento em ampola de separação com os seguintes solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e N-butanol. As fases foram, então, desidratadas com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), filtradas e concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida a uma temperatura média de 40 °C, obtendo-se: 11,1 g da fase hexânica; 9 g da fase clorofórmica; 7,8 g da fase acetato de etila; 2 g da fase n-butanólica (Esquema 1).

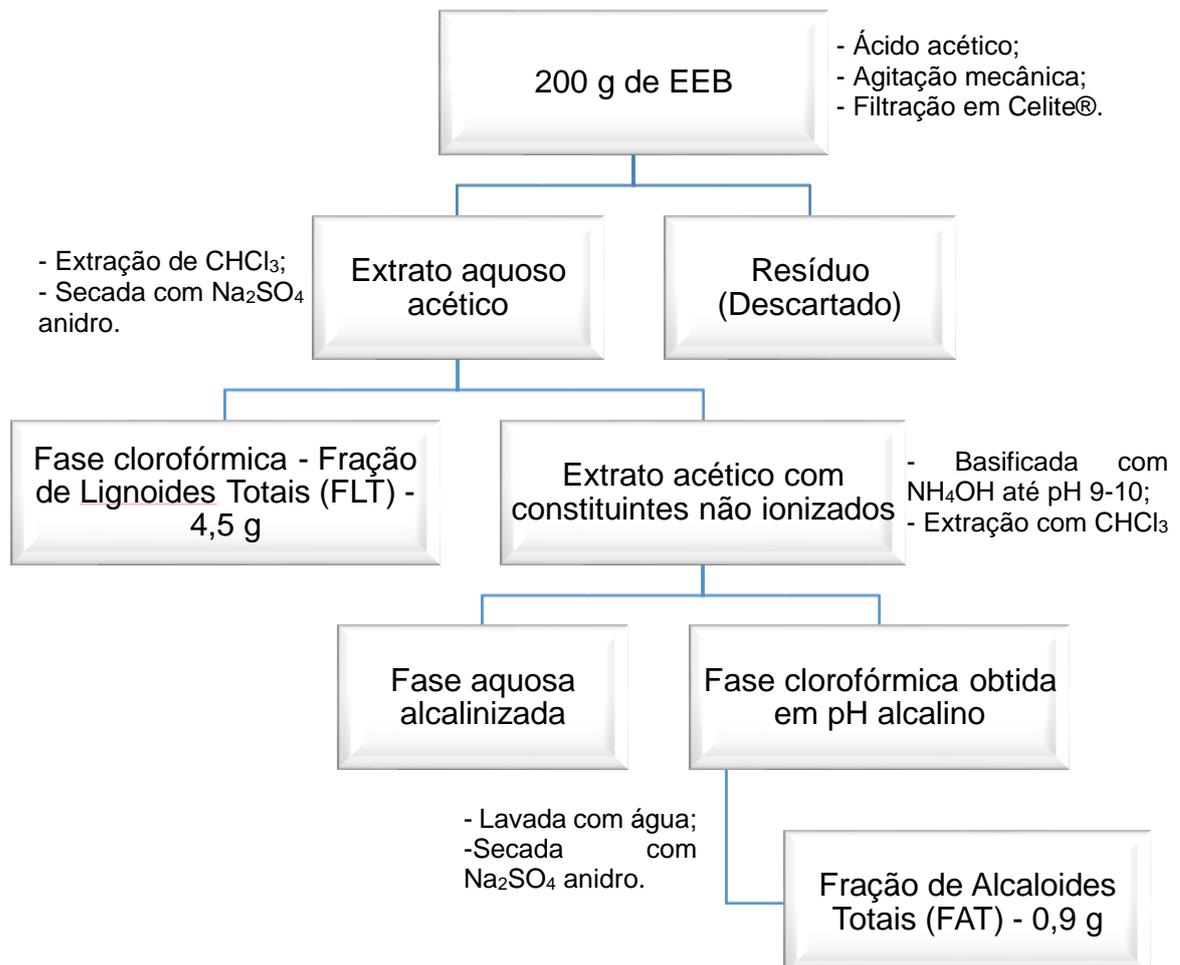
Esquema 1. Particionamento do EEB de *Ocotea duckei*.



Uma marcha para lignoides e alcaloides foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Barbosa-Filho et al. (1999), para obtenção dos resíduos isentos de lignoides e alcaloides (Esquema 2).

O EEB (200 g) obtido da primeira coleta foi tratado com solução de ácido acético a 10%, sob agitação mecânica e filtrado em celite, formando um resíduo que foi descartado e um extrato aquoso acético, extraído em clorofórmio e desidratado com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), obtendo-se 4,5 g da fase clorofórmica em pH ácido respectivo à fração de lignoides totais (FLT) e o extrato acético. O extrato acético foi basificado em hidróxido de amônio (NH_4OH), a frio, até pH 9-10 e extraído com clorofórmio (CHCl_3), até reação negativa com reagente de Dragendorff, obtendo-se a fase clorofórmica. Posteriormente, a fase foi tratada com água, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida, resultando 0,9 g de fração de alcaloides totais (FAT).

Esquema 2. Marcha de Lignoides e Alcaloides de *Ocotea duckei*.



4.4.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *O. duckei*

4.4.3.1 Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de *O. duckei*

Uma alíquota da fase clorofórmica (2,5 g) foi submetida à cromatografia em coluna sob média pressão, utilizando o equipamento *Sepacore® Easy Purification Systems* da Buchii. Utilizou-se como fase estacionária 51 g de sílica gel 60 (7734 MERCK - 0,063 – 0,200 mm) e uma coluna de vidro cilíndrica adequada. Como fase móvel, utilizaram-se hexano, clorofórmio e metanol, em sistema gradiente e isocrático, distribuídos em onze ciclos, todos com o fluxo a 17 ml/min (Tabela 1). Foram coletadas 40 frações com 50 ml cada, as quais foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida à temperatura média de 40 °C.

Tabela 1. Método utilizado na cromatografia sob média pressão da fase clorofórmica de *O. duckei*.

	Método	Frações coletadas
1º Ciclo	100% Hexano	ODFD-F1 à ODFD-F5
2º Ciclo	Hexano e Clorofórmio (80%:20%)	ODFD-F6 à ODFD-F10
3º Ciclo	Hexano e Clorofórmio (60%:40%)	ODFD-F11 à ODFD-F13
4º Ciclo	Hexano e Clorofórmio (50%:50%)	ODFD-F14 à ODFD-F16
5º Ciclo	Hexano e Clorofórmio (20%:80%)	ODFD-F17 à ODFD-F20
6º Ciclo	100% Clorofórmio	ODFD-F21 à ODFD-F23
7º Ciclo	Clorofórmio e Metanol (97%:3%)	ODFD-F24 à ODFD-F26
8º Ciclo	Clorofórmio e Metanol (95%:5%)	ODFD-F27 à ODFD-F30
9º Ciclo	Clorofórmio e Metanol (90%:10%)	ODFD-F31 à ODFD-F33
10º Ciclo	Clorofórmio e Metanol (60%:40%)	ODFD-F34 à ODFD-F37
11º Ciclo	Clorofórmio e Metanol (30%:70%)	ODFD-F38 à ODFD-F40

As frações obtidas foram concentradas sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C em rotaevaporador. Posteriormente, estas frações foram analisadas por RMN de ^1H , ^{13}C para identificação/determinação estrutural, sendo possível identificar a substância OD-1 (25 mg), correspondente à fração ODFD-26.

4.4.3.2 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de *O. duckei*

A fase acetato de etila foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etila e metanol (95%:5%). Foram coletadas 3 faixas, as quais foram filtradas e concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida à temperatura média de 40 °C, obtendo assim 3 frações (FX-1, FX-2 e FX-3). Posteriormente, estas frações foram analisadas por RMN de ^1H , ^{13}C para identificação/determinação estrutural, sendo possível identificar uma substância que foi codificada como OD-2 (8 mg), correspondente à fração FX-3.

4.4.3.3 Fracionamento cromatográfico da FAT de *O. duckei*

A casca de caule seca e em pó (6,500 g) foi extraída com 80% de EtOH à temperatura ambiente por 4 dias. Este extrato, após ser concentrado sob vácuo (600 g), foi suspenso em HCl a 3%, filtrado sobre Celite e extraído três vezes com CHCl_3 . A fração de H_2O foi alcalinizada com NH_4OH até pH 9 e extraída novamente com CHCl_3 . O extrato de CHCl_3 foi lavado com H_2O , seco (Na_2SO_4) e o solvente evaporado.

A fração alcaloide (9,2 g) foi cromatografada sobre uma coluna de óxido de alumínio eluída com misturas de CHCl_3 e MeOH numa ordem de polaridade crescente, obtendo três frações.

Estes foram submetidos a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), eluindo com CHCl_3 : MeOH (6,5: 3,5). A partir deste procedimento, foram isoladas três substâncias: OD-3 - 0,020 g; OD-4 (0,015 g) e OD-5 (0,008 g).

4.4.4. Análise e identificação estrutural

As identificações estruturais foram realizadas por meio de métodos espectroscópicos, tais como: Ressonância Magnética (RMN) ^1H e ^{13}C e bidimensionais

Os espectros de RMN de Hidrogênio (RMN de ^1H) e de Carbono (RMN de ^{13}C), além de técnicas bidimensionais, foram registrados em espectrômetro das marcas Bruker Ascend, operando a 400 MHz e Varian System, operando a 500 MHz do

Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os solventes deuterados utilizados foram clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) e Acetona- d_6 .

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm), sendo utilizado o próprio solvente como referência interna e as constantes de acoplamento (J) em Hz. As multiplicidades no espectro de RMN de ^1H foram indicadas segundo as convenções: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dl (duplete largo), dd (duplo duplete), t (tripleto) e m (multiplete). Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos utilizando-se a técnica de APT.

4.5 Bioensaio com *Artemia salina* Leach

O bioensaio com *A. salina* é baseado na técnica descrita por Meyer e colaboradores (1982). Após a escolha e preparação do extrato, procedeu-se a implantação e padronização da metodologia com *A. salina*. Os testes de toxicidade foram realizados com duas fases (Hexânica e Clorofórmica) da *O. duckei*.

De início, preparou-se a solução salina oriunda da solubilização de 39g de sal marinho em 1 litro de água destilada. Dessa forma, foi realizado o ensaio e, posteriormente, os cistos de *A. salina* foram colocados na incubadora, junto com a solução salina, em um dos lados do recipiente. A parte do sistema contendo os cistos foi recoberta com papel alumínio, para que as larvas, após a eclosão dos cistos, fossem atraídas pela luz do outro lado do sistema, forçando-as a atravessar à divisória.

Após 24 horas, em temperaturas compreendidas entre 22°C – 29°C e sob iluminação de uma lâmpada incandescente (40 W), os cistos eclodiram. Em um béquer mediu-se 40mg da fase Hex da *O. duckei*, que foi dissolvido em 400 μL de Cremofor® (solvente) e 20 mL da solução salina, obtendo-se a solução mãe. Em seguida, em tubos de ensaio, foram adicionados 2500, 1875, 1250, 625, 250 e 125 μL da solução mãe e 5 mL da solução salina, obtendo as concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em cada tubo foi adicionado 10 artemias que foram coletadas com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Cada concentração foi testada em triplicata.

O conjunto permaneceu em incubação sob luz artificial por 24h e, posteriormente, foi realizada a contagem do número de larvas vivas e mortas, para determinação da CL₅₀ (concentração que produz 50 % de letalidade).

A segunda fase utilizada foi a clorofórmica. Seu emprego seguiu as mesmas etapas listadas para a primeira fase.

Os valores de CL₅₀ foram calculados através da expressão dos resultados como uma percentagem dos controles e determinados graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%.

4.6 Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação dos marcadores

4.6.1 Preparação da amostra e padrão

A metodologia de preparação da amostra foi adaptada de Dias, 2011. As amostras utilizadas foram o EEB e a substância OD -1. A amostra do EEB foi preparada pesando-se 10 mg da amostra, diluindo-se para 10 ml em um balão volumétrico com etanol: água (50:50) obtendo-se uma solução estoque (SE) contendo 1 mg/ml de solução do EEB.

A solução estoque (SE) do EEB foi submetida a um processo de extração. Foram retirados os volumes de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mL desta SE e colocados em um tubo distintos e a cada um foi acrescido respectivamente 0,9; 0,8; 0,6; 0,4 e 0,2 mL de H₂O. Em seguida, adicionou-se 3 mL de diclorometano a cada um e realizou-se uma agitação no vortex por 2 minutos, seguida de uma agitação por 10 minutos na centrífuga. Logo após, retirou-se assim os 3 mL da fase diclorometano, seguindo-se para o armazenando. Repetiu-se esse processo mais duas vezes, obtendo 9 mL da fase diclorometano de cada amostra, no qual, desta fase, 4 mL foram retirados e secos. Para análise em HPLC, as amostras secas foram ressuspendidas em 2 mL de acetonitrila: água (50:50), obtendo-se assim as concentrações de 0,95; 1,34; 1,86; 2,49 e 3,18 µg/mL das amostras da fase diclorometano.

A amostra padrão foi preparada pesando-se 3 mg da OD-1, diluindo-a para 10 ml em um balão volumétrico com acetonitrila: água (50:50), obtendo-se uma SE contendo 0,3 mg/ml de solução padrão OD-1. Foram retirados os volumes de 0,16;

0,33; 0,50; 0,66 e 0,83 mL desta SE, que foram colocados em balões distintos de 10 mL e a cada um foi acrescido 10 mL de acetonitrila: água (50:50), obtendo-se assim as concentrações de 5; 10; 15; 20 e 25 µg/mL das amostras do padrão. Para análise de HPLC, as amostras foram ressuspensas em 2 mL de acetonitrila: água (50:50). Todas as soluções foram filtradas através de um filtro de seringa de nylon de 0,22 µm.

4.6.2 A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O desenvolvimento e validação do método foram realizados usando um Shimadzu Prominence HPLC-DAD equipado com um amostrador automático SIL-20A, bomba LC-6AD, unidade de desgaseificação DGU-20AS, forno CTO-20A e um detector DAD SPD-M20A. Foram utilizadas colunas Phenomenex, Gemini NX 5U C18 110A, 250 mm x 4,60 mm e C18 NST 18, 120A-253905, 250 mm x 3,9 mm, tamanho de partícula de 5 µm (NST). Para o desenvolvimento final do método e validação, foi utilizada a coluna C18 NST 18. O método final utilizado como fase móvel acetonitrila: água v/v (45%:55%), pH 1,94, vazão de 0,8 mL/min, temperatura do forno a 40° C, volume de injeção de 20 µL, com monitoramento a 205 nm.

4.6.3 Método de validação

Os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, efeito de matriz, exatidão e robustez foram avaliados de acordo com os critérios da Conferência Internacional de Harmonização (ICH) (Diretriz, 2005) e RDC 166 (Brasil, 2017).

O método de validação foi desenvolvido baseado no método utilizado no trabalho de Sandro Leal de Sousa, sob orientação de Professor José Maria Barbosa Filho (Leal, 2012).

4.6.3.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada comparando-se os tempos de retenção e perfis de picos de pureza do padrão OD-1 e dos marcadores presentes no EEB, através do detector de arranjo de diodos (DAD), em análise de 190 a 400 nm.

4.6.3.2 Adequabilidade

Para avaliar a confiabilidade da condição cromatográfica estabelecida, foram realizados testes de adequação do sistema, analisando os parâmetros: tempo de retenção, placas teóricas, fator de cauda, pureza do pico e tempo de retenção. Para avaliar a confiabilidade da condição cromatográfica estabelecida, foram realizados testes de adequação do sistema do padrão OD-1, analisando os parâmetros: tempo de retenção, placas teóricas, fator de cauda, pureza do pico e tempo de retenção.

4.6.3.3 Linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

A linearidade foi determinada pela análise de cinco concentrações na faixa de 5 a 25 µg/mL do padrão OD-1 em triplicata. O valor médio das curvas obtidas foi utilizado para construir a curva média final e avaliar a linearidade do método. Considerou-se o coeficiente de correlação (r) maior ou igual a 0,99 como critério mínimo de aceitação da linearidade.

Os LOD e LOQ foram calculados com o desvio padrão da inclinação (σ) e valor médio da inclinação (S) das curvas analíticas, utilizando as equações (7 e 8):

$$LOD = 3.3 \times \sigma / S \quad (7)$$

$$LOQ = 10 \times \sigma / S \quad (8)$$

4.6.3.4 Efeito matriz

O efeito matriz foi analisado comparando-se os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com o padrão OD-1 e com a amostra EEB fortificada com os mesmos níveis de concentração das curvas de linearidade. O paralelismo das curvas foi demonstrado por avaliação estatística (teste t) adotando-se nível de significância de 5%. Essa análise não foi realizada no estudo de Leal (2012).

Para fortificação de amostra, volumes de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mL de EEB foram colocados em tubos separados e a cada um foi adicionado, respectivamente, 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mL da solução padrão OD-1 e 1,8; 1,6; 1,2; 0,8 e 0,4 mL de

H₂O. Em seguida, foram adicionados 3 mL de diclorometano a cada um, agitados em vórtex por 2 minutos e colocados na centrífuga por 10 minutos, posteriormente, os 3 mL da fase de diclorometano foram removidos e armazenados. Este processo foi repetido mais duas vezes, obtendo 9 mL da fase enriquecida de cada amostra. Finalmente, 4 mL foram retirados, secos e ressuspensos em 2 mL de acetonitrila: água (50:50) para análise por HPLC. Obtendo as concentrações de 6,86; 14,48; 28,55; 45,34 e 55,35 µg/mL das amostras fortificadas.

4.6.3.5 Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas pela análise de amostras de EEB fortificada em três níveis de concentração: Baixo (6,86 µg/mL), Médio (28,55 µg/mL) e alto (55,35 µg/mL). As amostras foram preparadas em triplicado.

A precisão intradia (análise no mesmo dia realizada por um analista) e a precisão interdia (análise em dias não consecutivos realizada por outro analista) foram realizadas para avaliar a precisão intermediária. Os resultados foram interpretados em termos de porcentagem de recuperação (R), onde EC representa a concentração experimental (amostra) e TC a concentração teórica (padrão) (Equação 9):

$$R = \frac{EC}{TC} \times 100 \quad (9)$$

4.6.3.6 Robustez

A robustez foi analisada através da concentração referência de 1,86 e 15 µg/ml respectivamente do OD-1 e do EEB em triplicata. As análises foram realizadas através variações de pH, proporção de fase móvel, temperatura do forno, vazão e coluna. Os resultados foram expressos em termos de RSD e R, a partir das concentrações da amostra determinadas nos métodos método inalterado (UM) e método alterado (AM), de acordo com a equação 10:

$$R = \frac{AM}{UM} \times 100 \quad (10)$$

4.7 Estudos tecnológicos para desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas

4.7.1 Obtenção do Extrato Seco (ES)

O planejamento para obtenção do extrato seco (ES) foi realizado com a DV obtida na terceira coleta. Foram realizadas doze extrações por maceração por cinco dias consecutivos sem renovação de solvente, com o volume final de 250 mL, comparando-se a relação gradiente do solvente EtOH a 30, 50, 70 e 96% e a proporção droga/solvente a 10, 20 e 30% (Tabela 2).

Tabela 2. Extratos obtidos por maceração da droga vegetal da *O. duckei* em relação a proporção do solvente e a proporção droga/solvente.

EEB	% de Solvente	% de DV
1	30 %	10%
2	30 %	20%
3	30 %	30%
4	50 %	10%
5	50 %	20%
6	50 %	30%
7	70 %	10%
8	70%	20%
9	70 %	30%
10	96 %	10%
11	96 %	20%
12	96 %	30%

De cada EEB obtido foi retirado o volume 1 mL, que foram colocados em tubos distintos. A cada tubo foi adicionado 3 mL de diclorometano, realizado-se uma agitação no vortex por 2 minutos e na centrífuga por 10 minutos, retirando-se os 3 mL da fase diclorometano e armazenando. Repetiu-se esse processo mais duas vezes, obtendo-se um total de 9 mL da fase diclorometano de cada extrato, no qual 4 mL foram retirados, secos e ressuspensos em 2 mL de acetonitrila: água (50:50) para

análise em HPLC, seguindo os mesmos parâmetros escolhidos para validação do método analítico.

A medida da eficácia extrativa das condições avaliadas foi determinada em função da concentração dos marcadores quantificados por CLAE-DAD. Utilizou-se o padrão OD-1 na concentração de 15 µg/mL pra comparar com os EEB obtidos.

4.7.1.1 Obtenção do Resíduo Seco (RS)

Após definir o melhor sistema de extração, a determinação do RS no extrato foi feita de acordo com a Farmacopéia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019). Foram transferidos 2 mL do EEB fluido para o pesa-filtro (Cadinho) previamente dessecado e tarado, em triplicata. Submeteu-se a aquecimento em estufa a 105 °C durante 1:30h, com posterior resfriamento em dessecador e pesagem e por mais 30 minutos com posterior resfriamento em dessecador e pesagem. Os resultados de três determinações foram avaliados e foi calculado o valor do RS em porcentagem sobre o volume, através da fórmula descrita de acordo com a Farmacopeia Brasileira (Equação 11):

$$RS\% = \text{Matéria seca (g)} / \text{Extrato fluido (g)} \times 100 \quad (11)$$

4.7.1.2 Secagem com adjuvantes tecnológicos

Um planejamento fatorial fracionário 3² associado à metodologia de superfície resposta foi aplicado para avaliar e otimizar os efeitos dos parâmetros do processo de secagem sobre os teores dos marcadores químicos.

Para isto, foram investigados os efeitos individuais e interativos de duas variáveis independentes, sílica coloidal ou dióxido de silício coloidal (Aerosil) e celulose microcristalina, em três níveis, nível baixo (-1), nível médio (0) e nível alto (+1) (Tabela 3). A matriz do planejamento está demonstrada na Tabela 4.

Foi utilizado 300 mL do EEB, adicionado a ele os devidos fatores em seus respectivos níveis e realizado a secagem por rotaevaporação a uma temperatura de 80 °C, em duplicata, obtendo-se assim nove ES.

Tabela 3. Níveis do desenho experimental para o estudo de método de secagem

FATORES	NÍVEL		
	-1	0	+1
Aerosil	12,5%	50%	100%
Celulose	25%	100%	200%

Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial 3² para secagem por rotoevaporação

Experimentos	Celulose	Aerosil
1	0	0
2	1	1
3	-1	-1
4	-1	1
5	1	-1
6	0	1
7	0	-1
8	1	0
9	-1	0

4.7.2 Caracterização dos ES obtidos

Os ES foram caracterizados quanto a densidade, ângulo de repouso, granulometria e a higroscopicidade.

4.7.2.1 Determinação das densidades

A determinação da densidade seguiu o método descrito na Farmacopeia Brasileira (2019), na qual uma quantidade dos ES foi acondicionada em uma proveta de 50 mL e submetidas a sucessivas quedas de até 500 vezes a uma altura de 20 cm. Com o volume inicial medido, calculou-se a densidade aparente (equação 2) e, após o processo, a densidade compactada (equação 3). A partir das densidades aparente (d_a) e compactada (d_c), determinou-se o Fator de Hausner (FH) e o Índice de

compressibilidade (IC), conforme a equação (4) e a equação (5), respectivamente (Aulton, 2005).

4.7.2.2 Determinação do ângulo de repouso

Foi utilizado para essa determinação o método do funil, no qual uma quantidade dos ES foi colocada em um funil de vidro a uma determinada altura de uma superfície lisa contendo um papel, deixando-se cair sobre a folha de papel o ES. A altura (h) e o diâmetro (d) do cone formado foram medidas com um auxílio de uma régua. O ângulo de repouso é determinado pela equação 12:

$$AR = \frac{h}{d} \times 100 \quad (12)$$

4.7.2.3 Determinação da granulometria

O ensaio de granulometria seguiu a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (2019). O procedimento utilizou uma massa total de 11,04 g do ES que foi submetida a uma série de tamises com abertura de malhas diferenciadas (710; 355; 180; 150; 75 e 38 MM), submetido a agitação manual por alguns minutos. O tamanho das partículas foi analisado e avaliado pela quantificação percentual de massa de retenção (MR) em cada tamis de acordo com a seguinte equação (13):

$$\%R = MR \times MT/100 \quad (13)$$

4.7.2.4 Determinação da higroscopicidade

Para determinar a estabilidade do ES em relação à umidade, a amostra foi acondicionada em pesa-filtros e acondicionada em dessecador. A condição de umidade relativa foi de 80%, em uma temperatura de 25°C. A umidade relativa foi confirmada através de um termo-higrômetro. A higroscopicidade foi determinada pela massa de água absorvida nos tempos de 1 e 7 dias.

4.7.3 Caracterização térmica

As curvas termogravimétricas (TG) dinâmicas foram obtidas em uma termobalança (Shimadzu®, TGA-50). O aparelho foi verificado com oxalato de cálcio monohidratado. Os experimentos foram conduzidos no intervalo de temperatura de 25 a 900 °C nas taxas de aquecimento (β) de 5, 10, 15 e 20 °C.min⁻¹, com fluxo de gás de 50 mL.min⁻¹.

Foi utilizado a massa de 4,9,0 ± 0,1 mg em cadinho de alumina. Com base nos dados obtidos aplicou-se o modelo de Ozawa para determinação dos parâmetros cinéticos: ordem de reação, fator de frequência e energia de ativação. Para análise dos dados e determinação dos parâmetros cinéticos utilizou-se o software TA-60ws, da Shimadzu®.

As curvas térmicas DTA foram obtidas em um analisador térmico Shimadzu®, DTA-50. O aparelho foi calibrado com índio e zinco. Os experimentos foram conduzidos no intervalo de temperatura de 25 a 900 °C na taxa de aquecimento (β) 10 °C.min⁻¹, com fluxo de gás de 50 mL.min⁻¹. Foi utilizado a massa de 4,9,0 ± 0,1 mg em cadinho de alumina. Para análise dos dados utilizou-se o software TA-60ws, da Shimadzu®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química da droga vegetal (DV)

5.1.1 Distribuição granulométrica da droga vegetal

O tamanho das partículas contidas na droga vegetal influencia a interação com o solvente e o material vegetal. Portanto, a distribuição granulométrica configura um parâmetro preliminar importante para a escolha do processo extrativo e do solvente adequado, já que influencia diretamente na eficiência do processo extrativo (Migliato et al., 2007). De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2019), o pó resultante de *O. duckei* foi classificado como grosso, aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 1,70 mm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 mm. (Tabela 5).

Tabela 5. Percentual de massa da droga vegetal de *O. duckei*, retida em diferentes tamanhos de malhas.

TAMIS (MM)	N1	N2	N3	Média	DP	%
1,18 (16)	11,8566	10,2916	13,2164	11,79	1,46	47,2
0,71 (25)	7,7851	7,8578	5,9876	7,21	1,06	28,8
0,35 (45)	3,3071	3,9477	3,3647	3,54	0,35	14,2
0,149 (100)	1,1423	1,9224	1,6845	1,58	0,40	6,3
0,074 (200)	0,2862	0,6067	0,4813	0,46	0,16	1,8
Recipiente	0,1522	0,2635	0,1224	0,18	0,07	0,7

A determinação da granulometria do pó se mostra importante quanto a sua avaliação, tanto na distribuição da partícula da matéria-prima vegetal utilizada, quanto ao tamanho de pó obtido. Pois, a avaliação do tamanho das partículas possui influência na interação do uso de solventes com o material vegetal, já que a distribuição granulométrica confere um importante parâmetro quanto à escolha de processos extrativos e o uso de solventes, para melhor conferir um processo extrativo. Portanto, o pó obtido precisa ser testado frente a diferentes processos extrativos, para obtenção de maior eficiência na extração (Marques et al, 2012).

5.1.2 Densidade da droga vegetal

A determinação da densidade foi utilizada para avaliar as características de escoamento e compressibilidade do pó (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros obtidos no ensaio de propriedades de fluxo da droga vegetal de *O. duckei*.

Propriedades físico-químicas	Valores
Densidade de compactação (g mL ⁻¹)	0,3125
Densidade bruta (g mL ⁻¹)	0,25
Índice de Compressibilidade (%)	25
Fator de Hausher	1,25

Os resultados encontrados de Índice de Compressibilidade (IC) e Fator de Hausner (FH) são relacionados com os valores e com a classificação do tipo de fluxo do pó, mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Classificação do tipo de fluxo de um pó (USP 35, 2012b).

Fluxo	IC	FH
Excelente	<=10	1,00 - 1,11
Bom	11 – 15	1,12 - 1,18
Favorável	16 – 20	1,19 - 1,25
Aceitável	21 – 25	1,26 - 1,34
Pobre	26 – 31	1,35 - 1,45
Muito pobre	32 – 37	1,46 - 1,59
Péssimo	>38	>1,60

O fator de Hausner (FH) é uma medida indireta da facilidade de fluxo de pó, sendo que materiais que possuem valores superiores a 1,5 são classificados como coesivos, enquanto que os que apresentam valores inferiores a 1,25 são enquadrados como de fácil escoamento e valores entre 1,25 e 1,5 exigem a adição de lubrificantes para melhorar o escoamento, prevendo assim o potencial de compactação/compressão (Lagos et al., 2012).

A droga vegetal de *O. duckei* apresentou propriedades de fluxo aceitável, como

reafirmado pelo índice de compressibilidade (25%). Além disso, foi classificado como de fácil escoamento, que é fundamental no processo de fabricação de formas farmacêuticas sólidas, a exemplo dos comprimidos e cápsulas (Gupta et al., 2013).

5.1.3 Teor de umidade da droga vegetal

A média do valor obtido do teor de umidade da droga vegetal de *O. duckei* foi de 5,8%, conforme a Tabela 8.

Tabela 8. Teor de umidade da droga vegetal de *O. duckei*.

	U (%)
N1	5,7
N2	5,9
N3	5,7
Média	5,8
DP	0,097411

O teor máximo de umidade estabelecido nas diferentes farmacopeias varia entre 8 e 14%, com poucas exceções especificadas nas monografias. Esta determinação é importante para o controle microbiológico, pois o excesso de umidade em drogas vegetais acelera a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos, bactérias, hidrólise e atividade enzimática. Mesmo para extratos secos, há necessidade da análise do teor de umidade nesses derivados vegetais, pois são muito higroscópicos (Marques et.al., 2012).

5.1.4 pH da droga vegetal

A droga vegetal de *O. duckei* e a água destilada apresentaram um intervalo médio de pH de 6,01 e 6,73, respectivamente. Esse valor sugere a presença de substâncias ácidas, uma vez que, nas plantas, encontram-se diversos ácidos minerais orgânicos combinados sob a forma de sais, ésteres, lactonas, lipídeos, essências, resinas e proteínas. Partes desses componentes ácidos também podem estar

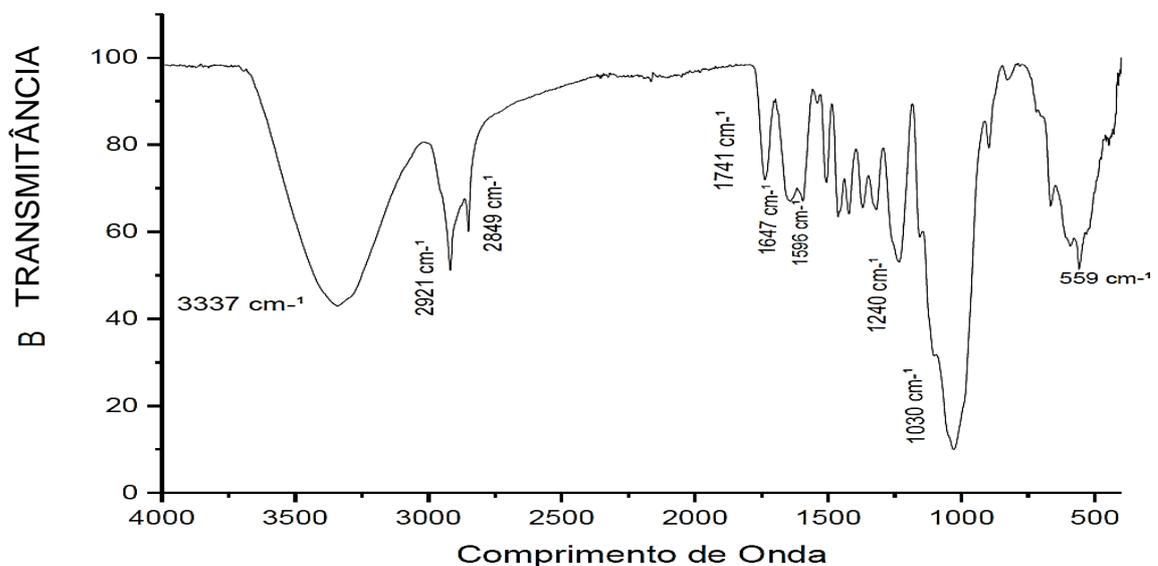
contidos no citoplasma da planta, podendo ser dosados para caracterizar se um determinado extrato vegetal tem caráter ácido ou básico (Guizzo et.al, 2015).

5.1.5 FTIR da droga vegetal

O espectro de infravermelho (Figura 3) mostrou uma banda larga e de média intensidade em 3337 cm^{-1} , referente ao estiramento axial -NH (Grupamento amina - Amina secundária). Duas bandas de pequena intensidade foram observadas em 2921 cm^{-1} e 2849 cm^{-1} , as quais são indicativas de hibridização sp^3 , correspondentes a grupos metílicos e metilênicos, respectivamente. Em 1741 cm^{-1} pode-se observar uma banda de baixa intensidade sugestiva de grupamento carbonila (C=O) e em 1677 e 1596 cm^{-1} pode-se observar duas bandas sugestiva de estiramento vibracional da ligação C=C de compostos aromáticos. Além disso, uma banda intensa e estreita, de estiramento C-O foi observada em 1030 cm^{-1} .

A presença dessas bandas sugere a presença de grupos funcionais como aminas, álcoois, ésteres, cetonas, ácidos carboxílicos, presentes em metabólitos secundários, tais como flavonoides, alcaloides, esteroides e polifenóis.

Figura 3. Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier da droga vegetal de *O. duckei*



5.1.6 TGA e DTA da droga vegetal

A decomposição térmica da droga vegetal de *O. duckei* ocorreu em três etapas (Figura 4 e Tabela 9). Na primeira etapa, que ocorreu entre 30,00 e 192,78 °C, houve uma perda de massa equivalente a 8,29%. A literatura relata que este evento pode ser relacionado à desidratação da droga vegetal e a evaporação de constituintes voláteis (Wesolowski, 2003). A etapa seguinte ocorreu entre 192,78 e 444,06 °C, na qual apresentou a maior perda de massa a 52,42% o que pode estar associada à degradação térmica de componentes orgânicos da droga vegetal (Wesolowski, 2003).

A terceira etapa foi entre 444,06 e 594,99 °C, com perda de massa igual a 23,67%. Esta última perda pode ser referente à queima dos restos carbonizados da matéria orgânica (Araújo et.al.,2006). O resíduo final da amostra foi de 2,04%, representando o percentual da amostra que não sofreu degradação total nas condições de análise.

Na Figura 4 está representada a curva de análise térmica diferencial da droga vegetal de *O. duckei*. Foi possível observar a presença de três picos endotérmicos. O primeiro pico, ocorreu em 320 °C. Pela temperatura de ocorrência, este pico pode estar relacionado ao primeiro evento de decomposição térmica evidenciado na TG. O segundo pico, também endotérmico, ocorreu em 460 °C. O último pico foi evidenciado em 500 °C, temperatura dentro da faixa de ocorrência da etapa de degradação térmica com maior perda de massa.

A aplicação conjunta das técnicas de TGA e DTA são ferramentas úteis e auxiliam a caracterização do material vegetal quanto ao seu comportamento de degradação térmica, mostrando como ocorre a decomposição e a entalpia envolvida nas principais etapas.

Figura 4. Curva Termogravimétrica (TG) e Curva Térmica diferencial (DTA) da droga vegetal de *O. duckei*.

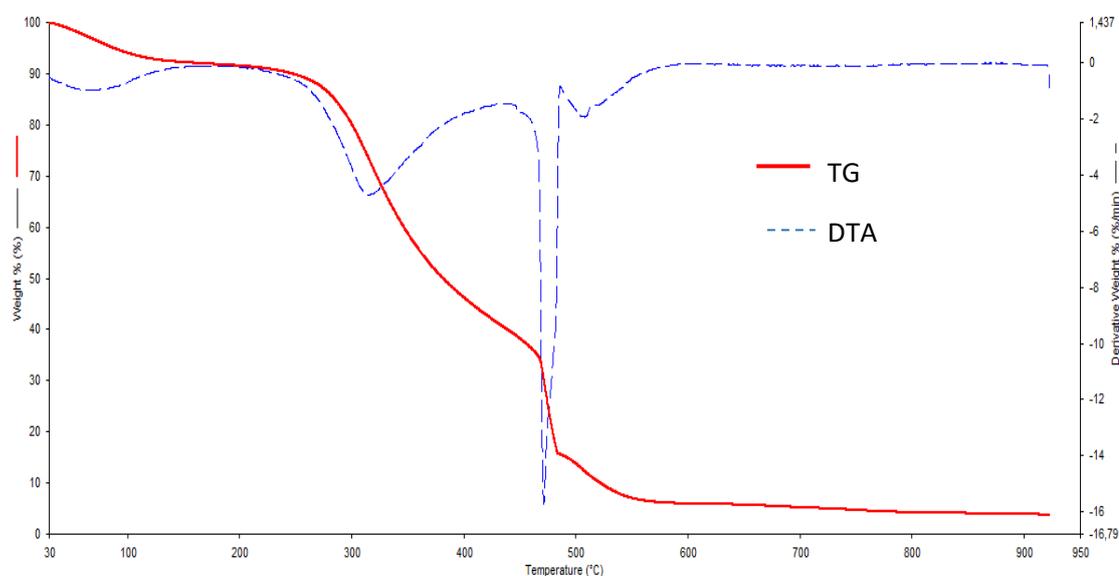


Tabela 9. Dados da curva termogravimétrica da droga vegetal de *O. duckei*.

Etapas	Onset- Endset (°C)	Perda de massa (%)
1ª Etapa	30,00 - 192,78 °C	8,29%
2ª Etapa	192,78 - 444,06 °C	52,42%
3ª Etapa	444,06 - 594,99 °C	23,67%

5.2 Identificação estrutural dos compostos de *O. duckei*.

5.2.1 Identificação estrutural de OD-1

A substância OD-1 foi isolada na forma de pó amarelo-claros com 25 mg. Através dos dados espectroscópicos e por comparação na literatura (Barbosa-Filho et al., 1999), foi possível identificar a OD-1 como sendo os lignoides, langambina e Epi-langambina (Figura 5 a 10; Tabela 10), considerados os compostos majoritários da espécie. O seu isolamento já foi relatado na espécie *O. duckei* no estudo realizado por este mesmo autor, utilizando a fase diclorometano obtida a partir do EEB desta planta.

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C (400 e 100 MHz, CDCl_3) de OD - 1 (Iangambina e Epi-Iangambina)

	EPI-IAN		IAN	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	2,89 (m)	54,30	3,09 (m)	54,15
2	4,42 (d)	87,63	4,79 (d, $J = 4\text{Hz}$)	85,78
4	Ax: 3,29-3,39 (m) Eq: 3,89 -4,00 (m)	70,90	Ax:3,85 – 3,88 (m) Eq: 4,27- 4,31 (m)	71,79
5	3,29-3,39 (m)	49,80	3,07 – 3,10 (m)	54,15
6	4,83 (d, $J = 5\text{ Hz}$)	82,00	4,72 (d, $J = 4\text{ Hz}$)	85,78
8	Ax: 3,87-3,9 (m) Eq: 4,27 (d)	69,62	Ax:3,85 – 3,88 (m) Eq: 4,27- 4,31 (m)	71,79
1'	-	136,62	-	136,57
1''	-	133,87	-	136,87
2'	6,56 (s)	102,83	6,55 (s)	102,77
2''	6,57 (s)	102,47	6,55 (s)	102,77
3'	-	153,24	-	153,24
3''	-	153,03	-	153,24
4'	-	137,30	-	137,30
4''	-	129,63	-	137,30
5'	-	153,24	-	153,24
5''	-	153,03	-	153,24
6'	6,56 (s)	102,77	6,55 (s)	102,83
6''	6,57 (s)	102,74	6,55 (s)	102,83
OCH₃ (4')	3,81 (s)	60,64	3,85 (s)	60,64
OCH₃ (4'')	3,83 (s)	60,64	3,85 (s)	60,64
OCH₃ (3')	3,85 (s)	56,03	3,86 (s)	56,01
OCH₃ (3'')	3,85 (s)	56,03	3,86 (s)	56,01
OCH₃ (5')	3,85 (s)	56,03	3,86 (s)	56,01
OCH₃ (5'')	3,85 (s)	56,03	3,86 (s)	56,01

Figura 5. Iangambina (IAN) e Epi-Iangambina (Epi-IAN)

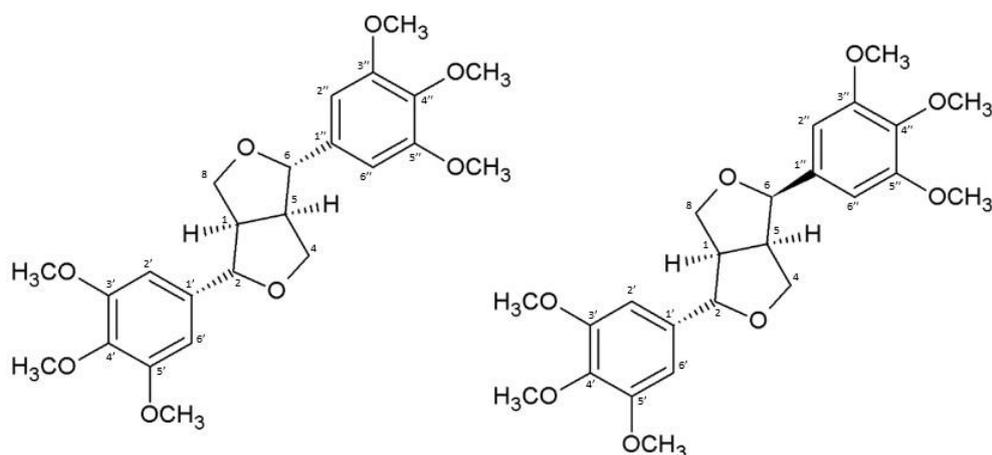


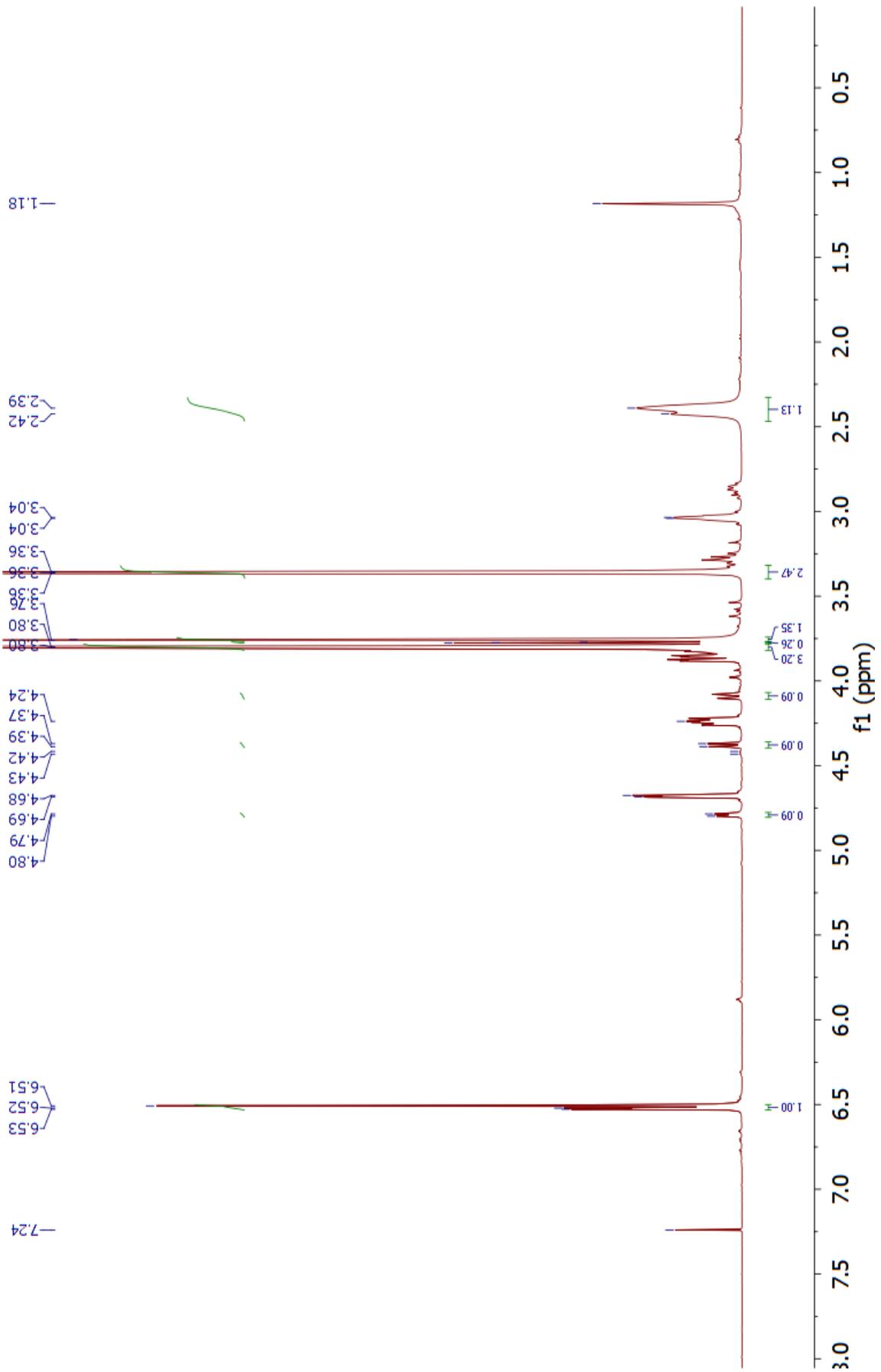
Figura 6. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) -OD-1

Figura 7. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) na região de 4,50 – 6,60 ppm – OD-1

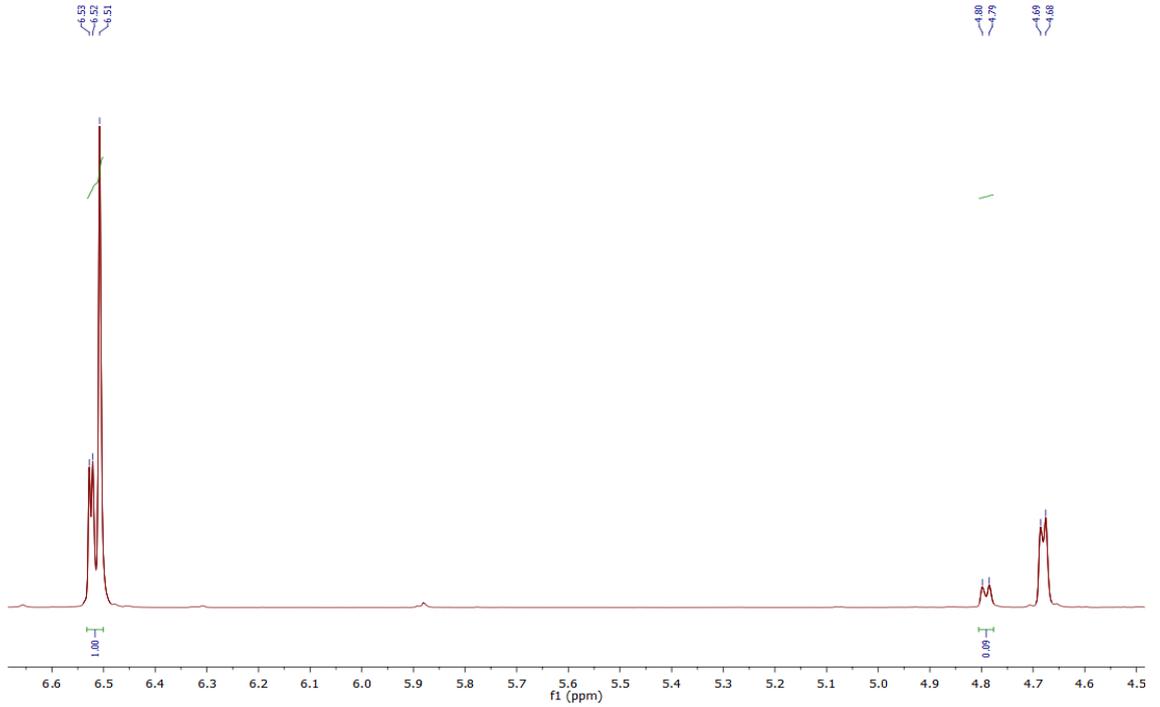


Figura 8. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) na região de 3,50 – 4,50 ppm – OD-1

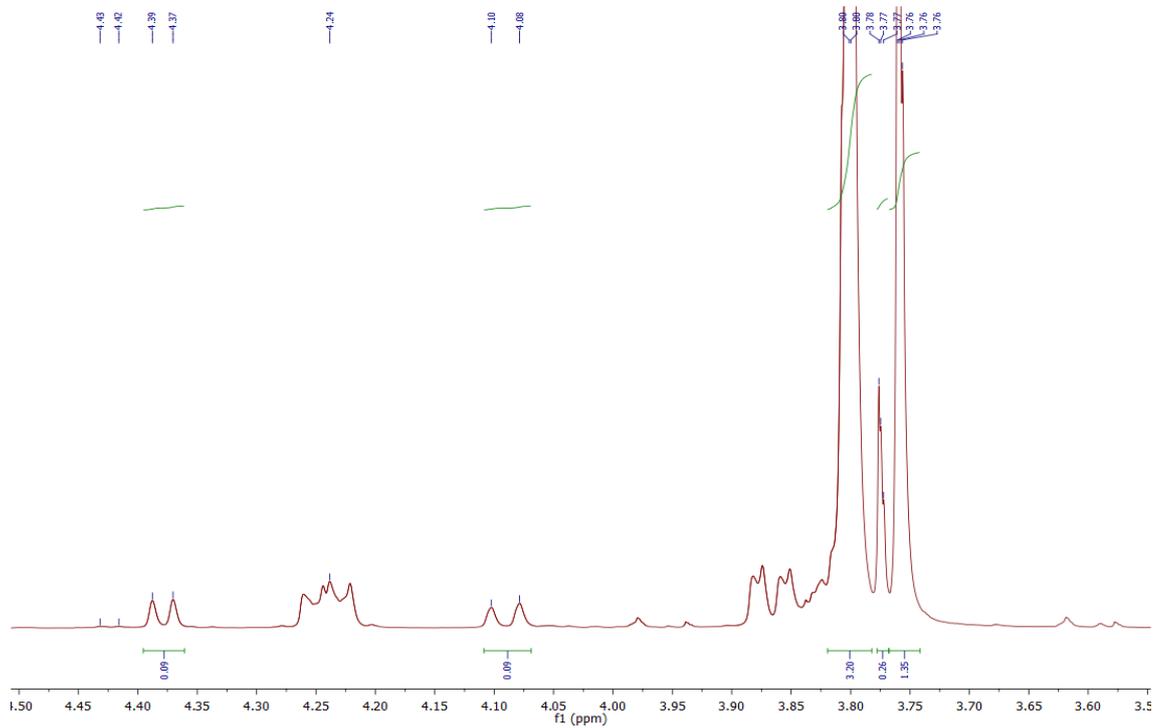


Figura 9. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) na região de 1,0 – 3,40 ppm – OD-1

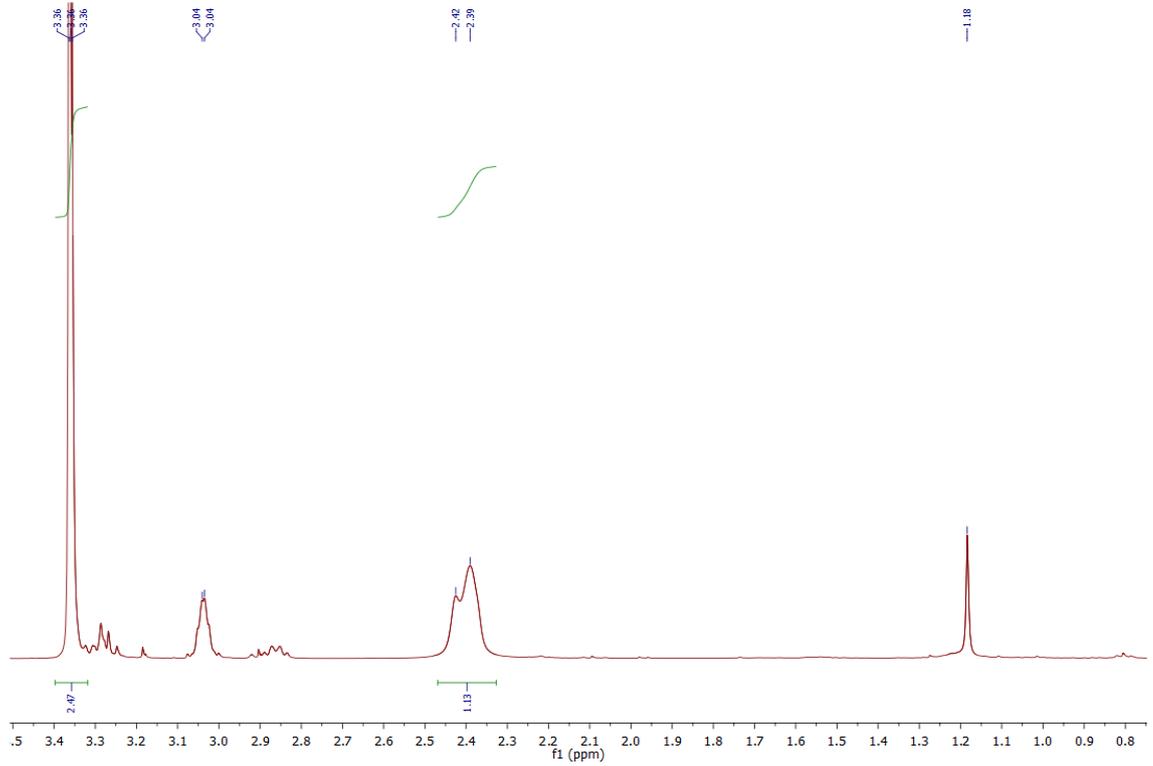
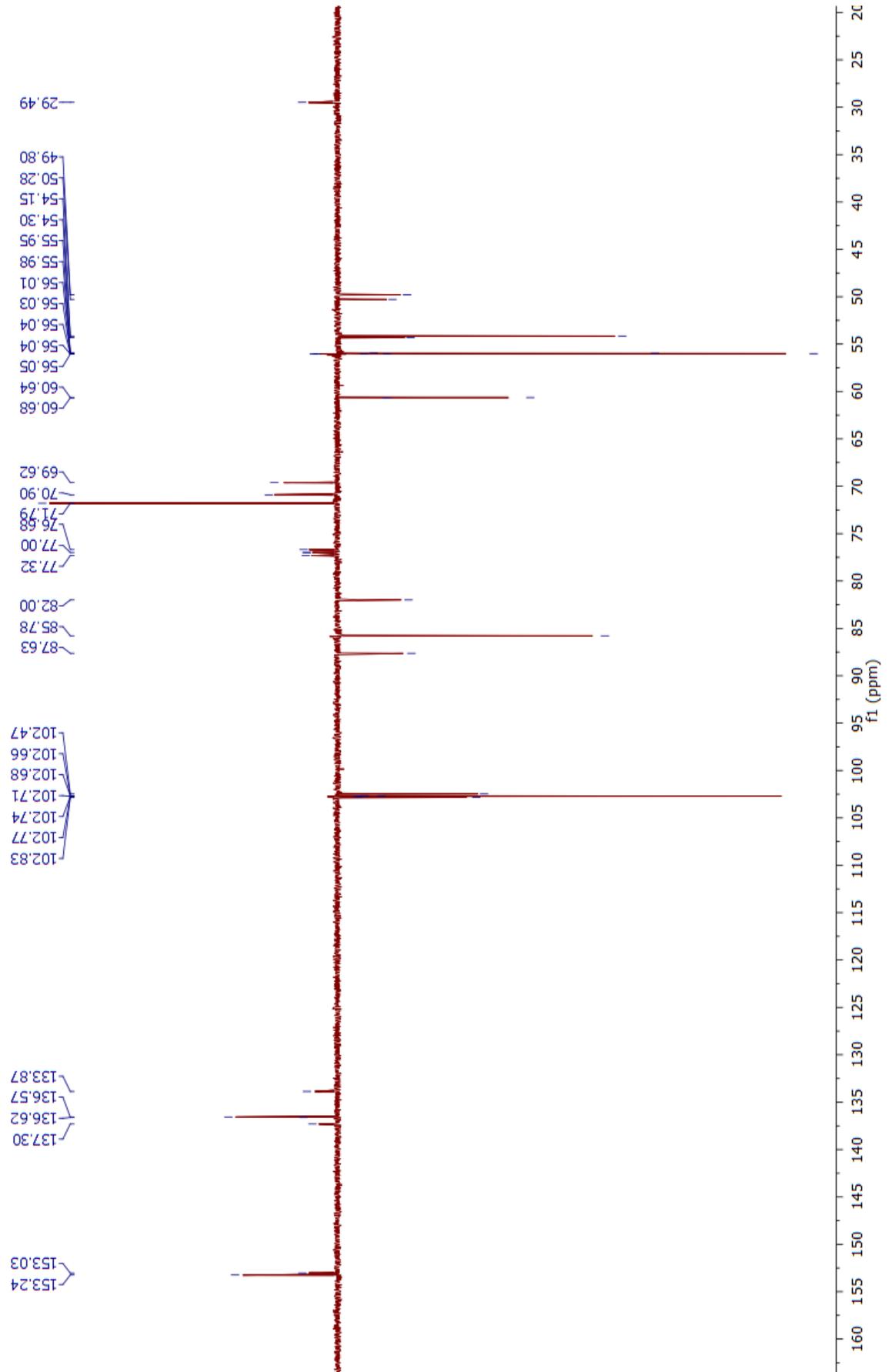


Figura 10. Espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz, CDCl_3)- OD-1

5.2.2 Identificação estrutural de OD-2

A substância OD-2 foi isolada na forma de um pó amorfo castanho com 8 mg. Através dos dados espectroscópicos e por comparação na literatura (Teles, 2016), foi possível sugerir a OD-2 como sendo um flavonoide, a Epicatequina (Tabela 11, Figura 11 a 16), cujo isolamento já foi relatado na espécie *O. gardneri* no estudo realizado por este mesmo autor, utilizando a fase acetato obtida a partir do extrato etanólico bruto desta planta. Esta substância foi isolada a primeira vez na espécie *O. duckei*

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C (400 e 100 MHz, MeOD) de OD-2 (Epicatequina) em comparação aos dados obtidos por TELES, 2016, nas mesmas condições.

	OD-2		Epicatequina (TELES, 2016)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2	4,57 (s, H)	79,89	4,803 (s, 1H)	79,8
3	4,18 (s, H)	67,50	4,165 (s, 1H)	67,5
4^a	2,76	29,27	2,862 (dd, $J=16,8$ e $4,4$ Hz, 2H)	29,3
4^b	2,65 dd		2,715 (dd, $J=16,8$ e $4,4$ Hz, 1H)	
5	-		-	158,0
6	5,94 (d, 1H)	96,39	5,928 (d, $J=2,4$ Hz, 1H)	96,3
7	-		-	157,3
8	5,92 (d, 1H)	95,89	5,905 (d, $J=2,2$ Hz, 1H)	95,9
9	-		-	157,6
10	-		-	100,0
1'	-	132,24	-	132,3
2'	6,98 (d, 1H)	115,31	6,964 (d, $J=1,6$ Hz, 1H)	115,3
3'	-		-	145,7
4'	-		-	145,9
5'	6,81- 6,75 (m, 2H)	115,83	6,7777-6,761 (m, 2H)	115,9
6'	6,81- 6,75 (m, 2H)	119,34	6,7777-6,761 (m, 2H)	119,4

Figura 11. Epicatequina (OD-2)

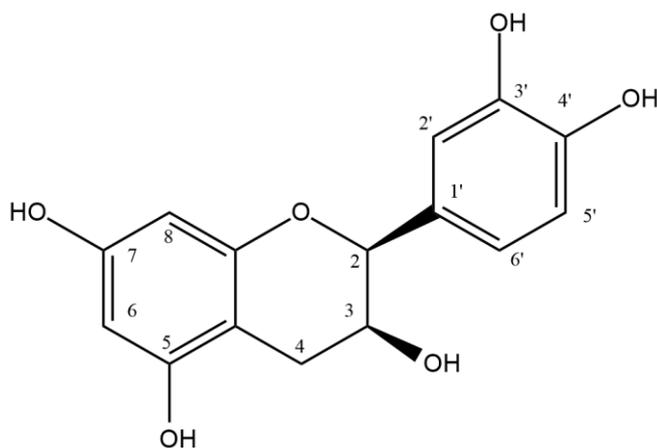


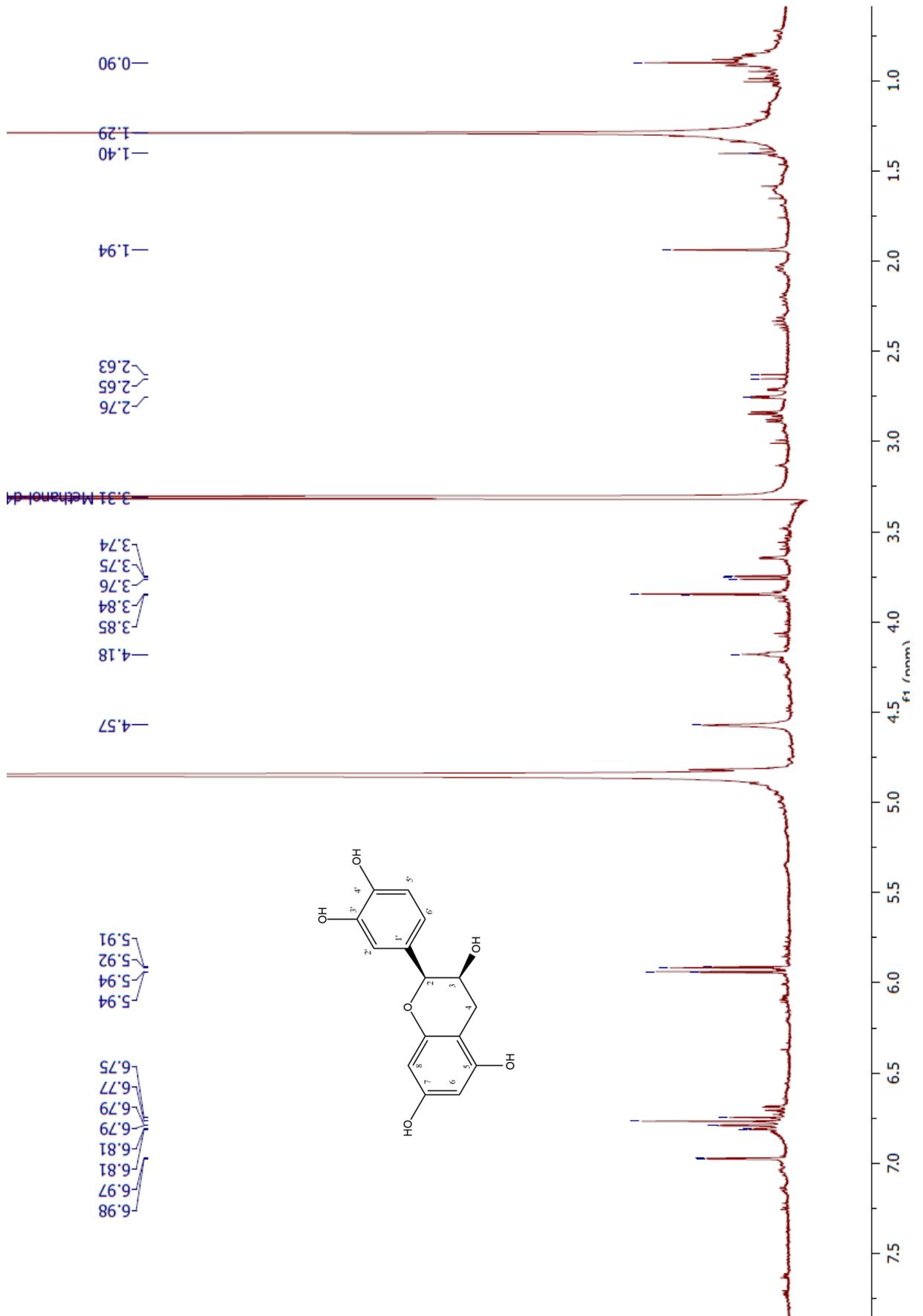
Figura 12. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância OD-2.

Figura 13. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de OD-2 na região de 5,85 – 7,00 ppm.

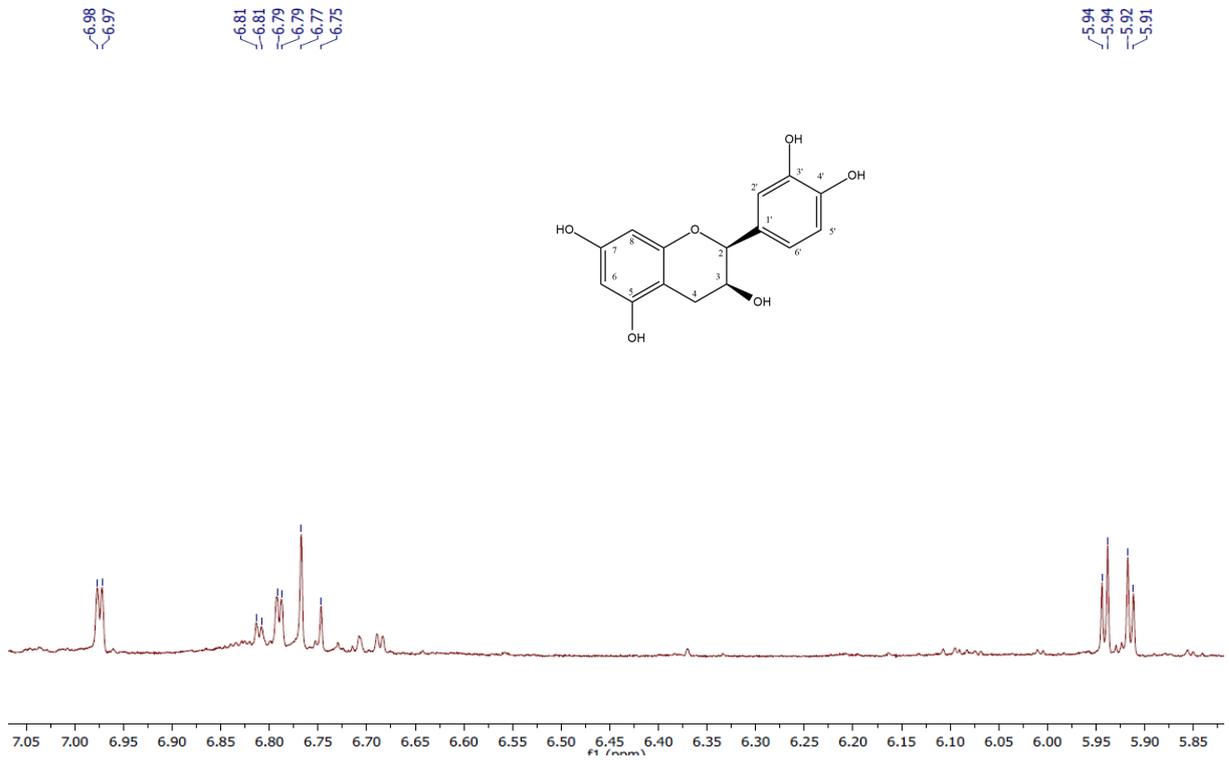


Figura 14. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de OD-2 na região de 3,70 – 4,65 ppm.

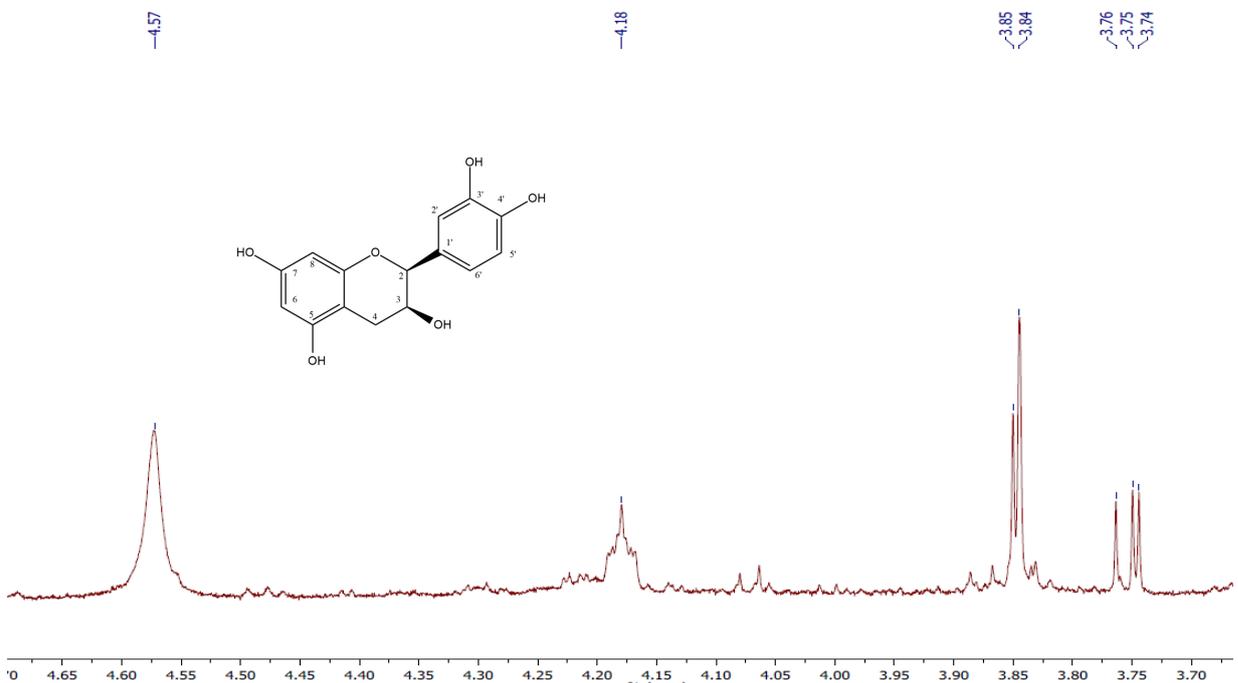


Figura 15. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de OD-2 na região de 1,80 – 3,00 ppm.

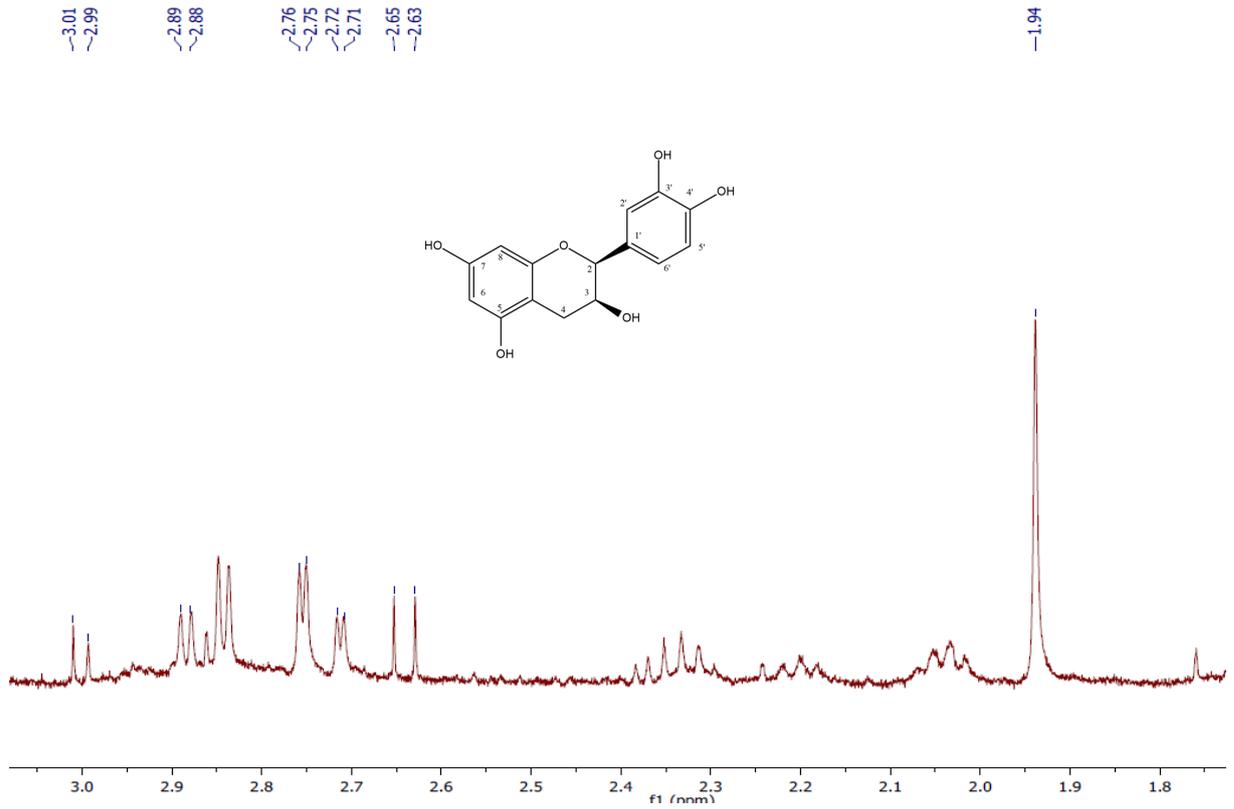
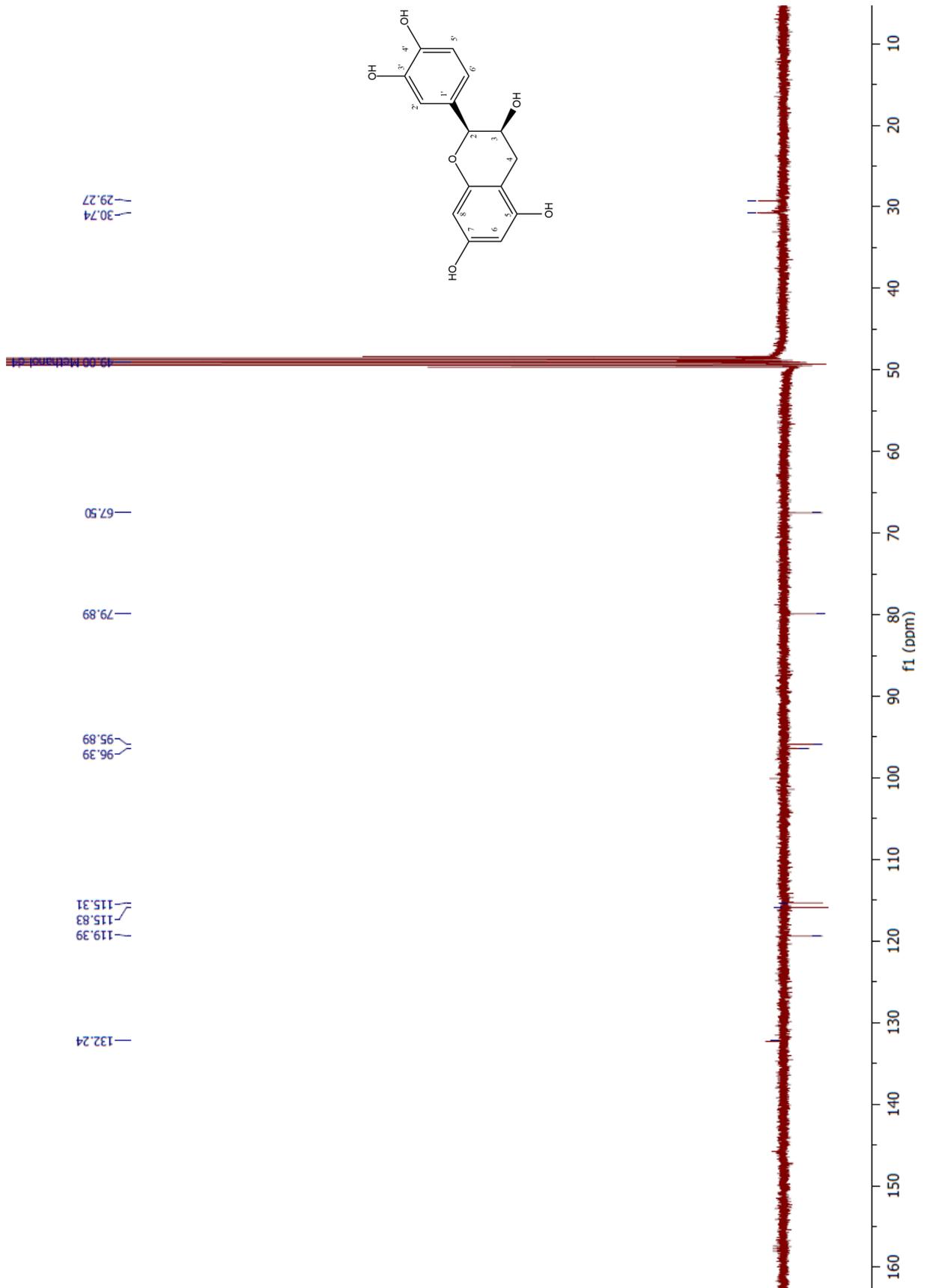


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz, CDCl_3) de OD-2

5.2.3 Identificação estrutural de OD-3, OD-4 e OD-5

O composto OD-3 foi isolado com um aspecto oleoso. O espectro de massa mostrou um $[M]^+ m/z$ 385, correspondendo à fórmula proposta $C_{23}H_{31}NO_4$.

O espectro de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) mostrou dois singletos em $\delta = 6,70$ e $6,12$ e um sistema AA'BB' em $\delta = 6,94$ e $6,71$ ($J_{AB} = 8,4$ Hz) na região aromática, característica da tetrahydrobenzylisoquinolina substituído em 6, 7, 12. Outros sinais significativos incluíram dois singletos a $\delta = 1,24$ para 3H ($2CH_3$), dois multipletos a $\delta = 3,59$ (H-1') e $\delta = 2,67$ (H-2') para 2H ($2CH_2$), suportados por um sinal quaternário C a $\delta = 70,0$ ppm (APT, DEPT) e os sinais em $\delta = 57,0$ e $64,5$ ($-CH_2-CH_2-$) ppm.

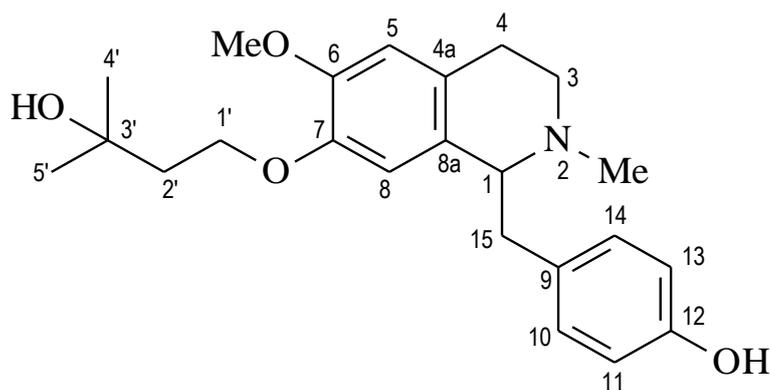
O espectro de RMN ^{13}C identificou a presença de um substituinte prenil. O deslocamento relativamente baixo em $\delta = 57,0$ ppm para C2' ($-CH_2-$) sugeriu um efeito de desproteção ($2CH_3$ e OH anexado ao C3'). Foram observados outros sinais a $\delta = 3,80$ (MeO) e a $\delta = 2,66$ (NMe). A localização do grupo MeO no C-6 foi atribuída pelo espectro HMBC a partir do seu acoplamento $^1H-^{13}C$ de longo alcance entre δ_H 3,80 (CH_3O-) e δ_C 148,8 (C6).

A atribuição completa de todos os prótons e átomos de carbono da OD-3 se encontra na Tabela 12, onde foi possível identificar um alcaloide, denominada Ocoteaduckeina A (Figura 17), sendo este ainda não descrito na literatura.

Tabela 12. Dados espectrais de ^1H e ^{13}C , em CDCl_3 a 500 e 125 MHz da OD-3. Deslocamentos químicos em δ (δ_{C} e δ_{H} e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz.

	$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC-}^1J_{\text{CH}}$		$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC-}^nJ_{\text{CH}}$	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
4a	124,5	-		H-8
6	148,8	-	H-5	H-8; MeO-6
7	145,9	-	H-8	H-5
8a	127,6	-	H-1	H-5
9	129,6	-		2H-11,13
12	157,5	-	2H-11,13	2H-10,14
3'	70	-	2H-2'; 3H-4'; 3H-5'	
1	66,2	4,03 (t, $J = 13,0$ e 5,5 Hz)	2H-15	H-8; NMe
5	112,7	6,70 (s)		
8	115,9	6,12(s)		
10,14	131,9	6,94 (d, $J = 8,4$ Hz)		2H-15
11,13	116,5	6,71 (d, $J = 8,4$ Hz)		
15	40,7	3,15 (dd, $J = 13,0$ e 5,5 Hz)	H-1	2H-10,14
		2,88 (dd, $J = 13,0$ e 7,8 Hz)		
3	47,4	2,98 (m)		NMe
		3,38 (m)		
4	24,9	2,82 (m)		H-5
		2,94 (m)		
1'	64,5	3,59 (m)		
2'	57,0	2,67 (m)		3H-4'; 3H-5'
MeO-6	56,3	3,81 (s)		
4'	29,7	1,24 (s)		2H-2'
5'	29,7	1,24 (s)		2H-2'
MeN-2	41,8	2,66 (s)		H-1

Figura 17. Ocoteaduckeina A (OD-3)



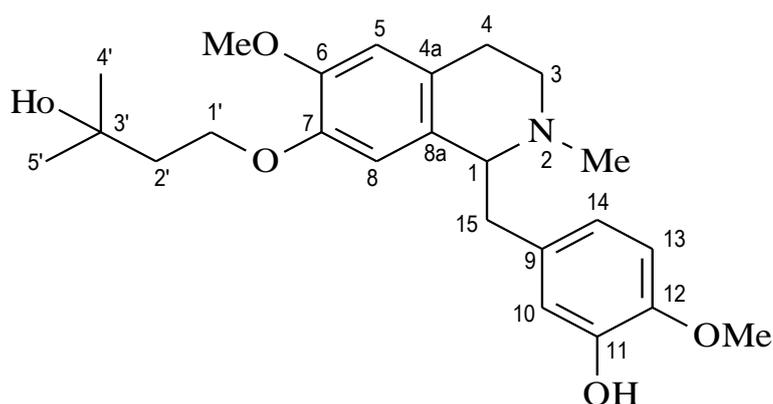
O composto OD-4 foi obtido com um aspecto oleoso. Seu espectro de massa mostrou um $[M]^+ m/z$ 415, correspondendo à fórmula $C_{24}H_{33}NO_5$. Diferentemente de OD-3, apresentou no espectro de RMN 1H um singuleto a $\delta = 3,83$ integrandos para três hidrogênios e sistema ABX a $\delta = 6,67$ (H-10), $\delta = 6,86$ (H-13), $\delta = 6,60$ (H-14), ($J_{ABX} = 8,2$ e $1,8$ Hz) indicando que o anel C foi trissubstituído. O HMBC mostrou correlações entre os sinais em $\delta_H = 3,38$ (CH_3O-12) e $\delta_C = 148,8$ (C-12), consistentes com o OCH_3 conectado a essa posição.

A atribuição completa de todos os prótons e átomos de carbono da OD-4 se encontra na Tabela 13, onde foi possível identificar um outro alcaloide, denominada Ocoteaduckeina B (Figura 18), sendo este ainda não descrito na literatura.

Tabela 13. Dados espectrais de ^1H e ^{13}C , em CDCl_3 a 500 e 125 MHz, da OD-4. Deslocamentos químicos em δ (δ_{C} e δ_{H} e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz.

	$^1\text{H}-^{13}\text{C}\text{-HSQC}-^1J_{\text{CH}}$		$^1\text{H}-^{13}\text{C}\text{-HMBC}-^nJ_{\text{CH}}$	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
4a	122,9	-		H-8
6	149,3	-	H-5	H-8; MeO-6
7	146,4	-	H-8	H-5
8a	125,7	-		H-5
9	130,5	-	2H-15	H-13
11	148,5	-	H-10	H-13
12	148,8	-		H-10; H-14; MeO-12
3'	70,9	-	2H-2'; 3H-4'; 3H-5'	
1	66,2	4,28 (t, $J = 6,0$ Hz)	2H-15	H-8; NMe
5	112,5	6,75 (s)		
8	115,5	6,21 (s)		
10	117,5	6,67 (sl)		H-14; 2H-15
13	112,7	6,86 (d, $J = 8,2$ Hz)		
14	122,1	6,60 (dl, $J = 8,2$ Hz)		H-10; 2H-15
15	40,8	3,17 (dd, $J = 14,0$ e 5,2 Hz)		
		2,98 (m)		
3	47,3	3,20 (m)		NMe
		3,50 (m)		
4	25,1	2,97 (m)		H-5
		3,02 (m)		
1'	64,5	3,59 (m)		
2'	57,2	2,67 (m)		3H-4'; 3H-5'
MeO-6	56,5	3,84 (s)		
MeO-12	56,6	3,83 (s)		
4'	29,6	1,26 (s)		2H-2'
5'	29,6	1,26 (s)		2H-2'
MeN-2	41,9	2,80 (s)		H-1

Figura 18. Ocoteaduckeina B (OD-4)

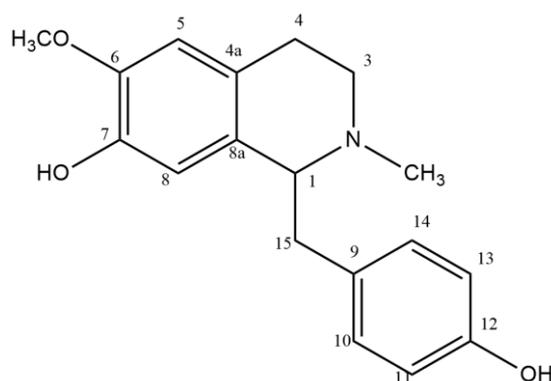


O composto OD-5 foi isolado na forma de pó amorfo acastanhado com 8 mg. O espectro de massa mostrou um $[M]^+ m/z$ 300, correspondendo à fórmula proposta $C_{18}H_{21}NO_3$. Através dos dados espectroscópicos foi possível identificar a OD-5 como a N-metilcoclorina (Figura 19, Tabela 14), que pertence ao grupo dos alcaloides verdadeiros derivado do aminoácido L-tirosina, pertencente a subclasse dos benziltetrahydroisoquinolinos, que são formados a partir da reação de dopamina com o 4-hidroxifenilacetaldeído por meio de uma reação de Mannich, com reações de N e O-metilação; e oxidação (Dewick, 2009). Esta substância já foi descrita em *Aniba muca* (Bravo et. al., 1996) e *Licaria puchury-major* (Wan e Hakimi, 2016), *Ocotea lancifolia* (Fournet et. al., 2007), espécies pertencentes a família Lauraceae. Seu isolamento foi relatado pela primeira vez na espécie *O. duckei*.

Tabela 14. Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) de N-metilcoclaurina e coclaurina, em CDCl_3 e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos em δ e constantes de acoplamento (J , entre parênteses).

	^1H - ^{13}C -HSQC- $^1J_{\text{CH}}$		^1H - ^{13}C -HMBC- $^nJ_{\text{CH}}$		N-metilcoclaurina	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
4a	126,3	-	2H-4	H-3a	125,3	-
6	147,0	-			145,8	-
7	146,0	-		H-5	143,8	-
8a	132,2	-		H-5	128,6	-
9	130,2	-	2H-15	2H-11,13	129,4	-
12	157,3	-		2H-10,14	155,4	-
NAC	-	-			-	-
1	57,5	4,29 (dd, $J = 3,2$ e $9,2$ Hz)	H-15b	2H-3	64,0	
5	112,7	6,76 (s)			111,2	6,48 (s)
8	114,5	7,28 (s)			112,4	6,66 (s)
10,14	131,0	7,15 (d, $J = 8,6$ Hz)		2H-15	130,1	6,95 (d, $J = 8,6$ Hz)
11,13	116,2	7,30 (d, $J = 8,6$ Hz)			115,4	6,67 (d, $J = 8,6$ Hz)
3	41,4	2,90-2,80 (m) 3,21 (m)			45,9	
4	30,1	2,90-2,60 (m)		H-5	24,4	
15	42,4	3,33 (dd, $J = 3,6$ e $13,8$ Hz) 3,00 (dd, $J = 9,4$ e $13,8$ Hz)			40,0	
MeO-6	55,8	3,75 (s)			55,5	3,70 (s)
MeO-7	-	-			-	-
NMe	-	-	-		41,7	2,32 (s)

Figura 19. N-metilcoclaurina (OD-5)

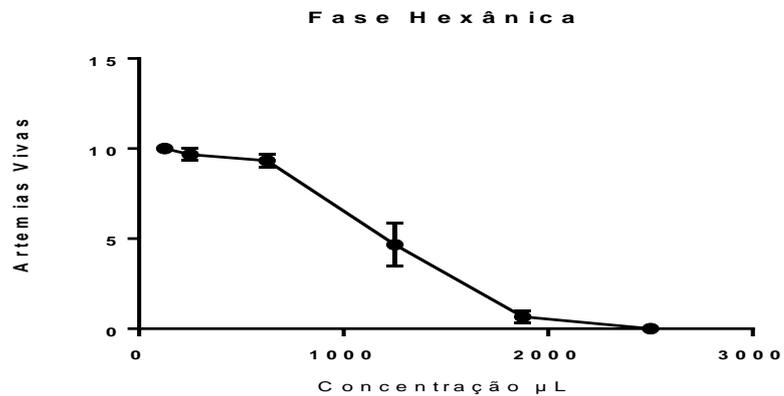


5.3 Bioensaio com *Artemia salina* Leach

Os valores de CL_{50} foram calculados através da expressão dos resultados como uma percentagem dos controles, sendo determinados graficamente a partir da curva de concentração-resposta por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%.

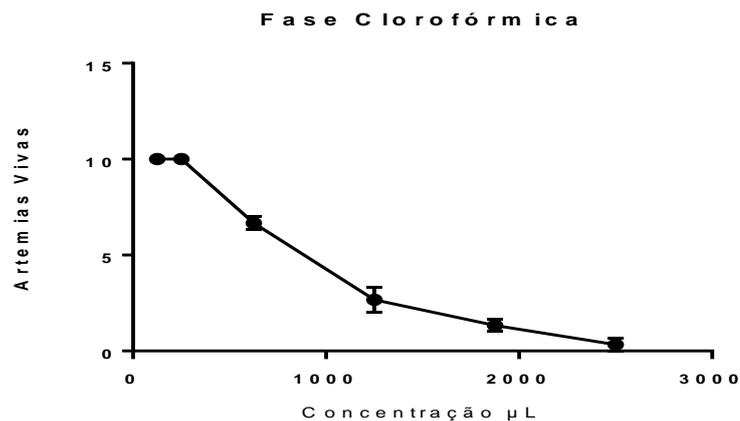
O valor da CL_{50} do fase hexânica de *O. duckei* foi de 1241 (1097-1501) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, como mostra o Gráfico 1.

Gráfico 1. Concentração letal média (CL_{50}) da fase hexânica de *O. duckei*.



O valor da CL_{50} do fase clorofórmica de *O. duckei* foi de 831,7 (699,9 - 1111) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, como mostra o Gráfico 2.

Gráfico 2. Concentração letal média (CL_{50}) da fase clorofórmica de *O. duckei*.



A determinação da CL₅₀ realizada por meio do uso de metanúplios de *A. salina* Leach fornece um indicativo do nível de toxicidade de uma determinada substância, além de apresentar uma boa correlação com testes de atividade antitumoral (Carballo et al., 2002), inseticida (Meyer et al., 1982; Mclaughlin, Rogers & Anderson, 1998) e anti-Trypanosoma cruzi (Alves et al., 2000) para substâncias que possuem o CL₅₀ < 1000 µg/mL.

De acordo com a literatura, resultados menores que 100 µg mL⁻¹ apontam como sendo um produto altamente tóxico, entre 100 a 500 µg mL⁻¹ indicam uma toxicidade moderada, entre 500 a 1000 µg mL⁻¹ baixa toxicidade e acima de 1000 µg mL⁻¹ representam uma amostra atóxica (Souza et.al., 2015).

Observou-se que o valor da CL₅₀ da fase hexânica representa uma amostra atóxica (CL₅₀ > 1000 µg mL⁻¹) e a fase clorofórmica possui uma baixa toxicidade (CL₅₀ 500 a 1000 µg mL⁻¹). Entretanto, isto não significa que estas fases sejam menos tóxicas, pois a toxicidade pode estar relacionada com compostos termo ou fotosensíveis, que não foram detectados por este método (Souza et.al., 2015).

Alguns estudos frente ao bioensaio com *Artemia salina* com espécies do gênero *Ocotea* foram realizados. Em Araújo (2012), as frações clorofórmio, acetato de etila e remanescente hidroalcoólica das folhas de *Ocotea pulchella* apresentaram atividade tóxica capaz de provocar mortalidade do microcrustáceo, sugerindo bioatividade. Um estudo utilizando os frutos da espécie *Ocotea heterochroma* demonstrou que a atividade para o extrato bruto etanólico, fração butanoica e fração benzeno foi considerada com boa bioatividade (Cuca et al., 2009).

Silva (2010) realizou um estudo biomonitorado do extrato bruto da folha, casca e frutos de várias espécies. A espécie *Ocotea minarum* não apresentou bioatividade para os extratos da folha e da casca, porém apresentou alta toxicidade para os frutos da espécie com CL₅₀ de 263,53 µg/mL. A espécie *Ocotea suaveolens* não apresentou toxicidade do extrato bruto das folhas e do caule, enquanto a espécie *Ocotea velloziana* apresentou atividade tóxica com uma CL₅₀ de 555,94 µg/mL para o extrato bruto da casca. Garrett e colaboradores (2007) realizaram um bioensaio com o óleo essencial de *Ocotea notata* tendo sua CL₅₀ de 2,73 µg/mL, sendo considerado extremamente tóxico.

Valores encontrados de DL₅₀ 103,27 para *O. catharinensise* e DL₅₀ 108,3 para *O. odorifera* indicam potencial tóxico para os extratos testados. Esses resultados sugerem que a considerável toxicidade encontrada pode estar relacionada aos grupos

de metabólitos secundários revelados nos extratos, uma vez que tais grupos demonstram grande potencial farmacológico (Meira, 2012).

De acordo com Betim 2016, a espécie *O. nutans*, apresentou níveis de toxicidade significativos nos extratos brutos cetônicos, frações e óleo essencial, ficando somente as frações residuais fora da classificação de toxicidade. Merecem destaque o extrato bruto da folha, fração hexânica do caule e o óleo essencial por se enquadrarem em altamente tóxica e por possivelmente possuírem potencial para atividades biológicas que demandem componentes tóxicos.

5.4 Validação do método analítico

De acordo com a análise cromatográfica, a substância OD-1 (padrão), representam a IAN (Pico 1) e EPI-IAN (Pico 2), lignoides majoritários da *O. duckei*, identificados pelas injeções anteriores dessas substâncias na literatura (Barbosa 1999; Leal, 2012).

No início do desenvolvimento cromatográfico, avaliou-se a força eluotrópica do solvente orgânico metanol e ácido fórmico a 1% e sua influência na retenção dos analitos, assim, permitindo um direcionamento no desenvolvimento do método. O cromatograma da fração padrão (IAN e EPI-IAN) (Figura 20a) foi feito em uma coluna analítica Phenomenex, Gemini NX 5U C18 110A, Part No: 006- 4454-EO, 250 mm x 4,60 mm, de modo que a fase móvel consistiu em Metanol/ Ácido fórmico a 1% (70:30), bombeado a 0,8 mL/min em modo isocrático, com volume de injeção foi de 20 µL e comprimento de onda de 218 nm, com o forno ajustado a 40°C. Foi possível observar só um pico com tempo de retenção em 5 minutos, relativo à sobreposição dos picos da iangambina e epi-iangambina. Como os picos estavam sobrepostos, foi alterado a proporção dos solventes, Metanol/ Ácido fórmico a 1% (60/40), mas os picos ainda estavam saindo sobrepostos.

A fim de alcançar tempo de retenção, seletividade e resolução adequadas para as duas lignanas. a próxima etapa consistiu em alteração no sistema do solvente. No cromatograma da fração padrão (IAN e EPI-IAN), na mesma coluna analítica, a fase móvel consistiu em Acetonitrila: Água (50:50), bombeado a 1 mL/min em modo isocrático, o volume de injeção foi de 20 µL, comprimento de onda foi de 218 nm e o forno foi ajustado a 40°C. Foi possível observar que há uma maior separação dos componentes da fração, com distinção entre os dois picos dos epímeros, entretanto,

ainda se encontram com resolução insatisfatória e tempos de retenção alto (29 min e 31 min) (Figura 20b). Alterando apenas o bombeamento para 1,5 mL/min, foi possível observar a diminuição no tempo de retenção (13:30 min e 15:30 min) e alterando o bombeamento para 1,25 mL/min, foi possível observar outros tempos de retenção (14:30 min e 16:30 min).

Foi realizada uma nova alteração de solvente. No cromatograma da fração padrão (IAN e EPI-IAN), na mesma coluna analítica, a fase móvel consistiu em Acetonitrila: Água e Fosfato de sódio monofásico (50:50), bombeado a 1,2 mL/min em modo isocrático, o volume de injeção foi de 20 µL, comprimento de onda foi de 218 nm e o forno foi ajustado a 40°C. Foi possível observar uma baixa separação dos picos (6 min) (Figura 20c).

Uma alteração na coluna cromatográfica foi necessária para melhorar a reprodutibilidade do método. O cromatograma da fração padrão (IAN e EPI-IAN) (Figura 19d) foi feito em uma coluna analítica C18 NST 18, 120A-253905, 250 mm x 3,9 mm, com tamanho de partícula de 5 µm (NST), de modo que a fase móvel consistiu em Acetonitrila/ Água (50:50), bombeado a 1,25 mL/min em modo isocrático, com volume de injeção foi de 20 µL e comprimento de onda de 218 nm. Foi possível observar os dois picos com tempo de retenção em 9:06 e 10:40 minutos, relativo aos picos da IAN e EPI-IAN, respectivamente (Figura 20d). Porém, a resolução dos picos não foi satisfatória.

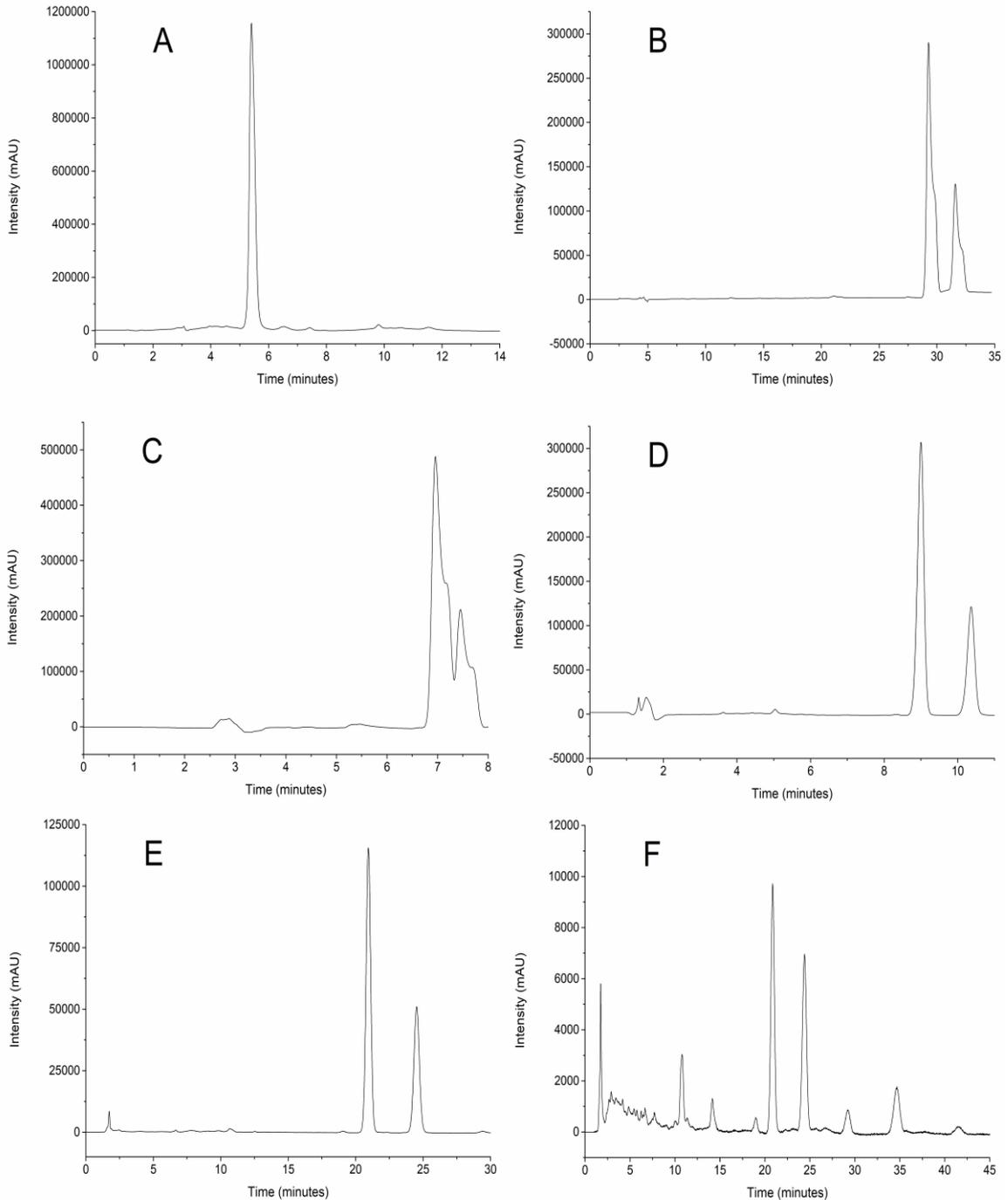
Foram realizadas algumas alterações para melhoria do método. A primeira foi o bombeamento para 1,00 mL/min, os picos foram observados em tempo de retenção de 11 e 13 min. A segunda alteração foi na proporção do solvente, para Acetonitrila/ Água (60:40), com tempo de retenção de 6:23 e 6:92 min. A terceira foi alteração do solvente para Acetonitrila/ Água (45:55) e bombeamento para 1 mL/min. Os tempos de retenção dos picos foram de 17 e 20 min para IAN e EPI-IAN, respectivamente. Este método se mostrou reprodutível e com uma boa resolução dos picos, porém a pressão da bomba estava aumentada.

Uma vez que o aumento do fluxo gera maior pressão na coluna e equipamento, o que pode reduzir sua vida útil com análises frequentes, foi necessário fazer mais uma alteração, com o intuito de diminuição do bombeado para 0,8 mL/min. Isso resultou em um tempo de retenção aumentado para 22 e 26 min (Figura 20e). Apesar disso, o método se mostrou o mais satisfatório, por possuir uma ótima

reprodutibilidade, uma boa resolução dos picos e manter a pressão da bomba boa e estável.

Em seguida, o método foi avaliado com a amostra EEB (Figura 20f). Pode-se observar que a boa resolução da IAN e EPI-IAN foi mantida na presença dos demais constituintes da amostra, tornando assim esse método escolhido para a validação do método (Coluna analítica: C18 NST 18, 120A-253905, 250 mm x 3,9 mm, tamanho de partícula de 5 μm (NST); Fase móvel: Acetonitrila e água, 45% e 55%. Bombeamento: 0,80 mL/min; Modo isocrático; Volume de injeção: 20 μL ; Comprimento de onda: 218 nm; Forno: 40°C).

Figure 20. Chromatograms of Standard (YAN) on Gemini NX 5U C18 110A Column in Methanol: 1% Formic Acid (70:30) (a); Acetonitrile: Water (50:50) (b); Acetonitrile: Water and Phosphoric Acid (50:50) (c). Standard chromatogram (YAN) on C18 NST 18 column in Acetonitrile: Water (50:50) flow rate 1.25 mL/min (d); Acetonitrile: Water (45:55) flow rate 0.8 ml/min (e); Chromatograms of CEE sample on C18 NST 18 column in Acetonitrile: Water (45:55) flow 0.8 mL/min (f).

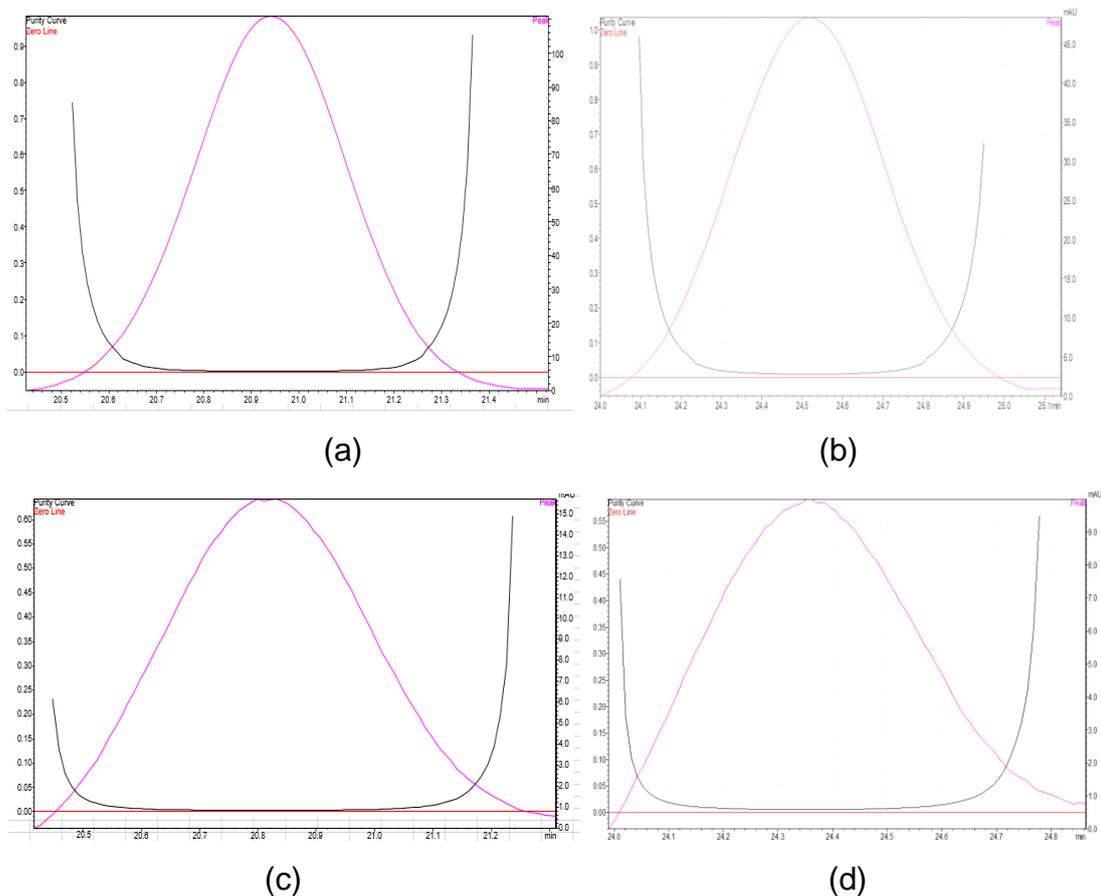


5.4.1 Seletividade

A Seletividade demonstra a capacidade de identificação ou quantificação do analito de interesse, através da presença de componentes potencialmente introduzidas na amostra sem equívocos. (Brasil, 2017).

A seletividade do método foi constatada pela pureza de pico da IAN e EPI- IAN, verificada pelo detector DAD. Dessa forma, o método desenvolvido junto a um bom preparo de amostra possibilitou uma menor presença de interferentes, além de aumentar a vida útil da fase estacionária. O espectro UV da IAN e EPI- IAN a partir do detector DAD é representado na Figura 21.

Figura 21. Espectro de UV do padrão IAN de 15 $\mu\text{g/ml}$ (a); padrão EPI- IAN de 15 $\mu\text{g/ml}$ (b); marcador IAN (c) e EPI- IAN (d) presente na amostra de EEB de 20 $\mu\text{g/ml}$ em coluna C18 NST 18 em ACN: Água (45:55) fluxo de 0,8 L/min.



5.4.2 Adequabilidade

O teste de adequabilidade é uma parte integrante de muitos procedimentos analíticos e baseia-se no conceito de que todos os fatores envolvidos em uma análise constituem um sistema integral que pode ser avaliado como tal. Em análises de cromatografia líquida, os testes de adequabilidade do sistema representam a garantia de que tanto o equipamento quanto o método validado estão de acordo com seus requisitos. Dessa forma, podem ser aplicados com a finalidade de verificar se a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico estão adequadas para as análises a serem realizadas. Nesses casos, são avaliados os parâmetros cromatográficos de resolução, repetibilidade do sistema, eficiência da coluna e fator de cauda (ICH, 2005, Dong, 2006; British 2010).

Os resultados dos testes de adequabilidade do Sistema (Tabela 15) estão de acordo com as recomendações do US Food and Drug Administration, no qual, para que o sistema seja considerado apto, os picos de interesse devem possuir resolução superior a 2,0, pratos teóricos superior a 2.000 e fator de cauda entre 0,5 e 2,0.

Tabela 15. Adequabilidade da IAN e EPI-IAN de 15 µg/ml e dos marcadores presente na amostra de EEB de 20 µg/ml em coluna C18 NST 18 em Acetonitrila/ Água (45:55) fluxo de 0,8 mL/min.

	TR	PT	FC	Pureza	R1	R2
Padrão (IAN)	20.955	14414.878	1.080	1.000	0.000	5.5130
Padrão (EPI-IAN)	24.858	14601.278	1.052	0.999	5.5130	
IAN na amostra de EEB	20.809	12834.923	0.991	0.999	2.855	4.435
EPI-IAN na amostra de EEB	24.344	12831.493	0.977	0.998	4.435	5.649

*TR= Tempo de Retenção; PT= Pratos Teóricos; FC= Fator de Cauda; R= Resolução

5.4.3 Linearidade, LOD e LOQ

A resposta dos marcadores IAN e EPI-IAN foram proporcionais as suas concentrações. A IAN e a EPI-IAN apresentaram uma linearidade satisfatória para o método na faixa de 5 – 25 µg/mL (Tabela 16). A equação da curva e o coeficiente de

correlação da IAN e da EPI-IAN foram de $y = 291007x - 106157$ e $R^2 = 0,9952$ e de $y = 287650x - 91340$ e $R^2 = 0,9952$, respectivamente (Gráfico 3 e 4).

Os limites de detecção e de quantificação foram de 1,19 e 3,97 $\mu\text{g/ml}$ para IAN e 0,74 e 2,46 $\mu\text{g/ml}$ para EPI-IAN, demonstrando que o método é sensível para detectar e quantificar os marcadores IAN e EPI-IAN.

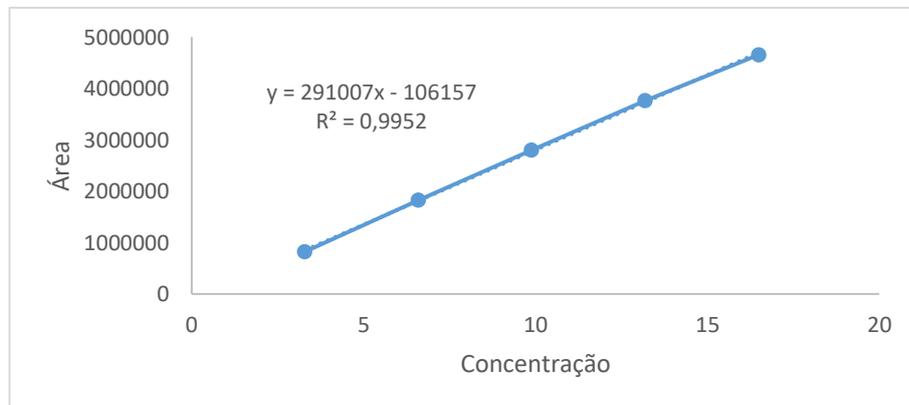
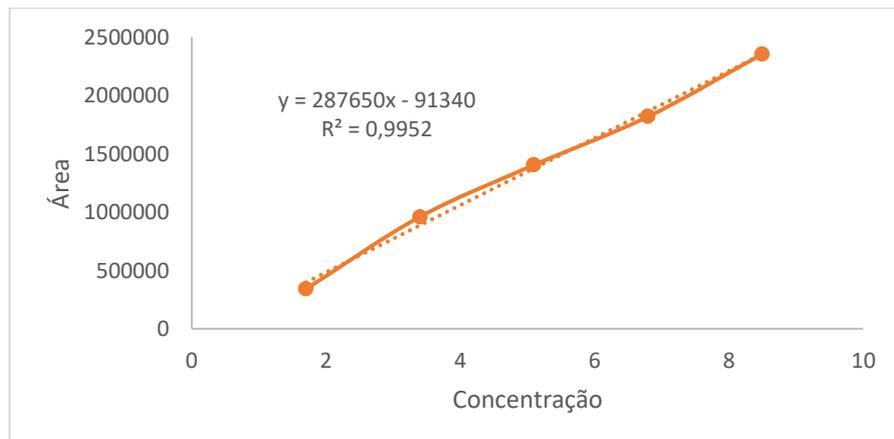
A linearidade é outro aspecto importante da validação. Ela valida que o método produz uma resposta proporcional à concentração do analito, permitindo uma quantificação precisa em diferentes níveis de concentração. Uma curva de calibração linear bem ajustada é essencial para obter resultados confiáveis em uma ampla faixa de concentração (Alvarenga, 2022).

A regressão linear é bem posta quando o seu coeficiente de correlação (R^2), se aproxima do valor unitário. A ANVISA recomenda valores de R^2 superiores a 0,99 enquanto o INMETRO, superiores a 0,90, na faixa de 80% a 120% (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018). Outros parâmetros constituem ponto de relevante interesse para análise de linearidade como o desvio-padrão e o desvio-padrão residual (DPR) dos dados coletados (Novaes et al., 2017).

O limite de detecção (LOD) consiste na menor quantidade do marcador presente no extrato que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado sob as condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação (LOQ), refere-se a menor quantidade do marcador presente no extrato, que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Em trabalhos de validação de metodologia analítica o LOD e LOQ são comumente obtidos com base nos parâmetros da curva analítica ou na razão sinal e ruído gerados nos equipamentos eletrônicos (Santos, 2018).

Tabela 16. Resultados da curva de calibração da IAN e EPI – IAN.

	Concentração	Area 1	Area 2	Area 3	Média
IAN	3,3	822056	833258	820453	825256
	6,6	1802545	1848311	1818995	1823284
	9,9	2745195	2746875	2919102	2803724
	13,2	3628509	3635992	4035212	3766571
	16,5	4517846	4689565	4758269	4655227
EPI- IAN	1,7	332658	348385	338548	339864
	3,4	865231	1024017	990499	959916
	5,1	1406990	1426520	1378666	1404059
	6,8	1798587	1835159	1824440	1819395
	8,5	2267996	2359973	2437486	2355152

Gráfico 3. Regressão linear das curvas de calibração (3,3 – 16,5 µg/mL) para IAN**Gráfico 4.** Regressão linear das curvas de calibração (1,7 – 8,5µg/mL) para EPI-IAN

5.4.4 Efeito matriz

O efeito matriz foi analisado para verificar se os componentes da amostra interferem no desempenho da medição do analito (INMETRO, 2020).

Após as análises, foi construído um gráfico relacionando a área do pico versus concentração para os padrões IAN e EPI-IAN e para a amostra fortificada.

Para a IAN a equação da curva e o coeficiente de correlação do padrão IAN e do EEB fortificado foram $y = 192065x - 102167$ e $r^2 = 0,9995$ e $y = 182587x - 103109$ e $r^2 = 0,9981$, respectivamente (Gráfico 5). O paralelismo das retas verificado pela comparação estatística dos coeficientes angulares a partir do teste T resultou no valor de P de 0,22305, demonstrando a não influência da matriz pela semelhança dos coeficientes angulares (Tabela 17).

Gráfico 5. Regressão linear das curvas de calibração para EEB fortificada -IAN

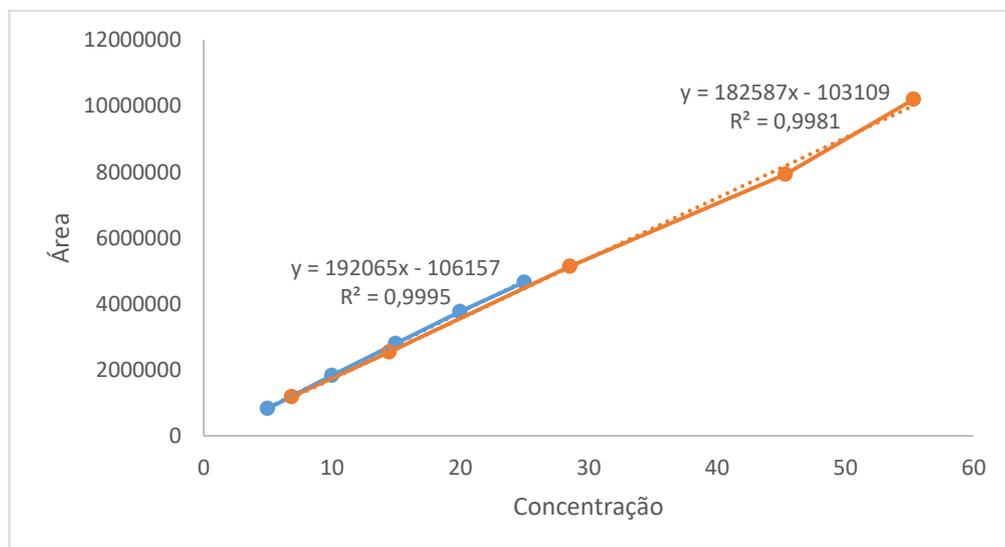


Tabela 17. Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes - IAN

	Variável 1	Variável 2
Média	189475,54	182587,87
Variância	58512169,65	141234974,65
Observações	3	3
Variância agrupada	99873571,83	
Hipótese da diferença de		
média	0	
gl	4	
Stat t	0,84	
P(T<=t) uni-caudal	0,22	
t crítico uni-caudal	2,13	
P(T<=t) bi-caudal	0,44	
t crítico bi-caudal	2,77	

Para a EPI-IAN a equação da curva e o coeficiente de correlação do padrão de EPI-IAN e EEB fortificado foram de $y = 100311x - 229975$ e $r^2 = 0,9979$ e $y = 97834x - 92037$ e $r^2 = 0,9951$ respectivamente (Gráfico 6). A partir do teste T resultou no valor de P de 0,1988 (Tabela 18).

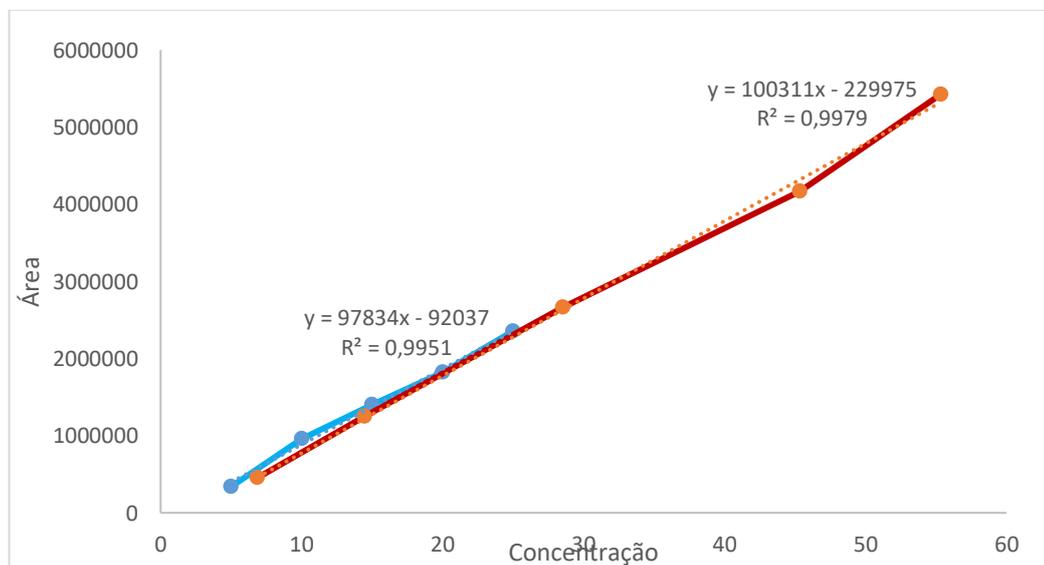
Gráfico 6. Regressão linear das curvas de calibração para EEB fortificada – EPI-IAN

Tabela 18. Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes – EPI-IAN

	Variável 1	Variável 2
Média	95490,52	100310,62
Variância	6616065,33	71241200,33
Observações	3	3
Variância agrupada	38928632,83	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	0,94	
P(T<=t) uni-caudal	0,19	
t crítico uni-caudal	2,13	
P(T<=t) bi-caudal	0,39	
t crítico bi-caudal	2,77	

Considera-se que para um teste-T seja adequado seu valor calculado para Stat t deve ser menor do que o valor obtido para t crítico bi-caudal. Como os valores de Stat t são menores do que o encontrado para bi-caudal, o teste estatístico encontra-se adequado para seu fim (Budske, 2022).

Deste modo, como as retas das curvas analíticas possuem coeficientes angulares estatisticamente iguais e paralelismo entre si, além de possuir também interceptos estatisticamente iguais, pode-se afirmar que não há efeito matriz no método proposto e a avaliação dos demais parâmetros analíticos do método podem ser avaliados sem a matriz, já que este parâmetro ficou nos conformes das diretrizes da ANVISA e INMETRO (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

5.4.5 Precisão e Exatidão

Precisão e exatidão são parâmetros para avaliar a confiabilidade e exatidão de um método analítico. A precisão mede a consistência dos resultados quando o mesmo teste é repetido em condições semelhantes. A exatidão, por outro lado, refere-se a quão próximos os resultados obtidos estão do valor real. Ambos são fundamentais para garantir resultados confiáveis e minimizar erros sistemáticos e aleatórios (ANVISA, 2017).

Os resultados da precisão intermediária e da exatidão dos marcadores IAN e EPI-IAN são mostrados na Tabela 19.

Tabela 19. Dados da Precisão e Exatidão da IAN e EPI-IAN

	Concentração (µg/mL)	IAN REC (%) / DP (%)	EPI- IAN REC (%) / DP (%)
Exatidão	5	98,15 / 5,59	65,36 / 8,07
	15	95,29 / 4,04	87,47 / 4,66
	25	94,03 / 3,04	91,65 / 4,99
Precisão	5	... / 5,59	... / 8,07
	15	... / 4,04	... / 4,66
	25	... / 3,04	... / 4,99

Rec = Recuperação; DP = Desvio padrão.

De acordo com os critérios de aceitação de repetibilidade recomendados pela AOAC (2002), a amostra pode ter um desvio padrão de até 11%. Os valores de exatidão determinados também se encontram dentro dos critérios estabelecidos a qual preconiza um intervalo de 80 a 110 % do valor nominal da concentração.

5.4.6 Robustez

A robustez é encontrada através da medida da capacidade de resistência de pequenas variações controladas dos parâmetros analíticos, podendo ser utilizado para espectrofotometria as variações de pH, temperatura ou diferentes fabricantes de solventes. O resultado indica a confiança do método durante sua aplicação (ANVISA, 2017).

Foram feitas alterações na proporção do solvente, marca da coluna, temperatura, fluxo e pH. Esses parâmetros foram escolhidos porque são alterações que podem ocorrer normalmente na rotina de um laboratório que vá utilizar essa metodologia validada.

Os valores de robustez e DPR para cada variação de método para amostra do IAN é mostrado na tabela 20.

Em todos os casos, a recuperação para a IAN foi adequada com valores na faixa de 94,27 a 105,30, com os valores de DPR menores que 10%, indicando que pequenas variações não interferiram no método, inclusive quando avaliou a recuperação comparando com uma outra coluna.

Dados reportados na literatura apontam cada vez mais a necessidade de um design experimental robusto, que são desenvolvidos durante a avaliação do parâmetro da robustez, para atender as exigências regulatórias devido as diversas alterações que podem vir a ocorrer durante o processo de fabricação de um produto, podendo estar associado ao próprio processo ou características do material analisado (Goetz et al., 2019).

Tabela 20. Dados da Robustez da IAN

Variável	Nível	REC %	DPR %
% ACN	48	97,78	6,23
	42	105,32	2,29
T °C	42	104,65	3,19
	38	98,03	0,55
F mL/min	0,9	99,47	2,20
	0,7	95,08	7,37
pH	3,68	95,43	2,99
	6,8	94,29	5,06
Coluna	Phenomenex	95,00	6,10

Rec = Recuperação; DP = Desvio padrão.

A validação do método confirmou o teor dos dois epímeros padrões IAN e EPI-IAN. Onde em 3 mg do padrão OD-1 (IAN e EPI-IAN), 1, 98 mg (66 %) refere-se a IAN e 1,02 mg (44 %) a EPI-IAN. Nos cromatogramas, a área sobre os picos é um parâmetro que pode indicar a concentração relativa de determinado analito em uma amostra, sendo proporcional à quantidade do analito que passa pelo detector. Pode-se estimar que quanto maior a área sobre o pico, maior sua concentração na amostra.

5.5 Estudos tecnológicos para desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas (Fuji, 2019).

5.5.1 Obtenção do Extrato Seco (ES)

As análises dos extratos por HPLC apresentaram concentrações crescente dos dois marcadores com aumento da proporção droga/solvente (v/m) e da proporção Etanol/água (v:v). As áreas correspondentes aos picos de IAN e EPI-IAN foram quantificados nos extratos analisados (Tabela 21).

Tabela 21. Análise das concentrações dos marcadores através da proporção droga/solvente e proporção etanol: água (v: v)

Proporção Droga/Solvente	Gradiente Etanol/Água	Área média IAN	Conc. µg/mL IAN	Área média EPI-IAN	Conc. µg/mL EPI-IAN
10%	30%	776906	17,39	1366025	37,05
	50%	620381	13,89	1217989	33,03
	70%	1038003	23,24	1756786	47,65
	96%	977771	21,89	1583158	42,94
20%	30%	1510135	33,81	1803610	48,92
	50%	1833157	41,04	3078868	83,51
	70%	1834150	41,06	3034936	82,32
	96%	1864635	41,75	3119417	84,61
30%	30%	1602327	35,87	2725354	73,92
	50%	1997791	44,73	4544894	123,27
	70%	2741935	61,39	4580591	124,24
	96%	3092314	69,23	4979112	135,05

A obtenção de um ES padronizado que apresente alto teor de ativos de constituintes de interesse e reprodutibilidade, requer avaliação de parâmetros que influenciam no processo extrativo. Portanto, avaliar técnicas extrativas eficientes, bem como conhecer todos os fatores que influenciam no processo é de fundamental importância na padronização de extratos vegetais secos (Tomasi, 2021).

Dentre as principais técnicas extrativas utilizadas para drogas vegetais podemos destacar: maceração, percolação, infusão, decocção, extração contínua a quente (soxlet), extração assistida por ultrassom, leite fluidizado, fluido supercrítico e turbólise. natureza química dos constituintes que se pretende obter, polaridade dos solventes e proporção ou mistura de solventes (Bampouli et al., 2014).

O sistema contendo 96% de etanol e 30% da DV apresentou a melhor concentração de IAN e EPI-IAN equivalente a 61,39 e 124,24 µg/mL, respectivamente, para procedimentos em triplicatas, justificando a escolha deste sistema para dar continuidade ao estudo. Com isso 7,5 kg da droga vegetal da terceira coleta foi submetido a maceração com etanol a 96% (25 litros), por 6 dias. O extrato fluido resultante da maceração foi de 15 litros.

5.5.1.1 Resíduo seco

A determinação do resíduo seco faz parte das diretrizes da OMS e ANVISA para o controle de qualidade de plantas medicinais e são essenciais para garantir a autenticidade, a estabilidade e a segurança tanto de plantas medicinais como de seus preparados (Costa, 2019).

O RS foi calculado a partir de 2 mL do extrato fluido 30% DV e 96% EtOH, realizado em triplicata, sobre porcentagem de matéria seca em extrato fluido. A determinação do resíduo seco apresentou resultado médios de 2,8532%, como mostra a tabela 22.

Tabela 22. Valores de resíduo seco para o extrato 30% DV-96% EtOH de *O. duckei*

	Cadinho (g)	EEB (g)	Cadinho + EEB (g)	1:30h	2h	ES (g)	RS (%)
1	45,88	1,61	47,21	45,93	45,93	0,04	2,88%
2	38,60	1,68	47,56	38,65	38,64	0,04	2,48%
3	39,60	1,68	64,60	39,66	39,66	0,05	3,19%
Md		1,66				0,04	2,85 %

*Md = Média

Não há na Farmacopeia Brasileira, ou em outro compêndio oficial, limites de valores de resíduos secos adequados para extratos vegetais. No entanto, a

determinação de tal parâmetro é fundamental no processo de padronização dos derivados vegetais, pois contribui para a sua caracterização e, conseqüentemente, para o controle da qualidade e da estabilidade dos mesmos (Borella e Carvalho, 2011)

A determinação do resíduo seco é um parâmetro fundamental e preliminar quando se objetiva alcançar a eficácia de uma formulação fitoterápica), uma vez que este ensaio implica na quantificação das substâncias extraídas da planta em condições específicas, através da eliminação do solvente extrator (Cardoso, 2009).

5.5.1.2 Secagem com adjuvantes tecnológicos

Foram utilizados 300 mL do EEB fluido em cada secagem, de modo que o RS seco respectivo foi de 7,12g. Os adjuvantes de secagem foram adicionados em proporção ponderal calculada sobre o resíduo seco da solução extrativa (Tabela 23).

Tabela 23. Quantidade de adjuntos de secagem quanto ao resíduo seco

Experimentos	Celulose (g)	Aerosil (g)
1	7,11	3,56
2	14,22	7,11
3	1,78	0,89
4	1,78	7,11
5	14,22	0,89
6	7,11	7,11
7	7,11	0,89
8	14,22	3,56
9	1,78	3,56

A utilização de adjuvantes de secagem é um fator primordial para a otimização da operação de secagem, pois estes atuam tanto no aumento do rendimento como no asseguramento da estabilidade do produto obtido. Vários trabalhos, utilizando diferentes adjuvantes de secagem, evidenciam a necessidade desses para otimização do rendimento, bem como para a definição e a melhoria das características tecnológicas do produto obtido (Bezerra, 2021).

Os adjuvantes são capazes de melhorar características tecnológicas dos extratos secos tais como baixa densidade, fluxo do pó e tendência a aglomerações e higroscopicidade (Oliveira & Petrovick, 2010).

5.5.2 Caracterização dos ES obtidos

Após a secagem com as adjuvantes, foi analisado as características organolépticas para cada ES (Figura 22 e Tabela 24).

Figura 22. Extratos secos obtidos pela secagem com adjuntos tecnológicos



*ES do 1 ao 9

Tabela 24. Características organolépticas das soluções extrativas de *O. duckei* com adjuvantes

ES	Propriedades organolépticas
1	Pó fino solto, marrom
2	Pó fino solto, marrom claro
3	Material compacto, marrom escuro
4	Pó fino solto, marrom claro
5	Pó granuloso, marrom escuro
6	Pó fino solto, marrom claro
7	Pó granuloso, marrom escuro
8	Pó fino solto, marrom claro
9	Pó granuloso, marrom escuro

A adição de adjuvantes pode modificar as características originais do pó, com função apenas de melhorá-los farmacotecnicamente como também aumentar o

rendimento de secagem, visto que eles são inertes, inócuos e termoestáveis quimicamente (Oliveira & Petrovick, 2010).

É provável que a mistura de celulose e o aerosil melhorem características de fluxo de pós, visto que são muito utilizados como material de enchimento e agente regulador de fluxo, respectivamente (Picanço, 2021).

Observa-se que os ES-1,2,4,6 e 8, foram os que apresentaram melhores aspectos organolépticas, onde destes a maioria (ES-1, 2 e 8) continha uma quantidade maior de celulose comparada ao aerosil.

A celulose é usada como excipiente para comprimidos, formulação cosmética, produtos alimentícios e também enchimento para vários materiais compostos, além de ser um aditivo especial para algumas aplicações técnicas (Ioelovich, 2019). Sua compatibilidade com a matriz fenólica se dá pela presença de grupos polares (hidroxilas), resultando em melhor interação na interface, e por consequência melhorando as propriedades dos compostos obtidos (Ramires et al., 2010).

5.5.2.1 Determinação das densidades

O Fator de Hausner (FH) e Índice de Carr (IC) são parâmetros vinculados à capacidade de empacotamento do pó. O FH é um indicador indireto da estabilidade de empacotamento. Quanto mais próximo de um, mais estável é o sistema de empacotamento (Thomas e Pourcelot, 1991).

Os ES obtidos da *O. duckei* apresentaram propriedades de fluxo pobre ou muito pobre, como reafirmado pelo índice de compressibilidade de 26,9% a 40%. (Tabela 25).

Tabela 25. Densidade aparente e compactada dos extratos secos da *O. duckei*

ES	Massa (g)	Vi	Vf	Da	Dc	IC	FH
		(mL)	(mL)	(g/mL)	(g/mL)		
1	14,0539	32	22	0,439	0,639	31,3	1,45
2	17,5782	50	31	0,352	0,567	38,0	1,61
4	14,3877	50	30,5	0,288	0,472	39,0	1,64
5	18,2337	50	32	0,365	0,570	36,0	1,56
6	17,0685	50	30	0,341	0,569	40,0	1,67
7	15,8945	40	24	0,397	0,662	40,0	1,67
8	21,3209	50	32	0,426	0,666	36,0	1,56
9	13,0773	26	19	0,503	0,688	26,9	1,37

*ES = extrato seco; Vi = Volume inicial; Vf = Volume final; Da = densidade aparente; Dc = Densidade compactada; IC = índice de Carr; FH = Fator de Hasuner

No entanto, os ES-9, 1, 5 e 8 apresentaram estes parâmetros tecnológicos consideravelmente melhores quando comparado aos demais. Os valores do IC para estes ES são menores quando comparados aos demais ES, embora sejam requeridos valores menores que 15 % para a obtenção de um escoamento mais adequado e, com isso, um fluxo mais apropriado. Esta observação, também, é corroborada pelo FH que para esta formulação apresenta-se mais próximo de 1, significando maior estabilidade de empacotamento das partículas.

5.5.2.2 Determinação do ângulo de repouso

O ângulo de repouso é um parâmetro associado à fluidez de pós e à fricção interparticular do material. A medida deste parâmetro é realizada a partir de diferentes métodos que procuram determinar a inclinação formada por partículas amontoadas até que ela forme uma altura elevada o suficiente para superar as forças de atrito dos pós, possibilitando o deslizamento do material após a transposição das forças adesivas e coesivas entre as partículas, até que as forças gravitacionais e interparticulares obtenham o equilíbrio (Bezerra, 2021).

Os resultados obtidos (Tabela 26) evidenciaram que todos os produtos secos por rotaevaporação alcançaram respostas consideradas boas para este parâmetro com ângulos de repouso inferiores a 40°. Percebe-se que os ES-7, 8 e 9 apresentaram os menores valores de ângulo de repouso.

Tabela 26. Dados de ângulo de repouso obtidos para os pós de extratos secos por rotaevaporação.

Número experimento	Base	Altura	Ângulo	Classificação
1	7,1	2,5	35,2	Bom-justo
2	7	2,7	37,6	Justo
4	7,3	3,1	40,3	Justo-aceitável
5	9	3,4	37,1	Justo
6	8,6	3,1	35,8	Bom-justo
7	7,2	2,3	32,6	Bom
8	8	2,8	35,0	Bom
9	6,9	2,3	33,7	Bom

Pós com ângulos de repouso abaixo de 40° apresentam propriedades de escoamento de excelentes à medianas, indicando que os produtos secos derivados de extratos apresentaram baixa coesão entre as partículas nesta avaliação; valores superiores indicam que as forças de coesão entre as partículas atuam com maior força, aumentando o atrito entre elas e dificultando o movimento e escoamento (Madian, et al., 2020).

5.5.2.3 Determinação da granulometria

O ES-8 apresentou melhor resultado quanto ao aspecto organoléptico, a determinação das densidades e ao ângulo de repouso. Com isso, deu-se continuidade a caracterização com o ES-8.

A granulometria também é um dos parâmetros a serem analisados, uma vez que fornece dados sobre a homogeneidade do tamanho de partículas. Este é um fator determinante nos processos extrativos, pois o tamanho das partículas está diretamente relacionado com a eficiência da extração (Pereira, 2021).

O resultado obtido de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2019) classifica ES-8 como pó finíssimo, onde 36% do pó ficou retido na malha de abertura nominal de 75 µm (200 mesh), (Tabela 27).

Tabela 27. Análise da granulometria do ES-8

Mesh	μm	Massa (g)	%
24	710	0,8301	7,52
42	355	0,7836	7,10
60	180	0,7325	6,64
100	150	0,1186	1,07
200	75	3,9737	36,00
400	38	3,9064	35,39
Coletor	-	0,694	6,29

5.5.2.4 Determinação da higroscopicidade

A avaliação da higroscopicidade consiste na determinação da estabilidade de pós frente à umidade relativa em temperatura ambiente, sendo um dos parâmetros de seleção das técnicas de secagem dos extratos vegetais líquidos, bem como de suas condições de armazenamento (Mendez et al., 2011).

Foi pesado o cadinho (39,6084) e adicionado a ele 0,165 g do ES-8, obtendo-se o peso de 39,7735 g. Após 24 horas, o cadinho foi retirado e pesado, obtendo o peso de 39,778 e após 7 dias o peso obtido foi 39,7827, obtendo-se um percentual de água absorvida de 0,02%. A Farmacopeia Brasileira 6^a ed. recomenda um valor de umidade menor que 5%, uma vez que valores mais altos prejudica a conservação, pois o material está susceptível a contaminação e degradação de princípios ativos (ANVISA, 2014).

Os extratos secos geralmente são higroscópicos e tem baixas propriedades reológicas, de compressibilidade e compactabilidade. Por estas razões, faz-se necessário o uso de adjuvantes de secagem que, por sua vez, altera as características tecnológicas do produto e melhoram os rendimentos de extratos secos (Gallo et al., 2011).

5.5.3 Caracterização térmica

Não foram encontrados trabalhos científicos disponíveis abordando a caracterização térmica dos ES de *O. duckei*, portanto, este é um estudo inédito e que poderá auxiliar na caracterização e no controle de qualidade desta droga vegetal.

A TG mede as alterações da massa da amostra em função do tempo ou temperatura. A decomposição térmica do ES-8 de *O. duckei* nas razões de aquecimento de 5, 10, 15 e 20 °C.min⁻¹ ocorreram em quatro etapas para todas as razões, como observado na figura 23 e tabela 28.

Figura 23. Curvas TG do ES-8 da *O. duckei* em atmosferas de nitrogênio e β de 5,10,15 e 20 °C.min⁻¹

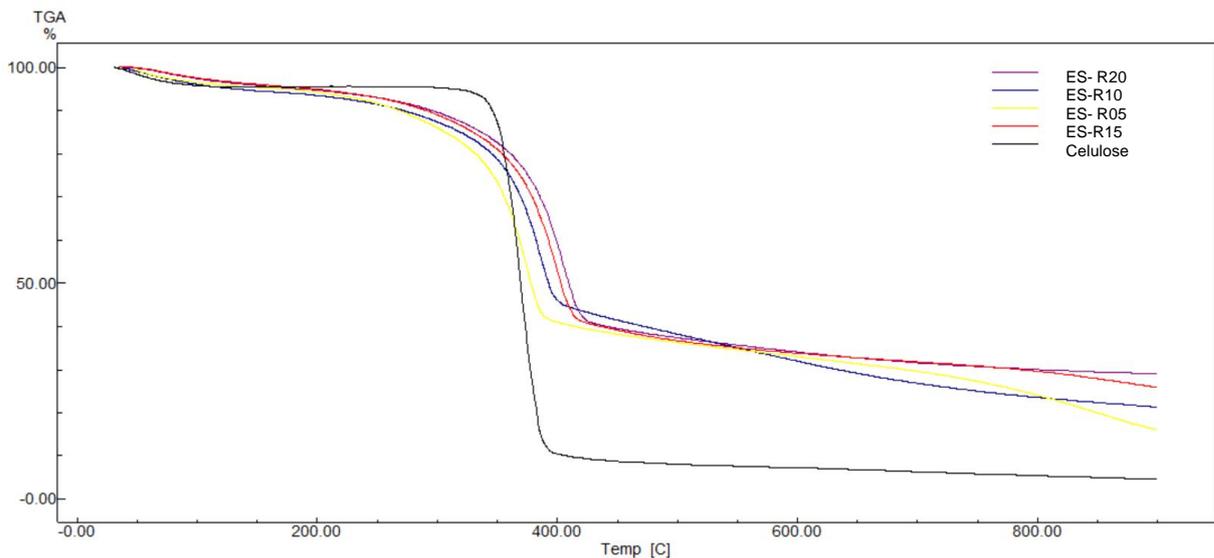


Tabela 28. Dados termogravimétricos do ES-8 da *O. duckei* em atmosferas de nitrogênio e β de 5,10,15 e 20 °C.min⁻¹

Razão	1º Etapa		2º Etapa		3º Etapa		4º Etapa		R %
	T _{onset} °C	Δm %							
5	43,37	4,73	263,72	10,41	353,24	43,10	600,51	24,54	16,07
10	40,36	5,46	276,29	7,89	363,02	42,62	627,85	21,42	21,16
15	54,10	4,01	282,71	11,85	375,60	45,22	622,73	13,12	26,16
20	53,75	4,54	288,27	11,01	381,57	44,60	581,55	10,93	21,03

*R= Resíduo; Δm = variação de massa; T_{onse} °C = Temperatura inicial de degradação

Neste trabalho, descreveu-se os eventos térmicos para a razão de 10, uma vez que as demais amostras com as razões diferentes apresentaram apenas diferenças nos valores de T_{onset}, perda de massa e resíduo ao final da análise.

Na primeira etapa, que ocorreu entre 36,67 a 151°C, houve uma perda de

massa equivalente a 5,46%. A literatura relata que este evento pode ser relacionado à desidratação da droga vegetal e a evaporação de constituintes voláteis (Wesolowski, 2003).

A etapa seguinte ocorreu entre 203,35 a 315,30 °C, na qual apresentou a perda de massa a 7,89%. A terceira etapa foi entre 315,32 a 429,33 °C, com perda de massa igual a 42,62%, respectivo a maior perda de massa. Essas etapas podem estar associadas à degradação térmica de componentes orgânicos da droga vegetal (Wesolowski, 2003). A degradação da celulose microcristalina ocorreu entre 328,78 a 405,49 °C, com perda de massa de 84,19%, coincidindo com a terceira etapa da degradação do ES.

A quarta etapa ocorre entre 429,34 a 894,76 °C, com perda de massa de 21,42%. Esta última perda pode ser referente à queima dos restos carbonizados da matéria orgânica (Araújo et al., 2006). O resíduo final da amostra foi de 21,26%, representando o percentual da amostra que não sofreu degradação total nas condições de análise.

Para o estudo cinético de decomposição térmica foi aplicado o modelo de Ozawa, utilizando a TG dinâmica. Na aplicação deste modelo, o ES foi submetido a taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹. A fração de decomposição (alfa 0,1) entre T_{onset} e T_{endset} do evento de decomposição foi determinada através da derivada do principal evento de degradação. A ordem da reação foi igual a um, com energia cinética de 152,16 ± 0,79 kJ/mol e fator frequência de 3,79 x 10¹¹ min⁻¹.

A cinética de degradação térmica depende não apenas da natureza do material, mas também das condições experimentais, tais como: massa da amostra, tipo de cadinho, fluxo e tipo de atmosfera de gás utilizada. A escolha da atmosfera pode afetar a taxa de degradação, bem como o número de etapas de perda de massa, a temperatura de início e fim do processo e a massa do resíduo (Vyazovkin et al., 2020).

A ordem da reação de degradação é estabelecida avaliando-se os ajustes dos modelos de zero, primeira e segunda ordens através do coeficiente de correlação linear (R²). A equação de Arrhenius, calcula-se a constante de velocidade da reação (k) a 25 °C por extrapolação e, diante deste valor, calcula-se o prazo de validade, t₉₀ ou α_{0,9} na temperatura de 25 °C. O α_{0,9} representa o tempo necessário para que o ativo degrade 10% da concentração do tempo zero, sendo então aceito como determinação de prazo de validade (Oliveira, 2011).

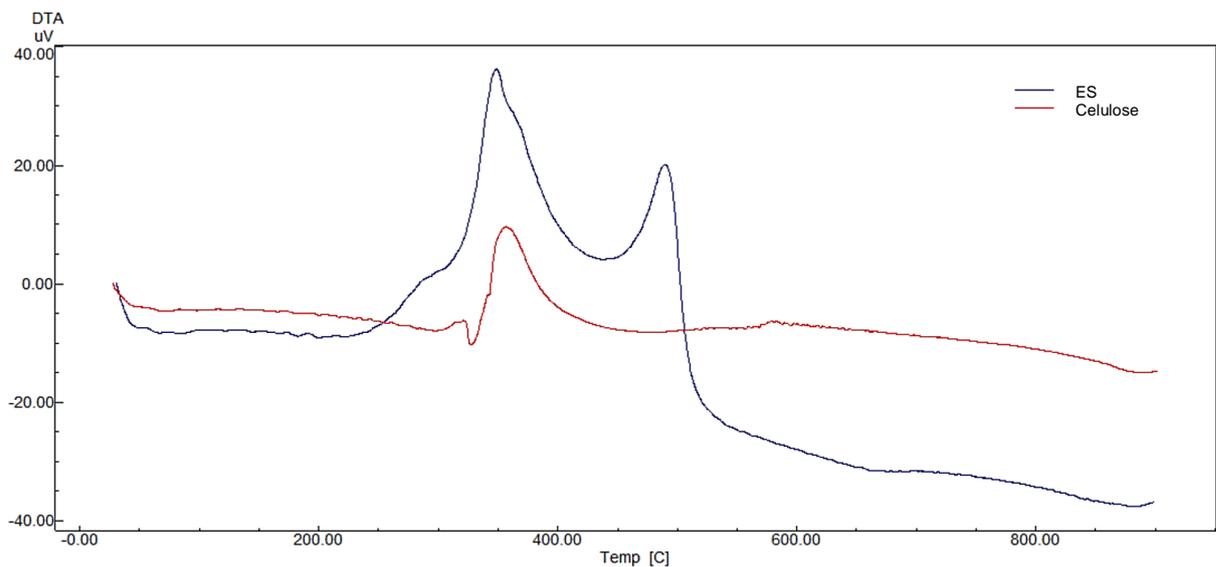
As reações de primeira ordem são aquelas em que as velocidades de reação

são diretamente proporcionais à concentração do reagente, onde o produto decompõe-se em um ou mais produtos (Freire, 2019).

Alguns autores relatam que a energia de ativação é a energia mínima necessária para que ocorram reações químicas em uma determinada amostra, inclusive essas reações podem ser de quebra de macromoléculas (Pan et al, 2015; Pugazhenthii e Kativa et al, 2014). Amostras de pós com tamanhos de partículas menores apresentam uma maior área superficial e assim são mais instáveis, necessitando de uma menor energia de ativação para que ocorram as reações de termodecomposição (Correia et al., 2013).

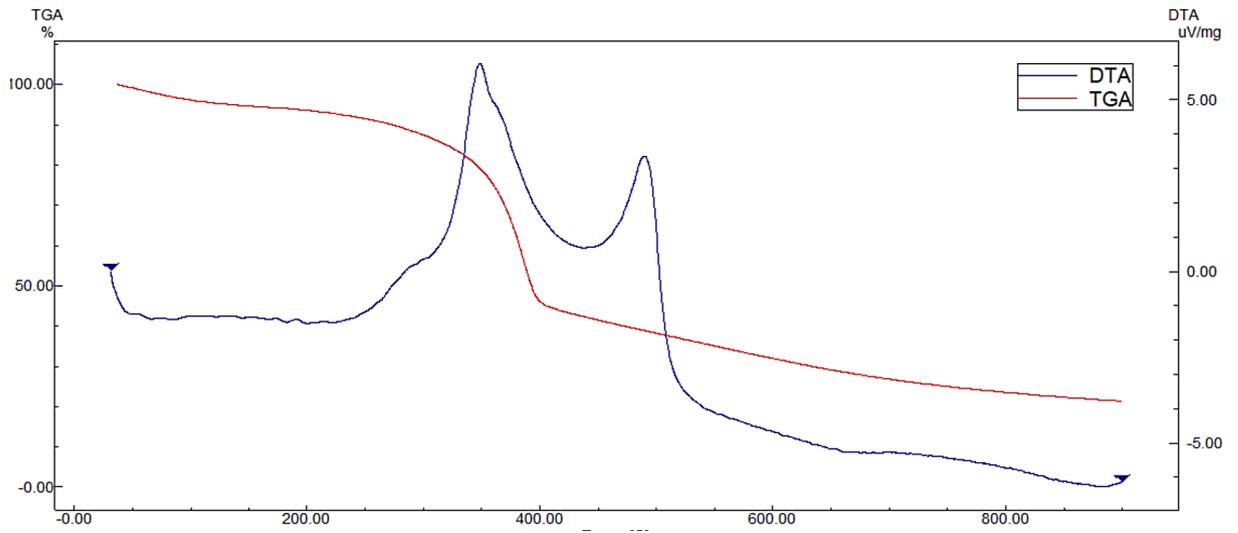
Na DTA foram observados três eventos exotérmicos relacionados a degradação do ES (Figura 24).

Figura 24. Curvas DTA do ES-8 da *O. duckei* em atmosferas de nitrogênio e β de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$



O primeiro evento ocorreu com temperatura de pico de $314,19^{\circ}\text{C}$ e o segundo a $348,65^{\circ}\text{C}$. Não foi possível determinar a energia do primeiro evento de degradação, devido a sobreposição com o segundo evento, sendo calculado o somatório de ambos, obtendo a energia de $2,25\text{ kJ/g}$, coincidindo com o evento exotérmico observado na celulose microcristalina, com temperatura de pico de $356,24^{\circ}\text{C}$ e energia de $1,07\text{ kJ/g}$. O terceiro evento ocorreu em uma temperatura de pico de $489,94^{\circ}\text{C}$ e energia de $0,77\text{ kJ/g}$, corroborando com os resultados obtidos pelo TG (Figura 25).

Figura 25. Curvas TG e DTA do ES-8 da *O. duckei* em atmosferas de nitrogênio e β de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$



6 CONCLUSÕES

O presente estudo possibilitou o controle de qualidade da droga vegetal de *O. duckei* a partir da determinação da distribuição granulométrica (pó grosso), pH (pH=6,1, sugerindo substâncias ácidas), densidade (apresentou propriedades de fluxo aceitável e fácil escoamento), teor de umidade (5,8%), bem como a investigação dos seus principais grupos de metabólitos secundários (alcaloides, flavonoides e lignoides), identificados através do FTIR. Esse estudo mostrou também a aplicação da análise térmica (TG e DTA), obtendo-se resultados importantes sobre a sua estabilidade, padronização e composição da droga vegetal.

O estudo fitoquímico inicial das partes aéreas de *O. duckei* resultou no isolamento e identificação, por meio de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e bidimensional, de dois lignoides (OD-1), um flavonoide (OD-2) e três alcaloides (OD-3; OD-4 e OD-5), no qual a IAN e EPI-IAN são consideradas como marcadores químicos da planta.

Os resultados preliminares com *A. salina* da espécie *O. duckei* demonstram que a fase hexânica é atóxica, uma vez que seu valor de CL_{50} encontra-se acima de $1000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e a fase Clorofórmica apresenta baixa toxicidade, pois a CL_{50} encontra-se entre 500 a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Faz-se necessário um estudo mais detalhado ou emprego de técnicas mais específicas para confirmar o grau de toxicidade da espécie.

O estudo envolveu o desenvolvimento do método cromatográfico de análise e a validação do método proposto segundo a ICH. O método cromatográfico desenvolvido em CLAE-DAD permitiu a identificação das lignanas com bom grau de pureza, mostrando-se ser simples, rápido e eficiente para este fim. O método desenvolvido apresentou resultados de acordo com o proposto para a validação de metodologias analíticas. Assim, a metodologia desenvolvida pode ser aplicada para a determinação do teor de langambina e Epi-langambina em matérias-primas e em formulações farmacêuticas.

Um modelo de superfície resposta foi aplicado na padronização dos extratos secos utilizando um método de extração clássico e solventes atóxicos. Os dados mostraram que existe diferença estatística com a variação da proporção da droga/solvente e proporção do solvente. A maceração a frio na proporção de droga/solvente de 30% e solvente extrator a 70% foi considerada a mais adequada para a extração dos marcadores químicos neste estudo.

Através de um planejamento fatorial foi viável a obtenção dos extratos secos por rotaevaporação utilizando dióxido de silício coloidal e celulose como adjuvantes, de modo que observou-se que o uso de adjuvantes foi indispensável para melhorar a caracterização do ES.

Através dos dados da caracterização físico-químicas e térmicas do ES foi possível estabelecer a padronização do ES à serem utilizada no desenvolvimento da formulação farmacêutica, como também garantir a qualidade, reprodutibilidade, e segurança do extrato seco.

Os resultados deste estudo podem ampliar o conhecimento sobre extratos secos de plantas medicinais com características tecnológicas adequadas, os quais encontram emprego como produtos ou intermediários na produção de fitoterápicos.

Diante da importância do estudo das plantas medicinais, almeja-se contribuir com a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos da *O. duckei*, encontrada no semiárido paraibano, bioma caatinga. Esta contribuição se dará através da obtenção tecnológica de extratos vegetais padronizados a partir das partes aéreas de *O. duckei*.

REFERÊNCIAS

Abranches, M.V. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos: abordagem teórica com ênfase em nutrição**. AS Sistemas, 2015.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, 6ª ed., 2019.

Ahmad, R. e Cava, M.P. Leucoxylophine and ocoxylophine - hexaoxygenated aporphines from *Ocotea leucoxyloph*. **Heterocycles**, v. 7, p. 927-931, 1977.

Aiba, C.J.; Gottlieb, O.R.; Yoshida, M.; Mourão, J.C. e Gottlieb, H.E. Structure of porosin. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1031-1032, 1976.

Alcântara, J. M.; Yamaguchi, K. K. De L.; Veiga Junior, V. F.; Composição química de óleos essenciais de espécies de Aniba e Licaria e suas atividades antioxidante e antiagregante plaquetária. **Química Nova**, vol. 33, n. 1, p. 141- 145, 2010b.

Alcântara, J. Moreira; Yamaguchi, K. K. De Lima.; Veiga Junior, V. Florêncio. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 3, p. 567 – 572, 2010ª.

Almeida, R. N.; Pachú, C. O.; Barbosa-Filho, J. M. Avaliação da possível atividade analgésica da iangambina obtida da *Ocotea duckei* Vattimo. **Ciênc. Cult. Saúde**, v. 14, p. 7-10, 1995.

Alvarenga, M. B. Validação de metodologias analíticas para a determinação de terras raras em amostras ambientais por ICP-MS. 2022.

Alves, T. M. A.; Grandi, T. S. M.; Smânia, E. F. A.; Smânia Júnior, A.; Zani, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2002.

Andrei, C.C.; Braz-Filho, R. e Gottlieb, O.R. Allylphenols from *Ocotea cymbarum*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3992-3993, 1988.

Antunes, R.M.P.; Lima, E.O.; Pereira, M. S.V.; Camara, C.A.; Arruda, T.A.; Catão, R.M.R.; Barbosa, T.P.; Nunes, X.P.; Dias, C.S.; Silva, T.M.S.; Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.16, n. 4, p. 517-524, 2006.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis of AOAC Washington, D.C., USA. 2002.

Araújo, A.A.S.; Mercuri, L.P.; Seixas, S.R.S.; Storpirtis, S; Matos, J.R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v.42, p.269-277, 2006.

Araújo, C. V.; Barbosa-Filho, J. M.; Cordeiro, R. S. B.; Tibiriçá, E. Protective effects of yangambin on cardiovascular hyporeactivity to catecholamines in rats with endotoxin-induced shock. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 363, p. 267-275, 2001.

Araújo, A. C. R. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antioxidantes, antilarvicidas e citotoxicidade das folhas de *Ocotea pulchella* Mart. (lauraceae). Dissertação. Universidade Federal do Paraná. p.118, 2012.

Araújo, I. G. A, Silva, D.F.; Alustau, M. C.; Dias, K. L. G.; Cavalcante, K. V. M.; Veras, R. C.; Barbosa-Filho, J. M.; Anjos-Neto, M.; Bendhack, L. M.; Correia, N. A; Medeiros, I. A. Calcium Influx Inhibition is Involved in the Hypotensive and Vasorelaxant Effects Induced by Yangambin. **Molecules**, 19: 6863-6876, 2014.

Bampouli, A., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Louli, V., Krokida, M., & Magoulas, K. (2014). Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. *chia* leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical

composition. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 1, n. 3, p. 81-91, 2014.

Baralle, F.; Schvarzberg, N.; Vernengo, M. e Comin, J. Dehydroocoteine and didehydroocoteine from *Ocotea puberula*. **Experientia**, v. 28, p. 875-876, 1972.

Baralle, F.; Schvarzberg, N.; Vernengo, M.J.; Moltrasio, G.Y. e Giacobello, D. Thaliminine from *Ocotea puberula*. **Phytochemistry**, v. 12, p.948-949, 1973.

Barbosa-Filho, J. M.; Yoshida, M., e Gottlieb, O. R. Lignoids from *Nectandra amazonum* and *N. glabrescens*. **Phytochemistry**, v. 28, 1989.

Barbosa-Filho, J. M.; Vargas, M. R. W.; Silva, I. G.; França, I. S.; Morais, L. C. S. L.; Da Cunha, E. V. L. e Almeida, R. N. *Ocotea duckei*: exceptional source of yangambin and other furofuran lignans. **Anais Academia Brasileira de Ciencias**, v. 71, p. 231-238, 1999.

Barreto, R. C. O gênero *Ocotea* Aubl. (Lauraceae) no estado de Pernambuco. In: XXVI Congresso nacional de botânica. Brasília, Brasil. **Sociedade Brasileira de Botânica**, v. 1, p. 175-199. 1990.

Beech, E.; Rivers, M.; Oldfield, S. e Smith, P. P. GlobalTreeSearch: The first complete global database of tree species and country distributions. **Journal of Sustainable Forestry**, v. 36, p. 454-489, 2017.

Betim, F. C. M. Estudo fitoquímico e biológico da espécie *Ocotea nutans* (Nees) Mez, lauraceae.2016.

Bezerra, I. C. F. Planejamento, produção e caracterização de formas farmacêuticas para veiculação de extrativos derivados das folhas de *Eugenia uniflora* Linn (pitanga).2021.

Borella, J. C.; Carvalho, D. M. A. de. Avaliação comparativa da qualidade de extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) comercializados em farmácias de

manipulação em Ribeirão Preto – SP. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 1, p. 13-18, 2011.

Botega, C.; Pagliosa, F.M.; Bolzani, V.S.; Yoshida, M. e Gottlieb, O.R. Benzylisoquinoline alkaloids and eudesmane sesquiterpenes from *Ocotea pulchella*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1331-1333, 1993.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC n. 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil: Poder Executivo, DF, 5 abr. 2010. Disponível em: [http://www. brasilsus.com.br](http://www.brasilsus.com.br). Acesso em: 20 junho. 2023.

Brasil. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017. Guia para validação de métodos analíticos - julho, 2017. acesso em 28.08.2017.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019. Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 07 nov. 2019.

British Pharmacopoeia. Volume IV. United Kingdom, 2010.

Bravo, J. A.; Sauvain, M.; Balderrama, L.; Moretti, C.; Richomme, P. e Bruneton, J. Alkaloids from *Aniba muca*. **Revista Boliviana de Quimica**, v. 13, p. 19-22, 1996.

Bruni, R.; Medici, A.; Andreotti, E.; Fantin, C.; Muzzoli, M.; Dehesa, M.; Romagnoli, C. e Sacchetti, G. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v. 85, p. 415-421. 2003.

Budske, C. F. *Desenvolvimento e validação de metodologia farmacêutica do Meloxicam* (Bachelor's thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná). 2022.

Carballo, J. L.; Hernández-Inda, Z. L.; Pérez, P. e García-Grávalos. M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v. 2, p 1-5, 2002.

Cardoso, C.M.Z. Manual de controle de qualidade de matérias-primas vegetais para farmácia magistral. 1. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2009.

Carnmalm, B. Constitution of resin phenols and their biogenetic relations. XX. Identity of pseudocubebin and d-sesamin. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 10, p. 134-135. 1956.

Casagrande, C. e Ferrari, G. Minor alkaloids of *Ocotea glaziovii*. **Il Farmaco, Edizione Scientifica**, v. 30, p. 479-490, 1975.

Castro-Farias-Neto, H. C.; Araújo, C. V.; Moreira, S.; Bozza, P. T.; Thomas, G.; Barbosa-Filho, J. M.; Cordeiro, R. S. B.; Tibiriça, E. V. Yangambin: a new naturally occurring-platelet-activating factor receptor antagonist in vivo pharmacological studies. **Planta Méd.**, v. 61, p. 106-112, 1995a.

Castro-Farias-Neto, H. C.; Bozza, P. T.; Cruz, H. N.; Silva, C. L. M.; Violante, F. A.; Barbosa-Filho, J. M.; Thomas, G.; Martins, M. A.; Tibiriça, E. V.; Noel, F.; Cordeiro, R. S. B. Yangambin: a new naturally occurring platelet-activating factor receptor antagonist: binding and in vitro functional studies. **Planta Méd.**, v. 61, p. 101-105, 1995b.

Castro, O. e Ruiz, I. Aporphine alkaloids and flavonoids from *Ocotea holdridgeana* leaves. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 32, p. 406-408, 1994.

Cava, M.P.; Watanabe, Y.; Bessho, K.; Mitchell, M.J. e da Rocha, A.I. *Ocotea* alkaloids: The characterization and structures of four new aporphine bases. **Tetrahedron Letters**, p. 2437-2442, 1968.

Cava, M.P.; Behforouz, M. e Mitchell, M.J. *Ocotea* alkaloids. Variabiline, a novel aminoaporphine. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 4647-4649, 1972.

Correia, L. P. et al., Characterization of herbal medicine with different particle sizes using Pyrolysis, GC/MS, SEM and thermal techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 1691-1698, 2013.

Costa, L.D.S. Quantificação de fenólicos totais em tintura de jatobá (*Hymenaea spp.*). 2019.

Crossley, N.S. e Djerassi, C. Naturally occurring oxygen heterocyclics. XI. Veraguensin. **Journal of the Chemical Society**, p. 1459-1462, 1962.

Cuca Suarez, L.E. Hydroxyotobain and reticuline from *Ocotea caparrapi*. **Revista Latinoamericana de Quimica**, v.11, p. 110-111, 1980.

Cuca, L. E., Leon, P., & Coy, E. D. A bicyclo [3.2. 1] octanoid neolignan and toxicity of the ethanol extract from the fruit of *Ocotea heterochroma*. **Chemistry of natural compounds**, v. 45, p. 179-181, 2009.

Custodio, D. L. e da Veiga Junior, V. F. Lauraceae alkaloids. **RSC Advances**, v. 4, p. 21864-21890, 2014.

da Silva, W.D.; Braz-Filho, R. e Gottlieb, O.R. Bicyclooctanoid neolignans from *Ocotea costulatum*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 661-662, 1989.

David, J.M.; Yoshida, M. e Gottlieb, O.R. Neolignans from bark and leaves of *Ocotea porosa*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 491-499, 1994a.

David, J.M.; Yoshida, M., e Gottlieb, O.R. Phenylpropanoid-catechins from bark of *Ocotea porosa*. **Phytochemistry**, v. 35, p. 545-546, 1994b.

de Carvalho, M.; Yoshida, M.; Gottlieb, O.R. e Gottlieb, H.E. Bicyclooctanoid, carinatone and megaphone type neolignans from *Ocotea porosa*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 2319-2323, 1988.

de Diaz, A.M.P.; Diaz D., P.P.; Ferreira, Z.S.; Gottlieb, O.R.; de Lima, R.A. e Cavalcante, S.H. Ferulic esters from *Endlicheria* and *Ocotea* species. **Acta Amazônica**, v. 7, p. 292-293, 1977.

de Diaz, A.M.P.; Gottlieb, H.E. e Gottlieb, O.R. Dehydrodieugenols from *Ocotea cymbarum*. **Phytochemistry**, v.19, p. 681-682, 1980.

Dewick, P. M. **Medicinal natural product: a biosynthetic approach**. 3^o edição, John Wiley & Sons, 2009.

Dias, D.A.; Yoshida, M. e Gottlieb, O.R. Further neolignans from *Ocotea porosa*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 2613-2616, 1986.

Dias, C. S.; Silva, I. G.; Cunha, E. V. L.; Silva, M. S.; Braz-Filho, R. e Barbosa-Filho, J. M. Isolamento e identificação de novos alcalóides de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 62-63, 2003.

Dodson, C.D.; Stermitz, F.R.; Castro, O. e Janzen, D.H. Neolignans from fruits of *Ocotea veraguensis*, **Phytochemistry**, v.26, p. 2037-2040, 1987.

Dong, M W. **Modern HPLC for practicing scientists**. John Wiley & Sons, 2006.

Drewes, S.E.; Horn, M.M.; Sehlapelo, B.M.; Ramesar, N.; Field, J.S.; Shaw, R.S. e Sandor, P Iso-ocobullenone and a neolignan ketone from *Ocotea bullata* bark. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1505-1508, 1995.

Emiliano, S. A., & Balliano, T. L. Prospecção de artigos e patentes sobre plantas medicinais presentes na caatinga brasileira. **Cadernos de Prospecção**, v. 12, n. 3, p. 615-615, 2019.

Ekor, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, p. 177, 2014.

Felício, J.D.A.; Motidome, M.; Yoshida, M. e Gottlieb, O.R. Further neolignans from *Ocotea aciphylla*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 1707-1710, 1986.

Fernandes, M.R.V. Padronização e avaliação biológica de extratos secos de *Psidium guajava* L. obtidos por spray drying. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Ferrari, G.; Fervidi, O. e Ferrari, M. Occurrence of isoboldine in *Nectandra pichurim*. **Phytochemistry**, v.10, p. 465-466, 1971.

Flores, S. L. G. Estudo fitoquímico do resíduo madeireiro de *Sextonia rubra* (Lauraceae) e investigação do potencial antioxidante.2022.

Fournet, A.; Ferreira, M. H.; Arias, A. R.; Guy, I.; Guinaudeau, H. e Heinzen, H. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 382-384, 2007.

Franca, N.C.; Giesbrecht, A.M.; Gottlieb, O.R.; Magalhaes, A.F.; Magalhaes, E.G. e Maia, J.G.S. Benzylisoquinolines from *Ocotea* species. **Phytochemistry** v. 14, p. 1671- 1672, 1975.

Freire, E. D. S. Síntese e caracterização de resina à base de melamina, tiourea e formaldeído para remediação de mercúrio em amostras ambientais. 2019.

Fuji, T. M. Dapsona: validação de métodos analíticos para formulações padronizadas na forma farmacêutica cápsula.2019.

Funazaki, M. **Estruturas, atividade biológica e biossíntese de metabólitos secundários de *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae)**. Tese de Doutorado em Química Orgânica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2006.

Gallo, L.; Llabot, J. M.; Allemandi, D.; Bucalá, V.; Piña, J. Influence of spraydrying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract physical properties. **Powder Technology**, v. 208, p. 205-214, 2011.

Garcez, W.S. Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellosiana*. **Phytochemistry**, v. 39, p. 815-816, 1995.

Garcez, W.S.; Garcez, F.R.; da Silva, L.M.G.E. e Shimabukuro, A.A. Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16 (6B), p. 1382-1386, 2005.

Garcez, F.R.; Silva, A.F.G.; Garcez, W.S.; Linck, G.; Matos, M.F.C.; Santos, E.C.S.; Queiroz, L.M.M. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. **Planta Médica**, vol. 77, p. 383- 387, 2011.

Giang, P.M.; Son, P.T.; Matsunami, K.; Otsuka, H. New neolignans and lignans from vietnamese medicinal plant *Machilus odoratissima* NEES. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 54, n. 3, p. 380-383, 2006.

Gilbert, B.; Gilbert, M.E.A.; de Oliveira, M.M.; Ribeiro, O.; Wenkert, E.; Wickberg, B.; Hollstein, U. e Rapoport, H. Aporphine and isoquinolinedienone alkaloids of *Ocotea glaziovii*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, p. 694-696, 1964.

Goetz, S. et al. Robustness Evaluation Of Product Concepts Based On Function Structures. **International Conference On Engineering Design**, v.1, p. 3521–3530, 2019

Goodwin, S.; Smith, A.F. e Horning, E.C. Leucoxine and leucoxylophine. **Chemistry & Industry**, p. 691-692, 1960.

Gottlieb, O.R. Essential oil of the wood of *Ocotea fragrantissima*. **Perfumery and Essential Oil Record**, v. 48, p. 386, 1957.

Gottlieb, O. R. & Yoshida, M.; Neolignanas antitumorais. **Ciência e Cultura**, Vol. 32, Pp. 93-100, 1978.

Gottlieb, O. R.; Yoshida, M. Lignans. In: Rowe, J. W. Ed. Natural Products of Woody Plants, **I.Berlin, Springer-Verlag**, p. 439-511, 1989.

Grundon, M.F. e McGarvey, J.E.B Isolation of the alkaloids, and the structure of sepeerine. **Journal of the Chemical Society**, p. 2739-2745, 1960.

Guizzo, P.L.; Bredda, T.C.C.; Scarpa, M.V.C. e Navarro, F.F. Controle de Qualidade e triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas de *Morus nigra* L. (MORACEAE). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.36, p. 259-265, 2015.

Gupta, E.; Purwar, S.; Sundaram, S. e Rai, G. Nutricional e valores terapêuticos de *Stevia rebaudiana*: Uma revisão. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 46, p. 3343-3353, 2013.

Haraguchi, M.; Motidome, M.; Yoshida, M. e Gottlieb, O.R. Neolignans from *Ocotea catharinensis*. **Phytochemistry**,. v. 22, p. 561-563, 1983.

Hasbun, C. e Castro, O. A novel phenanthrene alkaloid from *Ocotea insularis*. **Fitoterapia**, v. 64, p. 440-441, 1993.

Hausott, B.; Greger, H.; Marian, B. Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 129, n. 10, p. 569-576, 2003.

Hearst, P.J. Isolation and characterization of seven alkaloids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 29, p. 466-470, 1964.

ICH Harmonised Tripartite. Pharmaceutical development Q8. **Current step**, v. 4, p. 11, 2005.

loelovich, M.. Study of fractal dimensions of microcrystalline cellulose obtained by the spray-drying method. **Fractal and Fractional**, v. 3, n. 1, p. 3, 2019

Ishige, M.; Motidome, M.; Yoshida, M., e Gottlieb, O.R. Neolignans from *Ocotea catharinensis*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 4121-4128, 1991.

Jacobucci, G.A. Ocoteine, the alkaloid separated from the bark of *Ocotea puberula*. **Anales de la Asociacion Quimica Argentina**, v. 42, p. 18-29, 1954.

Khan, M.R.; Gray, A.I. e Waterman, P.G. Neolignans from stem bark of *Ocotea veraguensis*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 1155-1158, 1987.

Klein, T., Longhini, R., Bruschi, M. L., & Mello, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, 2009.

Kijjoa, A.; Pinto, M.M.M.; Carreiras, M.C.; Gottlieb, H.E.; Hezroni-Langerman, D. e Gottlieb, O.R. An unusual, dibenzo-cycloheptatriene based, flavonoid from *Ocotea foetens*. **Natural Product Letters**, v. 4, p. 85-92, 1994.

Kim, J. Y.; Lim, H. J.; Lee, D. Y.; Kim, J. S.; Kim, D. H.; Lee, H. J.; Kim, H. D.; Jeon, R.; Ryu, J.-H. In vitro anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 3, p. 937- 940, 2009.

Kostermans, A.J.; Pinkley, H.V. e Stern, W.L. New Amazonian arrow poison: *Ocotea venenosa*. **Botanical Museum Leaflets, Harvard University**, v. 22, p. 241-252, 1969

Lacerda, C. D. G. de. **Revisão dos Alcaloides de Lauraceae e estudo fitoquímico de *Ocotea duckei* Vattimo**. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. Universidade Federal da Paraíba, 234 p, 2004.

Lagos V.V.; Pereira, R.N. e Bertol. C.D. Propriedades micromeríticas e análise físico-química de matérias-primas de alopurinol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, p. 385-393, 2012.

Leal, S. D. S. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de langambina e seu epímero em extratos de *Ocotea duckei* (Lauraceae). 2012.

Lima, M. I. D. A. Estudo da toxicidade in vitro e in vivo da iangambina isolada da *Ocotea duckei* Vattimo-Gil (Lauraceae) (Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco). 2019.

Lima, V. T. M. Avaliação dos efeitos centrais da iangambina isolada de *Ocotea duckei* Vattimo: estudo comportamental e neuroquímico em córtex motor e corpo estriado de camundongo. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

Lombardo, M., & Eserian, J. K. A análise da qualidade de medicamentos e o papel do laboratório oficial no contexto da saúde pública. **Revista de Administração em Saúde**, v. 17, n. 67, 2017.

Lopes, M. A., Nogueira, I. S., Obici, S., & Albiero, A. L. M. Estudo das plantas medicinais, utilizadas pelos pacientes atendidos no programa “Estratégia saúde da família” em Maringá/PR/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 702-706, 2015.

Lopez, J.A.; Barillas, W.; Gomez-Laurito, J.; Lin, F.-T.; Al-Rehaily, A.J.; Sharaf, M.H. M. e Schiff, P.L. Aporphine alkaloids of selected species of *Nectandra* and *Ocotea*. **Planta Medica**, v. 61, p. 589, 1995a.

Lopez, H.; Valera, A. e Trujillio, J. Lignans from *Ocotea foetens*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 782-785, 1995b.

Lopez, J.A.; Barillas, W.; Gomez-Laurito, J.; Lin, F.-T.; Al-Rehaily, A.J.; Sharaf, M.H.M. e Schiff, P.L.J. Aporphine alkaloids of *Ocotea brenesii*. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 34, p. 145-147, 1996.

Lordello, A. L. L.; Cavalheiro, A. J.; Yoshida, M. e Gottlieb, O. R. Phenylpropanoids, sterols and sesquiterpene from wood of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Revista Latinoamericana de Química**, v. 28, p. 35-39, 2000.

Lordello, A.L.L. **Constituintes químicos de folhas e de cultura de células e tecidos de *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae)**, Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 1996.

Lordello, A.L.L. e Yoshida, M. Neolignans from leaves of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Phytochemistry**, v.46, p. 741-744, 1997.

Madian, A., Leturia, M., Ablitzer, C., Matheron, P., Bernard-Granger, G., & Saleh, K. (2020). Impact of fine particles on the rheological properties of uranium dioxide powders. **Nuclear Engineering and Technology**, v. 52, n. 8, p. 1714-1723, 2020.

Maia, J.G.S.; da Silva, M.L.; Luz, A.I.R.; Zoghbi, M.G.B. e Ramos, L.S. Species of *Piper* of the Amazon region rich in safrole. **Química Nova**, v. 10, p. 200-204, 1987.

Macedo, J. A. B. Plantas medicinais e fitoterápicos na atenção primária à saúde: contribuição para profissionais prescritores. 2016.

Magalhães, K.N. Plantas medicinais da caatinga do nordeste brasileiro: etnofarmacopeia do professor Francisco José de Abreu Matos. 2019.

Marques, M.O.M.; Gomes, M.C.C.P.; Yoshida, M. e Gottlieb, O.R. Bicyclo[3.2.1]octanoid neolignans from *Ocotea porosa*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 275-277, 1992.

Marques, R. C. P.; De Medeiros, S. R. B.; Dias, C. D.; Barbosa, J. M.; Agnez-Lima, L. F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. Mutation Research- **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 536, n. 1-2, p. 117-120, 2003.

Marques, G.S.; Lyra, M.A.M.; Peixoto, M.S.; Monteiro, R.P.M.; Leão, W.F.; Xavier, H.S.; Soares, L.A.L.; Neto, P.J.R. Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, p. 57-62, 2012.

Mclaughlin, J. L.; Rogers, L. L. e Anderson, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v.32, p.513-524, 1998.

Meira, T. D. S. O., & da Silva, A. F. G. Estudo fitoquímico e avaliação de atividades biológicas das das folhas de *Ocotea odorífera* e *Ocotea catharinensis*. N. 4: ANAIS DO 10º ENIC / CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA, 2012.

Mendez A.S.L, Simionato N.O, Valduga A.T, Reginatto F.H. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.32, n.1, p.105-11, 2011

Meyer, B.N; Ferrigni, N. R; Putnam, L.B.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E. e Mclaughlin J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.4, p. 31-45, 1982.

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

Mollan, T.R.M. The safrole cinnamic aldehyde type of sassafras laurel. **Perfumery and Essential Oil Record**, v. 52, p. 411-412, 1961.

Monte-Neto, R. L.; Sousa, L. M. A.; Dias, C. S.; Filho, J. M. B.; Oliveira, M.R.; Figueiredo, R. C. B. Q. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 215-221, 2011.

Moraes, M. M., Camara, C. A. D., & Silva, M. Comparative toxicity of essential oil and blends of selected terpenes of *Ocotea species* from Pernambuco, Brazil, against *Tetranychus urticae* Koch. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, p. 1417-1429, 2017.

Morais, L.C.S.L; Pachú, C.O; Santos, V.L e Barbosa-Filho, J.M. New lignan from *Ocotea duckei*. **Fitoterapia**, v. 67, p. 557,1996.

Morais, I.C.S.L.; Pachú, C.O; Santos, J.M.; Athayde-Filho, P.F.; Almeida, R.N e Barbosa-Filho, J.M. (+)-4'-O-demethylepimagnolin A from *Ocotea duckei*. **Fitoterapia**, v. 69, p. 91-92. 1998a.

Morais, L.C.S.L.; Barbosa-Filho, J.M. e Almeida, R.N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 57-61, 1998b.

Morais, L.C.S.L.; Almeida, R.N.; Da-Cunha, E.V.L.; Da-Silva, M.S.; Barbosa-Filho, J.M. e Gray, A.I. Further lignans from *Ocotea duckei*. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, p. 144-147, 1999.

Mors, W.B.; Magalhães, M.T e Gottlieb, O.R Physiological varieties of *Ocotea pretiosa*. **Perfumery and Essential Oil Record**, v. 50, p. 26-27, 1959.

Naranjo, P.; Kijjoa, A.; Giesbrecht, A.M. e Gottlieb, O.R. *Ocotea quixos*, American cinnamon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 4, p. 233-236, 1981.

Naves, Y.R.; Gottlieb, O.R. e Magalhaes, M.T. Essential oil of *Ocotea teleiandra*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 44, p. 1121-1123, 1961.

Novaes, C.G.; Yamaki, R.T.; De Paula, V.F.; Nascimento J.B.B.; Barreto, J.A.; Valasques, G.S.; Bezerra, M.A. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo. **Revista Virtual de Química**, v.9, p.1184-1215, 2017.

Oliveira, A.R.M. Análise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos empregando eletroforese capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 3, p. 231-247, 2011.

Oliveira, E. G. D. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a análise enantiomérica da duloxetina e de sua impureza quiral em formulação farmacêutica. 2012.

Oliveira, M. A. D., Yoshida, M. I., & Lima Gomes, E. C. D. (2011). Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, p. 1224-1230, 2011.

Oliveira, O. W.; Petrovick, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. São Paulo, SP. V. 20, n. 4, p. 641-650. 2010.

Pachú, C. O.; Almeida, R. N.; Barbosa-Filho, J. M. Atividade depressora do sistema nervoso central pela iangambina. **Ciênc. Cult. Saúde**, v. 21, p. 14-16, 1993.

Pan J.W.U.V, Kumar N.E.C.O, Rao C.N. Effect of Nitrogen and Fluorine Co-substitution on the Structure and Magnetic Properties of Cr₂O₃. *Chemphyschem*. n.16, v.7, p.1502-8.2015.

Pedroso, R. S; Andrade, G.; Pires, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. Physis: **Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, 2021.

Pereira, V. D. S. Extração de compostos bioativos das folhas de cajazeira (*Spondias mombin* L.) utilizando água pressurizada e técnicas convencionais (Master's thesis.2021.

Picanço, K. M. D. S. Estudos tecnológicos para obtenção de forma farmacêutica sólida a partir de *Justicia pectoralis* Jacq. 2021

Pino, J. A.; Marbot, R.; Payo, A.; Chao, D; Herrera, P. e Martí, M. P. Leaf oil of *Licaria triandra* (Sw.) Kostermans. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 382-383, 2005

Pugazhenthii, R. V. G. & Kativa, V. Thermal degradation kinetics of sucrose palmitate reinforcedpoly (lactic acid) biocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.65, p.275–283, 2014.

Quinet, A.; Baitello, J.B.; Moraes, P.L.R.; Assis, L.; Alves, F.M. 2015. Lauraceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/> FB143 (acesso em 25/11/2019).

Ramires, E. C.; Megiatto Jr., J. D.; Gardrat, C.; Castellan, A.; Frollini, E.. Biocompósitos de matriz glioxal-fenol reforçada com celulose microcristalina. *Polímeros*, v. 20, n. 2, p. 126-133, 2010.

Roensch, H.; Preiss, A.; Schreiber, K. e de Cordoba, F.H. Structure elucidation and carbon-13 NMR of the new aporphine alkaloid 3-hydroxyglaucine. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 5, p. 744-752, 1983.

Romoff, P.; Yoshida, M. e Gottlieb, O.R. Neolignans from *Ocotea aciphylla*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 2101-2104, 1984.

Rossato, A. E.; Pierini, M.D M.; Amaral, P.D.A.; Santos, R.R.D. e Citadini-Zanette, V. Fitoterapia racional: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos, v. 1, p. 211, 201.

Salleh, W. M. N. H. W.; Ahmad, F. Phytochemistry and biological activities of the genus *Ocotea* (Lauraceae): A review on recent research results (2000-2016). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 5, p. 204–218, 2017.

Santos, S. D. O. Lauraceae juss. ao norte da floresta atlântica (Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco). 2012

Santos, S.O. e Alves, M. Flora of Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Lauraceae. **Rodriguésia**, v. 63, p. 689-703, 2012.

Santos, L.M.G. Avaliação das impurezas elementares do medicamento captopril comercializadas na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Virtual de Química*, v. 10, n. 3, 2018.

Saraiva, S. R. G. L., Saraiva, H. C. C., de Oliveira-Júnior, R. G., Silva, J. C., Damasceno, C. M. D., da Silva Almeida, J. R. G., & Amorim, E. L. C. A implantação do programa de plantas medicinais e fitoterápicos no sistema público de saúde no Brasil: uma revisão de literatura. **Revista Interdisciplinar de Pesquisa e Inovação.**, v. 1, n. 1, 2015.

Sehlapelo, B.; Drewes, S.E. e Sandor, P. Ocobullenone: a bicyclo[3.2.1]octanoid neolignan from *Ocotea bullata*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1352-1353, 1993.

Silva, I.G.; Barbosa-Filho, J.M.; da Silva, M.S.; de Lacerda, C.D.G. e da-Cunha, E.V.L. Coclaurine from *Ocotea duckei*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 881-883, 2002.

Silva, J. R. Avaliação do efeito leishmanicida e imunomodulador de compostos naturais na infecção por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* (Doctoral dissertation). 2022

Silva, L. M. G. E. D. Estudo químico biomonitorado por ensaio com larvas *Aedes aegypti* das espécies *Ocotea velloziana* (Meisn.) Mez. e *Aiouea trinervis* (Meisn.).2010.

Silva, N. D. D. Terapia alternativa: indicação do uso de plantas medicinais e fitoterápicos na rede básica de saúde. 2020.

Silva, Y. C. D. Estudo de marcadores em espécies de Aniba (Lauraceae) bioativas da Amazônia. 2018

Silveira, L.M.S; Moraes, D.C.; Olea, R.S.G; Cruz, A.L.D.; Mendes; J.C.; Moraes, L.S. Atividade antibacteriana de duas espécies Vegetais do gênero *Ocotea*. **Revista Florence**, n. 1, 2011.

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosman, G., Palazzo de Melo, J., & MENTZ, L. E. P. PR (org.) Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Editora da UFRGS/Editora da UFSC. Porto Alegre/Florianópolis.2002.

Soares, A. J. S. et al. Potencialidades da prática da atenção farmacêutica no uso de fitoterápicos e plantas medicinais. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**,[SL], v. 7, n. 2, p. 10-21, 2021.

Sousa, F. C. F.; Lima, V. T. M.; Lacerda, C. D. G.; Barbosa-Filho, J. M.; Viana, G. S. Central nervous system activity of yangambin from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) in mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 282-286, 2005.

Souza, G.C.; Haas, A.P.S; Poser, G.L.V.; Elisabetsky, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 90, n. 1, p. 135-143, 2004

Souza, H.S.; Leal Junior, J.H.S.; Araujo, A.C.S.; Couto, C.M.O.; Oliveira, T.M.; Veloso Junior, P.H.H. e Dias, J.N. Avaliação da toxicidade de diferentes extratos da casca da castanha do pará (*Bertholletia excelsa*) por meio do ensaio com *artemia salina*. **Revista Brasileira de Biodiversidade e Biotecnologia**, v. 1, 2015.

Souza-Moreira, T. M.; Salgado, H. R. N.; Pietro, R. C. R. L. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

Teles, M.M.R.S. **Contribuição ao conhecimento fitoquímico de *Ocotea gardneri* (Meisn) Mez e *Ocotea duckei* Vattimo**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Brasil, João Pessoa. 2016.

Ter Steege, H., Vaessen, R. W., Cárdenas-López, D., Sabatier, D., Antonelli, A., De Oliveira, S. M., ... & Salomão, R. P. The discovery of the Amazonian tree flora with an updated checklist of all known tree taxa. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 29549, 2016.

Thomas, C.; Pourcelot, Y. Preformulation of five commercial celluloses in drug development: reological and mechanical behavior. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 19, n. 15, p. 1947-1964, 1991.

Tomasi, M. L. M. Aspectos relacionados ao desenvolvimento de um medicamento fitoterápico: preparação e avaliação biológica de extrato seco padronizado de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).2021.

United States Pharmacopeia 35, vol. 1, Powder Flow, p. 801-803, 2012b.

United States Food and Drug Administration (US-FDA). Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, 1994.

Vargas, L.; Barrios, M.; Cabezas, J.M. e Castro, O. Aporphine alkaloids from *Ocotea holdridgeana* bark. **Fitoterapia**, v. 67, p. 184-185, 1996.

Vyazovkin, S., Burnham, A. K., Favergeon, L., Koga, N., Moukhina, E., Pérez-Maqueda, L. A., & Sbirrazzuoli, N. ICTAC Kinetics Committee recommendations for analysis of multi-step kinetics. **Thermochimica acta**, v. 689, p. 178597, 2020.

Vecchiatti, V.; Casagrande, C. e Ferrari, G. Ocobotrine and 14-episinomenine. New trans-morphinane alkaloids of *Ocotea brachybotra*. **Tetrahedron Letters**, v. 19, p. 1631-1634, 1976.

Vecchiatti, V.; Casagrande, C.; Ferrari, G. e Severini, R.G. New aporphine alkaloids of *Ocotea minarum*. **Farmaco, Edizione Scientifica**, v. 34, p. 829-840, 1979.

Vecchiatti, V., Casagrande, C., Ferrari, G., Danieli, B. e Palmisano, G. Alkaloids of *Ocotea acutangula*. **Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions**, v. 1, p. 578-581, 1981.

Vilegas, J.H.Y.; Gottlieb, O.R.; Kaplan, M.A.C. e Gottlieb, H.E. Aporphine alkaloids from *Ocotea caesia*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 3577-3578, 1989.

Vilegas, J.H.Y. e Gottlieb, O.R. Benzylisoquinoline alkaloids from *Ocotea teleiandra*. **Revista Latinoamericana de Quimica**, v. 23, p. 18-19, 1992.

Villamizar, V.E.M. Metabolitos secundarios con actividad biológica (farmacológica), aplicación etnobotánica; y fitoquímica de algunas especies de los géneros: *Ocotea*,

Cryptocarya, Litsea, Caryodaphnopsis, Machilus y Actinodaphne (Lauraceae). Duazary: **Revista internacional de Ciencias de la Salud**, v. 7, p. 152-170, 2010.

Wesolowski, M., Suchacz, B.; Konieczynski, P. The application of artificial neural networks for the selection of key thermoanalytical parameters in medicinal plants analysis. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 6, p. 811-820, 2003.

Yamaguchi, K.K.L; Alcântara, J.M.; Veiga Junior, V.F.. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amazonica**, vol. 42, p. 541-546, 2012.

Zanin, S.M.W. e Lordello, A.L.L. Alcalóides aporfin ides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, v. 30, p. 92, 2007.

Zonner, A. M., Matiussi, J. R., de Melo, P. G. B., Cogo, J., Jacomassi, E., & Hoscheid, J. Plantas medicinais e seu uso na fitoterapia Medicinal plants and their use in phytotherapy. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 5, p. 35006-35016, 2022.