



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

***Lippia origanoides* H.B.K.: Obtenção do extrato padronizado, avaliação do efeito hipotensor e desenvolvimento de comprimidos**

ANGÉLICA GOMES COELHO

Teresina – Piauí

2015

ANGÉLICA GOMES COELHO

***Lippia origanoides* H.B.K.: Obtenção do extrato padronizado, avaliação do efeito
hipotensor e desenvolvimento de comprimidos**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Antônia Maria das Graças Lopes
Citó

Co-orientador: Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

Teresina - Piauí

2015

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

C6721 Coelho, Angélica Gomes.
Lippia origanoides H.B.K.: obtenção do extrato padronizado, avaliação do efeito hipotensor e desenvolvimento de comprimidos / Angélica Gomes Coelho. – 2015.
118 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.
“Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Antônia Maria das Graças Lopes
Citó”.
“Co-orientação: Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes”.

1. Plantas Medicinais. 2. Hipertensão. 3. HPLC.
4. Toxicidade. I. Título.

CDD 615.321

ANGÉLICA GOMES COELHO

***Lippia origanoides* H.B.K.: Obtenção do extrato padronizado, avaliação do efeito
hipotensor e desenvolvimento de comprimidos**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Antônia Maria das Graças Lopes Citó (Orientadora)

Departamento de Química – CCN/UFPI

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes (Co-orientador)

Departamento de Bioquímica e Farmacologia – CCS/UFPI

Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior

Departamento de Química – IFPI

Prof. Dr.^a Aldeídia Pereira de Oliveira

Departamento de Biofísica e Fisiologia – CCS/UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof^o Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dr^a Regina Ferraz Mendes

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dr^a Lina Gomes Santos

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

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

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

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

DEDICATÓRIA

À minha família, meus amores, meu tudo.

AGRADECIMENTOS

À professora Graça Citó, grande exemplo, por quem tenho a honra de ser orientada, desde o início da trajetória acadêmica;

Ao professor Lívio César, pela co-orientação ao trabalho, pela amizade e por me fazer apaixonar pela Tecnologia Farmacêutica;

Ao professor Daniel Arcanjo, pesquisador espetacular, que dignifica e enriquece nosso trabalho dia após dia;

Ao Dr. Lima Neto, pelos valiosos ensinamentos e apoio incansável à nossa pesquisa;

À professora Graça Medeiros, pelo fornecimento do material vegetal e contribuições à pesquisa;

Ao querido Arkellau Kenned, cuja qualidade de seu trabalho supera sempre minhas expectativas;

Ao mestrando Francisco Valmor, pelo auxílio em experimentação animal e análises estatísticas;

Às mestrandas do laboratório de Farmacologia Cardiovascular (NPPM) Ilmara Cecília e Gabriela, que com muita dedicação tornaram possível a realização deste trabalho;

À mestranda Ana Cristina, pelas muitas contribuições ao trabalho;

Aos professores Joaquim e Aldeídia, por aceitarem o convite de avaliar nosso trabalho.

Aos professores Bernardo Melo e Hilris Rocha, pela contribuição à pesquisa;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho, muito obrigada!

“Obrigado a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês”.

(Augusto Branco)

***Lippia origanoides* H.B.K.: Obtenção do extrato padronizado, avaliação do efeito hipotensor e desenvolvimento de comprimidos. ANGÉLICA GOMES COELHO. Orientadora: Antônia Maria das Graças Lopes Citó. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Curso de Farmácia, UFPI, 2015.**

RESUMO

Lippia origanoides H.B.K. (Verbenaceae) é um arbusto aromático utilizada popularmente para o tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais. O uso da tintura das folhas de *L. origanoides* com aplicação no tratamento da hipertensão arterial foi reivindicado através da patente PI 9305413-0A, depositada no Brasil, mas sem nenhuma evidência científica de eficácia e segurança desta aplicação. Desse modo, este estudo visa obter um extrato padronizado das partes aéreas de *L. origanoides*, bem como seu perfil cromatográfico por UFLC, além de avaliar seu potencial como agente hipotensor e propor uma formulação na forma de comprimidos contendo o extrato por planejamento fatorial 2³. Para tanto, foram preparados 8 sistemas de extração, em triplicata, variando-se os fatores: Solvente (etanol ou etanol/água (1:1)), sonicação (+ ou -) e troca de solvente (diária por três dias ou a cada três dias, por nove dias), sendo as massas secas dos resíduos utilizadas como parâmetro de análise para comparação entre os rendimentos. O perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico (Lo-EHA), bem como a identificação e quantificação da substância marcadora naringenina, foram obtidos através da análise por cromatografia líquida ultra-rápida (UFLC), acoplada a um detector UV. Para avaliação do potencial hipotensor de Lo-EHA, realizou-se medida direta da pressão sanguínea em ratos *Wistar* após administração intravenosa de Lo-EHA (12,5, 25 e 50 mg/kg), sequencial ou não ao pré-tratamento com L-NAME (20 mg/kg, i.v.). Além disso, avaliou-se o efeito hipotensor após administração oral a ratos (100 mg/kg e 200 mg/kg), através da medida indireta da pressão arterial sistólica pelo método de pletismografia de cauda. Para o desenvolvimento dos comprimidos, Lo-EHA (50 mg) foi acrescido a oito formulações determinadas por planejamento fatorial, variando-se o diluente (celulose ou babaçu), a presença do aglutinante e a porcentagem de lubrificante. Os comprimidos foram avaliados quanto às suas características organolépticas, peso médio, friabilidade, dureza, tempo de desintegração, perfil de dissolução e teor, utilizando os parâmetros da Farmacopeia Brasileira V. Foi também realizado o ensaio de toxicidade aguda seguindo-se o método de classe tóxica aguda do Guia 423 da OECD. O rendimento da extração foi 4,6 vezes maior com solvente hidroalcoólico que com o solvente etanólico e de modo independente da ocorrência de sonicação e do tempo de extração. A análise por UFLC confirmou a presença do marcador naringenina no Lo-EHA, na concentração de 3,73 g%. A administração do extrato por via intravenosa promoveu efeito hipotensor significativo nas três doses testadas seguido de efeito bradicárdico. Após o pré-tratamento com L-NAME, o efeito hipotensor foi acentuado nas doses 25 e 50 mg/kg, seguido de bradicardia em todas as doses, indicando que este efeito provavelmente não envolve a ativação da enzima NO sintase. Após administração por via oral nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg, foi observada resposta hipotensora pronunciada a partir de 60 e 90 minutos em relação ao grupo controle, com duração de efeito de 270 e 300 minutos, respectivamente. Quanto aos comprimidos desenvolvidos, os lotes contendo babaçu foram aprovados em todos os ensaios de controle de qualidade ao passo que os lotes com celulose foram reprovados no ensaio de desintegração, por apresentarem tempo de desintegração superior a 30 minutos. No ensaio de toxicidade aguda, não foram identificados sinais de toxicidade e a DL₅₀ para o extrato categorizou-se como indeterminada. Dessa forma, o extrato padronizado de *L. origanoides* apresenta potencial farmacológico para o desenvolvimento de fitoterápicos com aplicação no tratamento da hipertensão arterial.

Palavras-chave: Plantas Medicinais, hipertensão, HPLC, formulação farmacêutica, toxicidade.

***Lippia origanoides* H.B.K.: Obtention of a standardized extract, evaluation of the hypotensive effect and development of tablets. ANGÉLICA GOMES COELHO. Advisor: Antônia Maria das Graças Lopes Citó. Master's dissertation. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. UFPI, 2015.**

ABSTRACT

Lippia origanoides H.B.K. (Verbenaceae) is an aromatic bush commonly used for the treatment of gastrointestinal and respiratory diseases. The use of tincture from the leaves of *L. origanoides* due to its ethnopharmacological application in the treatment of hypertension was claimed by patent filed in Brazil, but no scientific evidence of efficacy and safety of this use. Thus, this study aims to obtain a standardized extract of aerial parts of *L. origanoides* and chromatographic profile by UFLC, and to evaluate its potential as a hypotensive agent and propose a formulation in tablet form containing the extract by factorial design 2^3 . Thereby, 8 extraction systems were prepared in triplicate, varying the factors: Solvent (ethanol or ethanol/water (1:1)), sonication (+ or -) and solvent exchange (daily for three days or every three days for nine days), dried weight draff used as an analytical parameter to compare the income. The chromatographic profile hydroalcoholic extract (Lo-EHA), and the identification and quantification of the substance marker naringenin, were obtained by analysis by ultrafast liquid chromatography (UFLC), coupled to a UV detector. To evaluate Lo-EHA potential hypotensive, was performed direct measurement of blood pressure in normal or L-NAMA hypertensive *Wistar* rats after intravenous administration of Lo-EHA (12,5, 25 e 50 mg/kg). In addition, hypotensive oral (100 mg/kg e 200 mg/kg) effect was evaluated in rats by tail plethysmometer. To development of tablets, Lo-EHA (50 mg) was added to eight formulations determined by factorial design, ranged the diluent (celulose or babaçu), agglutinative presence and lubricant percentual. The tablets were evaluated for their organoleptic characteristics, average weight, friability, hardness, disintegration time, dissolution profile and content, using the parameters of the Brazilian Pharmacopoeia V. Acute toxicity was accessed according to acute toxic class method of OECD 423. Thus, the yield was 4.6 times higher hydroalcoholic solvent with the ethanol solvent and the occurrence independently sonication and extraction time. UFLC analysis indicated presence of naringenin marker in Lo-EHA (3.73 g%). The administration of Lo-EHA intravenously caused a significant hypotensive effect followed by bradycardic effect at the three tested doses. After the pretreatment with L-NAME, the hypotensive effect was enhanced at doses of 25 and 50 mg/kg, followed by bradycardia at all doses, indicating that this effect probably does not involve the activation of the enzyme NO synthase. In oral treatment (100 mg/kg and 200 mg/kg), pronounced hypotensive response was observed from 60 to 90 minutes in the control group, with time effect 270 and 300 minutes, respectively. For developed tablets, babassu lots have been approved in all quality control testing while the lots with cellulose failed the disintegration test, because they have disintegration time higher than 30 minutes. In acute toxicity, were not identified signs of toxicity and the LD₅₀. Thus, the standardized extract of *L. origanoides* has pharmacological potential for the development of herbal application to the treatment of hypertension.

Key-words: Medicinal plants, hypertension, HPLC, pharmaceutical formulation, toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1	<i>Lippia origanoides</i> H.B.K	22
Figura 2	Folhas e inflorescências de <i>Lippia origanoides</i> H.B.K	23
Figura 3	Classes de flavonoides. A: Flavona; B: Flavonois; C: Flavanonas; D: Flavanóis; E: Isoflavonas; F: Antocianinas.	26
Figura 4	Alguns flavonoides encontrados em <i>Lippia origanoides</i>	26
Figura 5	Matriz de planejamento fatorial 2 ² .	32
Figura 6	Procedimento para execução do teste de toxicidade aguda oral pelo método de classes (OECD, 2001) com a dose inicial de 2000 mg/kg.	39

Capítulo I

Figura 1	Mapa do Piauí. Em destaque o município de José de Freitas	55
Figura 2	Otimização da extração de <i>Lippia origanoides</i> H.B.K. por planejamento fatorial.	59
Figura 3	Influência dos fatores solvente, tempo de extração e ocorrência de agitação sobre o teor de sólidos	60
Figura 4	Espectro de varredura de soluções etanólicas do Extrato Hidroalcoólico de <i>Lippia origanoides</i> (Lo-EHA) e de solução de naringenina	61
Figura 5	Curva de calibração construída com padrão naringenina em 290 nm.	62
Figura 6	Cromatograma do Lo-EHA (6,6 mg mL ⁻¹) em solução metanólica	63
Figura 7	Cromatograma do padrão de naringenina em solução metanólica (0,5 mg mL ⁻¹).	63
Figura 8	Cromatograma da coinjeção Lo-EHA (6,6 mg mL ⁻¹)/Padrão (0,5 mg mL ⁻¹) (1:1) em metanol.	65
Figura 9	Cromatograma Lo-EHA a 6,6 mg mL ⁻¹ / MeOH (1:1)	65

Capítulo II

Figura 1	Aparato para registro de pressão arterial média após administração intravenosa de Lo-EHA.	77
Figura 2	Aparato para registro de pressão arterial sistólica por Pletismografia de Cauda.	78

Figura 3	Efeito do Lo-EHA sobre a Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca antes e após pré-tratamento com L-NAME	80
Figura 4	Variação da Pressão Arterial Sistólica após administração oral de Lo-EHA nas doses de 100 mg/Kg e 200 mg/Kg em ratas normotensas.	82
Capítulo III		
Quadro 1	Parâmetros das atividades do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso autônomo e descrição para avaliação dos parâmetros.	94
Figura 1	Procedimento para execução do teste de toxicidade aguda oral pelo Método de Classes da OECD, com a dose inicial de 2000 mg/kg.	96
Figura 2	Preparo das amostras de comprimidos para doseamento do marcador naringenina em UFLC.	100
Figura 3	Efeito do tratamento com Lo-EHA (2000mg/kg) sobre o desenvolvimento ponderal em ratas <i>wistar</i> , durante 14 dias.	102
Figura 4	Gráfico de Pareto para os resultados do planejamento fatorial 2^3 , considerando os efeitos produzidos na dureza.	105
Figura 5	Gráficos de superfície do planejamento fatorial 2^3 para efeitos produzidos na dureza (N), a partir dos fatores: diluente (celulose-; babaçu+); uso de PVP como aglutinante (não -, sim +), lubrificante (0,5% -; 1,0% +).	106
Figura 6	Gráfico de Pareto para os resultados do planejamento fatorial 2^3 , considerando os efeitos produzidos no tempo de desintegração.	107
Figura 7	Gráficos de superfície do planejamento fatorial 2^3 para efeitos produzidos no tempo de desintegração (min), a partir dos fatores: diluente (celulose-; babaçu+); uso de PVP como aglutinante (não -, sim +), lubrificante (0,5% -; 1,0% +).	108
Figura 8	Perfil de dissolução dos lotes contendo babaçu como diluente.	110

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1	Siglas utilizadas para a representação dos parâmetros avaliados no Planejamento Experimental da Extração	56
----------	--	----

Capítulo III

Tabela 1	Matriz de planejamento fatorial 2^3 para otimização de comprimidos de <i>Lippia origanoides</i> H. B. K.	97
Tabela 2	Definição da composição dos diferentes lotes de comprimidos de acordo com os fatores em estudo (diluente, presença de aglutinante e percentagem de lubrificante).	98
Tabela 3	Resultado das análises de controle de qualidade para os comprimidos desenvolvidos.	104

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

OE	Óleo essencial
WHO	World Health Organization
DL₅₀	Dose Letal 50%
NADPH oxidase	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato-Oxidase
OMS	Organização Mundial de Saúde
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
PA	Pressão Arterial
HA	Hipertensão Arterial
DC	Débito Cardíaco
RVP	Resistência Vascular Periférica
PAS	Pressão Arterial Máxima ou Sistólica
PAD	Pressão Arterial Mínima ou Diastólica
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
SNC	Sistema Nervoso Central
NTS	Núcleo do Trato Solitário
FC	Frequência Cardíaca
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Agência de Regulação de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos da América)
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agência Europeia de Regulação de Medicamentos)
NCI	<i>National Cancer Institute</i> (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development (Organização para Cooperação e Desenvolvimento da Economia)
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i> (Conferência Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para o Registro de Fármacos de Uso Humano)

GHS	Globally Harmonized System
Lo-EHA	Extrato hidroalcoólico de <i>Lippia origanoides</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
UFLC	<i>Ultra Fast Liquid Chromatograph</i>
r	Coefficiente de Correlação
EPO	<i>European Patent Office</i>
INPI	Instituto Nacional de Propriedade intelectual
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>
USPTO	<i>United States Patent and Trademark Office</i>
UV	Ultravioleta
k	Fator de Retenção
OMS	Organização Mundial de Saúde
DCV	Doença Cardiovascular
AVE	Acidente Vascular Encefálico
HA	Hipertensão Arterial
PAM	Pressão Arterial Média
FC	Frequência Cardíaca
FHDE	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
NO	Óxido nítrico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
BK_{Ca}²⁺	Canais de potássio de grande condutância ativados por cálcio
CMC	Celulose Microcristalina
PVP	Polivinilpirrolidona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1 Família Verbenaceae.....	20
3.2 <i>Lippia origanoides</i>.....	21
3.3 Componentes bioativos da espécie.....	25
3.4 Produção de extratos vegetais.....	27
3.5 Produção de comprimidos fitoterápicos.....	29
3.6 Planejamento Fatorial.....	31
3.7. Sistema Cardiovascular e Hipertensão arterial.....	33
3.8 Pletismografia de Cauda.....	35
3.9. Ensaio de Toxicidade.....	36
REFERÊNCIAS.....	40
4. CAPÍTULO I: Obtenção de um extrato padronizado das partes aéreas de <i>Lippia origanoides</i> e determinação de naringenina como um possível biomarcador	49
Resumo.....	49
Abstract.....	50
Introdução.....	52
Material e Métodos.....	54
Resultados e Discussão.....	58
Conclusão.....	67
Referências.....	67
5. CAPÍTULO II: Avaliação do efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico de <i>Lippia origanoides</i> H.B.K. frente a modelo de experimentação “<i>in vivo</i>”	71
Resumo.....	71
Abstract.....	72
Introdução.....	73

Material e Métodos.....	74
Resultados e Discussão.....	79
Conclusão.....	83
Referências.....	83
6. CAPÍTULO III: <i>Lippia origanoides</i> H. B. K.: obtenção de extrato, avaliação da toxicidade e desenvolvimento de forma farmacêutica em comprimidos	88
Resumo.....	88
Abstract.....	89
Introdução.....	90
Material e Métodos.....	92
Resultados e Discussão.....	100
Conclusão.....	110
Referências.....	111
7. PERSPECTIVAS.....	114
APÊNDICE	116

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais ou seus derivados é historicamente arraigado à maioria dos povos ou etnias globais, no tratamento dos males que afetam a saúde (BADKE et al, 2012). Conforme relatado por Melo-Batista e Oliveira (2014), plantas são uma importante fonte de compostos nutricionais e medicinais, cujas propriedades podem ser mais bem exploradas através do desenvolvimento efetivo de formas de dosagem que permitam sua utilização. Tal prática impulsiona a indústria farmacêutica ao desenvolvimento de medicamentos derivados de plantas. Considerando-se o mercado mundial destes produtos, destaca-se o faturamento da ordem de 26 bilhões de dólares em 2011, valor que representa 3% do mercado global de medicamentos (DUTRA, 2013).

Dentre as plantas medicinais comumente utilizadas pela população, é objeto de estudo deste trabalho a espécie *Lippia origanoides* Humboldt, Bonpland e Kunth (H.B.K.), pertencente à família Verbenaceae. A presença de óleo essencial (OE) na espécie, bem como sua composição, determinam o aroma específico da planta e seu sabor de condimento (OLIVEIRA et al, 2007). É comumente usada como tempero e seu uso na medicina tradicional destina-se ao tratamento de doenças gastrintestinais e respiratórias (resfriados, gripe, bronquite, tosse e asma) (PASCUAL et al., 2001; VICUÑA; STASHENKO; FUENTES, 2010).

Além das atividades supracitadas, Carvalho et al. (2013) avaliaram através de modelo experimental *in vitro*, o efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato etanólico das folhas da *Lippia origanoides* (Lo- EtOH) em artéria mesentérica de ratos e concluíram que o extrato apresenta efeito vasorrelaxante dependente do endotélio vascular. Tal resultado mostra-se promissor e incentiva uma maior investigação sobre os efeitos de *L. origanoides* em patologias cardiovasculares, sobretudo no quadro de hipertensão arterial.

Segundo dados da OMS (2013), as doenças cardiovasculares são causa de 17 milhões de mortes por ano, quase um terço do total. Destas, 9,4 milhões relacionam-se à hipertensão. Esta patologia é responsável por, pelo menos, 45% das mortes relacionadas a doenças cardíacas e por 51% das mortes por doenças cerebrovasculares. Em 2008, aproximadamente 40% dos adultos de todo o mundo com idade igual ou superior a 25 anos foram diagnosticados como hipertensos, sendo a maior prevalência de hipertensão registrada na região africana (46%), enquanto a menor prevalência é encontrada nas Américas (35%) (WHO, 2011).

Diante desse contexto, é de grande relevância o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica fitoterápica a partir de *L. origanoides* H.B.K., vislumbrando-se a

possibilidade do desenvolvimento de um medicamento de baixo custo, para o tratamento da hipertensão arterial. Dentre as formulações farmacêuticas existentes, os comprimidos destacam-se por apresentarem efeito sistêmico, através de administração conveniente e segura de dose diária do fármaco, tendo baixo custo e facilidade de produção em escala industrial (ANSEL, 2007; KLEIN et al., 2013).

O uso de matéria-prima vegetal para o desenvolvimento de medicamentos deve estar acompanhado de uma eficiente metodologia de extração dos componentes ativos, que permita viabilizar a produção de medicamentos em escala industrial. O processo de otimização da metodologia de extração pode ser realizado através de Planejamento Experimental, um instrumento estatístico que estuda o efeito de qualquer fator inerente ao processo sobre a resposta, fazendo-o variar e observando-se o resultado dessa variação em, pelo menos, dois níveis, os quais podem ser entendidos como os valores ou designações arbitrárias do fator (NORIEGA et al., 2005).

Em se tratando de formulações fitoterápicas a partir de extratos vegetais, devem ser produzidos medicamentos cuja preservação e valorização do potencial terapêutico sejam priorizadas e sua qualidade assegurada. As diferentes técnicas de secagem são alternativas promissoras para conservação e estoque dos extratos vegetais, proporcionando maior estabilidade, conservando suas características físico-químicas e propriedades farmacológicas. Dentre estas técnicas, a secagem por aspersão ou *spray-dryer* é largamente utilizada na indústria de fitoterápicos por conferir estabilidade e permitir o controle das características do produto final (MARCEL, 2009).

Diante do exposto, este trabalho intitulado “*Lippia origanoides* H.B.K.: Obtenção do extrato padronizado, avaliação da atividade anti-hipertensiva e desenvolvimento de comprimidos”, foi desenvolvido com o intuito de apresentar perspectivas ao desenvolvimento de uma formulação fitoterápica promissora para o tratamento da hipertensão arterial. Este trabalho foi organizado em capítulos que darão origem a artigos científicos, os quais serão submetidos a publicação em revistas internacionais com extensa divulgação na comunidade científica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver uma formulação em comprimido de *L. origanoides* H.B.K. e avaliar a toxicidade e atividade cardiovascular de seu extrato padronizado.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar a metodologia de extração através de Planejamento Fatorial;
- Obter o perfil cromatográfico dos extratos liofilizado e seco por aspersão, bem como o doseamento de substância marcadora por Cromatografia Líquida Ultra-Rápida;
- Averiguar o efeito hipotensor do extrato padronizado de *L. origanoides* em ratas Wistar normotensas;
- Avaliar a toxicidade aguda em ratas Wistar tratadas com extrato hidroalcoólico de *L. origanoides*.
- Desenvolver formulação em comprimido de *L. origanoides* por Planejamento Fatorial 2^3 , variando-se o diluente, presença de aglutinante e concentração de lubrificante;
- Realizar testes de controle de qualidade físico-químico dos comprimidos desenvolvidos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Família Verbenaceae

Constituída de aproximadamente 75 gêneros e 3000 espécies, a família Verbenaceae, pertencente à ordem Lamiales, ocorre em regiões temperadas, tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios (BARRETO et al., 2014; BONZANI et al., 2003, GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011). Os representantes desta família apresentam hábitos variados, podendo ser arbustivas, trepadeiras ou herbáceas, muitos sendo exclusivamente brasileiros. Os gêneros mais representativos em número de espécies são: *Verbena*, *Lippia*, *Citharexylum*, *Stachytarpheta*, *Glandularia* e *Duranta* (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011).

Muitas das espécies desta família são caracterizadas por possuírem um elevado conteúdo de óleos essenciais (mais que 1%), com uma grande diversidade de usos nas indústrias farmacêutica, alimentar, têxtil, química, cosmética e de perfumaria (VEGA-VELA; DELGADO-ÁVILA; CHACÓN-SÁNCHEZ, 2013). Os óleos essenciais de algumas espécies têm sido relatados por suas propriedades antimicrobianas contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium smegmaus*. Além disso, a importância econômica da família Verbenaceae pode ser atribuída ao largo uso das espécies, como frutíferas e ornamentais (MONTIEL et al., 2007; STASHENKO, 2010).

Quanto a sua caracterização botânica, a família é identificada por um conjunto de atributos, tais como inflorescências racemosas, flores zigomorfas, pentâmeras, gamopétalas, monoclinas; corola hipocrateriforme ou infundibuliforme, com lobos curtos; androceu geralmente com 4 estames didínamos; ovário súpero, com 1 ou 2 óvulos por lóculo, fruto do tipo drupa ou esquizocarpo seco ou carnoso. As anteras se posicionam em torno do estigma, reduzindo a luz corolínea e fazendo com que os grãos de pólen sejam aderidos às peças bucais do visitante floral quando este retira o néctar da flor (VENÂNCIO, 2010).

O gênero *Lippia* é o segundo maior da família Verbenaceae e contém em torno de 200 espécies, entre herbáceas e arbustivas, distribuídas nas Américas Central e do Sul, além de África tropical. Tais espécies tem seu valor econômico atribuído ao seu uso como fonte de óleos essenciais e extratos com uma variedade de propriedades, tais como antibacteriana, antifúngica, larvicida, atividade inseticida, dentre outras (BARRETO et al., 2014; SARTORATTO et al., 2004; STASHENKO et al., 2013).

No Brasil, localiza-se um dos principais centros de diversidade específica do gênero *Lippia*, onde o maior número de espécies se encontra na Cadeia do Espinhaço, localizada nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás. Em torno de 120 espécies de *Lippia* encontram-se no Brasil, distribuídas no cerrado e caatinga, dois importantes biomas brasileiros, onde se destacam por sua floração chamativa e por seu aroma forte e geralmente agradável (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011; OLIVEIRA et al., 2007; SOARES; TAVARES-DIAS, 2013).

Inúmeras espécies de *Lippia* são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas patologias. Considerando-se a região nordeste do Brasil, as espécies desse gênero são popularmente utilizadas, para o tratamento de resfriados, gripes, bronquites e tosse. As folhas ou partes aéreas e as flores são partes das plantas usadas em muitos casos, na forma de infusão ou decocto, administradas oralmente ou através de emplastos (OLIVEIRA et al., 2007; PASCUAL et al., 2001).

Em virtude do largo uso popular, muitas espécies têm sido investigadas do ponto de vista farmacológico, revelando propriedades distintas e relevantes, tais como ação sedativa, antiespasmódica, estomáquica, anti-inflamatória, antipirética, antisséptica, cicatrizante, antimalárica, hipotensora, no combate à sarna e tratamento da tosse e bronquite (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011; OLIVEIRA et al., 2007; PASCUAL et al., 2001). As atividades farmacológicas apresentadas pelas espécies do gênero *Lippia*, podem ser relacionadas à diversidade de metabólitos secundários produzidos, especialmente à presença de monoterpenos característicos deste gênero, tais como citral, limoneno, citroneol, alfa e beta pineno, etileugenol, linalol, entre outros presentes no óleo essencial (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011; SOUSA, 2012; SOUZA et al., 2010). Embora sejam evidenciados principalmente os constituintes voláteis, outras substâncias como flavonóides, iridóides e naftoquinonas também são citadas com frequência (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011). No gênero *Lippia*, já foram identificados aproximadamente 56 flavonóides, sendo eles tanto derivados de flavona como de flavanona (GOMES, 2009; SOUSA, 2012).

Como supracitado, a indústria alimentícia também pode beneficiar-se de características apresentadas por espécies da família Verbenaceae. Neste aspecto, ressalta-se a importância de *Lippia dulcis* Trevir., cujo principal componente das folhas e flores é a (+)-hernandulcina, uma molécula 1.000 vezes mais doce que a sacarose (PASCUAL et al, 2001).

3.2 *Lippia origanoides* H.B.K.

L. origanoides H.B.K. é um arbusto aromático que chega a atingir até 3 m de altura (Figura 1), nativa da América Central (México, Guatemala e Cuba), norte da América do Sul, especialmente na região amazônica (Guiana, Venezuela, Brasil e Colômbia) e Antilhas. Na Colômbia é conhecida como “*Oregano del Monte*” (Orégano do Monte), no norte do Brasil, é conhecida como Salva-de-Marajó e Alecrim d’Angola. No Piauí é conhecida pela população como “Alecrim-do-campo” e nesta região a espécie é dispersa, já tendo sido encontrada, por exemplo, nos municípios de Cabeceiras, Campo Maior e José de Freitas (BARRETO et al., 2014; SANTOS et al., 2004; STASHENKO et al., 2010; VICUÑA; STASHENKO; FUENTES, 2010).

Figura 1 - *Lippia origanoides* H.B.K



Fonte: Sousa, 2012.

A abordagem pioneira sobre *L. origanoides* H.B.K foi realizada por Moraes et al. (1972), onde relata-se que a semelhança olfativa com o “orégano” deverá ter sido tão sugestiva que inspirou este nome aos botânicos Humboldt, Bonpland e Kunth (H.B.K). Na oportunidade de uma viagem feita à Amazônia, os Drs. Samuel Ribeiro dos Santos e Alcides d’Andrea Pinto adquiriram no Mercado do Ver-o-Peso, Belém (Pará) uma erva vendida com o nome de “alecrim d’Angola”, a qual era usada como tempero na culinária local. Após o cultivo e florescimento da erva adquirida em canteiros do Instituto Agrônomo de Campinas, foi possível classificá-la como “*Lippia origanoides* H.B.K (Verbenaceae)”, uma espécie da flora amazônica.

Este arbusto tem folhas opostas simples (Figura 2), de tamanhos variados, devido a possíveis adaptações morfológicas e fisiológicas em resposta a exposição à luz. Apresenta inflorescências caracterizadas por flores brancas (Figura 2), pequenas e pediculadas (em média 4 mm de tamanho) e um alto rendimento de frutos secos e sementes por planta. *L. origanoides* tem um odor pungente, semelhante ao orégano, devido à presença de metabolitos secundários, tais como o carvacrol, timol e *p*-cimeno, dentre outros compostos fenólicos responsáveis pelo aroma e sabor particulares deste condimento. A atração de agentes polinizadores pode ser atribuída também à presença de tais compostos odoríferos (SUÁREZ et al., 2008; VEGA-VELA; CHACÓN-SÁNCHEZ, 2012).

Na medicina tradicional, folhas ou partes aéreas da espécie são utilizada para o tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais, além de ser também utilizada para alívio de cólicas uterinas, doenças vaginais, desordens menstruais, febre e como antisséptico geral para infecções de boca, garganta, vagina e para a limpeza de feridas (BARRETO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014; VICUÑA; STASHENKO; FUENTES, 2010).

Assim como outras espécies de *Lippia*, *L. origanoides* tem sido utilizada também no reflorestamento de áreas mineradas. Na Venezuela esta espécie foi pioneira em regiões de minério de ferro que foram desativadas ou abandonadas (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011).

Figura 2 – Folhas e inflorescências de *Lippia origanoides* H.B.K



Fonte: Sousa, 2012.

De acordo com Stashenko et al. (2010), *L. origanoides* tem uma importante variação fitoquímica representada através de três quimiotipos, os quais são designados de acordo com o componente majoritário presente no óleo essencial (quimiotipo A: *p*-cimeno,

quimiotipo B: carvacrol e quimiotipo C: timol). Considerados uma faceta da biodiversidade, quimiotipos referem-se a plantas morfologicamente semelhantes que possuem composição diferente de metabólitos secundários, a qual pode resultar das fases de desenvolvimento da planta, de variações nas condições de cultivo ou de modificações fisiológicas da planta, causadas por fatores ambientais específicos (STASHENKO et al, 2010).

Já no trabalho de Vega-Vela et al. (2013), admite-se que através da composição dos óleos essenciais de *L. origanoides*, a espécie pode ser classificada em seis quimiotipos: rico em timol (quimiotipos C e D); carvacrol (quimiotipo B); p-cimeno, eucaliptol (+ traços de β -felandreno) e timol metil eter (quimiotipo F); timol metil eter, p-cimeno, timol e γ -terpineno (quimiotipo G); e eucaliptol e α -felandreno (quimiotipo E).

Santos et al. (2004), após coleta da planta realizada em Cabeceiras, Campo Maior e José de Freitas, três cidades do estado do Piauí (Brasil), apontam como principais constituintes da espécie carvacrol (37,3%, 42,9% e 35,5%, respectivamente), p-cimeno (12,1%, 45,8% e 11,9%) e timol (6,1%, 5,1% e 8,4%). Já a análise do óleo essencial de *L. origanoides* coletada em Oriximiná, Pará (Brasil), mostra que os compostos majoritários são carvacrol (38,6%), seguido por timol (18,5%) e p-cimeno (10,4%) (OLIVEIRA et al., 2007).

Ao longo dos anos a espécie vem sendo largamente estudada, especialmente no tocante à composição de seu óleo essencial, bem como suas possíveis atividades. Os resultados são volumosos e mostram-se promissores sobretudo no tocante a ensaios de atividade contra diversos microrganismos, dentre eles *Spongospora subterranea*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*; *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris maydis*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida sp.*, *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma cruzi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* Pode-se então sugerir que o uso popular da espécie no combate a afecções do trato respiratório esteja relacionado à atividade contra os microrganismos envolvidos em tais patologias. Há também relatos de que o OE de *L. origanoides* inibe a replicação *in vitro* do vírus da febre amarela, além de apresentar atividade contra o vírus da dengue (VICUÑA; STASHENKO; FUENTES, 2010).

No estudo de Barreto et al. (2014), o extrato etanólico e a fração diclorometano foram testados frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*), demonstrando-se que ambos apresentam inibição a cepas de *S. aureus*, sendo o potencial inibitório da fração diclorometano superior ao do seu constituinte majoritário, naringenina, bem como do extrato etanólico.

No tocante ao potencial tóxico da espécie *L. origanoides*, Sousa (2012) apresenta o resultado da toxicidade do extrato e frações frente a *Artemia salina*. O estudo aponta que a

fração diclorometano ($DL_{50} = 380,59 \mu\text{g mL}^{-1}$) e fração acetato de etila ($DL_{50} = 29,98 \mu\text{g mL}^{-1}$) são consideradas tóxicas, visto que apresentam DL_{50} menores que $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, ao passo que a fração hidroalcoólica ($DL_{50} = 513342,61 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o extrato hidroalcoólico não apresentaram toxicidade. Já o extrato etanólico e a fração hexânica mataram todos os microcrustáceos em todas as concentrações testadas, sendo considerados tóxicos quando testadas em *A. salina* (CITÓ et al., 2003; MEYER et al., 1982).

Corroborando com este resultado, o estudo de SIVIRA et al (2011), onde avaliaram a toxicidade do extrato etanólico das folhas de *Lippia origanoides* frente a *Tetranychus cinnabarinus*, uma espécie de ácaro, através da técnica de imersão de discos e detectaram mortalidade máxima de 96.6%, quando utilizada a concentração de 20% p/v do extrato.

Nesse contexto, Stashenko et al. (2013) destacam que existem poucas publicações relativas à composição e atividade dos extratos de *Lippia*, comparativamente ao número de estudos que têm como foco o óleo essencial. Tal deficiência deve ser corrigida, visto que as espécies de *Lippia* são convencionalmente utilizadas com finalidade medicinal pela população, na forma de infusão de suas partes aéreas.

3.3 Componentes bioativos da espécie

Como citado anteriormente, as espécies do gênero *Lippia* podem ser consideradas fontes importantes de compostos flavonoídicos. De acordo com Stashenko et al. (2013), *L. origanoides* pode ser considerada uma fonte promissora de substâncias bioativas devido à variedade de flavonoides e suas concentrações relativamente altas quando comparadas com outras plantas aromáticas comuns; e atribuem algumas das atividades da espécie a grupos de substâncias, dentre os quais destacam-se as flavanonas naringenina e pinocembrina e as flavonas quercetina e luteolina (Figuras 3 e 4).

Polifenóis com presença marcante no reino *Plantae*, os flavonoides são conhecidos por sua atividade antioxidante e capacidade quelante de íons metálicos. Muitos compostos têm sido identificados e podem ser divididos de acordo com a variação estrutural e grau de oxidação da molécula. Através de estudos epidemiológicos, o consumo de tais substâncias tem sido associado à baixa incidência de doenças cardiovasculares, tais como hipertensão, doença arterial coronariana e acidente vascular encefálico (MULVIHILL; HUFF, 2010; TARAHOVSKY et al, 2014).

Figura 3 – Classes de flavonoides. A: Flavona; B: Flavonois; C: Flavanonas; D: Flavanóis; E: Isoflavonas; F: Antocianinas

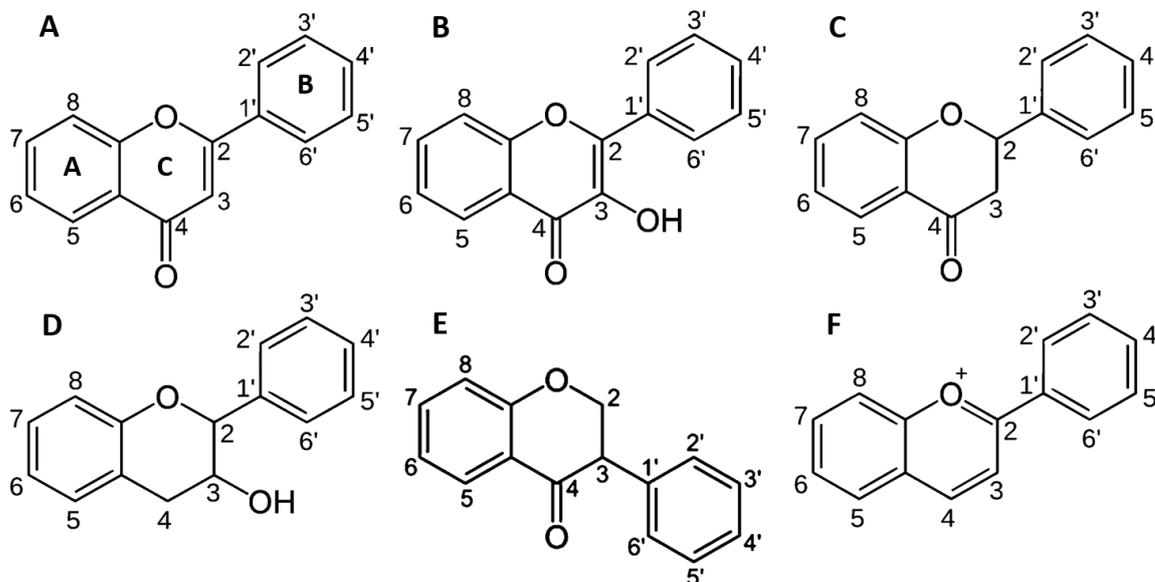
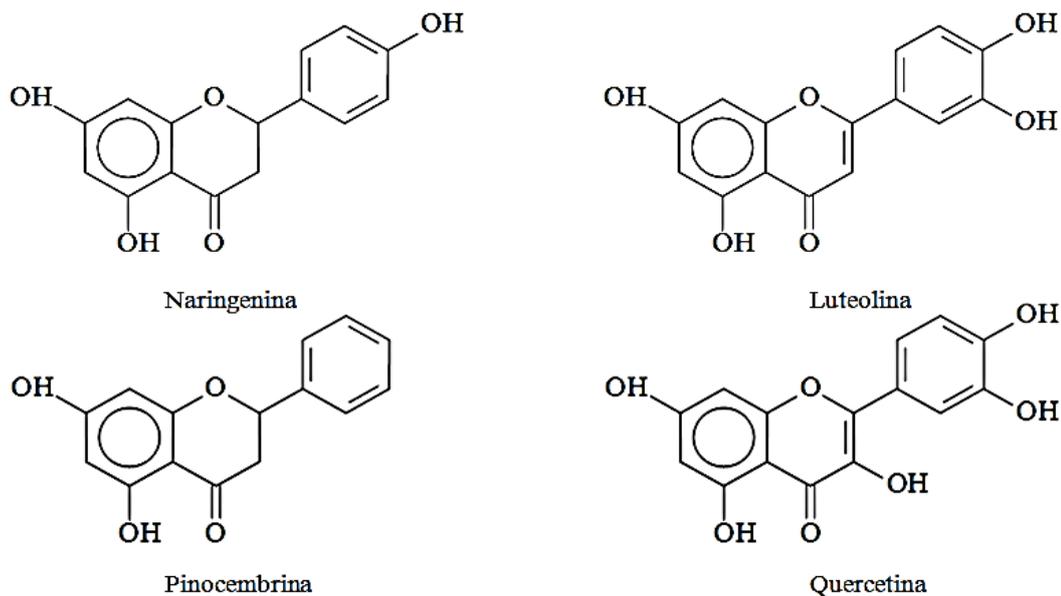


Figura 4 – Alguns flavonoides encontrados em *Lippia organoides*



Além da atividade antioxidante e quelante atribuída aos flavonoides, outros efeitos podem ser responsáveis por sua influência cardiovascular positiva, como é o caso da inibição direta de algumas enzimas formadoras de radicais (xantina oxidase, NADPH oxidase e as lipoxigenases), diminuição da agregação plaquetária, além do efeito vasodilatador. Diferentes

características estruturais estão relacionadas a cada um dos efeitos supracitados. Resumidamente, um anel B catecólico é necessário para a atividade de eliminação de radicais; grupos hidroxila na posição orto, ou grupo 3-hidroxi-4-ceto ou grupo 5-hidroxi-4-ceto permitem a quelação de ferro; conformação planar do grupo 4-ceto e a ligação 2,3-dupla são essenciais para a inibição da agregação plaquetária; a conformação hidroxi-metoxi orto no anel B é necessária para a inibição da NADPH oxidase; e o grupo 4-ceto é um requisito para a ação vasodilatadora (MLADĚNKA et al., 2010)

No estudo de Lou et al. (2014), destaca-se a importância dos efeitos de flavonoides para a saúde, tendo como característica a baixa toxicidade mesmo com o uso prolongado, sugerindo que eles podem ser apropriados para terapia de Doença de Parkinson. Vale ressaltar que estudos epidemiológicos demonstram a ligação entre a ingestão de dieta rica em fontes de flavonoides e o reduzido risco de Doença de Parkinson.

Como exemplo, tem-se a naringenina, que nos estudos de Heo et al. (2004) e Zbarsky et al. (2005), promoveu neuroproteção tanto em doença de Parkinson, quanto de Alzheimer. Desse modo, o alvo molecular da naringenina tem se tornado objeto de investigação, na busca pelo melhor entendimento da sua ação sobre o organismo (LOU et al., 2014).

Lee et al. (2003) estudaram os efeitos da naringenina e alguns produtos sintéticos dela derivados e mostraram atividade hipocolesterolemizante. Além disso, a naringenina e a aglicona da naringina, exibiram potencial antiaterogênico e, de modo promissor, naringenina mostrou bons resultados cardioprotetores nos estudos de Testai et al. (2013), Lee et al. (2012) e Chang et al. (2010), sendo obtida nos dois últimos a partir das espécies *Typha angustata* e *Calamus quiquisetinerviis* respectivamente. Naringenina foi também estudada quanto aos efeitos sobre aterosclerose onde, através da correção de distúrbios metabólicos ligados a resistência à insulina e dislipidemia, preveniu o desenvolvimento de aterosclerose em ratos com dieta rica em gordura (MULVIHILL; HUFF, 2010).

Diante do exposto, admite-se que o estudo de plantas tradicionais com atividade cardioprotetora, bem como a identificação de seus componentes bioativos, pode constituir fonte promissora para a descoberta de novos agentes hipotensores e o consequente desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da hipertensão (SUN et al., 2013).

3.4 Produção de extratos vegetais

A utilização de matérias primas vegetais, visando o aproveitamento de suas propriedades biológicas, requer o conhecimento prévio das substâncias ativas da espécie em

questão. Para tanto, um dos aspectos que deve ser observado consiste na preparação de extratos vegetais, visando o isolamento e/ou caracterização de seus constituintes químicos ativos. Pode-se sugerir como método adequado para a análise químico-farmacológica da composição vegetal, a preparação de extratos hidroalcoólicos (etanol/água 50%) por maceração. Nessas condições, tem-se um meio extrativo semelhante às tinturas realizadas na cultura popular, onde se misturam, em alguns casos, as partes ativas das plantas com bebidas alcoólicas (MIGLIATO et al., 2011).

Além disso, o método de extração estabelecido deve ser capaz de extrair os componentes de interesse do material vegetal, na maior proporção possível, visando a realização dos estudos necessários e o possível desenvolvimento tecnológico de um produto farmacêutico derivado da planta medicinal. Em extratos vegetais, baixas concentrações de sólidos requerem que grande quantidade de solvente seja eliminada ou que grandes quantidades de adjuvantes de secagem sejam utilizados, visando a obtenção do extrato seco, tal condição torna o processo de secagem mais oneroso e duradouro, o que não é vantajoso, especialmente em se tratando de uma escala industrial de produção (DE CAMPOS, 1996).

Por outro lado, a adição de adjuvantes de secagem diminui proporcionalmente o teor de ativo no extrato seco, o que gera um fator limitante à preparação de formas farmacêuticas que precisam conter uma determinada concentração de ativos por unidade farmacotécnica. Otimizar o método de preparo do extrato líquido é, portanto, de grande importância para a obtenção de um extrato seco de qualidade, com uma proporção aumentada de ativos em relação ao resíduo sólido total (SEVERO et al., 2013).

Desse modo, as diferentes condições de extração podem ser estudadas, a fim de aumentar o rendimento do processo extrativo e obtenção de degradação mínima dos constituintes químicos da espécie. Além disso, obter resultados otimizados das condições de extração, gera uma melhor representação da composição da matriz vegetal a ser utilizada nos estudos de caracterização (BOCHI et al., 2014).

A obtenção de um maior rendimento do processo extrativo é também incentivada pelo fato de que a atividade biológica apresentada pela espécie vegetal pode ser atribuída à combinação de vários compostos presentes no extrato. Informações coletadas de ensaios que avaliam a ação do extrato total de plantas versus a ação de preparações purificadas, permitem inferir que, em muitos casos, a potência declina à medida que continua a purificação do extrato para frações isoladas ou compostos moleculares isolados. Nestes casos, é sugerido que os componentes apresentem ações múltiplas que resultam em uma maior atividade total em função

de sinergismos, aumento de biodisponibilidade ou efeitos cumulativos dos diferentes constituintes do extrato (CARMONA; PEREIRA, 2013).

3.5 Produção de Comprimidos Fitoterápicos

A obtenção de terapias farmacológicas através do estudo de plantas medicinais ou seus constituintes isolados é, de longa data, fonte promissora de desenvolvimento para novas alternativas terapêuticas, que sobrepujem as características apresentadas pelas alternativas já existentes. Nesse contexto, estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados direta ou indiretamente de plantas medicinais, principalmente através da aplicação de tecnologias modernas ao conhecimento tradicional (BRASIL, 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2011), essa percentagem pode ser maior que 60% em se tratando de medicamentos antitumorais e antimicrobianos.

Deve-se ressaltar que o Brasil ocupa a décima posição no mercado farmacêutico mundial de fitoterápicos, e importa cerca de 100% da matéria-prima utilizada na produção destes medicamentos, fato que representa um paradoxo diante do potencial e oportunidades que o território brasileiro oferece (BRASIL, 2012). Este panorama reforça a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos nacionais e, desse modo, do melhor aproveitamento das potencialidades da flora local.

Medicamentos fitoterápicos podem apresentar-se através de diferentes formas farmacêuticas, sendo destacável o interesse da indústria farmacêutica pelo emprego de extratos vegetais secos, uma vez que estes apresentam menores chances de infestação e crescimento microbiológico, bem como de degradações físicas e químicas, o que lhes confere maior estabilidade, além de maior concentração de compostos ativos, fácil padronização, manuseio, transporte e armazenamento (SILVA, 2011).

Estes extratos secos são produzidos a partir do extrato líquido por meio de diferentes métodos de secagem, como a liofilização, secagem em leitos fluidizados e a secagem por nebulização ou aspersão (spray drying). Tais métodos podem ser comparados sob os pontos de vista tecnológico, industrial e econômico, devendo ser avaliados alguns parâmetros principais para a escolha do método de secagem, como a temperatura utilizada, o tempo e custo de operação e as características do produto final (ROSÁRIO NETO, 2012; SEVERO et al., 2013).

A aplicação inicial do *Spray Dryer* na área farmacêutica foi para obtenção de extratos secos de matérias-primas ativas de plantas. Atualmente, o método tem sido bastante

empregado, uma vez que fornece produtos com maior concentração de constituintes químicos e com características tecnológicas vantajosas, como a maior homogeneidade de distribuição dos componentes da preparação e maior estabilidade física (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; VASCONCELOS et al., 2005).

A utilização do equipamento *Spray Dryer* permite a transformação de matérias primas farmacêuticas a partir de um estado fluido em forma de partículas secas por aspersão através de um meio de secagem a quente. É uma operação de secagem contínua de partículas, onde o material em processo pode ser uma solução, suspensão, dispersão ou emulsão dentro de uma câmara submetida a uma corrente controlada de ar aquecido. O contato das gotículas produzidas com o ar quente promove a evaporação do solvente em um pequeno intervalo de tempo, obtendo-se o material seco, que pode encontrar-se na forma de pó, grânulos ou aglomerados, dependendo das propriedades físicas e químicas do material, do modelo do secador e propriedades do pó final desejado (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; PATEL; PATEL; SUTHAR, 2009; SEVERO et al, 2013).

As características do material seco produzido são inerentes às especificações estabelecidas para a realização do processo, tais como temperatura e tempo de secagem, velocidade de alimentação e composição do material de entrada na sua forma fluida. Nesse sentido, o uso de adjuvantes associados a extratos vegetais na técnica de secagem por aspersão é uma prática muito comum, sendo geralmente utilizados neste processo: amido, ciclodextrinas, dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcico, gelatina, goma arábica, lactose, maltodextrina entre outros (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

O dióxido de silício coloidal (Aerosil 200[®]) tem sido amplamente empregado como adjuvante na secagem de extratos vegetais, por apresentar características desejadas ao produto final, sendo adsorvente e apresentando elevada pureza, inércia química e inocuidade. Este adjuvante apresenta vantagens sobre os demais, pois, dada sua elevada superfície específica (200 m²/g), diminui a superfície exposta das partículas de solução extrativa adsorvidas, durante o contato destas com o calor, minimizando a aderência do produto na câmara de secagem, obtendo-se assim, um produto menos sensível à umidade e com melhores propriedades de fluxo (ROSÁRIO NETO, 2012).

Uma vez obtido um extrato vegetal seco de qualidade, pode-se prosseguir ao adequado desenvolvimento de formulações farmacêuticas na forma de comprimidos, amplamente empregadas por apresentarem vantagens em relação às demais formas farmacêuticas, visto que possuem maior estabilidade química, física e microbiológica, permitem a produção em larga escala por processos robustos e padronizados, além de serem

leves, compactos e apresentarem maior precisão de doses, bem como maior aceitação pela população (KLEIN et al., 2013; SILVA, 2011).

No tocante à produção de comprimidos, sabe-se que o método de compressão direta apresenta vantagens em relação à produção por via úmida, tais como menor custo e menor tempo de produção. Entretanto, estima-se que menos de 20% dos materiais farmacêuticos disponíveis podem ser submetidos satisfatoriamente ao processo de compressão direta, fato que leva, em muitos casos, à escolha pela via úmida de produção. Associado a este fato, deve-se ressaltar que extratos vegetais secos por spray drying apresentam-se como pós finos, leves e de baixa fluidez e compressibilidade, propriedades que podem ser melhoradas através da granulação dos pós, com conseqüente produção de comprimidos por via úmida (SILVA, 2011).

3.6 Planejamento Fatorial

O desenvolvimento de medicamentos deve estar acompanhado de processos melhorados de fabricação, que permitam viabilizar a produção de medicamentos em escala industrial. Tais melhoramentos podem ser obtidos através de metodologias de Planejamento Experimental, instrumento estatístico que estuda o efeito de qualquer fator inerente ao processo sobre a resposta, fazendo-o variar e observando-se o resultado dessa variação em, pelo menos, dois níveis, os quais podem ser entendidos como os valores ou designações arbitrárias de cada um dos fatores envolvidos no sistema. Um planejamento experimental em que todas os fatores (k) são estudados em dois níveis irá requerer a realização de $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes, sendo chamado por isso de planejamento fatorial 2^K (BUTTON, 2012; NORIEGA et al., 2005; SÁ, 2013).

Para cada fator, seus níveis podem ser entendidos como valores ou designações arbitrárias (máximo e mínimo: +1 e -1), ou seja, os valores que esses fatores poderão assumir em posições ou condições extremas. Nos planejamentos experimentais nos quais as variáveis são exploradas em 2 níveis, estas podem ser adequadamente codificadas com o uso dos sinais (+) e (-), de modo que os sinais são atribuídos aos níveis superiores ou inferiores de forma arbitrária, sem interferir na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados. Além disso, a atribuição de sinais é necessária para auxílio nos cálculos determinantes da influência das variáveis estudadas e das suas interações no sistema em estudo (SILVA, 2008).

De acordo com Sá (2013), o planejamento fatorial pode ser representado de modo ideal através de tabelas, assim, tomando como base um planejamento com 2 fatores variando

em 2 níveis, ou seja, planejamento do tipo 2^2 , serão permitidas 4 combinações possíveis como mostra a matriz de planejamento da figura 5.

Figura 5 - Matriz de planejamento fatorial 2^2 .

Ensaio	Fator 1	Fator 2	Interação entre Fatores 1 e 2
1	-	-	+
2	-	+	-
3	+	+	+
4	+	-	-

Fonte: Sá (2013).

Como resultado para o Planejamento Experimental, deve ser escolhido um parâmetro que seja inicialmente dependente dos fatores selecionados. Através do conjunto de resultados encontrados para a série de combinações possíveis, pode-se avaliar os efeitos de interação, que se referem à dimensão com que um fator interfere diretamente sobre a resposta de outro fator (MOURA JÚNIOR, 2009).

De acordo com Button (2012), são muitos os benefícios da utilização das técnicas estatísticas de planejamento experimental, dentre estes destaca-se a possibilidade de redução do número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação, o estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos, levando à elaboração de conclusões a partir de resultados qualitativos.

Desse modo, o Planejamento Experimental deve ser utilizado a fim de obter-se as melhores condições operacionais de um sistema, realizando-se um menor número de experimentos quando comparado com métodos não submetidos a variações (SEVERO, et al, 2013).

Assim, pode-se afirmar que o uso de metodologias de Planejamento Experimental permite, por exemplo, a otimização do processo de produção de medicamentos a partir de matéria-prima ativa vegetal, podendo-se atingir um menor custo de produção para os medicamentos, bem como o melhor aproveitamento do potencial terapêutico desempenhado pela espécie vegetal frente a diferentes sistemas orgânicos, tal como a atividade sobre o sistema cardiovascular desempenhada pela espécie *L. origanoides* (CARVALHO et al., 2013; NORIEGA et al., 2005).

3.7 Sistema Cardiovascular e Hipertensão arterial

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2013), doenças cardiovasculares são a maior causa de mortes no mundo e têm a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) como maior fator de risco para sua ocorrência prematura. As estatísticas brasileiras atuais reproduzem o cenário mundial, apresentando a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) como a maior causa de mortes por doenças cardiovasculares, além de ser o principal fator de risco para complicações comuns como acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio e doença renal crônica terminal. (ANGELI, REBOLDI; VERDECCHI, 2013; IKEDA et al., 2014; VILA-NOVA, 2014).

Em 2002, uma meta-análise realizada através de 61 estudos observacionais prospectivos mostrou que na faixa etária de 40 a 69 anos, cada redução de 20 mmHg na pressão arterial sistólica ou 10 mmHg aproximadamente na pressão arterial diastólica está associada com uma redução na taxa de mortalidade. Além disso, nas últimas três décadas o número de pessoas com hipertensão arterial não controlada aumentou em torno de 1 bilhão no mundo todo. Desse modo, os danos e as taxas de morte associadas a doenças cardiovasculares podem ser evitados através da redução dos valores de pressão sanguínea, prevenindo-se assim a hipertensão arterial (IKEDA et al., 2014; VAVRICKA; HIMMELMANN; SCHAFFNER, 2002).

Regular a Pressão Arterial (PA), que representa uma medida da força que o sangue exerce quando passa nos vasos sanguíneos, é uma das funções fisiológicas mais complexas do organismo, realizada através de ações integradas dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino. A Hipertensão Arterial (HA) é desenvolvida no organismo através de causa multifatorial e a investigação da sua fisiopatologia, bem como seu tratamento, requer conhecimento dos mecanismos normais de controle da PA para identificarem-se evidências de anormalidades que antecedam a elevação da PA a níveis patológicos (MONTEIRO, 2012; SANJULIANI, 2002).

A pressão arterial é determinada por fatores físicos como o volume sanguíneo e a capacitância da circulação, e resulta da combinação entre o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica (RVP). Débito cardíaco (DC) refere-se à quantidade de sangue bombeada pelo ventrículo esquerdo para as artérias, por minuto, este depende do volume de sangue circundante, da frequência cardíaca, do retorno venoso, além do grau de contração do miocárdio. Por outro lado, RVP representa a oposição dos vasos sanguíneos à circulação do sangue e é determinada por mecanismos vasoconstritores e vasodilatadores como o sistema

nervoso simpático, o sistema renina angiotensina e a modulação endotelial, bem como da espessura da parede das artérias. Em geral, pacientes portadores de HA apresentam elevação da PA decorrente do aumento da RVP ou do DC (GODINHO, 2011; SANJULIANI, 2002).

Desse modo, a PA deve ser controlada através de ajustes adequados da frequência e da contratilidade cardíaca, do estado contrátil dos vasos de resistência e dos vasos de capacitância. Valores de PA superiores a 140 mmHg (pressão sistólica) e 90 mmHg (pressão diastólica), medido em pelo menos duas ocasiões distintas, representam um dos critérios de diagnóstico da hipertensão (MONTEIRO et al., 2012; SANJULIANI, 2002; WEBB et al., 2010).

Ao longo do ciclo cardíaco a PA sofre oscilações, de modo que as referências aos seus valores são realizadas através de dois parâmetros: a pressão arterial máxima ou sistólica (PAS), que corresponde ao momento da sístole, onde o ventrículo esquerdo bombeia o seu conteúdo para a aorta e a pressão arterial mínima ou diastólica (PAD) que corresponde ao momento de diástole, em que o ventrículo esquerdo enche-se de sangue (ALVES, 2014; GODINHO, 2011). Deve-se ressaltar ainda que os valores de pressão arterial para humanos são semelhantes aos de ratos e camundongos, de modo que valores normais ou considerados hipertensos para humanos também o são para estes roedores (BOMFIM, 2012).

A PA deve apresentar uma estreita faixa de variação, de modo a permitir uma adequada perfusão tecidual. Tal controle envolve a interação complexa de grande número de moléculas e sistemas fisiológicos, tais como mecanismos neurais e neuro-humorais que, em curto e longo prazo, modulam a atividade do sistema nervoso autônomo para o coração e para os vasos, além do volume sanguíneo e da secreção de hormônios como renina, vasopressina, peptídeo natriurético atrial, etc. Oscilações de PA a curto prazo são reguladas pelo sistema nervoso simpático (SNS), ao passo que a longo prazo esse controle é feito pelos rins, basicamente pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (CHOPRA, BABY, JACOB, 2011; IRIGOYEN et al., 2003; IRIGOYEN et al., 2005; SANTOS, 2014).

Desse modo, o adequado controle sobre a PA é mediado tanto por mecanismos periféricos quanto centrais, sendo os barorreceptores arteriais um dos principais responsáveis pelo ajuste contínuo da PA. Estes receptores são ativados durante elevações da PA, emitindo sinais ao sistema nervoso central (SNC), especificamente ao núcleo do trato solitário (NTS), determinando aumento da atividade vagal e queda da frequência cardíaca (FC) e do tônus simpático para o coração, rins e vasos, o que promove a redução da contratilidade cardíaca e queda da resistência vascular periférica e renal, com consequente redução da PA (IRIGOYEN et al.; 2005; MENDONÇA et al.; 2005; SANTOS, 2014).

Nesse contexto, fármacos anti-hipertensivos reduzem a pressão sanguínea agindo sobre os vasos de resistência, os vasos de capacitância, o coração e os rins. Drogas diuréticas, simpaticolíticas, vasodilatadoras, bloqueadoras dos canais de cálcio, bloqueadores de angiotensina II e inibidores da enzima conversora de angiotensina, são importantes classes de drogas anti-hipertensivas (WEBB et al., 2010).

Diante da incidência de hipertensão arterial sobre a população mundial, é grandioso o consumo de fármacos anti-hipertensivos, bem como a oferta destes no mercado. Desse modo, é necessário assegurar que os fármacos anti-hipertensivos em uso, pertencentes a classes farmacológicas distintas e agindo sob diferentes mecanismos de ação, são seguros quanto a ocorrência de efeitos adversos, especialmente por tratarem-se normalmente de fármacos de uso contínuo e a exposição prolongada às substâncias ser fator preponderante para o desenvolvimento de tais reações, dentre elas, a toxicidade genética (SANTOS et al., 2013).

Brambilla e Martelli publicaram em 2006 um compêndio de informações sobre genotoxicidade e carcinogenicidade de 164 drogas anti-hipertensivas comercializadas em alguns países. Deste total, 65 drogas (39,6%) não apresentaram resultados para genotoxicidade ou carcinogenicidade. Os 99 medicamentos restantes tiveram pelo menos um resultado para genotoxicidade ou carcinogenicidade e dentre estes, apenas 42 (25,6%) tinham todos os dados exigidos pelas diretrizes para testes de produtos farmacêuticos anti-hipertensivos. Na mesma pesquisa, apontam-se resultados de estudos epidemiológicos que não excluem uma ligação, mesmo que pequena, entre o tratamento crônico com algumas drogas anti-hipertensivas e mortalidade por câncer.

Desse modo, a busca incessante por novas alternativas terapêuticas ao tratamento da HA pode revelar opções farmacológicas que forneçam maior proteção ao usuário no tocante a ocorrência de efeitos indesejados. Para tanto, a pesquisa de novos fármacos anti-hipertensivos pode ser realizada através de protocolos *in vitro* ou *in vivo*, recebendo destaque dentre estes últimos, a medida direta da pressão sanguínea, por canulação arterial, ou a medida indireta da pressão sanguínea, por pletismografia de cauda.

3.8. Pletismografia de Cauda

A medida da pressão sanguínea em modelo animal pode ser realizada através de protocolos laboratoriais, tais como a canulação arterial, que permite a medição direta com alto nível de precisão e a pletismografia de cauda, que permite a medição indireta da pressão sanguínea de modo não invasivo. Um pletismógrafo é um dispositivo que registra as variações

de volume ou pressão sanguínea através das extremidades. O volume de uma extremidade modifica-se entre a sístole e a diástole, como resultado do fluxo de sangue pulsátil nesta região. Existem diferentes tipos de pletismógrafos usados para mensurar tais variações, como de água, ar, impedância elétrica e pletismografia fotoelétrica (KUPINSKI, 2002; MOURA JÚNIOR, 2009).

Os valores fornecidos através da medição direta da pressão arterial são comumente tomados como padrão de referência aos valores fornecidos por medições indiretas, entretanto, a canulação arterial requer o preparo cirúrgico dos animais, o que atribui natureza invasiva ao método e limita o sucesso na sua adoção para o monitoramento crônico da pressão sanguínea (GANGWAR et al, 2014; MOURA JÚNIOR, 2009; PARASURAMAN; RAVEENDRAN, 2012).

Em contrapartida, a medida indireta da pressão arterial pela técnica de pletismografia de cauda é convenientemente utilizada em experimentos crônicos *in vivo*. O método consiste em ajustar um pequeno *cuff* à cauda do animal e inflá-lo numa faixa normal de pressão sanguínea. O *cuff* apresenta um transmissor que fornecerá os dados de pressão arterial a um *software* específico a partir da artéria caudal. A fim de melhorar a sensibilidade da medição, os animais são submetidos a aquecimento moderado (35 °C), favorecendo assim a dilatação da referida artéria. Através de alguns trabalhos em diferentes modelos de animais, tem-se demonstrado uma boa correlação entre as medidas direta e indireta de pressão sanguínea (MACEDO, 2007).

Todavia, a metodologia de pletismografia de cauda ainda é passível de erros, mesmo estando adequadamente validada, em especial quando é destinada a mensurar modestas alterações da pressão arterial. A fim de minimizar esses erros, esta técnica apresenta características inerentes que devem ser consideradas e devidamente controladas quando do seu uso, são elas: aquecimento adequado dos animais, correto posicionamento do manguito e do receptor e necessidade de treinamento e contenção dos animais para a realização dos protocolos (IBRAHIM; BERK; HUGHES, 2006; IKEDA; NARA; YAMORI, 1991; KREGE et al., 1995; MOURA JUNIOR, 2009).

3.9. Ensaio de Toxicidade

A toxicidade de uma substância a um organismo vivo pode ser entendida como a capacidade desta em promover danos graves ou morte, havendo uma relação entre

concentração e tempo de exposição quando da ocorrência de tais danos (BARROS; DAVINO, 2003).

Nesse contexto, deve-se considerar que plantas medicinais, em virtude da presença de xenobióticos, apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas ao organismo, sendo necessário enfrentar a falsa ideia de que os fitoterápicos, por terem seus constituintes obtidos da natureza, possuem uma “naturalidade inócua”, ou seja, são isentos de efeitos tóxicos ou adversos. Desse modo, para que os recursos oriundos da medicina popular possam ser adequadamente incorporados à medicina científica, torna-se imprescindível a avaliação de eficácia e segurança destes medicamentos, através dos estudos de toxicidade aguda ou crônica (MADALOSSO, 2011; MELLO; LANGELOH; MELLO, 2007; SILVA, 2007).

De acordo com a legislação brasileira para registro de medicamentos fitoterápicos, os testes de toxicidade pré-clínica exigidos são estipulados pelo “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”. Neste documento, constam, dentre outros, os ensaios de toxicidade aguda e o de doses repetidas (longa duração), que devem ser efetuados quando há indicação de uso contínuo ou prolongado em humanos (BRASIL, 2010). Além disso, a Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF da ANVISA, publicou em 2013 o “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos”. Este guia apresenta uma orientação para a condução de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos e sua elaboração foi baseada em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos (FDA, EMA), e de instituições internacionais de interesse na área (ICH, OECD, NCI, WHO). De acordo com este guia, estudos de toxicidade de dose única (aguda), são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração.

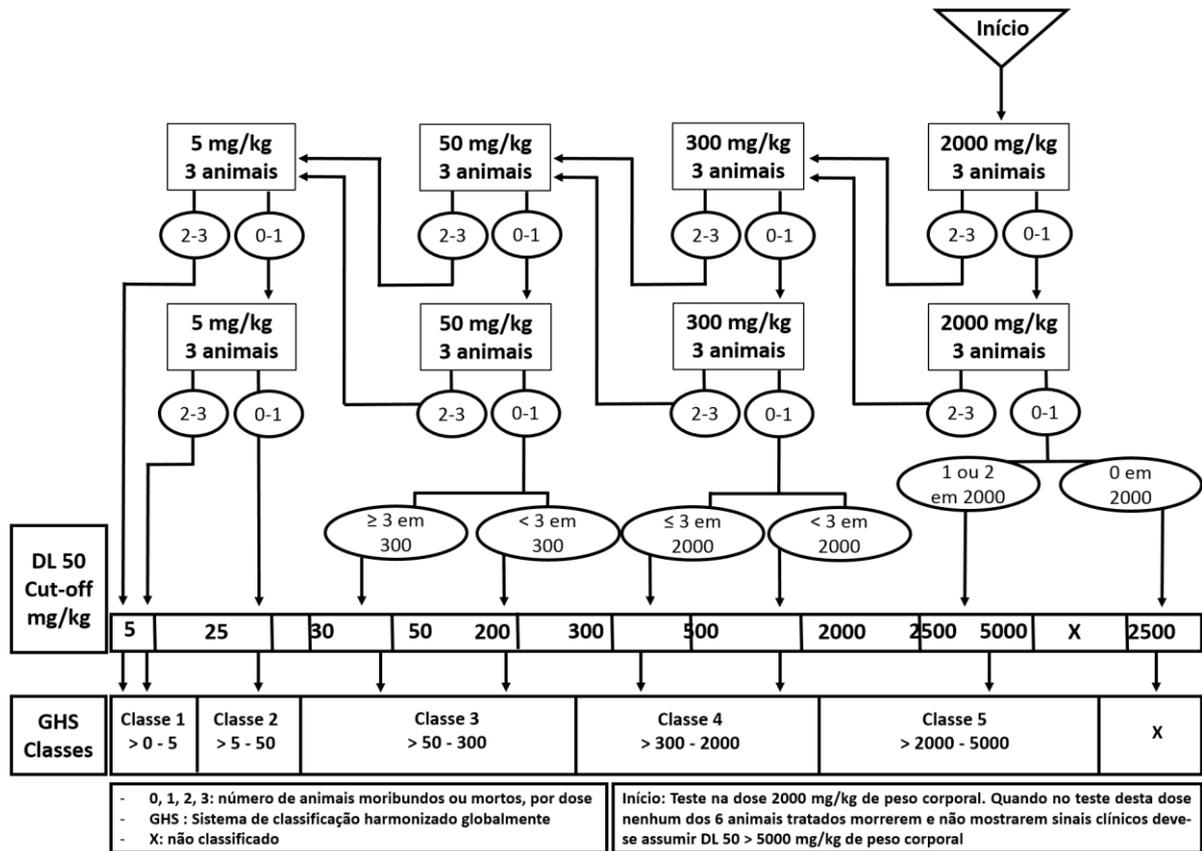
Dentre os métodos atualmente aceitos para o estudo de toxicidade aguda oral, é frequentemente adotado o Guia 423 da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD), onde realizam-se etapas sequenciais de teste e prioriza-se a utilização de pequena quantidade de animais (3 por etapa), sendo animais do mesmo sexo e usualmente do sexo feminino. São preestabelecidas no máximo cinco doses diferentes a serem utilizadas (5, 50, 300 ou 2000 mg/kg, além da dose de 5000 mg/kg, quando justificada por uma necessidade regulatória específica). O método não é direcionado inicialmente para o cálculo preciso da DL₅₀, embora permita determinar faixas de exposição em que se esperaria a

letalidade, uma vez que a proporção de animais mortos continua sendo o alvo final desse teste (MADALOSSO, 2011; OECD, 2001).

No ensaio de toxicidade aguda pelo método de classes, de acordo com o guia 423 da OECD, após a etapa inicial de teste da primeira dose administrada, a ausência ou presença de mortalidade dos animais relacionada à substância em teste, irá determinar a próxima etapa do ensaio, que pode ser: Não são necessários mais testes; Administração da mesma dose a três animais adicionais; Administração da próxima dose maior ou da próxima dose menor a três animais adicionais (Figura 6).

A dose inicial de escolha para o teste pode ser de 2000 mg/Kg quando as informações disponíveis sobre a substância em estudo apontarem que a mortalidade é improvável na maior dose inicial. Quando não existirem informações sobre a toxicidade da substância em questão é recomendada uma dose inicial de 300 mg/kg. De acordo com a proporção de mortalidade apresentada nas etapas sequenciais do ensaio, pode-se estimar uma DL_{50} de acordo com os padrões estabelecidos pela GHS (*Globally Harmonized System*), conforme apresentado pelo Fluxograma que segue (OECD, 2001).

Figura 6 – Procedimento para execução do teste de toxicidade aguda oral pelo método de classes (OECD, 2001) com a dose inicial de 2000 mg/kg.



FONTE: Costa, 2013.

REFERÊNCIAS

ALVES, T. P. **Efeitos sequenciais do treinamento aeróbio sobre a microcirculação muscular esquelética, cardíaca e renal em ratos hipertensos espontâneos**. 2014. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

ANGELI, F.; REBOLDI, G.; VERDECCHI, P. Hypertension around the world: new insights from developing countries. **Hypertension and urbanization**, v. 31, n. 7, p. 1358-1364, 2013.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr., L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**, 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

BARRETO, H. M.; FONTINELE F. C.; OLIVEIRA, A. P.; ARCANJO, A. D. R.; SANTOS, B. H. C.; ABREU, A. P. L.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, R. A. C.; SOUSA, T. O.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by *Lippia organoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1 – 7, 2014.

BARROS, S. B.; DAVINO, S. C. **Avaliação da toxicidade**. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. (Org.). Fundamentos de toxicologia. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 57-68.

BADKE, M. R.; BUDÓ, M. L. D.; ALVIM, N. A. T.; ZANETTI, G. D.; HEISLER, E. V. Popular knowledge and practices regarding healthcare using medicinal plants. **Text Context Nursing**, Florianópolis, v. 21, n. 2, p. 363-370, 2012.

BOCHI, V. C.; BARCIA, M.; RODRIGUES, D.; SPERONI, C. S.; GIUSTI, M.M.; GODOY, H. T. Polyphenol extraction optimization from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. **Food Chemistry**, em publicação, aceito em maio de 2014.

BOMFIM, G. F. **Participação do receptor tipo Toll 4 na reatividade vascular em ratos espontaneamente hipertensos**. 2012. 105 f. Tese (Doutorado em Farmacologia). Universidade de São Paulo. São Paulo. 2012.

BONZANI, N. E.; FILIPPA, E. M.; BARBOZA, G. E. Estudio anatómico comparativo de tallo en algunas especies de Verbenaceae. In: **Anales del Instituto de Biología**, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Bot 74, p. 31-45, 2003

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. **Mutation Research**, v. 612, p. 115–149, 2006.

BRASIL. Resolução - RDC Nº 14, de 31 de março DE 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 5 de abril de 2010. DOU nº 63.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Cadernos de Atenção Básica. **Práticas**

integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. n. 31. 156 f. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BUTTON, S. T. **Metodologia para planejamento fatorial e análise de resultados.** Apostila: Programa de Pós-graduação em engenharia mecânica. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2012.

CARMONA, F.; PEREIRA, A. M. S. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 2, p. 379-385, 2013.

CARVALHO, G. D.; CAMPELO R. T.; MIRANDA, V. C.; SANTOS, M. E. P.; CITÓ, A. M. G. L.; ARCANJO, D. D. R.; OLIVEIRA, A. P. Efeito vasorrelaxante de *Lippia origanoides* H.B.K. em anéis de artéria mesentérica de ratos. In: Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia, I, 2013, Parnaíba. **Anais do I Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste.** Parnaíba: UFPI, 2013.

CHANG, C.; WANG, G.; ZHANG, L.; TSAI, W.; CHEN, R.; WU, Y.; KUO, Y. Cardiovascular protective flavonolignans and flavonoids from *Calamus quiquesetinervius*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 271 – 279, 2010.

CHOPRA, S.; BABY, C.; JACOB, J.J. Neuro-endocrine regulation of blood pressure. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v.5, p.281-288, 2011.

CITÓ, A. M. G. L.; SOUZA, A. A.; LOPES, J.A.D.; CHAVES, M.H.; COSTA, F.B.; SOUSA, S. A. A.; AMARAL, M.P.M. Resina de *Protium heptaphyllum* March (Burceraceae): Composição Química do Óleo Essencial e Avaliação Citotóxica Frente a *Artemia salina* Leach. **Anais da Associação Brasileira de Química**. v. 52, n. 2, p. 74-76, 2003.

COSTA, E. V. M. **Estudo etnobotânico sobre plantas utilizadas como antimaláricas no estado do Amapá, avaliação da atividade antimalárica e toxicidade aguda por via oral de *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke.** 2013. 142 f. Tese. (Doutorado em em Biodiversidade Tropical). Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2013

DE CAMPOS, A.M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hill. Aquifoliaceae (erva-mate).** 1996. 149f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

DUTRA, D. M. **Desenvolvimento e validação de método por clae para análise da estabilidade de soluções extrativas e extrato seco de *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. (Convolvulaceae).** 2013.130f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2013.

GANGWAR, A. KUMAR, P.; RAWAT, A.; TIWARI, S. Noninvasive measurement of systolic blood pressure in rats: A novel technique. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 46, n. 3, p. 351–352, 2014.

GODINHO, A. L. M. **Farmacologia da hipertensão.** 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade do Algarve (Faculdade de Ciências e Tecnologia), Faro, 2011.

GOMES, S. M. C. **Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Electroquímica**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Química, ramo de Controle de Qualidade e Ambiente), Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GOMES, S. V. F. **Desenvolvimento de método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para diferenciação de genótipos de *Lippia gracilis* Schauer**. 2009. 163 f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal de Sergipe. Sergipe, 2009.

HEO, H.J.; KIM, D.O.; SHIN, S.C.; KIM, M.J.; KIM, B.G.; SHIN, D.H.; Effect of antioxidant flavanone, naringenin, from *Citrus junoson* neuroprotection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1520-1525, 2004.

IBRAHIM, J.; BERK, B.C.; HUGHES, A.D. Comparison of simultaneous measurements of blood pressure by tail-cuff and carotid arterial methods in conscious spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 28; p. 57-72, 2006.

IKEDA, K.; NARA, Y.; YAMORI, Y. Indirect systolic and mean blood pressure determination by a new tail cuff method in spontaneously hypertensive rats. **Laboratory Animals**, v. 25, p. 26-29, 1991.

IKEDA, N.; SAPIENZA, D; GUERRERO, R.; AEKPLAKORN, W.; NAGHAVI, M.; MOKDAD, A. H.; LOZANO, R.; MURRAY, C. J. L.; LIM, S. S. Control of hypertension with medication: a comparative analysis of national surveys in 20 countries. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 92, p.10–19C, 2014.

IRIGOYEN, M. C.; FIORINO, P.; DE ANGELIS, K.; KRIEGER, E. M. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial: reflexos cardiocirculatórios. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.12, n. 4, p. 229-233, 2005.

IRIGOYEN, M. C.; LACCHINI, S.; DE ANGELIS, K.; MICCHELINI, L.C. Fisiopatologia da Hipertensão: o que avançamos? **Revista da Sociedade de Cardiologia**, v. 1, p. 20-45, 2003.

KLEIN, T.; LONGHINI, R; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Development of tablets containing semipurified extract of guaraná (*Paullinia cupana*). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 186-193, 2013.

KREGE, J.H.; HODGIN, J.B.; HAGAMAN, J.R.; SMITHIES, O. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. **Hypertension**, v. 25, p. 1111-1115, 1995.

KUPINSKI, A. M. Segmental Pressure Measurement and Plethysmography. **The Journal of Vascular Technology**. v. 26, n. 1, p.32–38, 2002.

LEE, S.; LEE, C.; MOON, S.; KIM, E.; KIM, C.; KIM, B.; BOK, S.; JEONG, T. Naringenin Derivatives as Anti-atherogenic Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 3901 – 3903, 2003.

LEE, J.; YI, H.; KIM, I.; KIM, Y.; NHIEM, N. X.; KIM, Y. H.; MYUNG, C. (2S)-Naringenin from *Typha angustata* inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via a G₀/G₁ arrest. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 873 – 878, 2012.

LOU H.; JING, X.; WEI, X.; SHI, H.; REN, D.; ZHANG, X. Naringenin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity via activation of the Nrf2/ARE signaling pathway. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 380 – 388, 2014.

MACEDO, A. R. **Método não-invasivo para a caracterização da mecânica vascular na pletismografia por oclusão venosa e avaliação paramétrica do comportamento vascular pós-hiperemia reativa**. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Biomédica). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

MADALOSSO, R. C. **Avaliação da toxicidade aguda e da atividade gastroprotetora de extratos de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. em roedores**. 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

MARCEL, S. F. **Otimização de solução extrativa e desenvolvimento tecnológico de produto seco por aspersão de *Psidium guajava* L.** 2009. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

MELLO, F. B.; LANGELOH, A.; MELLO, J. R. B. Estudo de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico contendo *Pimpinella anisum*, *Foeniculum foeniculum*, *Sambucus australis* e *Cassia angustifolia*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 2, p. 230-237, 2007.

MELO-BATISTA, A. A.; OLIVEIRA, C. R. M. Plantas utilizadas como medicinais em uma comunidade do semiárido baiano: saberes tradicionais e a conservação ambiental. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v.10, n.18, p. 74-88, 2014.

MENDONÇA, D. A.; ALMADO, C. E. L.; FERNANDES, L.G.; MACHADO, B. H. Controle neural da circulação e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 12, n. 4, p. 235-241, 2005.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E. ; McLAUGHLIN, J. L. *Brine shrimp*: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIGLIATO, K. F.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N.; TOGNOLLI, J. O.; SACRAMENTO, L. V. S.; MELLO, J. C. P.; GIANNINI, M. J. S. M; ALMEIDA, F. A. M.; PIZZOLITTO, A. C. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 695-699, 2011.

MLADĚNKA, P.; ZATLOUKALOVÁ, L.; FILIPSKÝ, T.; HRDINA, R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 963–975, 2010.

MONTEIRO, F. S.; SILVA, A. C. L.; MARTINS, I. R. R.; CORREIA, A. C. C.; BASÍLIO, I. J. L. D.; AGRA, M. F.; BHATTACHARYYA, J.; SILVA, B. A. Vasorelaxant action of the total alkaloid fraction obtained from *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae) involves NO/cGMP/PKG pathway and potassium channels. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 895–900, 2012.

MONTIEL, J.; ARANGO, A. C. M.; DÚRAN, C.; BUENO, J. G.; GALVIS, L. B.; STASHENKO, E. Evaluación de la actividad anti-candida y anti-aspergillus de aceites esenciales de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown quimiotipo carvonalimoneno y su asociación com sus componentes mayoritarios. **Scientia Et Technica**, v. 13, n. 33, p. 243-246, 2007.

MORAIS, A. A.; MOURÃO, J. C.; GOTTLIEB, O. R.; MARX, M. C.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; MAGALHÃES, M. T. Óleos essenciais da Amazônia contendo Timol. **Revista Acta Amazônica**. v. 2, n. 1, p. 45-46, 1972.

MOURA JÚNIOR, M. R. **Avaliação temporal da Pressão Arterial Sistólica por Pletismografia de Cauda em ratos submetidos à desnutrição proteica e a Hipertensão de Goldblatt (2R-1C)**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

MULVIHILL, E. E.; HUFF, M. W. Antiatherogenic properties of flavonoids: Implications for cardiovascular health. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 26, p. 17A-21A, 2010.

NORIEGA, P.; RÖPKE, C. D.; CAMILO, C. M.; DEODATO DE FREITAS, P. C.; BARROS, S. B. M. Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4- nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L). Miq. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 41, n. 2, p. 261-269, 2005;

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **Guideline 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**. Paris: Head of Publications Service, 2001.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; LEITÃO, S. G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, p. 236–240, 2007.

OLIVEIRA, I.R.W.Z.; FATIBELLO-FILHO, O.; FERNANDES, F. C.; VIEIRA, I. C. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por spray drying e usadas na construção de biossensores. **Quimica Nova**, v. 32, n. 5, p. 1195-1201, 2009.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; FERNANDES, P. D.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological studies of *Lippia origanoides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 24, p. 206-214, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), **As doenças Cardiovasculares**. 2013. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html> acesso em , 27 de dezembro de 2014.

PARASURAMAN, S.; RAVEENDRAN, R. Measurement of invasive blood pressure in rats. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**. v. 3, n. 2, p. 172–177, 2012.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D. S.; VILLAR, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201–214, 2001.

PATEL, R. P.; PATEL, P. M.; SUTHAR, M. A. Spray drying technology: an overview. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 10, p: 44-47, 2009.

ROSÁRIO NETO, O. **Desenvolvimento de extratos secos de *Campomanesia reitziana* para avaliação da influência no ganho de peso corporal, consumo alimentar e parâmetros bioquímicos em camundongos C57BL/6J**. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 2012.

SÁ, L. L. F. **Desenvolvimento tecnológico de comprimidos de Pilocarpina para tratamento da Xerostomia**. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

SANJULIANI, A. F. Fisiopatologia da hipertensão arterial: conceitos teóricos úteis para a prática clínica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**, v. 15, n. 4, p. 210-218, 2002.

SANTOS, F. J. B.; LOPES, J. A. D.; CITÓ A. M. G. L.; OLIVEIRA, E. H.; LIMA, S. G.; REIS, F. A. M. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* H.B.K. **The Journal of Essential Oil Research**, v.16, p. 504-506, 2004.

SANTOS, M. E. P. **Envolvimento dos canais de cálcio sensíveis à voltagem do tipo L no efeito cardiovascular das inflorescências de *Mimosa caesalpinifolia* BENTH. (mimosaceae) em ratos normotensos**. 2014. 137 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Univerdiades Federal do Piauí, Teresina, 2014.

SANTOS, R.D.; GAGLIARDI, A.C.M.; XAVIER, H.T.; MAGNONI, C.D.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A.M. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 100, p 1-40, 2013.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SEVERO, A. A. L.; SOUZA, T. P.; ROLI, L. A.; SOARES SOBRINHO, J. L.; MEDEIROS, F. P. M.; ROLIM NETO, P. J. Otimização das condições de extração de senosídeos por soluções hidroetanólicas das folhas de *Senna alexandrina* MILL empregando planejamento fatorial. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 603-609, 2013.

SILVA, J. G. **Avaliação do potencial farmacológico de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess**. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

SILVA, A. S. **Avaliação da secagem do bagaço de cajá usando planejamento fatorial composto central**. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

SILVA, M. N. **Desenvolvimento de comprimidos e isolamento de marcadores a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.** 2011. 166 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2011.

SIVIRA, A.; SANABRIA, M.E.; VALERA, N.; VASQUEZ, C. Toxicity of ethanolic extracts from *Lippia origanoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). **Neotropical Entomology**, vol.40, n.3, p. 375-379, 2011.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SOUSA, T. O. **Contribuição ao estudo químico e biológico das folhas de *Lippia origanoides* H.B.K (Verbenaceae)**. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.

SOUZA, M. F.; SOUZA JUNIOR, I. T; GOMES, P. A.; FERNANDES, L. A.; MARTINS, E. R.; COSTA, C. A.; SAMPAIO, R. A. Calagem e adubação orgânica na produção de biomassa e óleo essencial em *Lippia citriodora* Kunth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 401-405, 2010.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; RUÍZ, C. A.; ARIAS, G.; DURÁN, D. C.; SALGAR, W.; CALA, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 93–103, 2010.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; CALA, M. P.; DURÁN, D. C.; CABALLERO, D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 192-202, 2013.

SUÁREZ, A. G.; CASTILLO, G.; CHACÓN, M. Genetic diversity and spatial genetic structure within a population of an aromatic shrub *Lippia origanoides* (Verbenaceae), in the Chicamocha Canyon, northeastern Colombia. **Genetics Research Cambridge**. v. 90, p.455- 465, 2008.

SUN, Y.; ZHAO J.; JIN H.; CAO Y.; MING T.; ZHANG L.; HU, M.; HAMLATI, H.; PANG, S.; MA, X. Vasorelaxant effects of the extracts and some flavonoids from the buds of *Coreopsis tinctoria*. **Pharmaceutical Biology**, p. 1 – 7, 2013.

TARHOVSKY, Y. S.; KIM, Y. A.; YAGOLNIK, E. A.; MUZAFAROV, E. N. Flavonoid–membrane interactions: Involvement of flavonoid–metal complexes in raft signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1838, p. 1235–1246, 2014.

TESTAI, L.; MARTELLI, A.; MARINO, A.; D'ANTONGIOVANNI, V.; CIREGIA, F.; GIUSTI L.; LUCACCHINI, A.; CHERICONI, S.; BRESCHI, M. C.; CALDERONE, V. The activation of mitochondrial BK potassium channels contributes to the protective effects of naringenin against myocardial ischemia/reperfusion injury. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, p. 1634 – 1643, 2013.

VASCONCELOS, E.A.F.; MEDEIROS, M.G.F.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n. 3, p. 243-249, 2005.

VAVRICKA, S. R.; HIMMELMANN, A.; SCHAFFNER. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospectives studies. **The Lancet**, v. 360, p.1903-1913, 2002.

VEGA-VELA, N. E.; DELGADO-ÁVILA, W. A.; CHACÓN-SÁNCHEZ, M. A. Genetic structure and essential oil diversity of the aromatic shrub *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) in two populations from northern Colombia. **Agronomía Colombiana**, v 31, n. 1, p. 7-17, 2013.

VEGA-VELA, N. E. e CHACÓN-SÁNCHEZ, M. A. Genetic structure along an altitudinal gradient in *Lippia origanoides*, a promising aromatic plant species restricted to semiarid areas in northern South America. **Ecology and Evolution**, v. 2, n. 11, p. 2669–2681, 2012.

VENÂNCIO, D. F. A. **Entomofauna visitante das flores de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Lamiales, Verbenaceae) em Juiz de Fora**. 2010. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

VICUÑA, G. C.; STASCENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v. 81, p. 343-349, 2010.

VILA-NOVA, R. S. **SISHIPERDIA – Apresentação**. Coordenação Nacional de HA e DM Departamento de Atenção Básica\ Secretaria de Atenção a Saúde. Disponível em: <<http://hiperdia.datasus.gov.br/>> acesso em 27 de dezembro de 2014.

WEBB, A. J. S.; FISCHER, U. R. S.; MEHTA, Z.; ROTHWELL, P. M.; Effects of antihypertensive-drug class on interindividual variation in blood pressure and risk of stroke: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 375, n. 9718, p. 906–915, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A global brief on hypertension**. Geneva, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases**, Geneva, 2011.

ZBARSKY, V.; DATLA, K.P.; PARKAR, S.; RAI, D.K.; ARUOMA, O.I.; DEXTER, D.T. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Free Radical Research**, v. 39, p. 1119-1125, 2005.

*Obtenção de um extrato padronizado das partes aéreas de *Lippia origanoides* e determinação de naringenina como um possível biomarcador*

**Obtenção de um extrato padronizado das partes aéreas de *Lippia origanoides* e
determinação de naringenina como um possível biomarcador**

COELHO, AG^{1,2}; MOURA, AKS²; MORAIS, ICPS³; CARVALHO, GD³; LIMA NETO, J. S.²; MEDEIROS, MGF¹; OLIVEIRA, AP^{3,4}; ARCANJO, DDR^{3,4}; NUNES, LCC¹; CITÓ, AMGL^{1,2}

¹Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

²Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

³Pós-graduação em Farmacologia, Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁴Departamento de Biofísica e Fisiologia, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

Resumo

A espécie *Lippia origanoides* H.B.K. (Verbenaceae) é um arbusto apícola cujo nome advém de seu aroma característico, similar ao de orégano. É nativa da América Central e do nordeste da América do Sul, utilizada como tempero e na medicina popular para o tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais, além de ser utilizada como antisséptico. Estudos prévios têm demonstrado a presença da flavanona naringenina como um dos principais compostos da fração diclorometano do extrato etanólico de *L. origanoides*. O objetivo do estudo foi a otimização da extração para obtenção de um extrato padronizado das partes aéreas de *L. origanoides* (Lo-HAE) e quantificação de naringenina no Lo-HAE por HPLC. Foram preparados 8 sistemas de extração, em triplicata, variando-se os fatores: Solvente (Etanol ou Etanol/Água (1:1)); Sonicação (+ ou -) e Troca de solvente (Diária por três dias ou a cada três dias, por nove dias). As massas dos resíduos e o rendimento da extração foram obtidos e as diferenças foram analisadas através do software Prisma® versão 6.0 (ANOVA One-way seguido de pós-teste de Tukey). A determinação do biomarcador foi realizada utilizando-se a flavanona naringenina como composto padrão (0,5 mg/mL) e Lo-EHA (5,35 mg/mL), ambos injetados em Ultra Rápido Cromatógrafo Líquido (Shimadzu Prominence, Tokyo, Japan), acoplado a um detector UV (fase móvel: metanol: água acidificada, 0,1%; taxa de fluxo: 0,25 ml/min, com aumento no

gradiente de metanol de 2% de metanol em 0-2 min, 10% em 5 min, 20% em 7 min e 100% em 30-35 min. A co-injeção de Lo-EHA e naringenina (1:1) foi também realizada, assim como da solução de Lo-EHA e metanol. A naringenina foi quantificada em Lo-EHA por obtenção de uma curva analítica, à qual foi interpolado o dado de área do sinal relativo à leitura, em triplicata, de uma solução metanólica do Lo-EHA (49,5 mg/L). O rendimento da extração foi significativamente maior com solvente hidroalcoólico e de modo independente da ocorrência de sonicação e do tempo de extração. A análise por HPLC confirmou a presença do marcador naringenina no extrato hidroalcoólico (Lo-EHA), considerando sinais com tempos de retenção similares em ambas as injeções, assim como nenhum novo sinal foi observado na co-injeção. Além disso, no cromatograma de co-injeção o sinal de naringenina apresentou área maior em aproximadamente 1,8 vezes. A concentração da naringenina no extrato foi determinada em 37,3 mg do marcador por grama de Lo-EHA. Desta forma, uma metodologia otimizada para obtenção de extrato padronizado das partes aéreas de *L. origanoides* foi estabelecido, assim como a determinação de naringenina como um composto biomarcador promissor.

Palavras-chave: *Lippia origanoides*, extrato padronizado, HPLC, naringenina.

Abstract: Obtention of a standardized extract from aerial parts of *Lippia origanoides* and determination of naringenin as a possible biomarker

The *Lippia origanoides* H.B.K. (Verbenaceae) is a honey plant species which possess distinctive oregano-like aroma. It is popularly used as spice and in the treatment of respiratory and gastrointestinal diseases, as well as being used as an antiseptic. Previous study has reported the presence of the flavanone naringenin as the major compound from dichloromethane fraction from *L. origanoides* ethanol extract. The aim of the study was optimization of extraction conditions for obtention of a standardized extract from *L. origanoides* (Lo-HAE) aerial parts, and quantification of naringenin in Lo-HAE by HPLC. Eight extraction systems were prepared in triplicate by varying factors: solvent (ethanol or ethanol/water 1:1); sonication (+ or -) and solvent exchange (daily for three days or every third day for nine days). The dry weights and extraction yields were obtained, and the differences were analyzed by GraphPad Prism 6.0 (ANOVA One-way followed by Tukey's post-test). The determination of the biomarker were performed by using the flavanone naringenin (0.5 mg/mL) as the standard compound, and Lo-HAE (5.35 mg/mL), both injected in Ultra Fast Liquid Chromatograph (Shimadzu Prominence, Tokyo, Japan) coupled to a UV detector (mobile phase: methanol:0.1% acetic acid in water;

flow rate: 0.25 ml/min, with increasing gradient of 2% methanol at 0-2 min, 10% at 5 min, 20% from 7 min and 100% at 30-35 min. The co-injection of Lo-HAE and naringenin (1:1) was also performed, as well as Lo-HAE solution and methanol. The naringenin in Lo-HAE was quantified by obtention of an analytical curve, and then the absorbances at 290 nm of Lo-HAE methanolic solution (49.5 mg/L) were obtained at triplicate and interpolated on a standard curve. The extraction yield was significantly more with hydroalcoholic solvent and not depended of sonication and time extraction. UFLC analysis confirmed the presence of naringenin in Lo-HAE, considering signals with similar retention times were observed at both injections, as well as no additional signal was observed at co-injection procedure. Interestingly, the signal of naringenin at co-injection presented a 1.8-fold larger area then other signals. The concentration of naringenin in Lo-HAE was 37.3 mg/g of Lo-HAE. An optimized method for obtention of a standardized extract of *L. origanoides* aerial parts was established, as well as the determination of the naringenin as a promising biomarker compound.

Keywords: *Lippia origanoides*, standardized extract, HPLC, naringenin

1. Introdução

O uso de plantas medicinais pela população ocorre em média há 60000 anos, de acordo com informações obtidas de registros fósseis e embora a medicina moderna apresente muitos avanços, uma parcela representativa de indivíduos ainda utiliza plantas medicinais objetivando o tratamento de diversas patologias. De modo a incentivar tal prática, a Organização Mundial de Saúde (2002) considera que países em desenvolvimento alcançam uma cobertura mais efetiva de cuidados primários em saúde através do uso tradicional de plantas medicinais (AÇIKGÖZ et al., 2014; KHATTAKA et al., 2013).

Nos estudos realizados por Iwu e colaboradores (1999), relata-se que plantas medicinais são menos agressivas, efetivas e frequentemente desempenham função específica a órgãos ou sistemas do corpo. No tocante ao uso tendo o sistema cardiovascular como alvo, por exemplo, Ylmaz et al. (2007) concluíram que 38,7% de 310 pacientes cardiopatas usaram plantas medicinais em algum momento de suas vidas. Em 2013, a pesquisa de Bahar e colaboradores mostra que 51,3% de 193 pacientes usaram plantas medicinais para tratar hipertensão (AÇIKGÖZ et al., 2014; KHATTAKA et al., 2013). O uso de plantas medicinais com finalidade terapêutica pela população impulsiona o estudo das espécies vegetais e fornece subsídio ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos.

Dentre as plantas medicinais com potencial para a geração de novos fitoterápicos, é objeto de estudo deste trabalho a espécie *Lippia origanoides* Humboldt, Bonpland e Kunth (H.B.K.), pertencente à família Verbenaceae. Trata-se de um arbusto apícola cujo nome advém de seu aroma característico, muito similar ao de orégano (OLIVEIRA et al., 2007). *L. origanoides* é espécie nativa da América Central e do nordeste da América do Sul, utilizada como tempero e na medicina popular para o tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais, além de ser também utilizada como antisséptico (BARRETO et al., 2014; VICUÑA; STASHENKO; FUENTES, 2010).

L. origanoides é ainda uma fonte promissora de substâncias bioativas devido à variedade de flavonoides e suas concentrações relativamente altas quando comparadas com outras plantas aromáticas comuns. Algumas das atividades da espécie podem ser atribuídas a grupos de substâncias, dentre os quais destacam-se as flavanonas naringenina e pinocembrina e as flavonas quercetina e luteolina (STASHENKO et al., 2013).

Medicamentos fitoterápicos são formulações obtidas com o emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança devem ser validadas. Dentre as exigências estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o

registro e controle de qualidade de matérias-primas vegetais e medicamentos fitoterápicos, pode-se citar a obtenção do perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica e análise quantitativa dos marcadores. Entende-se por marcador o composto ou classe de compostos químicos, como alcalóides, flavonoides e ácidos graxos, presentes na matéria prima vegetal, que preferencialmente apresente correlação com o efeito terapêutico e que deve ser utilizado como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico (BRASIL, 2010b). Entretanto, é importante destacar que o marcador não deve ser considerado o princípio ativo do medicamento fitoterápico, visto que essa perspectiva descaracteriza o conceito de que plantas medicinais e extratos vegetais delas oriundos são matrizes complexas de ingredientes capazes de atuarem em sinergia, desempenhando ação farmacológica (BUFAINO et al., 2013).

No Brasil, mais de 70% dos medicamentos fitoterápicos registrados apresentam-se como formas farmacêuticas sólidas (SEVERO et al., 2013). A matéria-prima para estes produtos são os extratos vegetais secos que podem ser obtidos a partir de diferentes metodologias de extração e processos de secagem. No âmbito dos produtos naturais, extrair implica em retirar de forma seletiva e eficaz, as substâncias ou fração ativa contida na droga vegetal. Para tanto, deve ser utilizado um líquido ou mistura de líquidos tecnologicamente apropriados e toxicologicamente seguros, associados a um eficiente processo de extração (NORIEGA et al., 2005; PINTO, 2011; SIMÕES et al., 2004).

Considerando a variabilidade quali-quantitativa, em geral inerente aos produtos naturais, a quantidade ideal dos componentes ativos em cada dose do fitoterápico a ser administrada pode ser assegurada através da utilização de extrato vegetal seco padronizado, o qual conta com um teor conhecido dos princípios ativos, associado à padronização do processo de extração, melhorando-se o rendimento da operação, bem como a qualidade, eficácia e segurança do produto final (PINTO, 2011; VASCONCELOS et al., 2005).

Os sistemas de extração podem ser otimizados através de técnicas de Planejamento Fatorial e análise estatística dos dados. No Planejamento Experimental da metodologia de extração, devem ser considerados os fatores que influenciam sobre as características do produto final, tais como: granulometria, polaridade do solvente, acidez do meio, agitação do sistema, método de extração, temperatura e o tempo de contato (MIGLIATO, 2011).

No desenvolvimento de medicamentos a partir de matérias-primas ativas vegetais, além de uma metodologia de extração satisfatória, deve-se dispor de um método de análise eficiente, conforme requerido pela ANVISA. Nesse contexto, a maioria das análises que envolvem amostras complexas, caso dos extratos vegetais, requerem o tratamento do analito

através de etapas de manipulação anteriores à identificação e/ou a medida da concentração de um ou mais marcadores de interesse (BRASIL, 2010b; SKOOG et al., 1996).

Dentre os vários tratamentos que podem ser empregados a amostras complexas, previamente à sua análise, merece destaque a etapa de *clean-up*, a qual é fundamental para eliminar compostos indesejáveis que fazem parte da constituição da matriz em estudo, como por exemplo clorofila e proteínas, as quais podem interferir drasticamente no método analítico a ser executado. A etapa de *clean-up* emprega a extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE), através do uso de cartuchos ou colunas que contêm entre 250 e 1000 mg de sorvente. Por meio de operação manual, esta técnica envolve o uso de solventes para lavagem da fase sorvente, além de etapas de evaporação e secagem do eluato. Outro fator que impulsiona o uso da técnica de *clean up*, é o fato desta estar intimamente ligada à longevidade de parte da instrumentação usada, especialmente quando as análises forem executadas em HPLC usando fase reversa (RP) no estudo de matrizes que apresentem grande quantidade de material lipofílico (PRESTES et al., 2009; RODRIGUES, 2007; WELLUM; KIRBY, 1981).

Diante do exposto, este estudo tem como objetivo a otimização das condições de extração de *L. origanoides* H.B.K., bem como a obtenção do perfil cromatográfico do extrato e doseamento de substância marcadora por Cromatografia Líquida. Além disso, tendo em vista as aplicabilidades em potencial apresentadas pela espécie, pretende-se realizar prospecção tecnológica relativa ao tema, a fim de averiguar-se a disponibilidade de produtos farmacêuticos à base de *L. origanoides*.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta do material vegetal

A coleta das folhas de *L. origanoides* H.B.K. foi realizada no mês de agosto de 2013, no município de José de Freitas (latitude 04°45'23" sul e longitude 42°34'32" oeste), Piauí, Brasil (Figura 1). A determinação da espécie foi realizada pela botânica Fátima Salmena Pires e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário “Graziela Barroso” do departamento de biologia da Universidade Federal do Piauí sob o número TEPB 09205.

2.2 Otimização do processo de extração das partes aéreas de *Lippia origanoides* H. B. K por planejamento fatorial

Figura 1 – Mapa do Piauí. Em destaque o município de José de Freitas



Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4b/Piaui_Municip_JosedeFreitas.svg

Para avaliação da eficiência de extração através de planejamento fatorial, foram analisados três parâmetros, cada um variando de dois níveis, são eles: Solvente (Etanol ou Etanol/Água (1:1)); Sonicação (+ ou -) e Troca de solvente (Diária por três dias ou a cada três dias, totalizando nove dias). Para sonicação foi utilizado aparelho de ultrassom Marconi (modelo: Cleanner Thornton T1425). Desse modo, foram preparados 8 diferentes sistemas de extração, em triplicata, a partir de 5 g de material vegetal (partes aéreas) seco e moído e 40 mL de solvente.

Dos extratos obtidos a partir de cada sistema, foram separadamente transferidos 10 mL a frascos previamente identificados e pesados, e submetidos a secagem em banho maria. Posteriormente, os frascos foram mantidos em estufa a 105 °C, por 3 horas. Após a secagem, as amostras foram resfriadas em dessecador e pesadas, repetindo-se a pesagem após 30 minutos para verificação de constância nos resultados. As massas dos resíduos obtidos foram utilizadas como parâmetro de análise e expressas em mg mL⁻¹. Os dados foram analisados por ANOVA com pós teste de Tukey, para comparação entre os rendimentos de cada grupo, utilizando-se o software Prisma® versão 6.0.

A Tabela 1 mostra as siglas utilizadas para a representação dos parâmetros avaliados, durante a otimização das condições de extração.

Tabela 1 – Siglas utilizadas para a representação dos parâmetros avaliados no Planejamento Experimental da Extração

PARÂMETRO AVALIADO	SIGLA
ETANOL COMO SOLVENTE	E
ETANOL: ÁGUA (1:1) COMO SOLVENTE	H
PRESENÇA DE SONICAÇÃO	S
AUSÊNCIA DE SONICAÇÃO	N
FILTRAÇÃO A CADA 3 DIAS	9
FILTRAÇÃO DIÁRIA POR 3 DIAS	3

2.3 Preparo do Extrato

O material vegetal (partes aéreas) foi seco à temperatura ambiente e triturado em moinho de facas Marconi (Modelo: MA 680 e série 98 2422). Em seguida, 1004 g de folhas foram extraídos por maceração com 8 L de etanol/água (1:1) durante três dias, com filtração do extrato e renovação do solvente todos os dias. O extrato hidroalcoólico (Lo-EHA) foi submetido à rota-evaporação (aquecimento de 60 °C, resfriamento à 11 °C e pressão de 600 mmHg) para eliminação e recuperação do etanol, nesse processo foi utilizado evaporador rotativo Heidolph; modelo: Laborota 4000, acoplado a uma bomba de vácuo Kohlbach. Para a obtenção do extrato vegetal seco, o material rota-evaporado foi submetido a liofilização em Liofilizador de Micro Modulyo Edwards acoplado a uma bomba de alto vácuo ValPump VLP80 Savant.

2.4 Varredura no ultravioleta-visível do extrato e do padrão de naringenina para escolha do comprimento de onda de análise

Foi preparada uma solução etanólica do padrão naringenina ($C_{15}H_{12}O_{15}$; SIGMA-ALDRICH, 95,0%), à concentração de 0,03 mg mL⁻¹ e uma solução de Lo-EHA à concentração de 0,12 mg mL⁻¹ e foram realizadas varreduras espectrais na faixa de comprimentos de onda de 200 a 800 nm para confirmação da presença da substância de interesse e para o diagnóstico do comprimento de onda máximo de absorção (290 nm). As varreduras foram realizadas em espectrofotômetro de duplo feixe (Perkin Elmer; Lambda 25 UV/Vis).

2.5 Identificação do composto marcador no Lo-EHA por UFLC

Tanto as soluções do padrão naringenina, quanto as soluções de extrato hidroalcoólico de *L. origanoides*, foram submetidas a Ultra Cromatógrafo Líquido Rápido (Shimadzu Prominence), munido de desgaseificador DGU-20A₃ e bomba binária LC-20AD Shimadzu, acoplado a um detector UV PDA (Shimadzu); A coluna utilizada nas análises foi C18 Shim-pack XR-ODS (2 mm x 30 mm), e a fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol: água acidificada (0.1% CH₃COOH) a uma taxa de fluxo de 0,25 ml min⁻¹, com o gradiente de metanol aumentando da seguinte forma: 2% de metanol em 0 a 2 min; 10% de metanol em 5 min; 20% de metanol em 7 min e 100% em 30 a 35 min. O comprimento de onda de detecção foi selecionado em 290 nm e o volume de injeção foi de 5,0 µl.

Para a análise por UFLC (Ultra Fast Liquid Chromatograph), a amostra de Lo-EHA liofilizado foi previamente submetida a *clean up*, utilizando-se cartucho de extração em fase sólida C18ec (Chromabond®). O cartucho foi ativado com MeOH e a amostra (30 mg) foi solubilizada na menor quantidade possível da fase móvel empregada, sendo posteriormente submetida à extração em fase sólida com metanol. O eluato metanólico obtido após extração exaustiva foi submetido à filtração em filtro nylon (0,2 µm, Titan3), seguida de secagem em evaporador rotativo.

Para a identificação do composto marcador no Lo-EHA, foram submetidas separadamente ao UFLC uma solução metanólica de naringenina com concentração de 0.5 mg/mL e uma solução metanólica do extrato seco liofilizado, após tratamento por *clean up*, a uma concentração de 6,6 mg/mL. Em seguida, foi efetuada a co-injeção de Lo-EHA e padrão - (6,6 mg mL⁻¹) / (0,5 mg mL⁻¹) (1:1), além da injeção da solução de Lo-EHA, acrescida de igual volume de metanol.

2.6 Construção da curva analítica do padrão naringenina e quantificação do marcador no Lo-EHA por HPLC

A curva analítica do padrão foi construída a partir da elaboração de um gráfico de área do pico versus concentração de naringenina com seis pontos (1,56; 2,08; 3,12; 3,64; 4,16 e 4,68 mg L⁻¹), derivadas de uma solução metanólica estoque a 52,0 mg L⁻¹ deste marcador. Assim, obteve-se a curva de regressão linear, com a respectiva equação da reta e o coeficiente de correlação (r).

Após a construção da curva analítica do padrão, uma solução da amostra de Lo-

EHA na concentração de 49,5 mg L⁻¹ foi preparada e analisada por UFLC, em triplicata.

A área do sinal relativo à naringenina nas três soluções analisadas foi calculada e através da equação da reta obtida com a construção da curva analítica de naringenina, foi possível quantificar o teor do marcador nas soluções analisadas e, por conseguinte, no extrato seco liofilizado.

2.7 Prospecção Tecnológica

Foi efetuada, em dezembro de 2014, prospecção tecnológica nas bases de dados EPO (*European Patent Office*), WIPO (*World Intellectual Property Organization*), USPTO (*United States Patent and Trademark Office*) e INPI (Instituto Nacional de Propriedade intelectual), utilizando-se, em todos as bases de dados, os descritores *Lippia* and *origanoides*, devendo estes estarem presentes nos títulos ou resumos dos documentos patentários.

3. Resultados e Discussão

3.1 Otimização do processo de extração das partes aéreas de *Lippia origanoides* H. B. K por planejamento fatorial

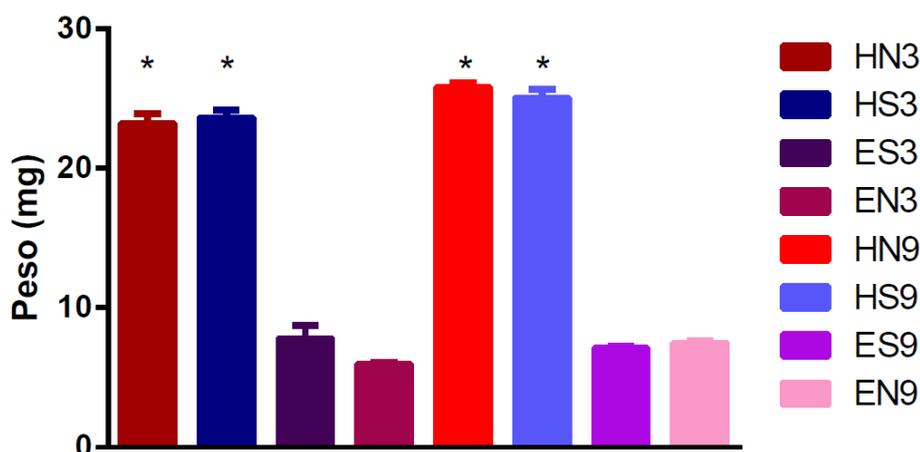
Para a otimização de diversos sistemas, incluindo-se sistemas extrativos, podem ser empregadas diversas técnicas de planejamento experimental e análise estatística dos dados. Neste sentido, a análise de variância (ANOVA) constitui-se no método mais utilizado para avaliar se determinado modelo construído é adequado ao sistema em avaliação (MIGLIATO, et al, 2011).

A análise estatística dos valores de resíduo seco obtidos em 8 diferentes sistemas de extração permitiu visualizar rendimento significativamente maior quando as extrações foram realizadas por solução hidroalcoólica e de modo independente da ocorrência de sonicação e do tempo de extração (3 ou 9 dias) (Figura 2). A partir destes resultados, procedeu-se a extração das partes aéreas com base no esquema HN3, utilizando-se etanol/água (1:1) como solvente, ausência de sonicação e um tempo de extração de três dias.

De acordo com Migliato et al (2011), os processos extrativos dependem de modo significativo dos fenômenos de difusão, sendo que a renovação do solvente desempenha papel de destaque na velocidade da dissolução, bem como a agitação pode determinar a duração do processo extrativo. Já Campos (2005), aponta que no preparo de extratos vegetais, alguns

componentes da amostra podem se esgotar com o decorrer da extração, ao passo que, de acordo com as características da amostra vegetal, pode ocorrer também a solubilização de outras substâncias presentes no sólido com o aumento do tempo de contato com o líquido extrator.

Figura 2 - Otimização da extração de *Lippia origanoides* H.B.K. por planejamento fatorial. (Anova seguida de Tukey post-hoc: * $p < 0,0001$ em relação aos grupos ES3 (extrato etanólico sonificado e extraído por três dias), EN3 (etanólico não sonificado extraído por três dias), ES9 (extrato etanólico sonificado por 9 dias) e EN9 (extrato etanólico não sonificado por 9 dias)).



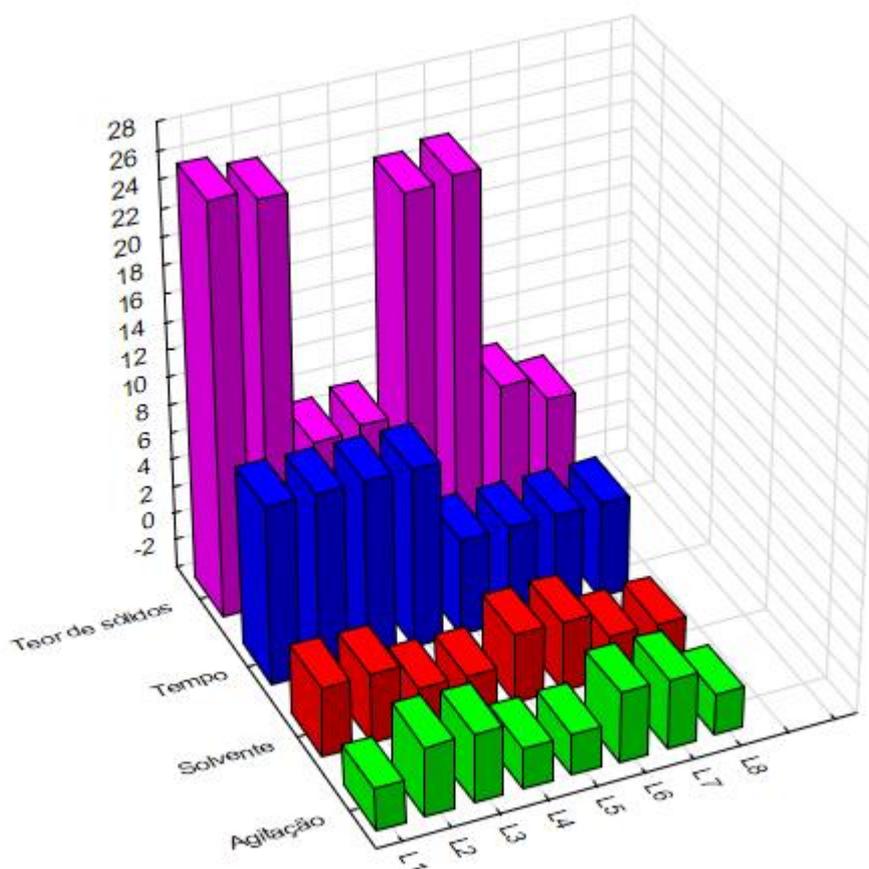
Desse modo, pode-se inferir que a espécie *L. origanoides*, apresenta comportamento particular no processo extrativo, visto que o prolongamento do tempo de contato com o solvente, bem como a ocorrência de sonicação no sistema de extração, não promovem diferenças estatisticamente significativas no rendimento da operação. Tal comportamento mostra-se como característica positiva da espécie, especialmente vislumbrando-se a aplicabilidade da mesma à produção de medicamentos em larga escala, uma vez que pode-se obter extratos com qualidade assegurada, a um menor tempo e menor custo de processo.

A figura 3 permite visualizar a relação entre os três fatores estudados, demonstrando que o teor de sólidos é mais expressivo para os lotes cujo solvente extrativo era Etanol/ Água 1:1, representado por +1, em relação à extração com etanol, representada por -1, ao passo que não recebe influência do tempo prolongado de extração, bem como da ocorrência de sonicação, representada por +1, quando presente e -1, quando ausente.

De modo semelhante ao resultado obtido para *L. origanoides*, Ferreira e Colombo (2011) avaliaram o melhor tempo de extração dos flavonoides das folhas da cana-de-açúcar através da maceração convencional e observaram que dentre os rendimentos das frações

flavonoídicas obtidas no intervalo de extração de 1 a 12 h o melhor tempo de extração estava compreendido entre 2 e 3 h.

Figura 3 - Influência dos fatores solvente, tempo de extração e ocorrência de agitação sobre o teor de sólidos. (Tempo de Extração: 9 dias (L1, L2, L3 e L4) e 3 dias (L5, L6, L7 e L8); Solventes: Etanol/Água (L1, L2, L5 e L6), Etanol (L3, L4, L7 e L8); Agitação: Presente (L2, L3, L6 e L7), Ausente (L1, L4, L5 e L8)).



3.2 Varredura no ultravioleta-visível do extrato e do padrão de naringenina para escolha do comprimento de onda de análise.

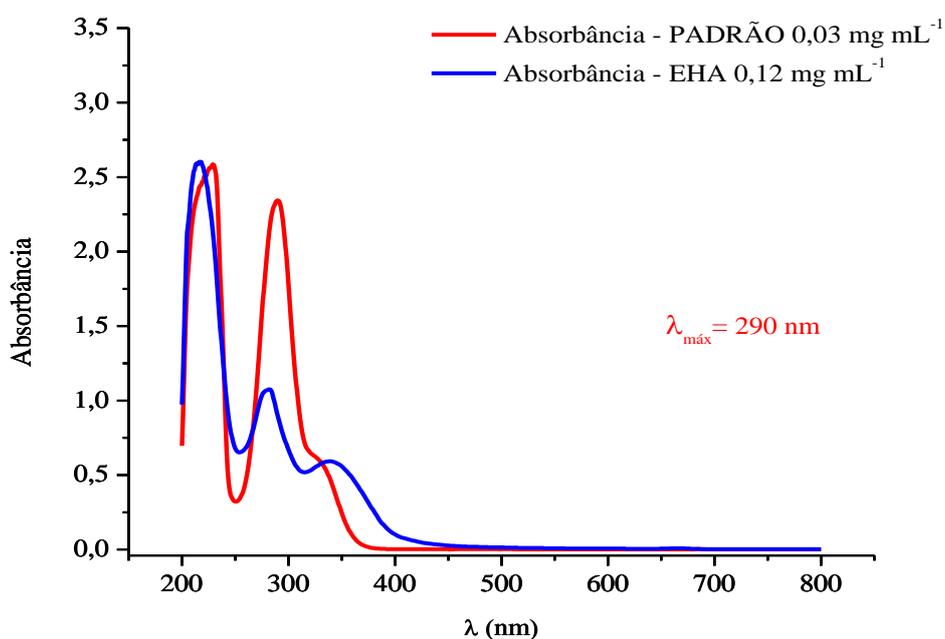
A análise quantitativa de extratos vegetais e de substâncias marcadoras isoladas através de métodos espectrofotométricos requer a escolha adequada do comprimento de onda de análise, o qual deve corresponder à banda de maior absorção, ou seja, de maior sensibilidade, de modo a tornar as absorbâncias menos sensíveis às pequenas vibrações de leitura do instrumento de medida e, portanto, menos sujeitas a incertezas (SKOOG et al., 2002).

Nessa perspectiva, o espectro de varredura do extrato (Figura 4) apresentou uma banda de absorção acentuada entre 280 e 290 nm, ao passo que o padrão de naringenina mostrou absorbância máxima em 290 nm.

A absorção de fenóis na região ultravioleta (UV) apresenta duas bandas de absorção características dos flavonoides. A banda II, com máximo de absorção em 240-285 nm, é atribuída ao anel A (Figura 3.4). Já a banda I, com máximo de absorção em 300-550 nm, indica absorção do anel B (Figura 3.4). Especificamente, o grupo das flavanonas, como a naringenina, apresenta a banda II de absorção na região de 275-295 nm e a banda I em 300 a 330 nm (AGRAWAL, 1989; HUBER e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Desse modo, a varredura espectrofotométrica (Figura 4) sugere a presença de flavonoides no Lo-EHA, bem como a presença do marcador naringenina, uma vez que o pico de absorção desta coincide com a banda de absorção do Lo-EHA.

Figura 4 – Espectro de varredura de soluções etanólicas do Extrato Hidroalcoólico de *Lippia origanoides* (Lo-EHA) e de solução de naringenina



3.3 Construção da curva analítica do padrão naringenina e quantificação do marcador no Lo-EHA por HPLC

A fim de confirmar-se a presença de naringenina como substância marcadora no Lo-EHA, bem como de quantificá-la, foi construída uma curva analítica com o padrão de naringenina (Figura 5) e soluções do padrão e do Lo-EHA foram submetidas a injeção em

UFLC separadamente e em coinjeção (Figuras 6, 7 e 8). A curva analítica construída apresenta um R de 0,9993 e equação da reta como segue: Área do sinal = $-11226,3496 + 42313,5809$ (Concentração). Dado o R obtido para a curva analítica da naringenina, pode-se inferir uma relação linear fortemente positiva, onde a influência é tal que um aumento na concentração do marcador tende a aumentar a área do sinal.

A análise do Lo-EHA originou o perfil cromatográfico representado na Figura 6. O sinal referente à substância de interesse é o de maior intensidade no comprimento de onda da análise (290 nm). A indicação de que o constituinte em questão fosse a flavanona naringenina foi confirmada através da análise do padrão nas mesmas condições (Figura 7), onde observam-se os picos com tempos de retenção semelhantes.

Figura 5 – Curva de calibração construída com padrão naringenina em 290 nm.

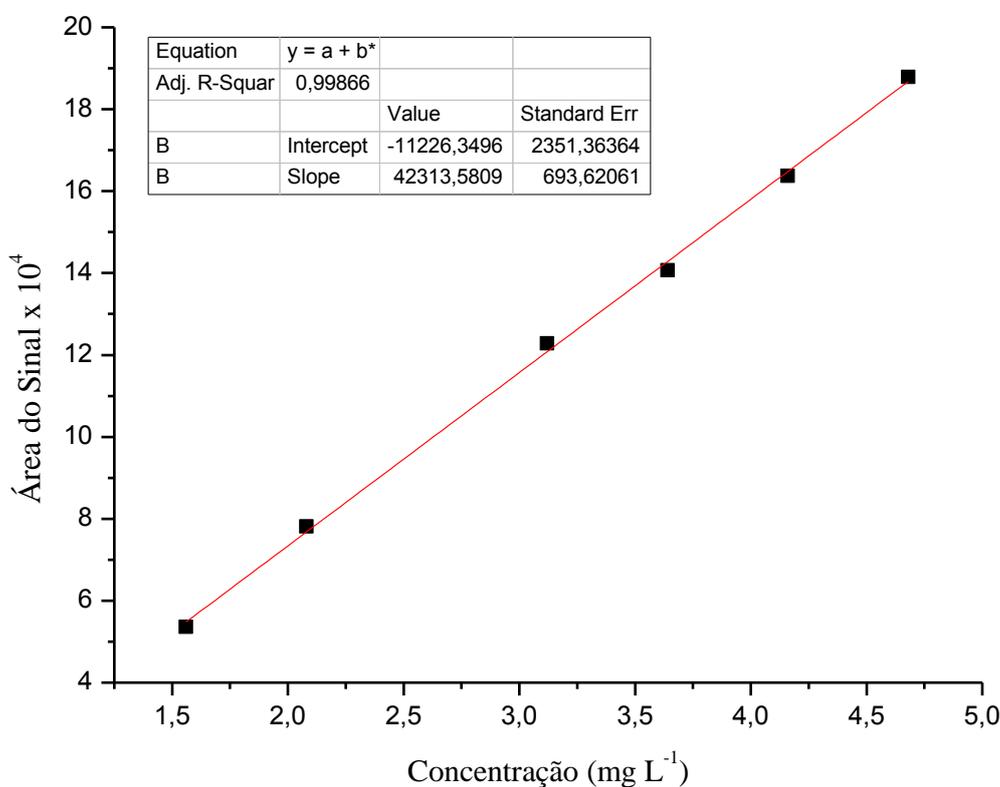
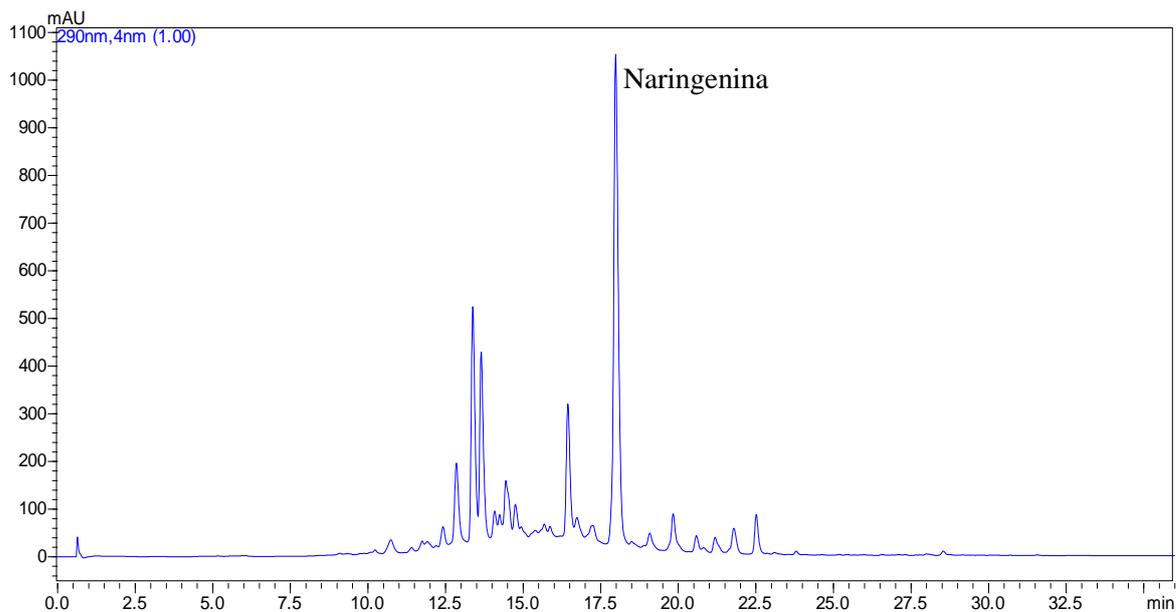
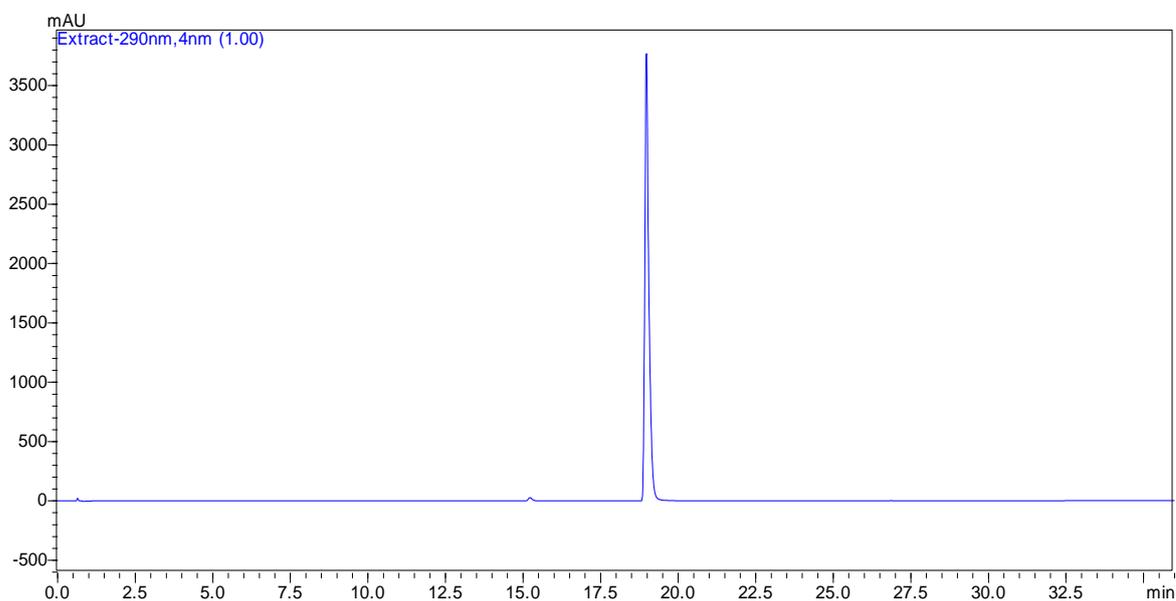


Figura 6 – Cromatograma do Lo-EHA ($6,6 \text{ mg mL}^{-1}$) em solução metanólica**Figura 7 - Cromatograma do padrão naringenina em solução metanólica ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$)**

De acordo com a figura 6, podem-se observar outros picos relativos a constituintes do Lo-EHA, que apresentam comprimento de onda de absorção em 290 nm, além da presença do marcador naringenina. Embora se tenha conhecimento de que o grupo das flavanonas apresenta a banda II de absorção na região de 275-295 nm, a natureza de tais constituintes deve ser adequadamente investigada e os mesmos identificados. Além disso, é oportuno o destaque ao estudo de Sousa (2012) que identificou o extrato hidroalcoólico de *L. origanoides* como tendo o maior teor de flavonoides acumulados ($30,14 \pm 0,21 \text{ mg}$ de Equivalentes de Rutina/g

de Material Vegetal Seco), comparativamente ao extrato etanólico e frações acetato de etila, hexânica, diclorometano e fração hidroalcoólica, cujos teores de flavonoides são, respectivamente, $6,07 \pm 0,53$; $4,97 \pm 0,07$; $3,36 \pm 0,62$; $2,23 \pm 0,07$ e $0,19 \pm 0,01$ mg de Equivalentes de Rutina/g de Material Vegetal Seco).

Ao analisarem-se cromatogramas de diferentes amostras deve-se considerar que o parâmetro tempo de retenção é característico da substância analisada, embora não seja um dado exclusivo. Desse modo, os tempos de retenção da amostra e da substância química de referência podem ser comparados e utilizados como indicativo da identidade da substância, não podendo garantir a total caracterização da amostra. Esta lacuna pode ser sanada através de comparações feitas em termos de fator de retenção (k) que representa a razão entre a quantidade da substância com afinidade pela fase estacionária e a quantidade com afinidade pela fase móvel, sendo que quanto maior a afinidade da substância pela fase estacionária maior será sua retenção. O fator de retenção (k) é calculado segundo a expressão que segue: $k = t - t_0 / t_0$, em que, t é o tempo gasto desde o momento da injeção até a detecção máxima do pico, ou seja, o tempo de retenção da substância analisada e t_0 ou tempo morto é o tempo gasto pelas moléculas não retidas a percorrer todo o sistema cromatográfico (BRASIL, 2010a; PIMENTA, 2013).

Considerando-se os valores de t e t_0 para a injeção do Lo-EHA, referente ao pico de naringenina (18,992 min e 0,634 min, respectivamente), tem-se um fator de retenção (k) igual a 29,9558, ao passo que a injeção do padrão de naringenina fornece um fator de retenção (k) para o pico máximo igual a 30,3994. A semelhança entre os valores de k para ambas as injeções, vem demonstrar que o pico máximo detectado com a injeção de Lo-EHA, indica a presença de naringenina na amostra. Vale ressaltar que esta substância foi identificada anteriormente por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas por Sousa (2012).

Além disso, no cromatograma resultante da coinjeção (Figura 8) nenhum novo sinal é apresentado, de modo a corroborar a identidade da substância. Ao comparar-se o cromatograma relativo à coinjeção e o relativo à diluição com metanol (Figura 9), ambos na proporção 1:1, verificam-se picos obtidos em tempos de retenção de 18 min, sendo que no cromatograma relativo à coinjeção, o sinal atribuído à naringenina apresentou-se mais intenso, com área maior em aproximadamente 1,8 vezes que a área do sinal equivalente do cromatograma relativo à diluição com metanol (Figura 9), ao passo que os demais picos apresentaram intensidade semelhante por sofrerem apenas efeito de diluição e não de dopagem.

Figura 8 – Cromatograma da coinjeção Lo-EHA (6,6 mg mL⁻¹)/Padrão (0,5 mg mL⁻¹) (1:1) em metanol

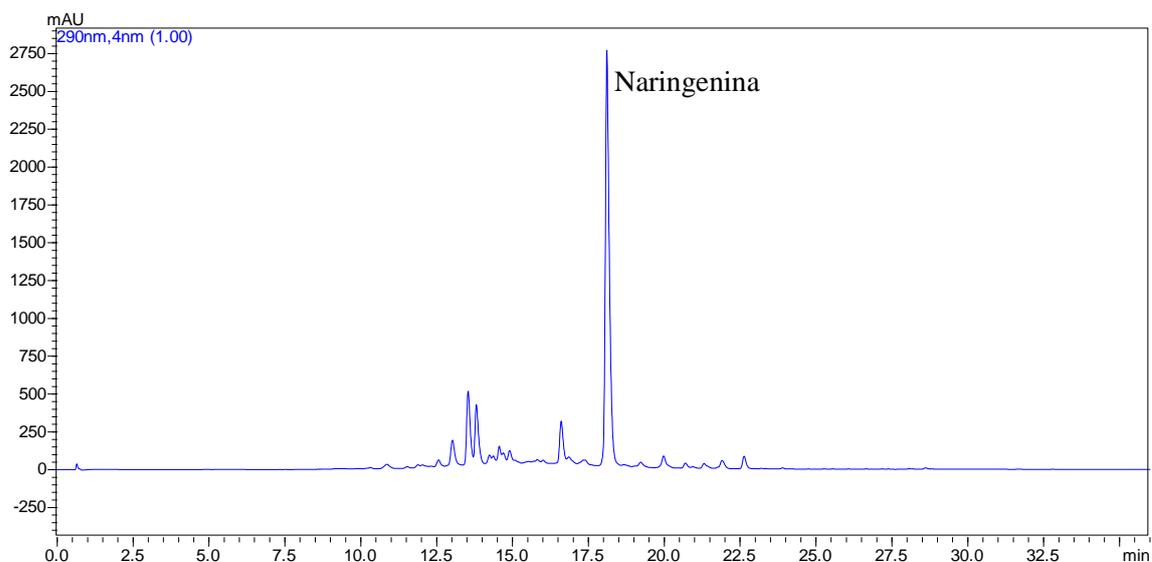
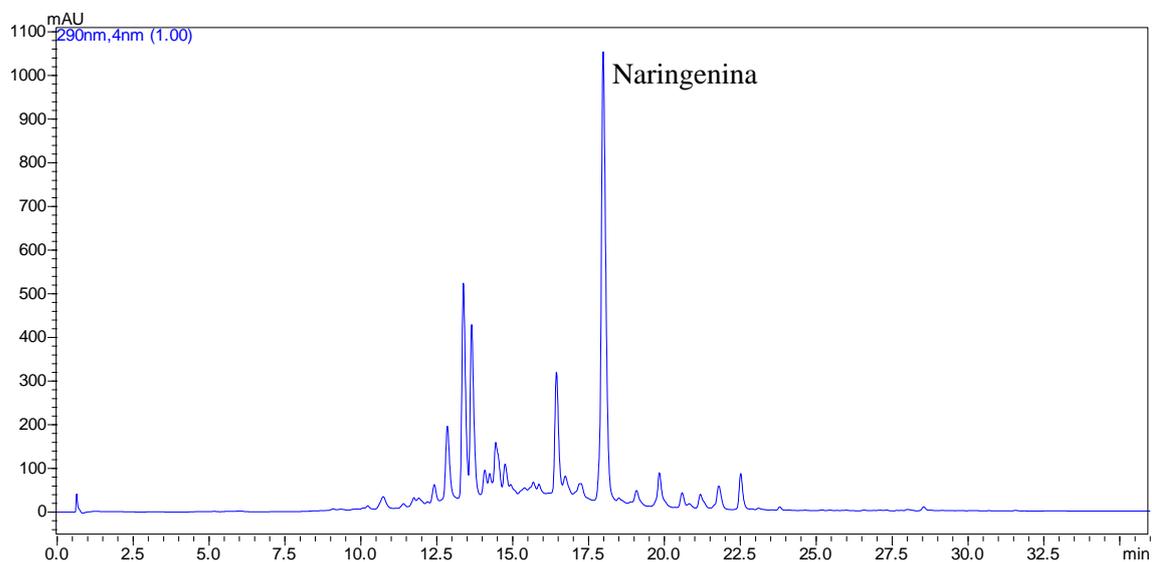


Figura 9 - Cromatograma Lo-EHA a 6,6 mg mL⁻¹/ MeOH (1:1)



Uma vez que um marcador tenha sua presença corretamente assegurada em determinado extrato, é de grande importância a sua quantificação, visto que este dado é pré-requisito fundamental para a obtenção de extratos vegetais padronizados e passíveis de um adequado controle de qualidade (BRASIL, 2010b).

Para a quantificação de naringenina no Lo-EHA analisou-se a área do sinal relativo ao marcador, presente no cromatograma resultante da injeção do extrato na concentração de 49,5 mg/L. Considerando o crescimento linear entre a área do sinal e a concentração do

marcador, representado através da curva analítica de naringenina, os dados de área do sinal foram plotados sobre a equação da reta e a concentração de naringenina no extrato foi determinada em 37,3 mg de Naringenina por grama de Lo-EHA, ou 3,73 g%.

Tal resultado corrobora a eficiência do método de extração desenvolvido, uma vez que no estudo de Stashenko et al (2013) foram analisados diferentes quimiotipos de *L. origanoides* quanto ao teor de naringenina, através de extração metanólica e em CO₂ supercrítico. Nesse estudo comparativo, o maior teor detectado foi 5,67 mg de naringenina por grama de material vegetal, extraído em metanol. Comparativamente, correlacionando-se o teor de naringenina à massa de material vegetal utilizada no presente estudo, obtém-se a proporção de 10,92 mg do marcador por grama de material vegetal.

3.4 Prospecção Tecnológica

No Instituto Nacional de Propriedade intelectual (INPI) foram detectadas duas patentes depositadas contendo os termos de busca, a primeira refere-se à Formulação Farmacêutica derivada de óleo essencial de *Lippia origanoides* H. B. K., enquanto a segunda protege um medicamento para tratamento da hipertensão arterial, cuja apresentação deve ser *in natura*, contendo a planta seca e moída, ou tintura mãe, na forma de alcoolato e extrato fluido, entretanto, trata-se de um documento do ano de 1993, que não goza mais do privilégio de invenção.

Na base *United States Patent and Trademark Office* (USPTO), foram encontrados 8 resultados, sendo que as patentes citam apenas a espécie *Lippia graveolens*, não reivindicando propriedades de *Lippia origanoides*. Já no *European Patent Office* (EPO), nenhum resultado foi encontrado. Por fim, no *World Intellectual Property Organization* (WIPO), foram observados 25 resultados, sendo que nestes as patentes referem-se sempre às propriedades da espécie *Lippia graveolens*; nenhuma das 25 reivindica propriedades de *L. origanoides*.

Em prospecção tecnológica realizada por Sousa et al. (2014), acerca das aplicações industriais de espécies do gênero *Lippia*, foram detectados 134 documentos patentários, em sua maioria referindo-se ao grupo A61K36 da Classificação Internacional de Patentes, que trata de preparações medicinais contendo materiais de constituição indeterminada, derivados de algas, líquens, fungos ou plantas. Assim, pode-se perceber que embora a espécie *L. origanoides* ainda não seja mundialmente explorada, sob a ótica de sua aplicabilidade tecnológica, as demais espécies do gênero *Lippia* o são, evidenciando o quão promissoras podem ser as investigações nesse âmbito.

A escassez de resultados encontrados na base de dados nacional e a ausência de resultados nas bases de dados estrangeiras podem ser vistos como um alerta às comunidades industrial e acadêmica, para a pesquisa e desenvolvimento de produtos contendo *L. organoides*, dadas as propriedades terapêuticas já comprovadas da espécie e, além disso, ressaltando-se a facilidade de cultivo da mesma em solo brasileiro.

4. Conclusão

Um processo de extração eficiente é obtido quando emprega-se Etanol/Água (1:1) como solvente extrator, sem necessidade de sonicação e por um período de três dias. A análise do extrato seco em UFLC, através dos parâmetros estabelecidos, permitiu detectar e quantificar com segurança a presença de naringenina na amostra, sendo este um potencial marcador para análises futuras relativas ao desenvolvimento de medicamento à base de *Lippia organoides*.

5. Referências

AÇIKGOZ, S. K.; AÇIKGOZ, E.; TOPAL, S.; OKUYAN, H.; YAMAN, B. ER, O.; SENSOY, B.; BALCI, M. M.; AYDOGDU, S.; Effect of herbal medicine use on medication adherence of cardiology patients, **Complementary Therapies in Medicine** (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctim.2014.05.013>

AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. v. 39. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Company INC. 1989.

BAHAR, Z.; KIZILCI, S.; BEŞER, A.; BESEN, D.B.; GÖRDES, N.; ERSIN, F.; KISSAL, A.; ÇAPIK, C. Herbal therapies used by hypertensive patients in Turkey. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative**, v. 10, n. 2, p. 292-298, 2013.

BARRETO, H. M.; FONTINELE F. C.; OLIVEIRA, A. P.; ARCANJO, A. D. R.; SANTOS, B. H. C.; ABREU, A. P. L.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, R. A. C.; SOUSA, T. O.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by *Lippia organoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1 – 7, 2014.

^aBRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia brasileira**, 2010. Brasília, 2010. 5ª ed. v. 1.

^bBRASIL. Resolução - RDC Nº 14, de 31 de março DE 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 5 de abril de 2010. DOU nº 63.

BUFAINO, E. M. Phytotherapy in Brazil: recovering the concepts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 22-27, 2013.

CAMPOS, L. M. A. S. **Obtenção de extratos de bagaço de uva cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*): parâmetros de processo e modelagem matemática**. 2005. 141 F. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.

FERREIRA, C. H. A.; COLOMBO, R. Validação de método e determinação espectrométrica dos flavonoides das folhas e do vinhoto da cana-de-açúcar e comparação com método CLAE-UV. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1651-1655, 2011.

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

IWU, M.; DUNCAN, A. R.; OKUNJI, C. O. **New antimicrobials of plant origin**. In: Perspectives on new crops and new uses. Alexandria: ASHS Press, 1999, p. 457-462.

KHATTAK, M. M. A.K.; TAHER, M.; CHWAN, S. J. A.; AZAHARI, N. Selected Herbal Extracts Improve Diabetes Associated Factors in 3T3-L1 Adipocytes. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v. 91, p. 357–375, 2013.

MIGLIATO, K. F.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N.; TOGNOLLI, J. O.; SACRAMENTO, L. V. S.; MELLO, J. C. P.; GIANNINI, M. J. S. M; ALMEIDA, F. A. M.; PIZZOLITTO, A. C. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 695-699, 2011.

NORIEGA, P.; RÖPKE, C. D.; CAMILO, C. M.; DEODATO DE FREITAS, P. C.; BARROS, S. B. M. Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4- nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L). Miq. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 41, n. 2, p. 261-269, 2005;

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; LEITÃO, S. G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, p. 236–240, 2007.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

PIMENTA, D. M. F. **Determinação de Catecolaminas e dos Metabolitos por HPLC com Detecção Eletroquímica**. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química). Instituto Politécnico de Tomar. Tomar, 2013.

PINTO, M. V. **Obtenção e caracterização do extrato seco padronizado de *Mikania laevigata* Sch. Bip. Ex Baker., Asteraceae (Guaco)**. 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2011.

RODRIGUES, C. M. **Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais**. 2007. 197 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2007.

SEVERO, A. A. L.; SOUZA, T. P.; ROLI, L. A.; SOARES SOBRINHO, J. L.; MEDEIROS, F. P. M.; ROLIM NETO, P. J. Otimização das condições de extração de senosídeos por soluções hidroetanólicas das folhas de *Senna alexandrina* MILL empregando planejamento fatorial. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 603-609, 2013.

SIMÕES C.M.O.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN G.; MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Florianópolis: UFRGS Editora. p. 230-239. 2004.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. Elimination of interferences. In: _____. **Fundamentals of analytical chemistry**. 7. ed. Philadelphia: Saunders College Publishing. p. 760-775, 1996.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman. p. 836. 2002.

SOUSA, T. O.; CITÓ, A. M. G. L.; LIMA, F. C. A. Prospecção Tecnológica do gênero *Lippia* e suas aplicações. In: Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia, II, 2014, Parnaíba. **Anais do II Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste**. Parnaíba: UFPI, 2014.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; CALA, M. P.; DURÁN, D. C.; CABALLERO, D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 192-202, 2013.

VASCONCELOS, E.A.F.; MEDEIROS, M.G.F.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n. 3, p. 243-249, 2005.

VICUÑA, G. C.; STASCHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the *Lippia* organoides essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v. 81, p. 343-349, 2010.

WELLUM, D. A.; KIRBY, W. High-performance liquid chromatographic assay for teaflavins. **Journal of Chromatography A**, v. 206, n. 2, p. 400-406, 1981.

World Health Organization. (2002). **WHO traditional medicine strategy 2002-2005**, Geneva, 2002.

YILMAZ, M.B.; YONTAR, O.C.; TURGUT, O.O.; YILMAZ, A.; YALTA, K.; GUL, M.; TANDOGAN, I. Herbals in cardiovascular practice: are physicians neglecting anything? **International Journal of Cardiology**, v. 122, n. 1, p. 48-51, 2006.

*Potencial farmacológico do extrato hidroalcoólico de *Lippia origanoides* H.B.K, como agente hipotensor em ratas normotensas*

Potencial farmacológico do extrato hidroalcoólico de *Lippia origanoides* H.B.K. como agente hipotensor em ratas normotensas

**COELHO, AG^{1,2}; MOURA, AKS²; MORAIS, ICPS³; CARVALHO, GD³;
VASCONCELOS, EAF; MEDEIROS, MGF¹; OLIVEIRA, AP^{3,4}; ARCANJO, DDR^{3,4};
NUNES, LCC¹; CITÓ, AMGL^{1,2}**

¹Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

²Departamento de Química, Universidade federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

³Pós-graduação em Farmacologia, Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais, Universidade federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁴Departamento de Biofísica e Fisiologia, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

Resumo: *Lippia origanoides* H.B.K. (Verbenaceae) é um arbusto aromático nativa da América Central e do nordeste da América do Sul, utilizada como condimento devido ao seu aroma característico, similar ao de orégano e para o tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais. Uma patente brasileira reivindica sua aplicação no tratamento da hipertensão arterial, mas sem nenhuma evidência científica de eficácia e segurança desta aplicação. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito hipotensor do extrato padronizado obtido das partes aéreas de *L. origanoides* (Lo-EHA) em ratas normotensas não anestesiadas. Para tanto, a atividade hipotensora foi investigada através da medida direta da pressão sanguínea em ratas *Wistar* (230 ± 30 g) após administração intravenosa de Lo-EHA (12,5, 25 e 50 mg/kg), sendo também realizada a aferição após o pré-tratamento com L-NAME (20 mg/kg, i.v) 30 minutos antes da administração de Lo-EHA. Em outra série de experimentos, o efeito hipotensor de Lo-EHA nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg foi avaliado após administração oral através da medida indireta da pressão arterial sistólica pelo método de pletismografia de cauda. Através da medida direta da pressão arterial, observou-se que o extrato promoveu efeito hipotensor nas três doses testadas (-10,72 ± 0,65; -10,01 ± 0,71; -16,34 ± 1,69 mmHg, respectivamente) seguido de efeito bradicárdico (-1,03 ± 0,40; -2,81 ± 0,26; -5,43 ± 0,30 bpm). Após o pré-tratamento com L-NAME, foi detectado aumento do efeito hipotensor nas doses de 25 e 50 mg/kg, seguido de bradicardia em todas as doses. Após administração oral, foi observada

resposta hipotensora em ambas as doses a partir de 60 e 90 minutos ($-19,120 \pm 4,82$; $-19,09 \pm 2,54$) em relação ao grupo controle ($1,41 \pm 2,45$; $6,21 \pm 1,43$), com duração de efeito de 270 e 300 minutos, respectivamente. O efeito hipotensor induzido por Lo-EHA em ratas normotensas demonstra potencial farmacológico para o desenvolvimento de medicamentos à base da planta com a aplicação no tratamento de hipertensão.

Palavras-chave: *Lippia origanoides*, hipertensão, L-NAME, pletismografia de cauda

Abstract: Pharmacological potential of the hydroalcoholic extract of *Lippia origanoides* HBK as an hypotensive agent in normotensive rats

Lippia origanoides H.B.K. (Verbenaceae) is an aromatic shrub native to Central America and northern South America, and is popularly used as condiment due to its distinctive oregano-similar aroma, and in the treatment of respiratory and gastrointestinal diseases. A Brazilian patent claims its application in the treatment of hypertension, but no scientific evidence of efficacy and safety of this application. The aim of the study was investigate the hypotensive effect of a standardized extract obtained from aerial parts of *L. origanoides* (Lo-EHA) in non anesthetized normotensive rats. The hypotensive activity was investigated by direct measurement of blood pressure in Wistar rats (230 ± 30 g) after intravenous administration of Lo- HAE (12.5, 25 and 50 mg/kg) in a second group was made pre treatment with L-NAME (NO synthase inhibitor) (2.0 mg / kg, iv) 30 minutes before administration of the extract. Furthermore, the hypotensive effect of Lo- HAE at doses of 100 mg / kg and 200 mg / kg has been reported after oral administration to rats by indirect measurement of systolic blood pressure by tail plethysmography. The administration of the extract intravenously promoted hypotensive effect in the three doses (-10.72 ± 0.65 , -10.01 ± 0.71 , -16.34 ± 1.69 , respectively) followed by bradycardic effect (-1.03 ± 0.40 ; -2.81 ± 0.26 , -5.43 ± 0.30). After the pretreatment with L-NAME (20 mg / kg, iv) 30 minutes before administration of Lo-EHA, there was increased hypotensive effect at doses 25 and 50 mg/kg, followed by bradycardia in all doses, indicating that this effect probably doesn't involve the activation of the enzyme NO synthase. After oral administration at doses of 100 mg/kg and 200 mg/kg, hypotensive response from 60 to 90 minutes was observed (-19.120 ± 4.82 , -19.09 ± 2.54) compared to the group control (1.41 ± 2.45 , 6.21 ± 1.43), with a duration of effect of 270 and 300 minutes, respectively. The Lo-EHA induced hypotensive effect in females normotensive rats demonstrates pharmacological potential for the development of herbal medicines with application in the treatment of hypertension.

Keywords: *Lippia origanoides*, hypertension, L-NAME, tail plethysmography

1. Introdução

Dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que as Doenças Cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no mundo, sendo responsável por 30% das mortes globais. De acordo com Santos e colaboradores (2013), mais de 80% das mortes por DCV no mundo ocorrem em países de média e de baixa renda. No Brasil, a hipertensão atinge 24,4% da população (21,1% dos homens adultos e 27,2% das mulheres), sendo o mais importante fator de risco para o desenvolvimento de DCV, em especial o Acidente Vascular Encefálico (AVE) e o infarto do miocárdio, que são as principais causas de morte isolada do país; nos Estados Unidos, um em cada três adultos apresenta pressão sanguínea alta, sendo que na faixa etária de 65 anos ou mais a incidência é muito maior em mulheres que em homens (GO et al., 2013; IKEDA et al., 2014; MALACHIAS, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Estes dados podem ser relacionados ao fato de que a população brasileira encontra-se em processo de envelhecimento, sendo este o maior fator de risco para doenças vasculares. Estudos anteriores têm demonstrado um excessivo aumento em casos de hipertensão, infartos e doenças coronarianas com o avanço da idade (BRASIL, 2012; CHOI, 2014).

Também conhecida como “assassino silencioso”, pois geralmente não produz sintomas, a hipertensão arterial (HA) é um grande desafio à saúde pública no mundo, especialmente para os países em desenvolvimento, onde parte da população tem pouco acesso a cuidados de saúde modernos, através do uso de anti-hipertensivos e suas combinações. Além disso, o tratamento medicamentoso da hipertensão sem qualquer efeito colateral ainda representa um desafio, sobretudo por serem fármacos em geral de uso contínuo cuja exposição prolongada às substâncias pode apresentar-se como fator preponderante ao desenvolvimento de tais efeitos. Desse modo, a pesquisa por novas alternativas terapêuticas para o tratamento da HA pode fornecer opções de tratamento com menor ocorrência de efeitos indesejados. No âmbito dessa busca, os extratos vegetais mostram-se como fontes promissoras de novos tratamentos, podendo ser mais seguros, menos onerosos e apresentarem melhor tolerabilidade, mesmo em maiores doses (GODINHO, 2011; NASCIMENTO, 2013).

A espécie *Lippia origanoides* Humboldt, Bonpland e Kunth (H.B.K.) é um arbusto pertencente à família Verbenaceae que possui aroma específico e sabor peculiar de condimento, em função de sua composição em óleos essenciais (OE) (OLIVEIRA, et al, 2007). É comumente usada como tempero e seu uso na medicina tradicional destina-se ao tratamento de doenças gastrintestinais e respiratórias (resfriados, gripe, bronquite, tosse e asma) (PASCUAL,

et al 2001; VICUÑA, STASCHEENKO e FUENTES, 2010). Na Colômbia é popularmente conhecida como “Oregano del Monte” (Orégano do Monte), no norte do Brasil, é conhecida como Salva-de-Marajó e Alecrim d’Angola. Já no Piauí é conhecida pela população como “Alecrim-do-campo” e nesta região a espécie é amplamente dispersa (BARRETO et al., 2014; SANTOS et al., 2004; STASHENKO et al, 2010; VICUÑA; STASCHEENKO; FUENTES, 2010).

L. origanoides é considerada uma fonte potencial de substâncias bioativas em função da variedade de flavonoides que apresenta e suas concentrações relativamente altas quando comparadas a outras plantas aromáticas comuns. Flavonoides são largamente conhecidos por sua atividade antioxidante e capacidade quelante de íons metálicos. Além disso, através de estudos epidemiológicos, o consumo de tais substâncias tem sido associado à baixa incidência de doenças cardiovasculares, tais como hipertensão, doença arterial coronariana e acidente vascular encefálico (MULVIHILL; HUFF, 2010; STASHENKO et al., 2013; TARAHOVSKY et al., 2014).

Nesse sentido, Carvalho e colaboradores (2013) realizaram estudo sobre os efeitos cardiovasculares induzidos pelo extrato etanólico das folhas de *L. origanoides* e observaram atividade hipotensora e vasorrelaxante com participação do endotélio vascular, o que mostra-se como um resultado promissor e incentiva uma maior investigação a cerca dos efeitos de *L. origanoides* sobre patologias cardiovasculares, sobretudo sobre o quadro de hipertensão arterial, assim como o desenvolvimento de novos medicamentos baseados nessas propriedades.

Desse modo, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito hipotensor *in vivo* do extrato hidroalcolólico das partes aéreas de *L. origanoides* através da medida direta e indireta da pressão arterial, em ratas normotensas.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta do material vegetal

Realizou-se a coleta das partes aéreas de *L. origanoides* H.B.K. em agosto de 2013, no município de José de Freitas (latitude 04°45'23" sul e longitude 42°34'32" oeste), Piauí, Brasil. A determinação da espécie foi realizada pela botânica Fátima Salmena Pires e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário “Graziela Barroso” do departamento de biologia da Universidade Federal do Piauí sob o número TEPB 09205.

2.2 Preparo do Extrato

O preparo do extrato foi realizado conforme metodologia de extração previamente padronizada. O material vegetal (partes aéreas) foi seco à temperatura ambiente e triturado em moinho de facas Marconi (Modelo: MA 680 e série 98 2422). Em seguida, 1004 g de folhas foram extraídos por maceração com 8 L de etanol/água (1:1) durante três dias, com filtração do extrato e renovação do solvente todos os dias. O extrato hidroalcoólico (Lo-EHA) foi submetido à rota-evaporação em evaporador rotativo Heidolph Laborota 4000 acoplado a uma bomba de vácuo Kohlbach (aquecimento de 60 °C, resfriamento à 11 °C e pressão de 600 mmHg). Para a obtenção do extrato vegetal seco, o material rota-evaporado foi submetido à liofilização em Liofilizador de Micro Modulyo Edwards acoplado a uma bomba de alto vácuo ValPump VLP80 Savant.

2.3 Animais

Foram utilizadas ratas *Wistar*, com aproximadamente 3 meses de vida, pesando 230 ± 30 g. Os animais foram mantidos em gaiolas e separados por grupo experimental. A temperatura ambiente do biotério (Biotério Setorial do NPPM / UFPI) foi mantida entre 22 e 24 °C, com luz controlada em ciclo de claro-escuro de 12 em 12 horas. Água e comida foram administradas *ad libitum*. Este estudo transcorreu sob a orientação do médico veterinário Prof. Dr. Rozeverter Moreno Fernandes e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí sob o parecer 008/12.

2.3.1 Eutanásia dos animais

A eutanásia dos animais após a realização dos protocolos experimentais, transcorreu conforme o exigido pela Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV, a qual dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. Para a eutanásia, foi administrado Tiopental Sódico na dose de 100 mg/kg, por via intraperitoneal.

2.4 Efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico de *L. origanoides* (Lo-EHA)

2.4.1 Medida da pressão arterial média após administração intravenosa de Lo-EHA

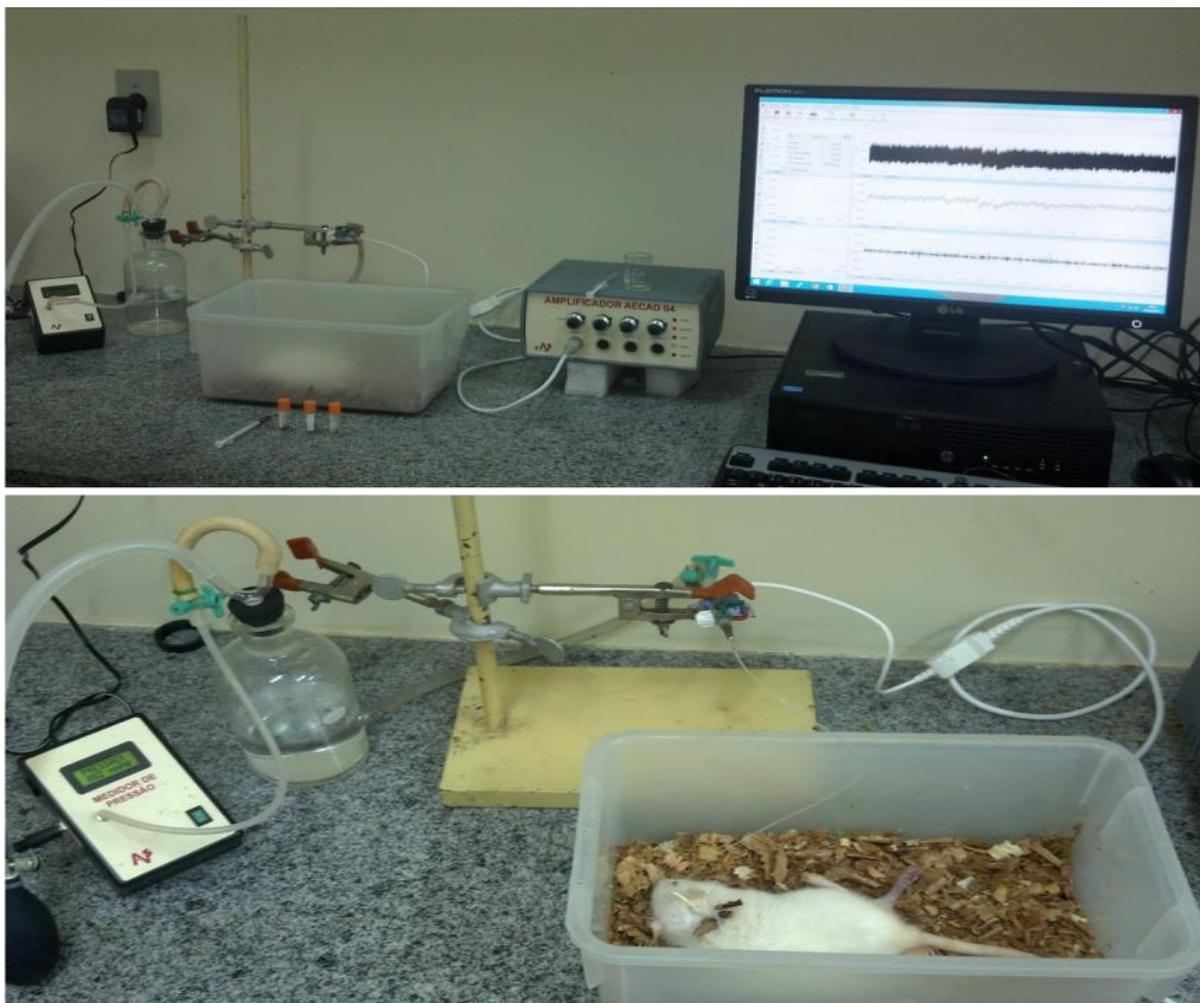
Após anestesia com tiopental sódico na dose de 45 mg/kg, i.p., realizou-se canulação das artéria e veia femurais utilizando catéteres de polietileno, sendo um segmento de PE-10 (4 cm - diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50 (20 cm - diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), em seguida à inserção e fixação, os catéteres foram encapsulados por via subcutânea e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (*scapulae*) e foram mantidos com solução salina heparinizada (100 U/mL) imediatamente após a colocação e antes do registro do sinal da PA (OLIVEIRA et al., 1996).

A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram medidas 24 horas após recuperação da anestesia, conectando o catéter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (Statham P23 ID, Gould, Cleveland, OH, EUA) e acoplado a um sistema de aquisição de dados (AECAD 04H, AQCAD 2.3.9, AVS Projetos, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 1). Para cada ciclo cardíaco, o *software* fornece dados de pressão arterial sistólica, diastólica e média, e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca). Após estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, administrou-se nitroprussiato de sódio (10 µg/kg) por via intravenosa (i.v.), a fim de verificar-se a eficiência da canulação, uma vez que o nitroprussiato de sódio é um vasodilatador de ação imediata e curta duração, cuja molécula ao interagir com grupos sulfidríla das hemácias e da parede vascular, libera íons cianetos e grupo óxido nítrico, agindo este último como vasodilatador direto, provocando hipotensão e taquicardia reflexa (FEITOSA-FILHO et al., 2008; CASTRO et al., 2011).

Após nova estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, Lo-EHA foi administrado por via intravenosa nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg (n = 5), com intervalos de tempo suficiente (± 30 min) para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores da linha de base. Em um segundo grupo (n = 4), foi realizado pré-tratamento com L-NAME (20 mg/kg, i.v.) 30 minutos antes da administração do Lo-EHA (12,5, 25,0 e 50 mg/kg, i.v.), a fim de investigar-se a ocorrência de resposta hipotensora provocada por Lo-EHA mesmo após o tratamento com L-NAME, visto que este composto apresenta atividade inibidora da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (WEBB et al., 2010).

Para o correto registro dos efeitos observados sobre a PAM e FC, foram computados os valores da linha de base e os valores imediatamente após a administração das substâncias. As variações de PAM (Δ PAM) e FC (Δ FC) foram expressas como diferença da pressão arterial média final (PAMf) ou frequência cardíaca final (FCf) menos a pressão arterial média inicial (PAMi) ou frequência cardíaca inicial (FCi): Δ PAM = PAMf – PAMi / Δ FC = FCf – FCi.

Figura 1. Aparato para registro de pressão arterial média após administração intravenosa de Lo-EHA



Fonte: Arquivo Pessoal

2.4.2 Medida da pressão arterial sistólica por pletismografia de cauda após administração oral de Lo-EHA

A mensuração indireta da pressão arterial foi realizada através do pletismômetro de cauda ML125 NIBP (ADInstruments, Sydney, Austrália) para a obtenção da pressão arterial sistólica (PAS). Todos os animais utilizados neste protocolo foram adaptados às condições experimentais através de treinamento prévio por duas semanas, consistido por entrada e saída do contendor para reduzir a influência do estresse induzido pela manipulação do animal.

Antes da realização das medidas, os animais foram mantidos em caixa de madeira com ventilação por 15 minutos, iluminadas por lâmpada fluorescente, a fim de submetê-los a um leve aquecimento (35 °C). A mesma condição de aquecimento foi seguida durante todas as

medições, em uma segunda caixa de madeira (Figura 2). O animal foi mantido em um contenedor de acrílico que permite adequada exposição e acesso à sua cauda, sendo a porção proximal desta encaixada a um manguito de borracha conectado ao pletismômetro para insuflar, a fim de comprimir a cauda momentaneamente, e depois desinsuflar. O manguito é combinado a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, LabChart®, ADInstruments, Sydney, Austrália) que gera os registros de pulso, e frequência cardíaca a partir dos dados enviados pelo amplificador de sinais. A PAS foi considerada como sendo o primeiro sinal de pulso de retorno após desinsuflar o manguito.

As medidas de PAS foram obtidas a partir de três grupos: tratado com Lo-EHA 100 mg/kg (n=6), tratado com Lo-EHA 200 mg/kg (n=6) e grupo controle (n=6). As aferições foram realizadas após administração por via oral, no tempo zero e a cada 30 minutos, totalizando 390 minutos de observação. O valor da PAS caudal de cada animal representa a média, em mmHg, de três medidas sequenciais.

Figura 2. Aparato para registro de pressão arterial sistólica por Pletismografia de Cauda



Fonte: Arquivo Pessoal

2.5 Análise Estatística

Os valores foram expressos como a diferença média entre PAM, PAS ou FC medidas após e antes dos tratamentos. Para o tratamento estatístico das medições de PAS por pletismografia de cauda foi realizado ANOVA two-way, seguido de pós teste de Bonferroni. Por sua vez, os resultados obtidos com a medida direta foram avaliados empregando-se o teste *t* de Student para amostras não pareadas. Utilizou-se o software GraphPad Prism 5.0.® para a plotagem dos gráficos e a análise estatística, considerando como significativo quando $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

3.1 Efeito hipotensor de Lo-EHA após administração intravenosa

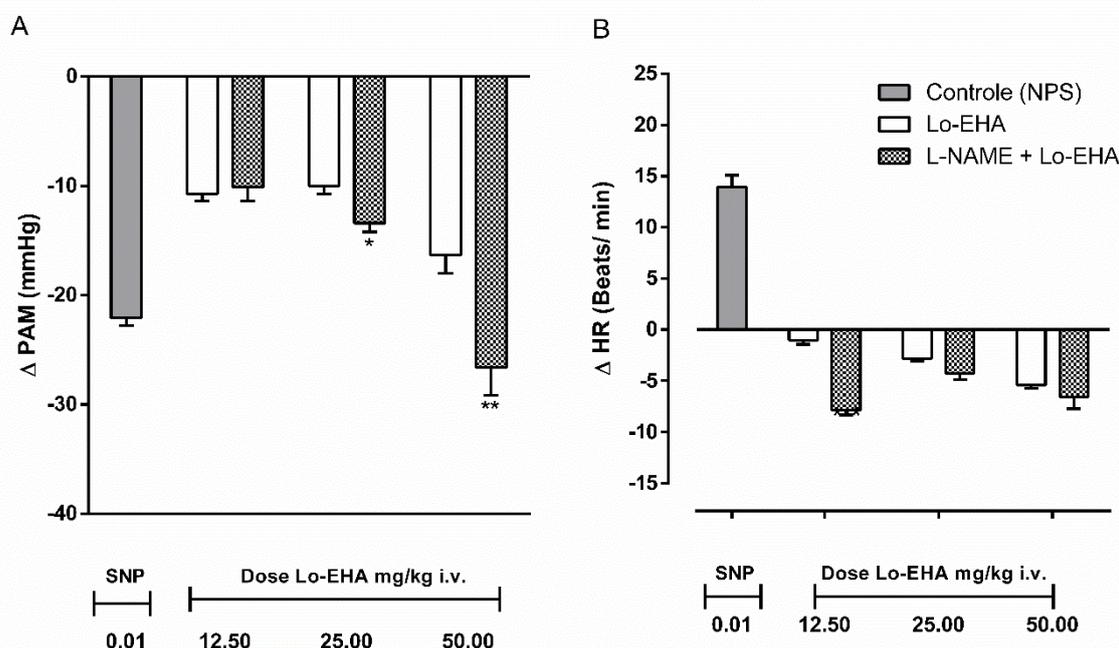
A manutenção da homeostase vascular possui participação ativa do endotélio, através do balanço entre a liberação de substâncias vasodilatadoras, como óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE), além de substâncias vasoconstritoras como endotelina, prostaglandina-H₂, tromboxano-A₂ e angiotensina II. A administração de substâncias vasoativas pode resultar no desequilíbrio destas forças moduladoras, promovendo a vasodilatação ou vasoconstrição e contribuindo para o aumento ou diminuição da resistência vascular periférica e, por conseguinte, da pressão arterial (RIGATTO, 2002; RAMOS et al, 2006).

Desse modo, tratando especificamente do NO, sabe-se que uma diminuição da sua síntese causa disfunção endotelial, a qual pode representar um indicativo de hipertensão. Sabe-se também que a diminuição da síntese de óxido nítrico em função da administração de inibidores da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) ou através de sua inativação genética, produz hipertensão em modelos de experimentação animal (ARNAL et al., 1993; HUANG et al., 1995).

A administração por via intravenosa de Lo-EHA nas doses 12,5; 25 e 50 mg/kg promoveu hipotensão (respectivamente, em mmHg: -10.72 ± 0.65 ; -10.01 ± 0.71 ; -16.34 ± 1.69) seguida de bradicardia (em bpm: -1.03 ± 0.40 ; -2.81 ± 0.26 ; -5.43 ± 0.30). Por sua vez, o pré-tratamento com L-NAME promoveu aumento do efeito hipotensor nas doses 25 e 50 mg/kg (em mmHg: -13.42 ± 0.79 ; -26.62 ± 2.52), seguido de aumento do efeito bradicárdico na dose de 12,5 mg/kg (-7.89 ± 0.45) (Figura 3).

Considerando que o L-NAME apresenta atividade inibidora da eNOS, a permanência da resposta hipotensora provocada pela administração de Lo-EHA mesmo após o tratamento com L-NAME, sugere que este efeito parece não envolver a ativação da enzima eNOS e, por conseguinte, o aumento na liberação de óxido nítrico. Entretanto, sabe-se que a resposta hipotensora é provocada não somente através de mecanismos vasculares. Substâncias com potencial hipotensor reduzem a pressão sanguínea a partir de diversos mecanismos, por exemplo: efeito simpaticolítico, efeito diurético, bloqueio aos canais de cálcio, antagonismo aos receptores de angiotensina e inibição da enzima conversora de angiotensina (STAFFILENO, 2005; WEBB et al., 2010; ZHAO et al, 2013).

Figura 3. Efeito do Lo-EHA sobre a Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca antes e após pré-tratamento com L-NAME. Os valores são expressos por média \pm EPM. Teste *t* de Student não-pareado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo tratado com L-NAME.



Em conformidade aos resultados supracitados, os achados de Carvalho e colaboradores (2014) apontam que o extrato etanólico de *L. origanoides* também desempenha efeito hipotensor quando administrado por via intravenosa a ratas normotensas. Todavia, neste estudo observou-se atenuação da resposta hipotensora após tratamento com L-NAME, sugerindo a participação da enzima eNOS. Deste modo, faz-se necessária a investigação acerca dos possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito hipotensor provocado pelo extrato de *L. origanoides*, bem como a pesquisa minuciosa sobre a constituição característica do extrato, de modo a promover-se uma possível correlação entre os componentes deste e as rotas farmacológicas percorridas.

Ao analisar os valores de frequência cardíaca durante a administração de Lo-EHA, percebe-se a ocorrência de bradicardia paralela à resposta hipotensora (Figura 3). Tal efeito pode resultar, dentre outros possíveis mecanismos, de ação cardiopressora direta, promovida pelos constituintes do extrato. Nesse contexto, deve-se ressaltar que a atividade contrátil do coração é controlada precisamente por estímulos elétricos que se propagam de modo ordenado através do tecido miocárdico. A ativação dos miofilamentos é promovida pelo cálcio

intracelular livre que acopla as atividades elétricas e mecânicas do músculo cardíaco, promovendo então a sístole. Com a abertura dos canais para potássio, as células do coração repolarizam, levando-o à diástole. Além disso, sabe-se que a estimulação parassimpática, através da liberação de acetilcolina, é capaz de aumentar a permeabilidade da membrana das fibras ao K^+ , o que permite o rápido efluxo de K^+ para fora das fibras condutoras, causando hiperpolarização das fibras e tornando o tecido cardíaco menos excitável (SCHOLZ et al., 2010; BRITTO, 2011). Assim, a elucidação do efeito bradicárdico desempenhado por Lo-EHA deve considerar diversas hipóteses investigativas, dentre as quais pode-se citar por exemplo, possível efeito muscarínico ou, quiçá, ação redutora do influxo de cálcio.

Em oposição à bradicardia relatada para o Lo-EHA, Carvalho e colaboradores (2014) detectaram resposta taquicárdica após administração do extrato etanólico de *L. origanoides* por via intravenosa na maior dose testada (50 mg/kg). Entretanto, neste mesmo estudo, a administração do extrato por via oral não apresentou alterações na frequência cardíaca.

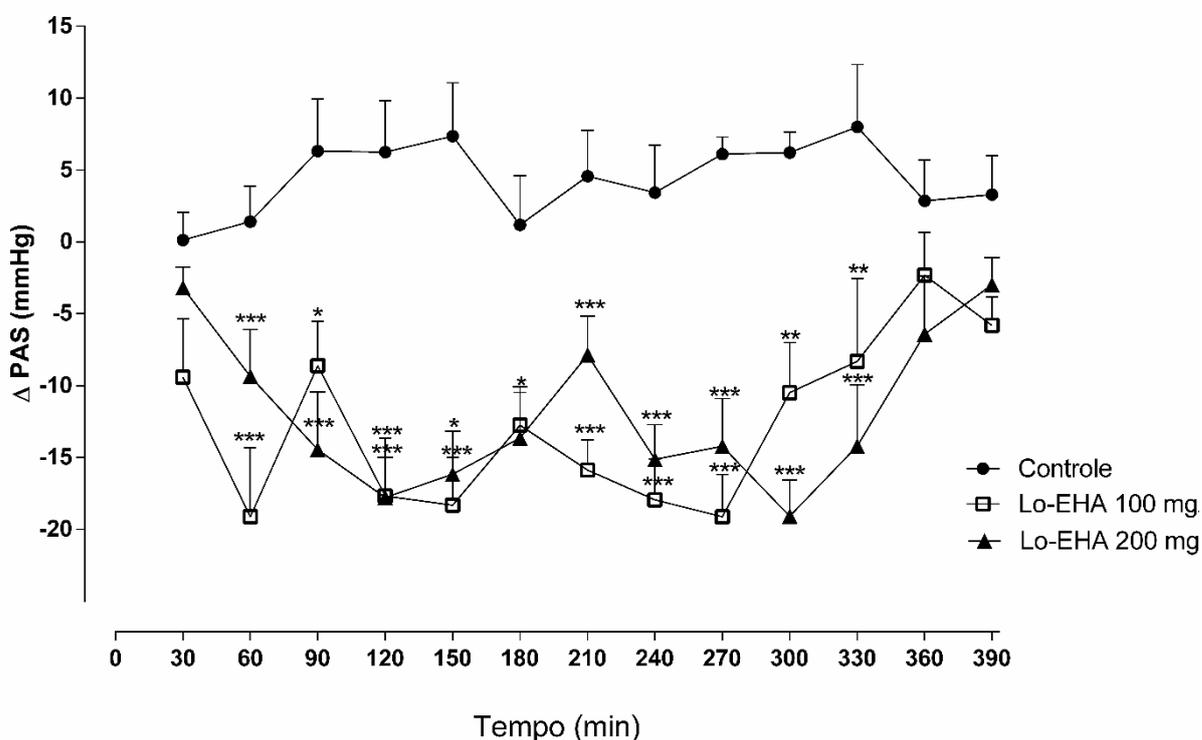
3.2 Medida indireta do efeito hipotensor de Lo-EHA após administração oral

A técnica de pletismografia de cauda permite realizar medições repetidas da pressão arterial sistólica de ratos de modo não invasivo. Nesta técnica, a circulação caudal é obstruída pela insuflação de um manguito situado na raiz deste órgão. Após insuflação, ocorre a perda dos sinais de pulso da artéria caudal, e a desinsuflação sequencial permite que a pressão seja gradualmente reduzida, de modo que imediatamente ao fluxo sanguíneo ser retomado, o primeiro pulso mensurado corresponde à pressão sistólica, que é detectado por um sensor que permite a obtenção dos registros de pressão arterial sistólica (PAS) (WILSON; BYROM, 1938).

A Figura 4 representa os valores de diferença de pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos de animais tratados com Lo-EHA e grupo controle. Observa-se que na dose de 200 mg/kg, ocorre redução progressiva na PAS em função do tempo, chegando ao seu máximo após 300 min de administração (A), enquanto que na dose de 100 mg/kg observa-se resposta máxima logo após 60 minutos de administração (B) do Lo-EHA seguida de um aumento na PAS em 90 min (C), com posterior retorno à resposta máxima em 270 min (D) (em mmHg; A: $-19,09 \pm 2,54$; B: $-19,120 \pm 4,82$; C: $-8,620 \pm 3,089$; D: $-19,123 \pm 2,946$) em relação ao grupo controle (A: $1,41 \pm 2,45$; B: $6,21 \pm 1,43$; C: $6,313 \pm 3,613$; D: $6,112 \pm 1,188$), embora sem diferença estatisticamente significativa entre as doses. Entretanto, deve-se ressaltar que a duração na redução da PAS foi maior após o tratamento com a dose de 200 mg/kg, com 300 min de duração, enquanto com a dose de 100 mg/kg o efeito foi observado durante 270 min.

A resposta hipotensora pronunciada apresentada pelo Lo-EHA pode ser relacionada à variedade de substâncias bioativas presentes no extrato. De acordo com Stashenko et al., (2013), algumas das atividades da espécie *Lippia origanoides* podem ser atribuídas ao seu conteúdo em flavonoides, apresentando substâncias como naringenina, pinocembrina, quercetina e luteolina. Além disso, Mladěnka, et al (2010) aponta que a presença do grupo 4-ceto na estrutura de flavonoides é um requisito para a ação vasodilatadora. Esta característica é encontrada na estrutura molecular dos quatro principais flavonoides supracitados.

Figura 4. Variação da Pressão Arterial Sistólica após administração oral de Lo-EHA nas doses de 100 mg/Kg e 200 mg/Kg em ratas normotensas. Os valores são expressos por média \pm EPM (n = 6). ANOVA two way seguido do pós teste de Bonferroni. *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 quando comparado ao grupo controle.



Ao analisar-se o efeito hipotensor promovido por Lo-EHA (Figura 4) após administração oral, merece destaque o tempo de duração deste efeito, que chega em aproximadamente 5 h e 30 min de duração, com recuperação dos valores basais após 6 h e 30 min. O tempo de ação prolongado permite vislumbrar a possibilidade de desenvolvimento de um medicamento fitoterápico para tratamento crônico de hipertensão, tendo em vista a facilidade posológica que pode ser atingida com o adequado delineamento da formulação. No

estudo de Krepsky (2011), por exemplo, foi verificada redução de aproximadamente 20 mmHg na pressão arterial sistólica de camundongos normotensos, após administração oral de *Cuphea carthagenensi*, entretanto, o tempo de ação foi curto (cerca de 2h) e nesse caso, mantendo-se o rápido início e final da ação nos estudos clínicos, é plausível que o medicamento possa ser indicado em casos de urgência ou emergência hipertensiva, e não para o tratamento crônico de HA (KREPSKY, 2011).

4. Conclusão

A administração de Lo-EHA a ratas *Wistar* promoveu hipotensão pronunciada nas doses de 100 e 200 mg/Kg, v.o., bem como nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/Kg, i.v. Na administração i.v. o efeito hipotensor foi seguido de bradicardia, não havendo atenuação da resposta após o tratamento com L-NAME, sugerindo que este efeito não envolve o aumento na liberação de óxido nítrico. Dessa forma, Lo-EHA apresenta potencial farmacológico para o desenvolvimento de fitoterápicos com aplicação no tratamento da hipertensão arterial.

5. Referências

ARNAL, J. F.; AMRANI, AI EL; CHATELLIER, G.; MENARD, J.; MICHEL, J. B. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. **Hypertension**, v. 22, n. 3, p. 380–387, 1993.

BARRETO, H. M.; FONTINELE F. C.; OLIVEIRA, A. P.; ARCANJO, A. D. R.; SANTOS, B. H. C.; ABREU, A. P. L.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, R. A. C.; SOUSA, T. O.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by *Lippia organoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1 – 7, 2014.

CARVALHO, G. D.; CAMPELO R. T.; MIRANDA, V. C.; SANTOS, M. E. P.; CITÓ, A. M. G. L.; ARCANJO, D. D. R.; OLIVEIRA, A. P. Efeito vasorrelaxante de *Lippia organoides* H.B.K. em anéis de artéria mesentérica de ratos. In: Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia, I, 2013, Parnaíba. **Anais do I Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste**. Parnaíba: UFPI, 2013.

CARVALHO, G. D.; MIRANDA, V. C.; COELHO, A. G.; MENDES, M.B.; ARCANJO, D. D. R.; CITÓ, A. M. G. L.; OLIVEIRA, A. P. Hypotensive effect of ethanol extract from *Lippia organoides* H.B.K. in normotensive rats. In: Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 46, 2014, Fortaleza. **Anais do 46º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**. Fortaleza: SBFTE, 2014.

CASTRO P.F.S.; PEREIRA A.C.; ROGRIGUES G.J.; BATISTA A.C.; SILVA R.S.; BENDHACK L.M.; ROCHA M.L. A new nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor presents higher efficacy than sodium nitroprusside on relaxation of airway smooth muscle. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 5, p. 370–377, 2011.

CHOI, S.; KIM, M.; HAN, S.; KIM, S.; KIM, H. J.; KANG, S.; KIM, D.; KIM, B. S. KIM, W. H.; KIM, J. KIM, H.; RHEW, J. Y.; PARK, K.; CHO, K.; JEONG, M. H.; JEONG, Y. S.; RYU, K. Characteristics of hypertension subtypes and treatment outcome among elderly Korean hypertensives. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 8, n.4, p. 246-253 ,2014.

FEITOSA-FILHO, G. F.; LOPES, R. D.; POPPI, N. T.; GUIMARÃES, H. P. Hypertensive emergencies. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v. 20, n. 3, p. 305-312, 2008.

GO, A.S.; MOZAFFARIAN, D.; ROGER, V.L.; BENJAMIN, E.J.; BERRY, J.D.; BORDEN, W.B.; BRAVATA, D.M.; DAI, S. .; FORD, E.S.; FOX, C.S.; FRANCO, S.; FULLERTON, H.J.; GILLESPIE, C.; HAILPERN, S.M.; HEIT, J.A.; HOWARD, V.J.; HUFFMAN, M.D.; KISSELA, B.M.; KITTNER, S.J.; LACKLAND, D.T.; LICHTMAN, J.H.; LISABETH, L.D.; MAGID, D.; MARCUS, G.M.; MARELLI, A.; MATCHAR, D.B.; MCGUIRE, D.K.; MOHLER, E.R.; MOY, C.S.; MUSSOLINO, M.E.; NICHOL, G.; PAYNTER, N.P.; SCHREINER, P.J.; SORLIE, P.D.; STEIN, J.; TURAN, T.N.; VIRANI, S.S.; WONG, N.D.; WOO, D.; TURNER, M.B.; Heart disease and stroke statistics – 2013. Update: a report from the American Heart Association. **Circulation**. v. 127, p.245-246, 2013.

GODINHO, A. L. M. **Farmacologia da hipertensão**. 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade do Algarve (Faculdade de Ciências e Tecnologia), Faro, 2011.

HOUGHTON, P.J.; HOWES, M.J.; LEE, C.C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of ethnopharmacology**. v. 110, p. 391-400, 2007.

HUANG, P. L.; HUANG, Z.; MASHIMO, H.; BLOCH, K. D.; MOSKOWITZ, M. A.; BEVAN, J. A.; FISHMA, M. C. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature**, v. 377, p. 239–242, 1995.

IKEDA, N.; SAPIENZA, D; GUERRERO, R.; AEKPLAKORN, W.; NAGHAVI, M.; MOKDAD, A. H.; LOZANO, R.; MURRAY, C. J. L.; LIM, S. S. Control of hypertension with medication: a comparative analysis of national surveys in 20 countries. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 92, p.10–19C, 2014.

KREPSKY, P. B. Composição química quantitativa e avaliação da potencial atividade vasodilatadora de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) MacBride. 2011. 211 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, 2011.

MALACHIAS, M.V.B. “Eu sou 12X8”. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 17, n. 1, p. 2, 2010.

McNEILL, J.R.; JURGENS, T.M. A systematic review of mechanisms by which natural products of plant origin evoke vasodilatation. **Canadian journal of physiology and pharmacology**. v. 84, p. 803-821, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hipertensão Arterial e Diabetes Mellitus. Morbidade auto referida segundo o VIGTEL - 2009. Cadastro de portadores do SIS-HIPERDIA – 2010, 2011.

MULVIHILL, E. E.; HUFF, M. W. Antiatherogenic properties of flavonoids: Implications for cardiovascular health. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 26, p.17A-21^a, 2010.

NEGRÃO, C. E.; RONDON, M. U. P. B. Exercício físico, hipertensão e controle barorreflexo da pressão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v. 8, p: 89-95, 2001.

OLIVEIRA, E. J.; MEDEIROS, I. A.; MUKEIERJEE, R. Hypotensive and spasmolytic effects of normacusine B from *Strychnos atlantica* root. **Phytomedicine**, v. 3, p. 45-49, 1996.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; LEITÃO, S. G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, p. 236–240, 2007.

PALAMARCHUK, I.; IVES, C. T.; HACHINSKI, V.; KIMPINSKI, K. Baroreflex sensitivity: Reliability of baroreflex components of the Valsalva maneuver, **Autonomic Neuroscience** (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2014.05.002>.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D. S.; VILLAR, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201–214, 2001.

RAMOS, L. R.; CARVALHO, F. A. S.; MARTIN, A. B.; MARTINS, R. A. R. L. Efeito da administração oral de arginina sobre a pressão arterial e parâmetros cardíacos em ratos submetidos ao bloqueio crônico da síntese de óxido nítrico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 12, n. 4, p. 169-174, 2006.

RIGATTO, K. V. Curso temporal da hipertensão induzida pelo bloqueio da síntese do óxido nítrico: avaliações hemodinâmicas e bioquímicas. 2002. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2002.

SANTOS, F. J. B.; LOPES, J. A. D.; CITÓ A. M. G. L.; OLIVEIRA, E. H.; LIMA, S. G.; REIS, F. A. M. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* H.B.K. **The Journal of Essential Oil Research**, v.16, p. 504-506, 2004.

SCHOLZ, E. P. E.; HUGO, A.; KATUS; CHRISTOPH, A.; KARLE. Cardiovascular Ion Channels as a Molecular Target of flavonoids. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**. v. 28, p. e46-e52, 2010.

SECRETARIA DE DIREITOS HUMANOS. SECRETARIA NACIONAL DE PROMOÇÃO DEFESA DOS DIREITOS HUMANOS. **Dados sobre o envelhecimento no Brasil**, Brasília, 2012.

STAFFILENO, B.A. Treating hypertension with cardioprotective therapies: the role of ACE inhibitors, ARBs, and beta-blockers. **Journal of Cardiovascular Nursing**, v. 20, p. 354–364, 2005.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; CALA, M. P.; DURÁN, D. C.; CABALLERO, D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 192-202, 2013.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; RUÍZ, C. A.; ARIAS, G.; DURÁN, D. C.; SALGAR, W.; CALA, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 93–103, 2010.

TARAHOVSKY, Y. S.; KIM, Y. A.; YAGOLNIK, E. A.; MUZAFAROV, E. N. Flavonoid–membrane interactions: Involvement of flavonoid–metal complexes in raft signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1838, p. 1235–1246, 2014.

VICUÑA, G. C.; STASCHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v. 81, p. 343-349, 2010.

WEBB, A.J.; Fischer U.; Mehta Z.; Rothwell P.M. Effects of antihypertensive drug class on interindividual variation in blood pressure and risk of stroke: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**. 375, 906–915. 2010.

WILSON, C; BYRON, F. B. A plethysmographic method for measuring systolic blood pressure in the intact rat. **Journal of Physiology**. v. 93, p. 301-304, 1938.

ZHAO, W.; YU, J.; SU, Q., LIANG, J.; ZHAO, L.; ZHANG, Y.; SUN, W. Antihypertensive effects of extract from *Picrasma quassiodes* (D. Don) Benn. in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 145, p. 187–192, 2013.

Lippia origanoides H. B. K.: obtenção de extrato, avaliação da toxicidade e desenvolvimento de forma farmacêutica em comprimidos

***Lippia origanoides* H. B. K.: obtenção de extrato, avaliação da toxicidade e desenvolvimento de forma farmacêutica em comprimidos**

COELHO, AG^{1,2}; MOURA, AKS²; MORAIS, ICPS³; CARVALHO, GD³; CUNHA, F. V. M.³; LIMA NETO, J. S.²; VASCONCELOS, EAF; MEDEIROS, MGF¹; ARCANJO, DDR^{3,4}; NUNES, LCC¹; CITÓ, AMGL^{1,2}.

¹Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

²Departamento de Química, Universidade federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

³Pós-graduação em Farmacologia, Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais, Universidade federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁴Departamento de Biofísica e Fisiologia, Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

Resumo

Lippia origanoides H.B.K. (Verbenaceae) é um arbusto apícola que, dentre outras atividades farmacológicas, tem demonstrado potencial hipotensor frente a estudos *in vivo*. Desse modo são objetivos deste trabalho a avaliação da toxicidade aguda do extrato frente a ratas *wistar*, além do desenvolvimento de uma formulação farmacêutica fitoterápica a partir de *L. origanoides* para o tratamento da hipertensão arterial e a quantificação do marcador naringenina no extrato seco e comprimidos desenvolvidos. Para tanto, o extrato hidroalcoólico de *L. origanoides* (Lo-EHA) foi liofilizado ou seco em Spray-Dryer, acrescido de Aerosil®. O ensaio de toxicidade aguda em ratas foi realizado seguindo-se o método de classes do Guia 423 da OECD, com dose inicial de 2000 mg/Kg. Foram então preparados oito lotes de comprimidos através de planejamento fatorial 2³ e avaliados quanto à influência do diluente (celulose ou babaçu), a presença do aglutinante (granulação com ou sem PVP) e a porcentagem de lubrificante (0,5 e 1,0%), sob suas características organolépticas, peso médio, friabilidade, dureza, tempo de desintegração e perfil de dissolução, utilizando os parâmetros da Farmacopeia Brasileira V edição. Para a quantificação dos teores do marcador no Lo-EHA liofilizado e seco por aspersão, foi previamente construída uma curva analítica do padrão naringenina e em seguida as amostras dos extratos foram separadamente tratadas por *clean-up* e analisadas em UFLC, acoplado a um detector de UV, a uma concentração de 0,0495 mg/mL. A secagem do Lo-EHA em *spray dryer* apresentou um rendimento de 77,94%. O Lo-EHA não apresentou sinais de toxicidade e não possui classificação de DL₅₀ de acordo com o GHS. Além disso, todos os lotes apresentaram características macroscópicas aceitáveis e os lotes de comprimidos

de babaçu produzidos foram aprovados em todos os ensaios de controle de qualidade ao passo que os lotes de comprimidos de celulose foram reprovados no ensaio de desintegração, por apresentarem tempo de desintegração superior a 30 minutos. Para os lotes contendo babaçu como diluente, os perfis de dissolução foram satisfatórios e dentre estes o melhor teor de Lo-EHA no comprimido (100,27%) foi identificado para o lote contendo 1% de lubrificante, sem o aglutinante PVP. Para a quantificação de naringenina nos extratos liofilizado e seco por aspersão, detectou-se em ambos a mesma concentração do marcador (3,73 g%). Portanto, o pó do mesocarpo de babaçu é um excipiente farmacêutico promissor para o desenvolvimento de comprimidos fitoterápicos à base de *Lippia origanoides* H.B.K. para o tratamento de hipertensão arterial.

Palavras-chave: *Lippia origanoides*, toxicidade, mesocarpo de babaçu, planejamento fatorial, comprimidos.

Abstract: *Lippia origanoides* H.B.K: Obtention of extract, evaluation of toxicity and development of tablet pharmaceutical form

Lippia origanoides H.B.K. (Verbenaceae) is a beekeeping shrub which, among other pharmacological activities, has shown potential hypotensive forward to *in vivo* studies. Thus objectives of this work is the evaluation of acute toxicity of extract front the *wistar* rats, besides to develop a herbal pharmaceutical formulation from *L. origanoides* for the treatment of hypertension and the quantification of naringenin marker in dry extract and developed tablets. Thus, the hydroalcoholic extract of *L. origanoides* (Lo-EHA) was lyophilized or dry spray dryer, plus Aerosil®. The acute toxicity in rats was performed according to the method Guide 423 classes OECD, with a starting dose of 2000 mg/kg. Were then prepared eight batches of tablets by factorial design 2³ and evaluated the influence of diluent (cellulose or babassu), the presence of the binder (granulation with or without PVP) and the percentage of lubricant (0.5 and 1.0%) under its organoleptic characteristics, average weight, friability, hardness, disintegration time and dissolution profile, using the parameters of the Brazilian Pharmacopoeia V edition. For quantification of marker levels in lyophilized and spray dried Lo-EHA, was previously constructed an analytical curve of standard naringenin and then the samples of the extracts were treated separately for clean-up and analyzed UFLC coupled to a detector UV, at a concentration of 0.0495 mg/ml. Drying Lo-EHA in spray dryer had a yield of 77.94%. The Lo-EHA no showed signs of toxicity and does not have an LD₅₀ classification according to the GHS. In addition, all lots presented acceptable macroscopic characteristics and lots of babassu tablets were approved in all quality control testing while lots of cellulose tablets were disapproved in the disintegration test, because they have a disintegration time greater than 30 minutes. For lots containing babassu as a diluent, the dissolution profiles were satisfactory and among these the best Lo-EHA content in the tablet (100.27%) was identified for the lot containing 1% lubricant, without PVP binder. For quantification of naringenin in lyophilized and dry by spraying extracts, it was detected on both the same concentration of the tracer (3.73 g%). Therefore, babassu mesocarp powder is a pharmaceutical excipient promising for the development of herbal tablets based on *Lippia origanoides* H.B.K for the treatment of hypertension.

Keywords: *Lippia origanoides*, toxicity, mesocarp babassu, factorial design, tablets.

1. Introdução

Lippia origanoides H.B.K. (Verbenaceae) é um arbusto apícola de pequeno porte, nativo da América Central e do nordeste da América do Sul, cujo nome advém de seu aroma característico, similar ao de orégano. É utilizada como tempero e na medicina popular para o tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais, apresentando também propriedade antisséptica (BARRETO et al., 2014; VICUÑA; STASHENKO; FUENTES, 2010). Além disso, Coelho e colaboradores (2014a) demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *L. origanoides* (Lo-EHA) induz efeito hipotensor significativo seguido de bradicardia quando administrado por via endovenosa a ratas.

Segundo dados da OMS (2013), as doenças cardiovasculares são causa de 17 milhões de mortes por ano, quase um terço do total. Destas, 9,4 milhões relacionam-se à hipertensão arterial. No Brasil, as doenças cardiovasculares representam hoje a maior causa de mortes, dentre estas, a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é a mais frequente, além de ser o principal fator de risco para complicações comuns como acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio e doença renal crônica terminal. Tais doenças trazem consigo uma volumosa carga econômica, produzindo elevados custos para os sistemas de saúde e da previdência social devido à mortalidade e invalidez precoces, e, sobretudo para a sociedade, famílias e as pessoas portadoras (VILA-NOVA, 2014). Diante desse contexto, é de grande relevância o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica fitoterápica a partir de *L. origanoides* H.B.K., vislumbrando-se a possibilidade do desenvolvimento de um medicamento de baixo custo, para o tratamento da hipertensão arterial.

No tocante ao desenvolvimento de formulações farmacêuticas, é necessária a avaliação de toxicidade das matérias-primas e formulações propostas. De acordo com a legislação brasileira para o registro de medicamentos fitoterápicos (RDC nº 14 de 2010), devem ser realizados testes de toxicidade pré-clínica, estipulados pelo “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos (BRASIL, 2010).

Deve-se ressaltar ainda que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária preconiza a obtenção do perfil cromatográfico e análise quantitativa de marcadores da espécie para o registro de fitoterápicos. No caso de *L. origanoides*, Coelho et al. (2014b), identificaram a flavanona naringenina como um possível marcador da espécie.

Dentre as formulações farmacêuticas existentes, os comprimidos destacam-se por apresentarem efeito sistêmico, através de administração conveniente e segura de dose diária do

fármaco, apresentando maior precisão de dose e tendo baixo custo e facilidade de produção em escala industrial (KLEIN et al., 2013; SILVA, 2011).

Em se tratando de formulações fitoterápicas a partir de extratos vegetais, devem ser produzidos medicamentos cuja preservação e valorização do potencial terapêutico sejam priorizadas e sua qualidade assegurada. As diferentes técnicas de secagem disponíveis são alternativas promissoras para conservação e estoque dos extratos vegetais, proporcionando maior estabilidade, conservando suas características físico-químicas e propriedades farmacológicas. Dentre estas técnicas, a secagem por aspersão ou *spray-drying* é largamente utilizada na indústria de fitoterápicos, uma vez que o equipamento permite a alimentação direta de líquidos e a descarga direta de pó, sendo um método produtivo e altamente versátil, que confere estabilidade e permite o controle das características do produto final (MARCEL, 2009; SILVA, 2011).

No desenvolvimento de formulações farmacêuticas, o mesocarpo de babaçu (*Orbygnia sp.*), um dos principais produtos extrativos do Brasil, surgiu como uma matéria-prima de grande potencial, já que apresenta cerca de 70% da sua composição em amido. Tal característica permite a sua utilização como excipiente em comprimidos, uma vez que amidos são biopolímeros naturais, rentáveis e não tóxicos, amplamente utilizados como aglutinantes e desintegrantes das formulações (BARROS, 2011). As vantagens do uso do mesocarpo de babaçu em formulações farmacêuticas frente aos excipientes convencionais devem ser averiguadas. Para tanto, pode ser realizado estudo estatístico comparativo entre as características destas formulações e os comprimidos produzidos de forma convencional, contendo celulose microcristalina (CMC) como diluente (SÁ, 2013). Nesse sentido, o instrumento estatístico conhecido como Planejamento Fatorial pode ser adotado, visto que estuda o efeito de qualquer fator inerente a um processo sobre a resposta, fazendo-o variar e observando-se o resultado dessa variação em pelo menos dois níveis (NORIEGA et al., 2005).

As formulações desenvolvidas devem ser analisadas através do controle de qualidade sobre suas características e propriedades, de modo a assegurar a estabilidade física e química das mesmas. Os comprimidos devem desintegrar-se no tempo previsto, ser pouco friáveis e destituídos de defeitos como falhas, fissuras e contaminação. Tal controle consiste em um conjunto de operações qualitativas e quantitativas, que visam verificar se o produto está em conformidade com as especificações estabelecidas por organismos regulatórios, como as especificações farmacopeicas (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2001; PEIXOTO, 2005).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade aguda oral do extrato de *L. origanoides* H.B.K. em ratas, bem como desenvolver uma formulação farmacêutica fitoterápica a partir deste, para o tratamento da hipertensão arterial.

2. Material e Métodos

2.1 Preparo dos extratos secos

Após coleta das partes aéreas de *L. origanoides* H.B.K. no município de José de Freitas uma exsicata foi depositada no Herbário “Graziela Barroso” do departamento de biologia da Universidade Federal do Piauí sob o número TEPB 09205. Para o preparo do extrato, o material vegetal foi seco à temperatura ambiente e triturado em moinho de facas Marconi (Modelo: MA 680 e série 98 2422). Em seguida, 1004 g de folhas foram extraídos por maceração com 8 L de etanol/água (1:1) durante três dias, com filtração do extrato e renovação do solvente todos os dias. O extrato hidroalcoólico (Lo-EHA) foi submetido à rota- evaporação em evaporador rotativo Heidolph Laborota 4000 acoplado a uma bomba de vácuo Kohlbach (aquecimento de 60 °C, resfriamento à 11 °C e pressão de 600 mmHg). Após evaporação do etanol, parte do material foi submetido à secagem por liofilização em Liofilizador de Micro Modulyo Edwards acoplado a uma bomba de alto vácuo ValPump VLP80 Savant e outra parte do extrato foi destinada à secagem por aspersão. Nesta etapa, ao resíduo aquoso foi adicionado Aerosil 200[®] (Dióxido de Silício Coloidal), como adjuvante de secagem, em uma proporção de 30% em relação à massa do resíduo sólido do extrato, previamente determinada conforme metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5 ed. O extrato acrescido do adjuvante foi submetido a secagem em Mini *Spray-Dryer* (Büch; B-290), utilizando-se temperaturas de entrada e saída de 150 °C e 100 °C respectivamente. A velocidade da bomba peristáltica (3 mL min⁻¹) foi mantida a 10% da capacidade máxima, a pressão foi mantida constante (55 bar) e a aspiração de ar a 80% da capacidade total.

2.2 Ensaio de toxicidade aguda do Lo-EHA liofilizado e seco por aspersão – Teste de Classes (OECD 423)

2.2.1 Animais

Para realização deste ensaio, foram utilizadas um total de 18 ratas *Wistar*, com aproximadamente 4 meses de vida, pesando 230 ± 30 g. Os animais foram mantidos em gaiolas e separados por grupo experimental. A temperatura ambiente do biotério foi mantida entre 22 e 24 °C, com luz controlada em ciclo de claro-escuro de 12 em 12 horas. As ratas ficaram em jejum de comida por 12 h antes da administração, sendo o alimento restituído 3 h após a administração, a partir daí, água e comida foram administradas *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí sob o protocolo nº 008/12. Todos os animais foram tratados em conformidade com os princípios definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelos preceitos da legislação brasileira (Lei Arouca - Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008).

2.2.2 Toxicidade Aguda

O ensaio foi realizado de acordo com o Guia 423 da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD), o Método de Classes para Toxicidade Aguda, onde realizam-se etapas sequenciais de teste e prioriza-se a utilização de pequena quantidade de animais (3 por etapa). Este guia estabelece no máximo cinco doses diferentes a serem utilizadas (5, 50, 300 e 2000 mg/kg – podendo chegar a 5000 mg/kg). Neste experimento, a dose inicial administrada dos extratos secos de *L. origanoides* foi de 2000 mg/kg, em uma única administração, já que as informações disponíveis sobre a amostra em estudo apontam que a mortalidade é improvável na maior dose inicial, como preconiza o guia supracitado.

Para viabilizar-se a administração por gavagem dos extratos aos animais na dose pretendida, ambas as amostras foram dispersas em volume previamente calculado de água purificada e submetidas a agitação em vortex, de modo a produzirem-se preparações líquidas homogêneas. No preparo da amostra do extrato liofilizado, foi necessário o uso de carboximetilcelulose 2% (p/v) como agente suspensor. Para o preparo das doses, foi respeitada a proporção de 1 mL de amostra para cada 100 g de peso do animal.

As ratas foram inicialmente divididas em três grupos, de três animais cada, sendo ao grupo 1 administrado o Lo-EHA liofilizado, ao grupo 2 administrado o Lo-EHA seco por asperção (*Spray-dryer*) e ao grupo 3 (Controle), foi administrada água purificada.

Como parâmetros de análise após a administração, foi avaliada diariamente a massa corporal dos animais e realizou-se o “*screening*” hipocrático por meio de observações individuais dos animais nos tempos de 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 8 h, 24 h, e a cada 24 h por 14 dias. Os animais foram observados quanto à função comportamental,

motora e sensorial para verificar os potenciais efeitos neurotóxicos. Essa avaliação seguiu a metodologia adotada por Costa (2013), com modificações, e consistiu em analisar a presença ou não de alterações respiratórias, digestivas e neurológicas com o objetivo de quantificar-se os efeitos da administração aguda sobre os parâmetros apresentados no Quadro 1. A quantificação dos efeitos foi observada utilizando a seguinte classificação: (0): sem efeito, (-): efeito diminuído; (+): efeito presente e (++): efeito intenso. O apêndice A mostra a ficha de acompanhamento dos animais utilizada.

No 14º dia após o início do experimento, os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico (100 mg/Kg, i.p), seguindo-se as determinações da Resolução 1000 / 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Foram então retirados e analisados macroscopicamente o coração, fígado, pulmão, baço e rins dos animais.

Quadro 1 - Parâmetros das atividades do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso autônomo e descrição para avaliação dos parâmetros.

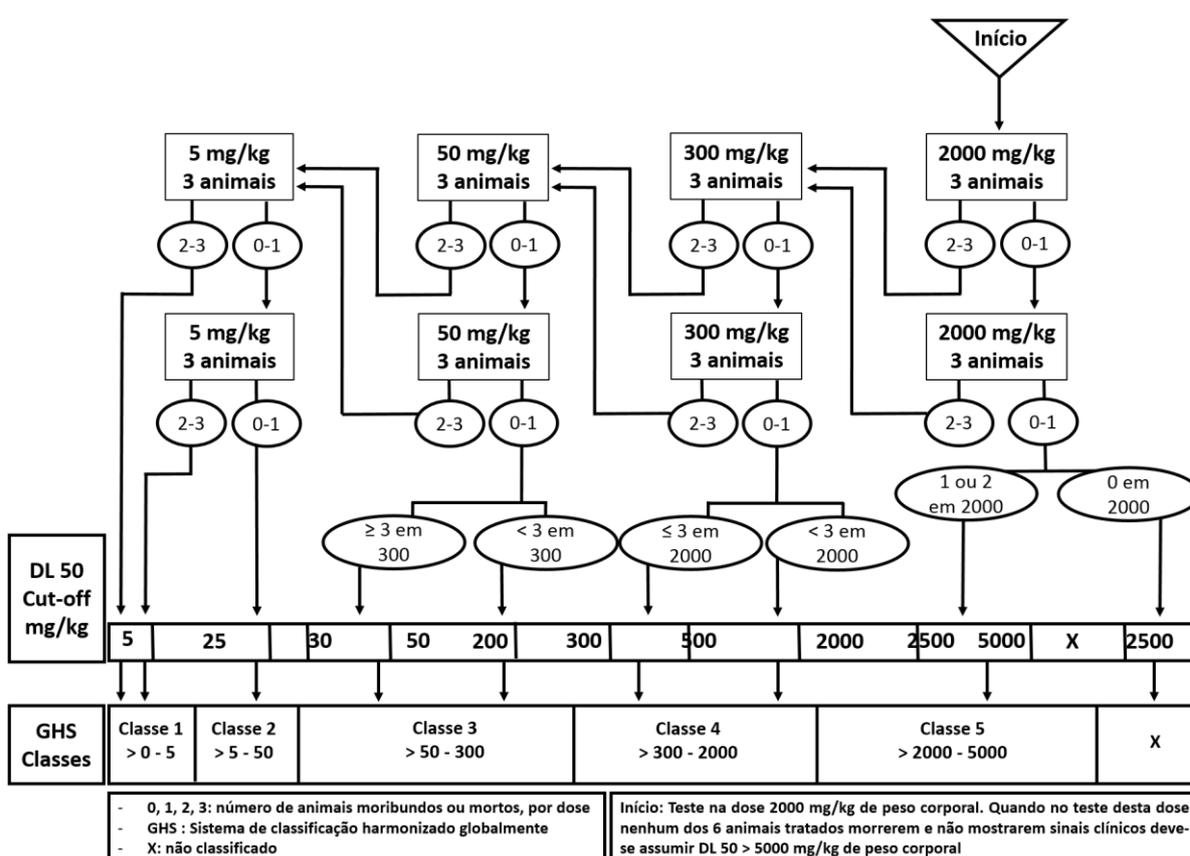
Função	Parâmetro	Descrição para avaliação do parâmetro
SNC-Estimulante	Hiperatividade	Observar se os animais estão hiperativos e excitados.
	Irritabilidade e agressividade	Soprar o animal e tocá-lo levemente para examinar reação.
	Tremores	Observar se estão presentes ou não.
	Convulsão	Observar a presença ou não.
	Piloereção	Verificar se há eriçamento de pelos.
	Movimento intenso das vibrissas	Verificar aumento no movimento das vibrissas.
SNC-Depressora	Hipnose	Verificar se os animais dormem agrupados.
	Ptose	Olho fechado ou semi-fechado mesmo após estímulo.
	Sedação	Observar se o animal está quieto, sem movimento, mas se tocado responde ao estímulo.
	Anestesia	Ausência de resposta a estímulo doloroso.
	Ataxia	Observar se há irregularidades das ações musculares ou falta de coordenação destas ações.

	Reflexo de endireitamento	Colocar o animal com o dorso para baixo e verificar a latência com que o animal volta à sua posição normal.
	Resposta ao toque diminuída	Tocar o animal com uma pinça e examinar as respostas.
	Reflexo corneal	Aproximar um algodão, lentamente, até os olhos do animal e verificar se o animal tem o reflexo de fechá-los.
	Reflexo auricular	Estalar os dedos para observar os reflexos.
Outros Comportamentos	Limpeza	Verificar se o animal apresenta comportamento de autolimpeza aumentado
	Levantar	Avaliar se o animal consegue levantar apoiado apenas nas patas traseiras.
	Vocalizar	Verificar se os sinais sonoros emitidos pelos animais estão aumentados.
	Contorções abdominais.	Movimento vermiforme do corpo
SNA	Diarréia	Verificar presença ou não.
	Constipação	Verificar ausência de bolos fecais.
	Defecação aumentada	Verificar aumento dos bolos fecais.
	Respiração forçada	Observar se a respiração do animal está aumentada.
	Lacrimejamento	Examinar nos olhos dos animais a presença de secreção e tonalidade avermelhada.
	Micção	Verificar se há aumento de micção.
	Salivação	Verificar se há aumento da salivação.
	Tono muscular.	Retirar o animal da gaiola e verificar se a musculatura está flácida
	Força para agarrar	Avaliar a capacidade do animal em permanecer seguro à grade superior da gaiola.

Fonte: Costa (2013), modificado.

A ocorrência de morte em 0 ou 1 animal por grupo durante a realização do ensaio, conduz à repetição deste utilizando-se novamente a dose de 2000 mg/Kg, conforme indicado pelo fluxograma do Guia 423 da OECD, apresentado na figura 1. Seguindo-se o fluxograma, é possível estimar uma DL_{50} de acordo com os padrões estabelecidos pela GHS (*Globally Harmonized System*) (OECD, 2001).

Figura 1 – Procedimento para execução do teste de toxicidade aguda oral pelo Método de Classes da OECD, com a dose inicial de 2000 mg/kg.



FONTE: Costa, 2013.

2.3 Preparo dos comprimidos por Planejamento Fatorial 2^3

Utilizando-se o extrato seco por aspersão, foram preparadas misturas de pós e extrato de *L. origanoides* referentes a 8 lotes de comprimidos determinados pelo planejamento fatorial (2^3), no qual foram combinados em dois níveis os parâmetros diluente utilizado (Celulose Microcristalina (CMC) ou pó do mesocraço de babaçu), percentagem de lubrificante

(Estearato de Magnésio 1 ou 0,5%) e presença ou não do aglutinante polivinilpirrolidona (PVP) 1%, como mostra a matriz de planejamento fatorial da tabela 1. Utilizou-se Celulose Microcristalina PH 101 (fornecedor: Genix[®], Lote: 90652) e Estearato de Magnésio (fornecedor: Natural Pharma[®]; Lote: s/n).

O mesocarpo de babaçu foi obtido da empresa Ativa Vida Ltda (Lote: 1841003) e submetido a um processo de clarificação, a fim de que os grupos cromóforos presentes no material não interferissem nas metodologias de análise espectrofotométricas futuras (ROSA, 2011). O processo de clareamento foi realizado, no Laboratório de Análises de Combustíveis (LAPETRO), utilizando-se a metodologia de Pereira (2010), com modificações.

Tabela 1 - Matriz de planejamento fatorial 2³ para otimização de comprimidos de *Lippia origanoides* H. B. K.

Ensaio	Diluyente (1)	Presença de					
		Aglutinante (2)	Lubrificante (3)	(1/2)	(1/3)	(2/3)	(1/2/3)
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: Diluyente (celulose-; babaçu+); Uso de PVP 1% como aglutinante (não -, sim +), Lubrificante (0,5% -; 1,0% +). Interação dos parâmetros 1 e 2 (1/2); Interação dos parâmetros 1 e 3(1/3); Interação dos parâmetros 2 e 3 (2/3); e Interação dos parâmetros 1, 2 e 3 (1/2/3).

A tabela 2 apresenta a composição segundo a qual os comprimidos foram desenvolvidos. Todos os lotes foram produzidos por via úmida, após prévio processo de granulação em malha nº 2, utilizando-se água-álcool (1:1) para produção dos grânulos e o extrato seco em *Spray-Dryer* na dose de 50 mg. Para os grupos contendo PVP, foi utilizado 1 % (peso) de polivinilpirrolidona solubilizados em água-álcool (1:1) na etapa de granulação. A compressão foi realizada em compressora monopunção de mesa, marca Lemaq, modelo Monopress LM1, utilizando-se punção de 5 mm.

Cada lote (n = 40) foi avaliado quanto às características macroscópicas, que incluem verificação da cor, rugosidade da superfície e a presença de defeitos físicos, e quanto ao peso médio, espessura, diâmetro, dureza, friabilidade e tempo de desintegração, que seguiram metodologia descrita pela Farmacopeia Brasileira V (2010), com auxílio de balança analítica

Sartorius modelo BL 210S, paquímetro Starret[®] modelo 125/6, durômetro digital Nova Ética[®] 298-DGP, friabilômetro Nova Ética[®] Modelo 300 e desintegrador Nova Ética[®], Modelo 301 AC.

Tabela 2 - Definição da composição dos diferentes lotes de comprimidos de acordo com os fatores em estudo (diluyente, presença de aglutinante e percentagem de lubrificante).

Número do lote	Diluyente	Presença de Aglutinante	Lubrificante (%)	Número do lote	Diluyente	Presença de Aglutinante	Lubrificante (%)
Lote 1	Celulose	Não	0,5%	Lote 5	Celulose	Não	1 %
Lote 2	Babaçu	Não	0,5%	Lote 6	Babaçu	Não	1 %
Lote 3	Celulose	Sim	0,5%	Lote 7	Celulose	Sim	1 %
Lote 4	Babaçu	Sim	0,5%	Lote 8	Babaçu	Sim	1 %

Os resultados, por sua vez, foram submetidos à análise estatística sendo a significância dos efeitos das variáveis verificada pela aplicação da análise de variância (ANOVA), utilizando-se o software Graph Pad Prism[®] versão 6.0. Os gráficos de pareto e de superfície foram construídos, respectivamente, através dos softwares Excel[®] 2013 e Statistica[®] versão 12.

2.4 Quantificação do marcador Naringenina nos extratos secos e nos comprimidos por UFLC

Para a quantificação dos teores do marcador no Lo-EHA liofilizado e seco por aspensão, foi previamente construída uma curva analítica do padrão naringenina (SIGMA-ALDRICH, 95,0%) obtendo-se a curva de regressão linear, com a respectiva equação da reta e o coeficiente de correlação (R). Sequencialmente, as amostras foram separadamente tratadas por *clean-up*, com cartucho de extração em fase sólida C18ec (Chromabond[®]), utilizando-se metanol como eluente, seguindo-se a filtração do eluato em filtro *nylon* (0,2 µm, Titan3). Após secagem das amostras tratadas, foram preparadas as soluções metanólicas de análise, em triplicata, a uma concentração de 0,0495 mg/mL.

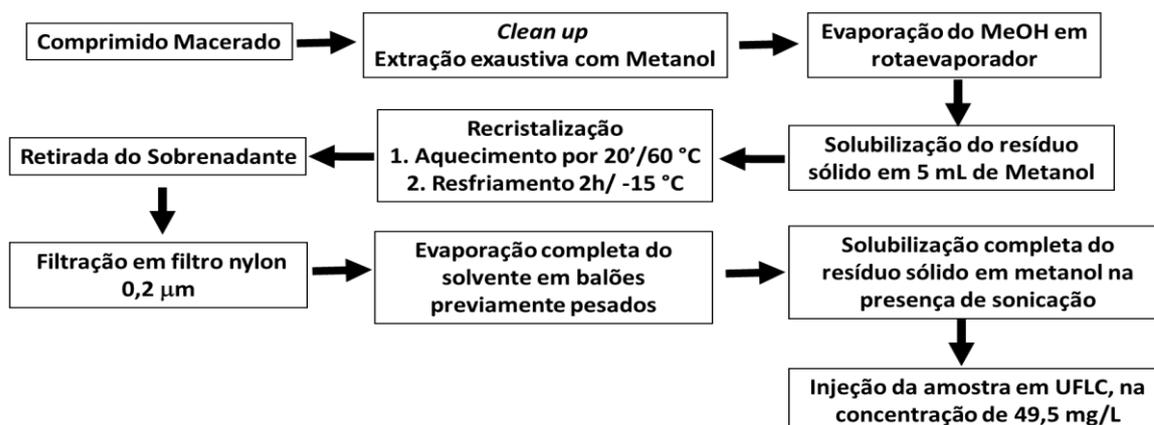
A curva de calibração do marcador foi preparada a partir de seis concentrações de naringenina (1,56; 2,08; 3,12; 3,64; 4,16 e 4,68 mg L⁻¹), submetidas a Ultra Cromatógrafo Líquido Rápido (Shimadzu Prominence), acoplado a um detector UV PDA (Shimadzu). As soluções provenientes dos extratos liofilizado e seco por aspensão foram submetidas à análise nas mesmas condições do marcador, utilizando-se Ultra Cromatógrafo Líquido Rápido - UFLC

(Shimadzu Prominence), munido de desgaseificador DGU-20A₃ e bomba binária LC-20AD Shimadzu, acoplado a um detector UV PDA (Shimadzu); A coluna utilizada nas análises foi C18 Shim-pack XR-ODS (2 mm x 30 mm), e a fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol: água acidificada (0.1% CH₃COOH) a uma taxa de fluxo de 0.25 ml min⁻¹, com o gradiente de metanol aumentando da seguinte forma: 2% de metanol em 0 a 2 min; 10% de metanol em 5 min; 20% de metanol em 7 min e 100% em 30 a 35 min. O comprimento de onda de detecção foi selecionado em 290 nm e o volume de injeção foi de 5.0 µl.

A área do sinal relativo à naringenina nos extratos foi calculada e através da equação da reta da curva analítica foi possível quantificar o teor do marcador nas soluções analisadas e, por conseguinte, nos extratos secos.

No tocante ao doseamento do marcador nos comprimidos, foram analisados apenas os lotes 2, 4, 6 e 8, que continham em sua composição o pó do mesocarpo de babaçu como diluente, pois apresentaram os melhores parâmetros de qualidade. Para tanto, amostras de comprimidos de cada lote foram analisadas por UFLC, em triplicata, sob as mesmas condições supracitadas. Antecedendo a injeção em UFLC, as amostras de comprimidos foram tratadas por *clean up* (Cartucho de extração em fase sólida C18ec - Chromabond[®]), utilizando-se metanol como eluente, a fim de extrair-se por completo o marcador naringenina presente no Lo-EHA. Após concentração do eluato por evaporação do solvente, percebeu-se a ocorrência de turvação da amostra, indicando a presença de sólidos insolúveis na mesma, provenientes da mistura de excipientes que compunham os comprimidos. Para a adequada filtração destes sólidos insolúveis, realizou-se o processo de recristalização, aquecendo-se a amostra por 20 minutos, a 60 °C, seguida de resfriamento a -15 °C por 2 horas, o que proporcionou a formação de precipitado visível. Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente recolhido utilizando-se pipeta de Pasteur (protegida por algodão tratado) e posteriormente submetido à filtração em filtro *nylon* (0,2 µm, Titan3). Após evaporação do solvente, foram então preparadas as soluções finais para injeção na concentração de 0,0495 mg/mL. As etapas realizadas para o preparo das amostras estão esquematizadas na Figura 2. O teor do marcador foi determinado através da área do sinal relativo à naringenina, utilizando-se a curva analítica desta substância.

Figura 2 – Preparo das amostras de comprimidos para doseamento do marcador naringenina em UFLC.



2.5 Ensaio de Dissolução *in vitro*

Realizou-se o ensaio de dissolução para os lotes contendo pó do mesocarpo de babaçu em sua formulação, tendo em vista que os lotes contendo celulose foram reprovados no ensaio de desintegração. Foi construída curva de calibração do extrato hidroalcoólico de *L. origanoides*, nas concentrações de 10,4; 15,2; 24; 32 e 40 µg/mL, em meio HCl 0,1 M e comprimento de onda de leitura selecionado em 290 nm, conforme varredura prévia.

A partir dessa curva foi calculado o teor dissolvido dos comprimidos e construído o perfil de dissolução destes, utilizando-se dissolutor Nova Ética® (Modelo 299). Foram adotados os parâmetros de rotação em 50 RPM, temperatura em 37 °C, 900 mL de meio HCl 0,1 M por cuba, e tempo de coleta para leitura das amostras em 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 75 minutos, seguindo-se as exigências da Farmacopeia Brasileira 5ªed. para dissolução de comprimidos de liberação imediata. Foi utilizado o software Prisma® versão 6.0 para o preparo das curvas de dissolução.

3. Resultados e Discussão

3.1 Ensaio de toxicidade aguda do Lo-EHA liofilizado e seco por aspensão – Teste de Classes (OECD 423)

Na realização do ensaio de toxicidade aguda, com dose inicial de 2000 mg/kg, nenhum dos animais expostos apresentou mortalidade nas primeiras 24 horas e durante todo o período do estudo, após exposição ao Lo-EHA, liofilizado ou seco em *Spray Dryer*. De acordo

com o protocolo adotado, tal resultado conduziu à repetição das administrações a novos grupos de 3 animais cada, novamente não havendo mortes.

Desse modo, pode-se afirmar que a toxicidade oral aguda do extrato de *L. origanoides* é superior a 2000 mg/kg, e de acordo com o Guia 423 (OECD, 2001) a amostra é considerada praticamente atóxica quando apresenta um valor de DL₅₀ acima de 2000 mg/kg ou entre 2000 e 5000 mg/kg, não aconselhando, neste caso, a realização do teste com a dose de 5000 mg/kg, em virtude da preservação à vida dos animais utilizados nos experimentos, bem como em função das dificuldades de solubilização e administração das amostras. Desse modo, o Lo-EHA pode ser enquadrado na categoria X do GHS (*Globally Harmonized System*), que refere-se às substâncias não classificadas.

Segundo Costa (2013) e Valadares (2006), os testes que avaliam a toxicidade aguda de substâncias podem classificá-las de acordo com seu potencial de toxicidade ou letalidade, entretanto, para que os resultados sejam aceitos pelas agências regulatórias dos diversos países, é imprescindível que os protocolos seguidos sejam internacionalmente adotados (*Globally Harmonised System - GHS*), como é o caso dos publicados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD).

No tocante ao *screening* hipocrático realizado, a administração de Lo-EHA na dose única de 2000 mg/kg, não alterou o comportamento dos animais dos grupos tratados, quando comparados ao grupo controle, não tendo sido observados quaisquer sinais clínicos de toxicidade.

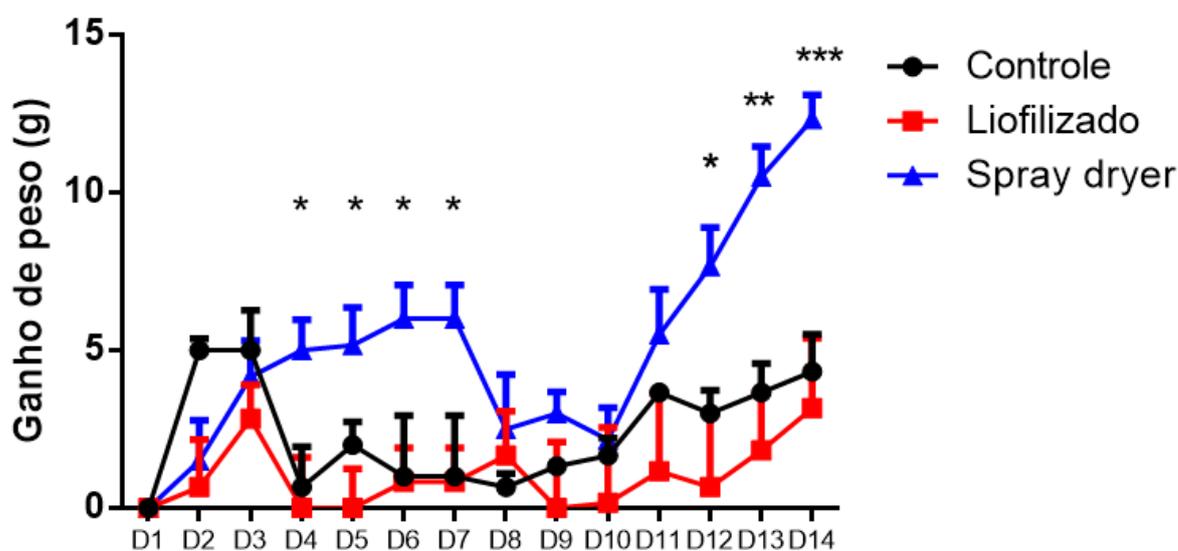
De acordo com Cunha et al. (2009) e Lucio et al. (2000), o *screening* hipocrático é um ensaio útil e comumente utilizado na triagem preliminar de plantas para detecção de possíveis atividades farmacológicas e toxicológicas, uma vez que esta análise fornece uma estimativa geral da toxicidade de uma substância sobre a espécie animal investigada, no tocante à disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e sobre o sistema nervoso autônomo.

Desse modo, pode-se sugerir que o extrato administrado de forma aguda é bem tolerado por via oral em ratas. Entretanto, embora seja um resultado promissor, deve-se considerar que o comportamento observado trata-se de uma avaliação preliminar das possíveis propriedades tóxicas do Lo-EHA e que a mesma forneceu informações acerca dos riscos resultantes de uma única exposição, apenas a animais do sexo feminino.

Além do *screening* hipocrático, os sinais de intoxicação sistêmica podem ser avaliados a partir da redução da massa corporal dos animais em experimento (MELLO, 2001). Neste estudo, a análise da evolução ponderal indicou que a administração do extrato seco por

liofilização não alterou de forma significativa a massa corporal dos animais do grupo tratado quando comparado ao grupo controle, ao passo que a administração do Lo-EHA seco em *Spray Dryer* ocasionou aumento significativo de massa corporal em relação aos grupos controle e tratado com o extrato liofilizado (Figura 3).

Figura 3 – Efeito do tratamento com Lo-EHA (2000 mg/kg) sobre o desenvolvimento ponderal em ratos *Wistar*, durante 14 dias. Anova two way seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ em relação aos grupos liofilizado e controle; ** $p < 0,01$ em relação aos grupos liofilizado e controle; *** $p < 0,001$ em relação aos grupos liofilizado e controle.



Uma possível associação a este aumento de massa corporal é a presença do Aerosil® utilizado como adjuvante no processo de secagem por aspersão. No entanto, amplamente utilizado em formulações farmacêuticas orais e tópicas, o dióxido de silício coloidal é considerado como um excipiente, essencialmente, não tóxico e não irritante, de modo que apenas a administração intraperitoneal e subcutânea podem produzir reações aos tecidos locais e/ou granulomas. Os valores de DL_{50} em ratos para este excipiente são 0,015 g/kg (IV) e 3,16 g/Kg (VO) (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

O ganho de peso associado à exposição a dióxido de silício coloidal foi também observado em outros estudos de toxicidade. No trabalho de Rosário Neto (2012), a administração de extrato vegetal seco em aerosil também provocou aumento de peso corporal dos animais, após um período de exposição de 60 dias. Na pesquisa de Reuzel et al. (1991), foi avaliado o ganho de peso de ratos machos e fêmeas, após 13 semanas de exposição ao Aerosil

200@, por via inalatória, também sendo observado o aumento na massa corporal dos animais de ambos os sexos. Entretanto, uma avaliação toxicológica subcrônica envolvendo doses terapêuticas e respectivos grupos satélites são necessários para avaliar o grau de relevância deste efeito observado.

Além da avaliação ponderal dos animais, foram avaliados macroscopicamente os órgãos das cavidades abdominal e torácica (fígado, rins, coração, baço e pulmões) e não foram detectadas alterações no tamanho, rigidez, estrutura ou coloração das superfícies, quando comparados ao grupo controle. A OECD e a Sociedade de Patologia Toxicológica (*Society of Toxicologic Pathology - STP*) não preconizam a análise do peso relativo dos órgãos e estudo histopatológico em ensaios de toxicidade aguda, visto que os resultados podem não ser conclusivos por serem oriundos de uma única exposição à substância teste. De acordo com a STP, a determinação dos pesos relativos dos órgãos e a análise histopatológica devem ser realizadas após tratamento por no mínimo 7 dias, a não ser que hajam alterações macroscópicas visíveis (OECD, 2001; SELLERS, 2007).

3.2 Secagem do Lo-EHA e Preparo dos comprimidos por Planejamento Fatorial 2³

A secagem do Lo-EHA em *Spray Dryer* apresentou um rendimento de 77,94%. Tal rendimento mostra-se satisfatório e supera os rendimentos normalmente obtidos nas secagens por aspersão em escala laboratorial, que estão em torno de 50 a 70% (LI et al., 2010).

Na análise macroscópica, os comprimidos de todos os lotes apresentaram-se com características adequadas, sendo circulares, planos, isentos de rachaduras, trincas ou deformações. Quanto ao controle físico químico dos comprimidos, conforme apresentado na tabela 3, pode-se inferir que no tocante ao Peso Médio (100 mg) têm-se resultados satisfatórios uma vez que, de acordo com a Farmacopeia Brasileira V, para comprimidos não revestidos que possuam mais que 80 mg e menos que 250 mg, os limites de variação permitidos são de $\pm 7,5\%$. A uniformidade das características dos comprimidos mantém-se ao analisar-se o diâmetro, já que todos possuíram 5 mm, o que demonstra a qualidade dos punções, embora tenha sido observada diferença significativa entre a espessura dos comprimidos de babaçu, dos lotes 2, 4 e 6, em relação aos dois grupos contendo celulose e estearato de magnésio a 1% (Lotes 5 e 7).

Em relação à resistência de comprimidos, as duas principais formas de avaliá-la são a análise da friabilidade e da dureza. É de interesse que estes apresentem certa resistência para suportarem íntegros aos impactos do processo produtivo, transporte e armazenamento dos medicamentos (PRISTA et al., 1995). Além disso, no desenvolvimento farmacotécnico de

comprimidos, a resistência física é uma característica fundamental a ser considerada, visto que pode comprometer a administração da dose terapêutica devido à perda de pó e fragmentos, ou ainda, comprometer o desempenho da forma farmacêutica nas etapas de desintegração e dissolução *in vivo* do medicamento (MARCOLONGO, 2003).

De acordo com a Tabela 3, a análise da friabilidade mostra que todos os lotes atendem à exigência da Farmacopéia Brasileira V, onde o limite de friabilidade tolerável é de 1,5% do seu peso.

Tabela 3 – Resultado das análises de controle de qualidade para os comprimidos desenvolvidos. Anova seguida de pós teste de Tukey: ^asignificativamente maior em relação aos grupos cujo babaçu compunha a formulação ($p < 0,01$); ^b $p < 0,05$, significativamente menor em relação aos lotes 5 e 7, T.D: Tempo de Desintegração, Teor: Teor do marcador naringenina.

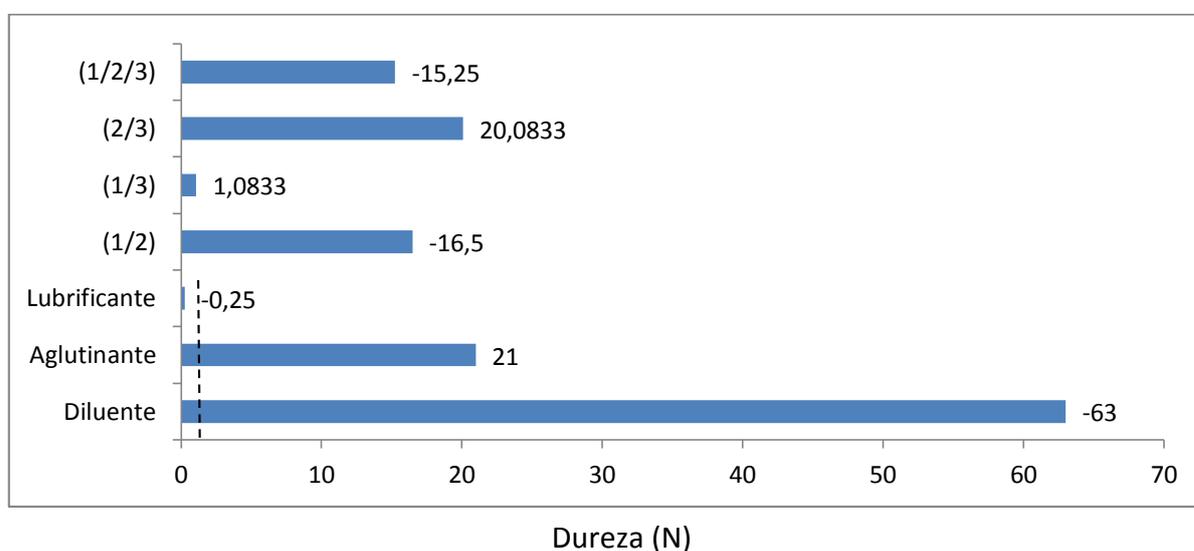
Lote	Peso Médio (g)	Espessura (mm)	Diâmetro (mm)	Friabilidade (%)	Dureza (N)	T. D. (min)	Teor (%)
1 (Cel + sem PVP + 0,5)	100,7±1,59	4,9±0,06	5	0,44	95,88±1,75 ^a	49	
2 (Bab +sem PVP + 0,5)	99,97±1,4	4,8±0,00 ^b	5	0,8	35,13±1,50	25	92,76
3 (Cel + PVP + 0,5)	100,58±1,25	4,9±0,00	5	0,52	99±0,71 ^a	48	
4 (Bab + PVP+ 0,5)	100,43±1,05	4,8±0,00 ^b	5	0,16	36,75±2,60	27	84,72
5 (Cel + sem PVP + 1)	101,82±1,41	5±0,1	5	0,53	61,5±1,47 ^a	44	
6 (Bab + sem PVP + 1)	100,05±1,14	4,8±0,00 ^b	5	0,29	30,63±2,02	17	100,27
7 (Cel+ PVP + 1)	101,66±0,88	5±0,00	5	0,64	124,25±1,76 ^a	47	
8 (Bab + PVP + 1)	100,92±1,42	4,9±0,12	5	0,38	39,37±1,6	17	90,08

Quanto à dureza, que representa a resistência do comprimido ao esmagamento ou a ruptura sob pressão radial, os lotes também foram aprovados, visto que segundo a Farmacopeia Brasileira V a dureza mínima aceitável é de 30 N. Entretanto, é significativamente menor a dureza dos lotes produzidos com mesocarpo de babaçu, quando comparados aos lotes produzidos com celulose, sendo que para os lotes contendo babaçu como excipiente, a presença do aglutinante forneceu índices de dureza mais satisfatórios, uma vez que distanciam-se do valor limítrofe estabelecido pela farmacopéia.

Para o estudo da influência exercida por cada fator sobre a dureza, bem como suas interações, calculou-se o valor limite para a significância com 95% de confiança (Anova seguida de pós teste de Tukey) e considerou-se que apenas os valores acima de 1,37 N podem ser considerados significativos para a resposta obtida. Assim, foi construído o Gráfico de Pareto (Figura 4), onde é possível perceber que o fator diluente foi quem mais influenciou sobre o aumento da dureza, proporcionando um ganho de 63 N quando a formulação contém celulose

(codificada como valor negativo na matriz de planejamento fatorial 2^3 , Tabela 1). Além disso, a presença do aglutinante PVP também influenciou significativamente sobre a dureza dos comprimidos, aumentando este parâmetro em 21 N. Já o fator lubrificante não apresentou influência significativa. No tocante à interação entre os fatores, pode-se perceber que diluente e aglutinante aumentam a dureza quando esta interação é negativa, que pode ser representada, de acordo com a matriz de planejamento fatorial 2^3 , pela ocorrência de celulose como diluente e presença de PVP. De modo semelhante, os três fatores associados, quando gerada uma interação negativa, podem aumentar a dureza em 15,25 N, podendo-se admitir que a presença de celulose como diluente é fator preponderante para este aumento.

Figura 4 – Gráfico de Pareto para os resultados do planejamento fatorial 2^3 , considerando os efeitos produzidos na dureza. Linha tracejada define 95% de intervalo de confiança. Interação dos parâmetros 1 e 2 (1/2); Interação dos parâmetros 1 e 3 (1/3); Interação dos parâmetros 2 e 3 (2/3); e Interação dos parâmetros 1, 2 e 3 (1/2/3).

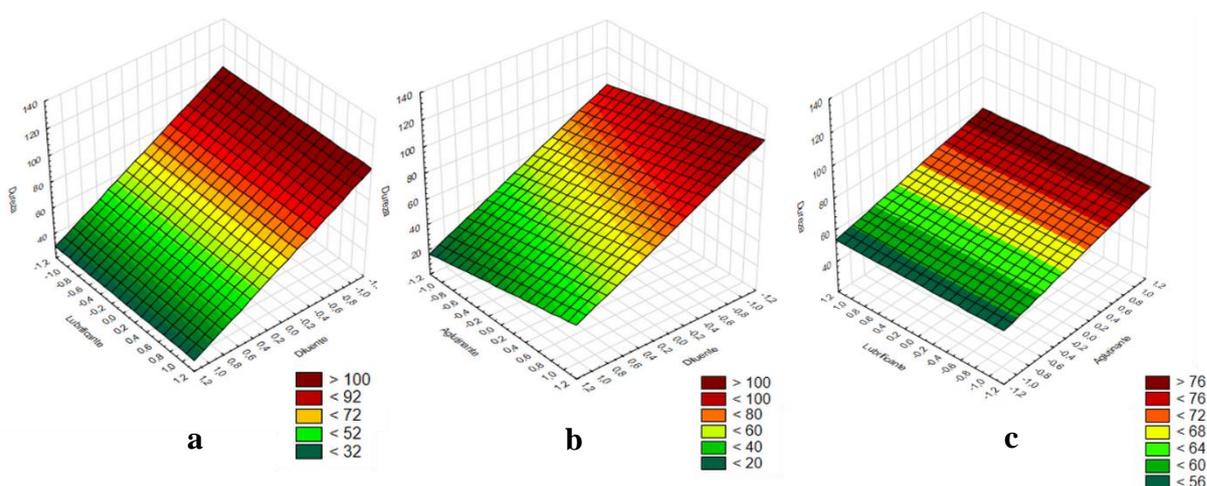


De modo semelhante ao Gráfico de Pareto, os gráficos de superfície do planejamento fatorial 2^3 (Figura 5) permitem visualizar a evolução da dureza dos comprimidos à medida que o diluente é alterado de babaçu (+) para celulose (-), figura 5a, ou ainda, à medida que os lotes de comprimidos não possuem PVP (-) ou possuem PVP como aglutinante (+), figura 5c.

A dureza significativamente maior dos comprimidos contendo celulose influencia diretamente sobre o tempo de desintegração avaliado para tais lotes, contudo, deve-se ressaltar que a relação direta entre dureza e tempo de desintegração dos comprimidos é coerente com seu padrão de resistência mecânica, mas não pode ser estabelecida como regra, uma vez que a

resistência mecânica dos comprimidos determina-se pela técnica de compressão empregada, pela densidade e pelas propriedades de fluxo dos pós (ativos e excipientes) (FERREIRA et al., 2013; SANTOS, 2012).

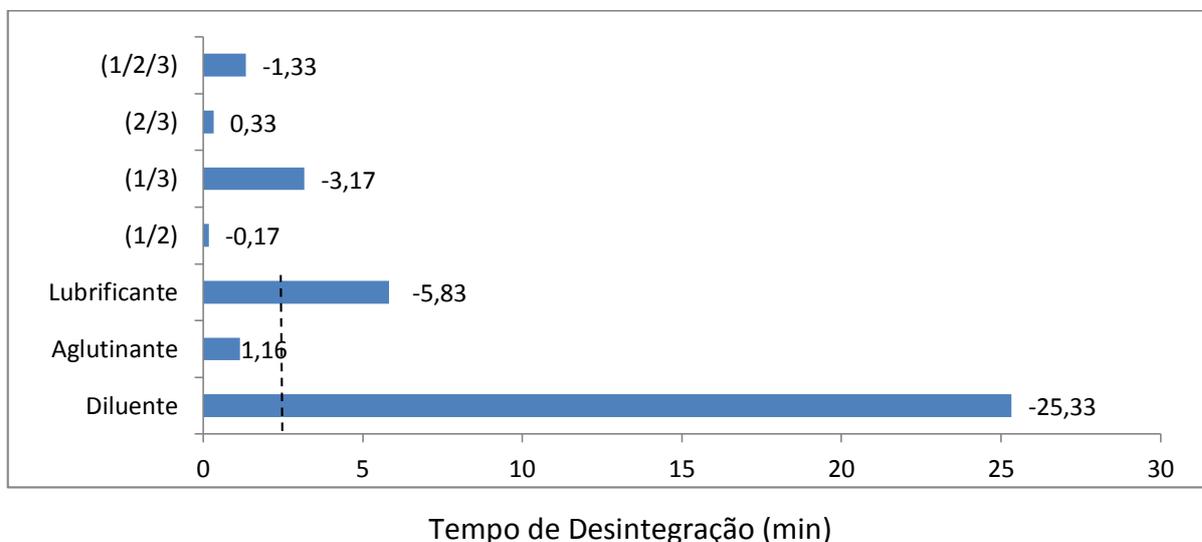
Figura 5 – Gráficos de superfície do planejamento fatorial 2^3 para efeitos produzidos na dureza (N), a partir dos fatores: diluente (celulose-; babaçu+); uso de PVP como aglutinante (não -, sim +), lubrificante (0,5% -; 1,0% +).



Assim como foi realizado para o teste de dureza, calculou-se o valor limite para a significância com 95% de confiança para o tempo de desintegração e considerou-se que apenas valores acima de 2,49 min podem ser considerados significativos. Assim, do Gráfico de Pareto construído (Figura 6), depende-se que o fator diluente foi quem mais influenciou sobre o aumento do tempo de desintegração, proporcionando um ganho de 25,33 min quando a formulação contém celulose.

Por outro lado, a presença do aglutinante PVP não influenciou significativamente ao passo que o lubrificante na concentração de 0,5% aumentou em 5,83 min o tempo de desintegração. Quanto à interação entre os fatores, pode-se perceber que só foi significativa a associação entre diluente e lubrificante que aumentam o tempo de desintegração quando esta interação é negativa, que pode ser representada, de acordo com a matriz de planejamento fatorial 2^3 , pela ocorrência de celulose como diluente e presença de lubrificante a 1% ou pela ocorrência de babaçu como diluente e lubrificante a 0,5%.

Figura 6 - Gráfico de Pareto para os resultados do planejamento fatorial 2^3 , considerando os efeitos produzidos no tempo de desintegração. Linha tracejada define 95% de intervalo de confiança. Interação dos parâmetros 1 e 2 (1/2); Interação dos parâmetros 1 e 3 (1/3); Interação dos parâmetros 2 e 3 (2/3); e Interação dos parâmetros 1, 2 e 3 (1/2/3).

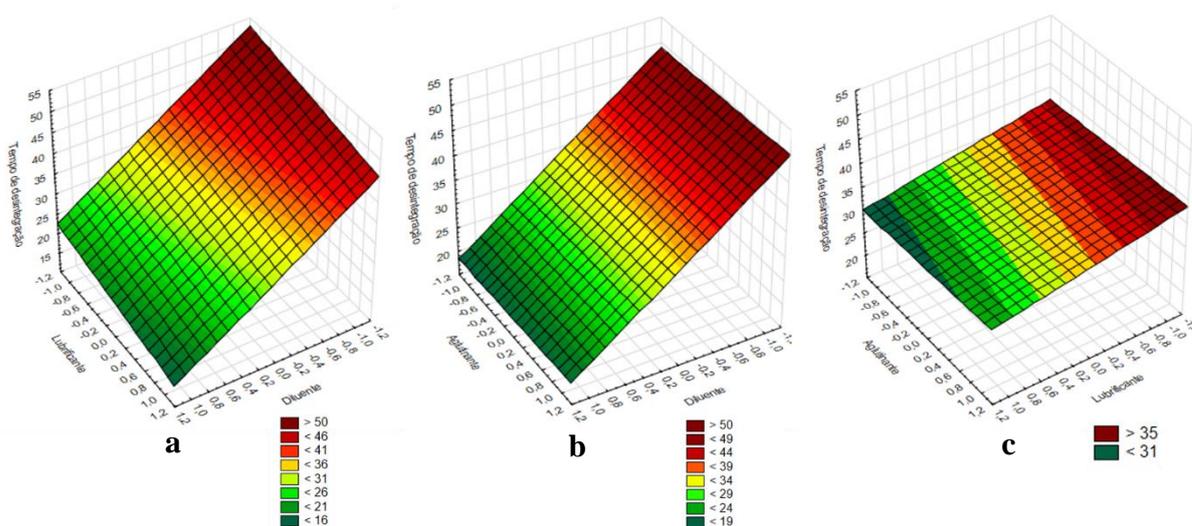


De acordo com o gráfico de superfície para efeitos produzidos no tempo de desintegração (Figura 7), pode-se visualizar que a relação direta com a dureza dos comprimidos se mantém no tocante ao tipo de diluente utilizado, havendo maiores tempos de desintegração quando os comprimidos têm seu diluente alterado de babaçu (+) para celulose (-), figura 7a. Já a ocorrência de lubrificante na concentração de 0,5% (-) está relacionada a maiores tempos de desintegração (> 35 min) que quando na concentração de 1% (+), onde obtém-se tempos inferiores a 31 min (Figura 7c). Tal resultado contrapõe o esperado, visto que uma maior concentração do lubrificante (estearato de magnésio) deveria estar relacionada a um maior tempo de desintegração da formulação, já que, dada a natureza hidrofóbica deste excipiente, apresenta-se uma predisposição a recobrir partículas, dificultando a penetração de água no comprimido e retardando o tempo de desintegração (SOARES; PETROVICK, 1999; SÁ, 2013).

Contudo, pode-se sugerir que o tempo de desintegração esteja aumentado na concentração de 0,5% de lubrificante, por estar sob influência do aglutinante PVP, que apresenta o potencial de tornar os grânulos mais coesos e, por conseguinte, dificultar a desintegração das formulações (figura 7c) (BLOCK, 2007). Entretanto, conforme apresentado no gráfico de Pareto (Figura 6), a presença de aglutinante na formulação não resultou em influência estatisticamente significativa.

Dentre os critérios estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira para comprimidos de liberação imediata, o tempo máximo de desintegração aceito é de 30 minutos. Por conseguinte, apenas os comprimidos contendo babaçu possuem tempo de desintegração satisfatório, inferior a 30 minutos, ao passo que os comprimidos contendo celulose como diluente foram, poranto, reprovados neste teste (Tabela 3).

Figura 7 – Gráficos de superfície do planejamento fatorial 2^3 para efeitos produzidos no tempo de desintegração (min), a partir dos fatores: diluente (celulose-; babaçu+); uso de PVP como aglutinante (não -, sim +), lubrificante (0,5% -; 1,0% +).



3.3 Doseamento do marcador naringenina no Lo-EHA liofilizado, seco por aspersão e nos comprimidos.

A curva analítica do padrão naringenina construída apresenta um R de 0,9993 e equação da reta como segue: Área do sinal = -11226,3496 + 42313,5809 (Concentração). Para a quantificação comparativa de naringenina nos extratos liofilizado e seco por aspersão, analisou-se a área do sinal relativo ao marcador, presente no cromatograma resultante da injeção das amostras. Considerando o crescimento linear entre a área do sinal e a concentração do marcador, representado através da curva analítica de naringenina, os dados de área do sinal foram plotados sobre a equação da reta e a concentração de naringenina no extrato liofilizado foi determinada em 37,3 mg de Naringenina por grama de Lo-EHA, ou 3,73 g%, e a quantificação realizada para o extrato seco em Spray Dryer, resultou no mesmo teor de naringenina (3,73 g%). Desse modo, os dois métodos de secagem apresentam teores iguais do

marcador, demonstrando que a secagem por aspersão, bem como a presença do Aerosil® como adjuvante de secagem, não influenciam o teor de naringenina no extrato, tornando seguro o uso desta técnica para a produção de extratos secos a serem empregados no desenvolvimento de comprimidos.

Através da equação da reta da curva padrão de naringenina foi possível quantificar este marcador nos comprimidos, bem como calcular o teor de Lo-EHA de fato presente nas formulações (Tabela 3). Assim, pode-se inferir que a formulação 6 (Babaçu como diluente, sem PVP e 1% de lubrificante) forneceu o melhor resultado, visto que apresentou teor de 100,27%, garantindo assim que os comprimidos deste lote apresentam a dose de 50 mg de Lo-EHA pretendida no preparo das formulações.

Deve-se ressaltar que as variações de teor encontradas entre os lotes analisados podem estar relacionadas à técnica de preparo prévio das amostras para injeção em UFLC (Figura 1), onde as filtrações e secagens sequenciais podem ter ocasionado perdas de material durante o processo e assim, resultando em um menor teor do marcador. Deste modo, torna-se necessária a validação da metodologia analítica desenvolvida, de modo a sanarem-se possíveis vieses da técnica de quantificação executada. Além disso, sabe-se que a validação de metodologias analíticas consiste em exigência regulatória para o registro de medicamentos fitoterápicos junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2010).

3.4 Ensaio de Dissolução

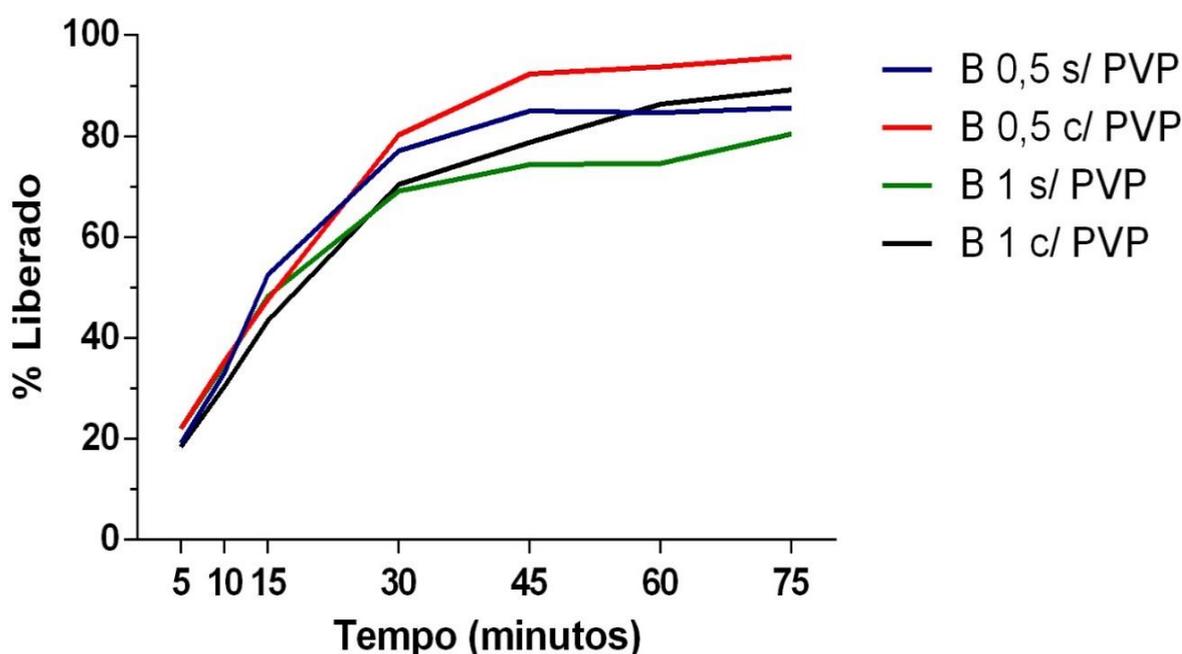
A etapa de dissolução de comprimidos pode ser entendida como decisiva para a chegada do fármaco ao local de ação, visto que após este processo, o fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo. Muitos fatores interferem no processo de dissolução de comprimidos, podendo-se destacar o tamanho das partículas, a solubilidade e natureza química do fármaco, além da composição em excipientes da formulação (MARCOLONGO, 2003; ARAÚJO, 2009).

Os documentos oficiais relativos aos parâmetros aceitos para dissolução divergem entre si, entretanto, a FDA estabelece que, de acordo com as características biofarmacêuticas do fármaco, estas formulações devem liberar 85% do ativo entre os 15 e 60 minutos iniciais do teste (FDA-CDER, 1997). Desse modo, pode-se afirmar que apenas os lotes contendo PVP atendem a esta especificação, pois foi liberada quase que a totalidade do Lo-EHA presente nos comprimidos em até 60 minutos de ensaio. Contudo, deve-se destacar que melhores perfis de

dissolução ocorreram para os lotes contendo estearato de magnésio na menor concentração (0,5%) (Figura 8).

Tal fato justifica-se pela insolubilidade característica dos lubrificantes que retardam o processo de dissolução. Por outro lado, a constituição majoritária em amido do pó de mesocarpo de babaçu facilita o processo de dissolução, já que este excipiente atua também como desintegrante das formulações. Além disso, a secagem realizada em *spray dryer* é capaz de reduzir o tamanho das partículas de extrato seco e, assim, favorecer sua dissolução. Por fim, o perfil de dissolução obtido para os comprimidos pode ainda ser relacionado à granulação úmida realizada, que de modo geral confere características mais hidrofílicas aos constituintes pouco solúveis (MARCOLONGO, 2003).

Figura 8 - Perfil de dissolução dos lotes contendo babaçu como diluente. B0,5: estearato de magnésio 0,5%; B1: Esterato de magésio 1%.



4. Conclusão

O Lo-EHA não apresentou sinais de toxicidade e não possui classificação de DL₅₀ de acordo com o GHS. Para as condições de compressão estabelecidas, os comprimidos contendo pó do mesocarpo de babaçu apresentam características físico-químicas superiores quando comparados aos comprimidos contendo celulose como diluente, sendo também possível

quantificar o teor do marcador naringenina nas formulações desenvolvidas. Portanto, é vantajoso o uso do pó do mesocarpo de babaçu no desenvolvimento de formulação farmacêutica à base de *L. organoides* para o tratamento de hipertensão arterial.

5. Referências

BARRETO, H. M.; FONTINELE F. C.; OLIVEIRA, A. P.; ARCANJO, A. D. R.; SANTOS, B. H. C.; ABREU, A. P. L.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, R. A. C.; SOUSA, T. O.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by *Lippia organoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1 – 7, 2014.

BARROS, I. C. **Avaliação Biofarmacotécnica de potencial excipiente farmacêutico: pó de mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.)**. 2011, 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

BLOCK, L.C. **Desenvolvimento e caracterização de comprimidos de metformina 500 mg de liberação imediata: efeto de aglutinantes**. 2007. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia brasileira**, 2010. Brasília, 2010. 5ª ed. v. 1;

COELHO, A. G.; CARVALHO, G. D.; MORAIS, I. C. P. S.; OLIVEIRA, A. P.; NUNES, L. C. C.; ARCANJO, D. D. R.; CITÓ, A. M. G. L. Pharmacological potential of a standardized extract of *Lippia organoides* HBK as an antihypertensive agent in awake female rats. In: Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia, II, 2014, Parnaíba. **Anais do II Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste**. Parnaíba: UFPI, 2014a.

COELHO, A. G.; CARVALHO, G. D.; MORAIS, I. C. P. S.; OLIVEIRA, A. P.; NUNES, L. C. C.; ARCANJO, D. D. R.; CITÓ, A. M. G. L. Obtention of a standardized extract from aerial parts of *Lippia organoides* and determination of naringenin as a possible biomarker. In: Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia, II, 2014, Parnaíba. **Anais do II Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste**. Parnaíba: UFPI, 2014b.

COSTA, E. V. M. **Estudo etnobotânico sobre plantas utilizadas como antimaláricas no estado do Amapá, avaliação da atividade antimalárica e toxicidade aguda por via oral de *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke**. 2013. 142 f. Tese. (Doutorado em em Biodiversidade Tropical). Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2013.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; LINO JUNIOR, R. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v., n. 2A, p. 403-411, 2009.

FERREIRA, T. F.; MOURÃO, A. S. R.; RIBEIRO, L. A. L.; FREITAS, M. B. Estudo comparativo da influência dos excipientes na qualidade de hidroclorotiazida 25 mg em

medicamentos referência e genéricos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 34, n. 1, p. 63-68, 2013.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Development of tablets containing semipurified extract of guaraná (*Paullinia cupana*). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 186-193, 2013.

LI, X.; ANTON, N.; ARPAGAUS, C.; BELLETEIX, F.; VANDAMME, T. F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. **Journal of Controlled Release**. v. 147, p. 304–310, 2010.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Trad. João F. Pinto et al. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 2001.

LUCIO, E.M.R.A; ROSALEN, P.L.; SHARAPIN, N.; BRITO, A. R. M. S. Avaliação toxicológica aguda e *screening* hipocrático da epilsopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 9, n. 10, p. 23-25, 2000.

MARCEL, S. F. **Otimização de solução extrativa e desenvolvimento tecnológico de produto seco por aspersão de *Psidium guajava* L.** 2009. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. 2003. 117 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MELLO, F. B. **Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos**. 2001. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

NORIEGA, P.; RÖPKE, C. D.; CAMILO, C. M.; DEODATO DE FREITAS, P. C.; BARROS, S. B. M. Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4- nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L). Miq. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 41, n. 2, p. 261-269, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), **As doenças Cardiovasculares**. 2013. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html> acesso em , 27 de dezembro de 2014.

OSHIO, L. T.; RIBEIRO, C. C. T.; MARQUES, R. M.; GUERRA, M. O.; MATTA, S. L. P.; REIS, J. E. P.; SÁ, R. C. S.; PETERS, V. M. Efeito do Extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) sobre a toxicidade sistêmica e órgãos do sistema reprodutor masculino de ratos Wistar adultos. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 6, n. único, p. 7-14, 2014.

PEIXOTO, M. M.; SANTOS JUNIOR, A. F.; SANTOS, C. A. A.; CAETITÉ JUNIOR, E. Avaliação da qualidade de comprimidos de captopril dispensados em Feira de Santana – BA. **Infarma**, v.16, n.13-14, p. 69–73, 2005.

PEREIRA, A. L. S. **Extração de nanocelulose de fibras vegetais**. 2010. 54 f. Monografia (Curso de Graduação em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

PRISTA, L. N.; ALVES, A.C. & MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1. 1995.

ROSA, M. S. L.; SILVA FILHO, E. C.; NUNES, L. C. C.; CRUZ, E. T. L.; ARAÚJO, K. A. Caracterização do mesocarpo de babaçu (*Orbignya sp.*): termogravimetria e avaliação do conteúdo de amido. In: Congresso Brasileiro de Química, 51, 2011, São Luís. **Anais do 51º Congresso Brasileiro de Química**. São Luís: Associação Brasileira de Química, 2011.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6 ed. Washington: Pharmaceutical Press, v. p. 187, 2009.

SÁ, L. L. F. **Desenvolvimento tecnológico de comprimidos de Pilocarpina para tratamento da Xerostomia**. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

SANTOS, D. P. G. **Obtenção e caracterização de comprimidos de captopril 50 mg via compressão direta**. 2012 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Farmácia), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.

SELLERS, R. S.; MORTON, D.; MICHAEL, B.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K. YANO, B. L.; PERRY, R.; SCHAFER, K. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: OrganWeight Recommendations for Toxicology Studies. **Toxicologic Pathology**, v.35, p.751-755, 2007.

SOARES, L. A. L., PETROVICK, P. R. **Física da compressão**. Caderno de Farmácia, v. 15, n. 2, 1999.

VICUÑA, G. C.; STASCENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v. 81, p. 343-349, 2010.

VILA-NOVA, R. S. **SISHIPERDIA – Apresentação**. Coordenação Nacional de HA e DM Departamento de Atenção Básica\ Secretaria de Atenção a Saúde. Disponível em: <<http://hiperdia.datasus.gov.br/>> acesso em 27 de dezembro de 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A global brief on hypertension**. Geneva, 2013.

7. PERSPECTIVAS

- ✓ Validação de todas as metodologias analíticas adotadas;
- ✓ Avaliação da resposta hipotensora de ratas hipertensas após administração intravenosa de Lo-EHA e administração oral dos comprimidos formulados;
- ✓ Realização de atividade vasorrelaxante *in vitro* do Lo-EHA, visando investigar os possíveis mecanismos envolvidos na resposta hipotensora;
- ✓ Desenvolvimento de estudo toxicológico agudo e subagudo da formulação desenvolvida;
- ✓ Depósito de patente reivindicando o direito de prioridade sobre a formulação farmacêutica desenvolvida.

APÊNDICES

