



Universidade
Estadual de Goiás



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS A
PRODUTOS PARA SAÚDE**

THAÍS MOREIRA SILVA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO, DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE
EXTRATOS PADRONIZADOS E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE
DE *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants
(AMARANTHACEAE)**

**Anápolis
2018**

THAÍS MOREIRA SILVA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO, DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE
EXTRATOS PADRONIZADOS E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE
DE *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants
(AMARANTHACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde.

Orientador: Joelma Abadia M. de Paula
Co-orientador: Vanessa Cristiane de S. Amaral

**Anápolis
2018**

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MF383c Moreira Silva Ferreira, Thaís
 CARACTERIZAÇÃO, DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE
 EXTRATOS PADRONIZADOS E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE
 Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants
 (AMARANTHACEAE) / Thaís Moreira Silva Ferreira; orientador
 Joelma Abadia Marciano de Paula; co-orientador Vanessa Cristiane
 de Santana Amaral. – Anápolis, 2018.
 125 p.

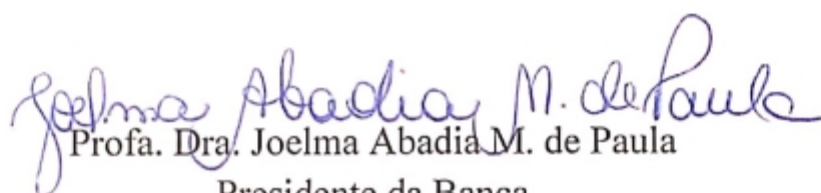
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado
Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) –
Câmpus-Anápolis CET, Universidade Estadual de Goiás, 2018.

1. Chenopodium ambrosioides. 2. Padronização de Extrato . 3.
Metodologia de Superfície de Resposta. 4. Extração Assistida por
Ultrassom. 5. Spray drying. I. Marciano de Paula, Joelma Abadia,
orient. II. de Santana Amaral, Vanessa Cristiane, co-orient. III. Título.

Thaís Moreira Silva Ferreira

“Caracterização, desenvolvimento tecnológico de extratos padronizados e avaliação de toxicidade de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants – Amaranthaceae”

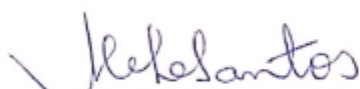
Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, para a obtenção do título de Mestra, aprovada em 28 de setembro de 2018, pela banca examinadora constituída pelos seguintes professores



Prof. Dra. Joelma Abadia M. de Paula

Presidente da Banca

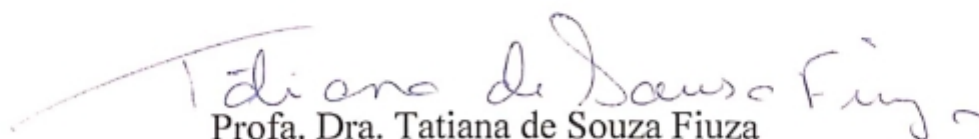
UEG



Prof. Dra. Mirley Luciene dos Santos

Membro Interno

UEG



Prof. Dra. Tatiana de Souza Fiuza

Membro Externo

UEG

***Dedico este trabalho aos amados pai e mãe, por
todo incentivo ao meu crescimento profissional
À florzinha de laranjeira da mamãe, amada Ana
Luísa e ao nosso Gabriel que ainda nem conheço,
mas mamãe já ama incondicionalmente
Ao amado esposo por todo companheirismo e
paciência***

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Autor e consumidor da vida, por possibilitar mais uma jornada de crescimento e sempre colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

À admirável orientadora Prof^a Dr^a Joelma A. M. de Paula por toda dedicação profissional, ternura e disponibilidade. Uma experiência gratificante desenvolver este projeto com você.

À professora Dr^a Vanessa C. S. do Amaral por todo empenho na co-orientação do experimento de toxicidade oral aguda.

Às alunas de iniciação científica Júlia, Leandra, Ludimilla e Maria Patrícia por acreditarem no projeto.

Às companheiras de laboratório Debborah Bezerra, Alessandra Ribeiro, Kamila Souto e Marielly Carvalho

À Universidade Estadual de Goiás (UEG) pelo apoio financeiro através do programa de bolsas *stricto sensu* e pela disponibilidade de toda estrutura de laboratórios para execução de projeto. Aos técnicos de laboratório Fernando, Osvaldo e Valdeir.

À Universidade Estadual de Goiás (UEG) pelo apoio financeiro por meio do edital PrP 029/2016 Pró-projetos/Pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao Horto de Plantas Medicinais do Jardim Botânico de Goiânia, na figura do engenheiro agrônomo Nilton Marciano Júnior pelo fornecimento de mudas e cultivo da espécie vegetal.

Ao LabMic da Universidade Federal de Goiás (UFG) pelas micrografias eletrônicas de varredura.

Ao Biotério Central da Unievangélica pelo fornecimento das ratas.

A todos que gentilmente colaboraram para a coleta de erva-de-santa-maria nas cidades de Anápolis, Goiânia, Itapuranga e Pirenópolis, Goiás.

Aos colegas e professores que entre disciplinas e conversas de corredores contribuíram para a construção do meu conhecimento científico. A todos meu obrigado!

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1	<i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants (AMARANTHACEAE)	23
2.2	PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS	27
2.3	PROCESSOS EXTRATIVOS.....	28
2.4	PROCESSOS DE SECAGEM DE EXTRATOS VEGETAIS	30
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	MATERIAL VEGETAL	34
4.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	35
4.2.1	Estudo Macroscópico da Planta	35
4.2.2	Estudo Microscópico da Folha	36
4.3	PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL	36
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL	37
4.4.1	Identificação Microscópica	37
4.4.2	Determinação de Teor de Voláteis	37
4.4.3	Determinação de Cinzas Totais	37
4.4.4	Determinação de Cinzas Insolúveis em Ácido Clorídrico	38
4.4.5	Determinação da Granulometria do Pó.....	38
4.4.6	Determinação do Índice de Intumescência.....	39
4.4.7	Triagem Fitoquímica.....	39
4.4.8	Perfil do Óleo Essencial	39

4.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RUTINA EM EXTRATOS DAS PARTES AÉREAS DE <i>D. ambrosioides</i> POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).	41
4.6 SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA PARA DETECÇÃO DE RUTINA	41
4.7 VALIDAÇÃO PARCIAL DA METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE	42
4.7.1 Adequabilidade do Sistema	43
4.7.2 Seletividade	43
4.7.3 Linearidade	43
4.7.4 Teor de rutina no extrato etanólico bruto das partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i>	44
4.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA O DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES TOTAIS, EXPRESSOS COMO RUTINA, EM <i>D. ambrosioides</i> .	44
4.9 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS DAS PARTES AÉREAS DE <i>D. ambrosioides</i> .	46
4.9.1 Otimização das condições de EAU para obtenção dos flavonoides totais, expressos como rutina, a partir de <i>D. ambrosioides</i>	47
4.9.2 Obtenção do extrato líquido por percolação	48
4.9.3 Caracterização do Extrato Líquido (Percolado)	49
4.9.3.1 Determinação de Sólidos Totais	49
4.9.3.2 Determinação do pH	49
4.9.3.3 Determinação da densidade relativa	49
4.9.3.4 Doseamento de flavonoides totais, expressos como rutina	50
4.9.3.5 Viscosidade	50
4.10 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DAS PARTES AÉREAS DE <i>D. ambrosioides</i>	50
4.10.1 Análise termogravimétrica (ATG) do padrão rutina	51
4.10.2 Delineamento experimental	51
4.10.3 Otimização da secagem dos extratos por aspersão (<i>Spray Drying</i>)	51
4.10.4 Rendimento e caracterização dos extratos secos obtidos	52
4.10.4.1 Determinação do rendimento de secagem	52
4.10.4.2 Determinação da perda por dessecação	53
4.10.4.3 Determinação da atividade de água	53

4.10.4.4 Doseamento de flavonoides totais, expressos como rutina.....	53
4.10.4.5 Validação das condições de secagem otimizadas	53
4.10.5 Morfologia das partículas de extrato seco analisadas por Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	54
4.11 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>D. ambrosioides</i> EM <i>Artemia salina</i>	54
4.12 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>D. ambrosioides</i> EM ROEDORES	55
4.12.1 Aspectos éticos	55
4.12.2 Animais.....	56
4.12.3 Ensaio de toxicidade oral aguda	56
4.12.4 Preparo da amostra para administração em roedores	56
4.12.5 Análise estatística	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1 DESCRIÇÃO MORFOANATÔMICA.....	58
5.1.1 Estudo Morfológico da Planta.....	58
5.1.2 Descrição Macroscópica das Folhas.....	59
5.1.3 Descrição Microscópica da Folha.....	60
5.1.3.1 <i>Lâmina Foliar</i>	60
5.1.3.2 <i>Pecíolo</i>	66
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL	68
5.2.1 Identificação microscópica	68
5.2.2 Determinação de teor de voláteis.....	68
5.2.3 Determinação de cinzas totais	68
5.2.4 Determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico	69
5.2.5 Granulometria do pó.....	69
5.2.6 Determinação do índice de intumescência.....	70
5.2.7 Triagem fitoquímica	70
5.2.8 Perfil do óleo essencial de partes aéreas de <i>Dysphania ambrosioides</i>	71
5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RUTINA POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA	73

5.3.1	Identificação de Constituintes e Seleção do Marcador Químico.....	77
5.3.2	Validação parcial de metodologia analítica cromatográfica	78
5.3.2.1	<i>Adequabilidade do sistema</i>	78
5.3.2.2	<i>Seletividade</i>	78
5.3.2.3	<i>Linearidade</i>	79
5.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS, EXPRESSOS COMO RUTINA, NAS PARTES AÉREAS DE <i>D. ambrosioides</i>	83
5.4.1	Seletividade.....	83
5.4.2	Linearidade.....	84
5.4.3	Limites de Detecção e Quantificação	86
5.4.4	Efeito Matriz	86
5.4.5	Precisão, Exatidão e Robustez	87
5.5	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS	89
5.5.1	Otimização das condições de EAU de flavonoides totais a partir das partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i>	89
5.5.2	Caracterização extrato líquido concentrado	94
5.6	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DAS PARTES AÉREAS DE <i>D. ambrosioides</i>	95
5.6.1	Análise termogravimétrica (ATG) do padrão rutina	95
5.6.2	Determinação de parâmetros de secagem.....	96
5.6.3	Otimização da secagem dos extratos por aspersão (<i>Spray Drying</i>).....	97
5.6.4	Rendimento e caracterização dos extratos secos obtidos nas condições de secagem otimizadas.....	104
5.6.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	105
5.7	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>D.</i> <i>ambrosioides</i> EM <i>Artemia salina</i>	106
5.8	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>D. ambrosioides</i> EM RATAS <i>Wistar</i>	107
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	112
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
	ANEXO	127

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Tabela 1: Dados das exsiccatas depositadas no herbário da Universidade Estadual de Goiás.....	35
Tabela 2: Parâmetros do método analítico de CLAE para avaliação do marcador escolhido para o extrato das partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i>	43
Tabela 3: Variáveis independentes e seus níveis, avaliados por MSR em um modelo Box-Behnken 3 ³ , para a otimização da EAU de flavonoides totais, expressos como rutina, nas partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i> , 1 ^o planejamento fatorial.....	47
Tabela 4: Variáveis independentes e seus níveis, avaliados por MSR, em um modelo Box-Behnken 3 ³ , para a otimização da EAU de flavonoides totais, expressos como rutina, nas partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i> , 2 ^o planejamento fatorial.....	47
Tabela 5: Parâmetros de secagem no <i>spray dryer</i> utilizados na avaliação preliminar dos adjuvantes maltodextrina e Aerosil®.....	51
Tabela 6: Variáveis independentes e seus níveis avaliados pela metodologia de superfície de resposta para otimização do processo de secagem por aspersão (<i>Spray Drying</i>) do extrato líquido de <i>D. ambrosioides</i>	52
Tabela 7: Composição química do óleo essencial de partes aéreas de <i>Dysphania ambrosioides</i>	72
Tabela 8: Valores médios (\pm DP) dos critérios de adequabilidade do sistema (<i>System suitability</i>) obtidos para o extrato etanólico das partes aéreas de <i>D.ambrosioides</i>	78
Tabela 9: Áreas dos picos do padrão rutina utilizadas na construção da curva padrão.....	81
Tabela 10: Dados da ANOVA obtidos pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários para a linearidade, na quantificação de rutina pelo método cromatográfico.....	82
Tabela 11: Dados de seletividade para quantificação de flavonoides totais, expressos como equivalentes de rutina, nas folhas de <i>D. ambrosioides</i> para o método espectrofotométrico.....	83
Tabela 12: Dados de ANOVA obtidos pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários para a linearidade, na quantificação de flavonoides totais,	

expressos como equivalentes de rutina, pelo método espectrofotométrico.....	85
Tabela 13: Dados de precisão para a quantificação de flavonoides totais, expressos como equivalentes de rutina, pelo método espectrofotométrico.....	88
Tabela 14: Dados da exatidão para a quantificação de flavonoides totais, expressos como equivalentes de rutina, pelo método espectrofotométrico.....	89
Tabela 15: Análise de variância para a primeira bateria de experimentos do modelo de regressão quadrática polinomial para a extração assistida por ultrassom de flavonoides totais, expressos como equivalentes de rutina, nas partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i>	90
Tabela 16: Análise de variância para a segunda bateria de experimentos para o modelo de regressão quadrática polinomial para flavonoides totais, expressos como equivalentes de rutina.....	92
Tabela 17: Caracterização do extrato líquido concentrado obtido de partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i>	95
Tabela 18: Matriz experimental do modelo Box Behnken (3^3), rendimento e ensaios de caracterização dos extratos secos de partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i> obtidos por aspersão.....	98
Tabela 19: Sumário dos efeitos das variáveis independentes e suas significâncias (ANOVA) sobre as respostas analisadas no planejamento Box-Behnken 3^3 para obtenção de extrato seco de <i>D. ambrosioides</i> por aspersão.	99
Tabela 20: Valores preditos para otimização do rendimento e dados de caracterização do extrato seco obtido de partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i> por aspersão.....	104
Tabela 21: Valores observados de rendimento e dados de caracterização do extrato seco obtido de partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i> por aspersão.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Dysphania ambrosioides</i> : A – aspecto geral, B – exsicata, C – inflorescência, D – frutos verdes.....	59
Figura 2: <i>Dysphania ambrosioides</i> – folhas. A – superfície adaxial; B - superfície abaxial.....	60
Figura 3: <i>Dysphania ambrosioides</i> - Secções paradérmicas em coloração Azul de Alcian/safranina.....	61
Figura 4: Fotomicrografia de <i>Dysphania ambrosioides</i>	62
Figura 5: <i>Dysphania ambrosioides</i> - Secção transversal da região internervura em coloração Azul de Alcian/Safranina.....	63
Figura 6: <i>Dysphania ambrosioides</i> - Secção transversal da região de bordo, coloração Azul de Alcian/Safranina.....	64
Figura 7: <i>Dysphania ambrosioides</i> - Secção transversal do internervura de coloração Sudan III.....	65
Figura 8: <i>Dysphania ambrosioides</i> - Secção transversal da nervura central, corada com Azul de alcian e safranina.....	66
Figura 9: <i>Dysphania ambrosioides</i> - Secção transversal do pecíolo, coloração Azul de Alcian/ Safranina e Sudan III.....	67
Figura 10: <i>Dysphania ambrosioides</i> – Microscopia da droga vegetal. Corante Azul de alcian e safranina.....	68
Figura 11: Distribuição granulométrica da droga vegetal de <i>D. ambrosioides</i> ...	70
Figura 12: Perfis cromatográficos via CLAE dos métodos testados.....	75
Figura 13: Cromatograma do extrato bruto obtido a partir da droga vegetal de partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i> método Jesus et al. (2017) adaptado.....	76
Figura 14: Cromatograma do padrão rotina.....	76
Figura 15: Espectro de varredura do padrão rotina.....	77
Figura 16: Perfis cromatográficos via CLAE do diluente (A), da solução padrão rotina (B) e do extrato etanólico bruto de <i>D.ambrosioides</i> (C).....	79
Figura 17: Curva de calibração média do padrão rotina.....	80
Figura 18: Gráficos de dispersão de resíduos para a linearidade do método cromatográfico.....	82

Figura 19: Curva de calibração média do padrão rotina no intervalo de concentração de 1,25 a 40µg/ml para o comprimento de onda de 364nm.....	84
Figura 20: Gráficos de dispersão de resíduos para a linearidade do método espectrofotométrico.....	85
Figura 21: Diagrama de dispersão das absorvâncias (364nm) em função das concentrações de flavonoides, construído a partir do padrão rotina e da amostra fortificada com o padrão rotina, nos mesmos níveis de concentração da linearidade (1,25 – 40 µg/mL).....	87
Figura 22: Gráficos de superfície de resposta (A – C) do primeiro experimento de extração assistida por ultrassom (EAU) de flavonoides, expressos como equivalentes de rutina, das partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i>	91
Figura 23: Gráficos de superfície de resposta (A – C) do segundo experimento de extração assistida por ultrassom (EAU) de flavonoides, expressos como equivalentes de rutina, das partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i>	93
Figura 24: Aspecto dos extratos secos de partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i> , obtidos com diferentes adjuvantes de secagem.....	97
Figura 25: Gráficos de superfície de resposta para rendimento (A – C) em função das variáveis independentes na obtenção de extrato seco das partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i> por aspersão.....	100
Figura 26: Gráficos de superfície de resposta para teor de voláteis (A – C) em função das variáveis independente na obtenção de extrato seco das partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i> por aspersão.....	101
Figura 27: Gráficos de superfície de resposta para flavonoides totais (A – C), expressos como equivalentes de rutina, em função das variáveis independentes na obtenção de extrato seco das partes aéreas de <i>D. ambrosioides</i> por aspersão.....	103
Figura 28: Fotomicroscopia eletrônica de varredura de extrato seco de <i>D. ambrosioides</i>	106
Figura 29: Gráfico de massa corporal relativa durante o experimento de toxicidade oral aguda do extrato seco de <i>D. ambrosioides</i> em ratas <i>Wistar</i>	108
Figura 30: Gráfico consumo de ração relativo a 3 dias durante o experimento de toxicidade oral aguda do extrato seco de <i>D. ambrosioides</i> em ratas <i>Wistar</i>	109

Figura 31: Gráfico do consumo de água relativo a 3 dias durante o experimento de toxicidade oral aguda do extrato seco de <i>D. ambrosioides</i> em ratas <i>Wistar</i>	109
Figura 32: Gráfico da massa dos rins (A) e fígado (B) relativa durante o experimento de toxicidade oral aguda do extrato seco de <i>D. ambrosioides</i> em ratas <i>Wistar</i>	110

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE – Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
DL₅₀ – Dose Letal 50%
DPR – Desvio Padrão Relativo
EAU – Extração Assistida por Ultrassom
IN – Instrução Normativa
INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MSR – Metodologia de Superfície de Resposta
OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
ONU – Organização das Nações Unidas
RI – Índice de retenção
RDC – Resolução de Diretoria Colegiada
RE – Resolução
RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
TR – Tempo de Retenção
UEG – Universidade Estadual de Goiás
UV - Ultravioleta
WHO – *World Health Organization*
WIPO - *World Intellectual Property Organization*

Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants (sin: *Chenopodium ambrosioides* L.), Amaranthaceae, é empregada na medicina popular brasileira e é conhecida como erva-de-santa-maria e mastruz. Possui propriedades antiparasitárias, antibacterianas, anti-inflamatórias, antifúngicas e antitumorais. O presente trabalho visa a caracterização e o desenvolvimento tecnológico do extrato seco das partes aéreas de *D. ambrosioides*, padronizado em flavonoides expressos como rutina, bem como a avaliação da sua toxicidade. Os espécimes foram coletados nas regiões de Anápolis, Goiânia, Itapuranga e Pirenópolis, estado de Goiás, e as exsiccatas foram depositadas no herbário da Universidade Estadual de Goiás com registros HUEG11387-11392, 11873. O material vegetal foi dessecado e caracterizado por métodos farmacopeicos. Parte do material foi macerado, percolado em etanol 70% (p/p), numa proporção droga/solvente de 10% (p/p). O extrato obtido foi concentrado, caracterizado e acrescido de dióxido de silício coloidal para secagem por aspersão (*spray-drying*). A droga vegetal também foi submetida à extração assistida por ultrassom (EAU), para a qual foram desenvolvidos e validados métodos analíticos de identificação e doseamento de rutina por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), e de flavonoides totais expressos como rutina, por método espectrofotométrico. Os processos de EAU e de obtenção do extrato seco padronizado em flavonoides, expressos como rutina, foram otimizados utilizando o modelo de planejamento fatorial Box Behnken (3³) e a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). O extrato seco padronizado e caracterizado foi submetido a ensaios toxicológicos *in vitro* em *Artemia salina* nas concentrações de 62,5 a 1000 µg/mL e também *in vivo*, de toxicidade oral aguda em ratas *Wistar*, aprovado pela comissão de ética no uso de animais, nas dosagens de 300 e 2000 mg/kg. Os ensaios farmacopeicos demonstraram parâmetros relevantes na identificação vegetal da espécie e controle de qualidade da matéria-prima vegetal. Para o extrato bruto de partes aéreas de *D. ambrosioides*, o método analítico em cromatografia a líquido de alta eficiência para identificação e doseamento do marcador rutina foi validado parcialmente para os parâmetros seletividade e linearidade. Já o método analítico espectrofotométrico atendeu aos critérios de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, sendo rápido, barato e de fácil execução no doseamento de flavonoides expressos como rutina. Na EAU as melhores condições para as variáveis analisadas foram: tempo de extração de 60 minutos, temperatura de 57°C e teor etanólico de 57% (p/p). Para a obtenção do extrato seco padronizado as melhores condições, neste estudo, foram: concentração do adjuvante de secagem de 50% (p/p), temperatura de entrada de 148°C, fluxo de alimentação 0,5 L/h. Para os ensaios toxicológicos, o extrato seco padronizado foi considerado atóxico no ensaio de *Artemia salina* e classificado como de baixa toxicidade no protocolo de toxicidade oral aguda em roedores, com DL₅₀ entre 2000 a 5000 mg/Kg. Os resultados obtidos contribuem para o desenvolvimento de

matérias-primas de alta qualidade e baixa toxicidade a partir das partes aéreas de *D. ambrosioides*. No entanto, devem ser conduzidos ainda estudos de toxicidade crônica, subcrônica e materno-fetal.

Palavras-chaves: *Chenopodium ambrosioides*, flavonoides, extrato padronizado, metodologia de superfície de resposta, extração assistida por ultrassom, *spray drying*.

ABSTRACT

Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants (syn: *Chenopodium ambrosioides* L.), Amaranthaceae, is used in Brazilian folk medicine and is known as “erva-de-santa-maria” and “mastruz”. It has antiparasitic, antibacterial, anti-inflammatory, antifungal and antitumor properties. The present work aims at the characterization and technological development of the dry extract of *D. ambrosioides* aerial parts, standardized in flavonoids expressed as rutin, as well as the evaluation of its toxicity. The specimens were collected in the regions of Anápolis, Goiânia, Itapuranga and Pirenópolis, State of Goiás, identified and the vouchers were deposited at State University of Goiás herbarium, with number registers HUEG11387-11392, 11873. The plant material was dried and characterized by pharmacopoeia methods. Part of the material was macerated, percolated in 70% (w/w) ethanol, in a drug/solvent ratio of 10% (w/w). The extract obtained was concentrated, characterized and added with colloidal silicon dioxide for spray-drying. The plant material was also submitted to ultrasound-assisted extraction (UAE), for which analytical methods for identification and quantification of rutin by high performance liquid chromatography (HPLC) and of total flavonoids, expressed as rutin, by spectrophotometric method were developed and validated. The processes of UAE and of dry extract standardization in flavonoids, as rutin equivalents, were optimized using a Box Behnken (3³) design and the Response Surface Methodology (RSM). The standardized and characterized dry extract was subjected to *in vitro* and *in vivo* pre-clinical toxicological tests performed, respectively, in *Artemia salina* at concentrations of 62.5 to 1000 µg/mL, and in *Wistar* rats, approved by ethics commission, at dosages of 300 and 2000 mg/kg. The pharmacopoeia tests demonstrated relevant parameters in the vegetal identification of the species and quality control of the vegetal raw material. For the crude extract of aerial parts of *D. ambrosioides*, the high performance liquid chromatography analytical method for identification and assay of rutin was partially validated for the selectivity and linearity parameters. The spectrophotometric analytical method met the criteria of selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness, being a fast, inexpensive and easy method to perform the dosage of flavonoids expressed as rutin. In the UAE the best conditions for the analyzed variables were: extraction time of 60 minutes, temperature of 57°C and ethanol content of 57% (w/w). In order to obtain the standardized dry extract, the best conditions achieved in this study were: 50% (w/w) adjuvant concentration, inlet temperature of 148°C, feed flow of 0.5 L/h. For toxicological tests, the standardized dry extract was considered nontoxic in the test of *Artemia salina* and classified as low toxicity in the acute oral toxicity protocol in rodents, with LD₅₀ between 2000 and 5000 mg/kg. The results obtained contribute to the development of high quality and low toxicity raw materials from *D. ambrosioides* aerial parts. However, chronic, sub chronic and maternal-fetal toxicity studies should be conducted.

Keywords: *Chenopodium ambrosioides*, flavonoids, standardized extract, response surface methodology, ultrasound-assisted extraction, spray drying.

1 INTRODUÇÃO

Gastos mundiais com medicamentos podem atingir 1,5 trilhão de dólares até 2021 (IMS, 2016). Novas estratégias para promoção de saúde e redução de desigualdades são necessárias. A Organização das Nações Unidas (ONU) delimitou como uma das metas dos “Objetivos de Desenvolvimento Sustentável” até 2030: assegurar o acesso a medicamentos seguros, eficazes e com preços acessíveis (ONU, 2015). Neste contexto, os medicamentos fitoterápicos representam uma oportunidade para o alcance desta sustentabilidade.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como medicina tradicional o conjunto de práticas medicinais presentes nas culturas mundiais, que abrange a medicina tradicional chinesa, Ayurveda, indígena, o uso de ervas medicinais entre outros. Segundo a entidade o alcance destas práticas pode atingir 80% da população de países em desenvolvimento. Desde 2002 a OMS tem se posicionado a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário e na atenção básica à saúde e mais recentemente tem lançado novas metas de incentivo à medicina tradicional até o ano 2023 (WHO, 2002; WHO, 2014).

Em 2009, no Brasil, o Ministério da Saúde, a partir do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) a qual apresenta 71 plantas medicinais com potencial para gerar produtos. O objetivo desta lista foi direcionar estudos e pesquisas que subsidiem a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população (BRASIL, 2009).

A legislação sanitária brasileira define fitoterápico como o produto obtido exclusivamente de matéria-prima ativa vegetal, com finalidade profilática, terapêutica ou paliativa e não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais. Dentre os fitoterápicos incluem-se: o medicamento fitoterápico (MF) e o produto tradicional fitoterápico (PTF), podendo ser simples, quando o ativo é

proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal. O insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) é a matéria-prima ativa vegetal, ou seja, droga ou derivado vegetal, utilizado no processo de fabricação de um fitoterápico (BRASIL, 2014b).

Para o registro, manipulação/produção e comercialização de MF, PTF e IFAV, o Brasil tem hoje normas sanitárias e uma legislação rígida que solicita comprovações científicas de segurança e eficácia. Dentre as exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) prevista na RDC 26/2014, está a realização de testes para a comprovação da qualidade do derivado vegetal, como a sua caracterização físico-química e botânica, em toda a cadeia produtiva.

Para garantir a segurança são conduzidos testes pré-clínicos (não clínicos) e clínicos dos fitoterápicos. Os estudos pré-clínicos incluem ensaios de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética. Os ensaios clínicos preveem quatro estágios: estudos de farmacologia humana (fase I), estudos terapêuticos ou profiláticos de exploração (fase II), estudos terapêuticos ou profiláticos confirmatórios (fase III) e os ensaios pós-comercialização (fase IV) (BRASIL, 2008; BRASIL 2013).

A espécie vegetal *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (erva-de-santa-maria) da família Amaranthaceae está presente na RENISUS, tem grande aceitação na medicina tradicional e popular em diversos países e em alguns destes chega a ser consumida como condimento. A planta tem sido usada no tratamento de verminoses, inflamações, doenças respiratórias e gastrointestinais (JARDIM et al., 2010; BARROS et al., 2013; TRIVELLATO-GRASSI et al., 2013; JESUS et al., 2018). Embora a espécie possua diversas atividades farmacológicas, um de seus princípios ativos presente no óleo essencial em concentrações elevadas, o ascaridol, é também responsável por sua toxicidade (GADANO et al., 2002).

No intuito de produzir fitoterápicos, o controle de qualidade deve ocorrer desde a matéria prima vegetal até o desenvolvimento de um produto intermediário de qualidade. Para os produtos intermediários os extratos secos são preferidos a extratos líquidos, por serem mais estáveis quimicamente, microbiologicamente, além da possibilidade de serem incorporados a diversas formas farmacêuticas sólidas e semi-sólidas. Para a obtenção de extratos secos, dentre as diversas técnicas, a secagem por aspersão ou *spray drying* é uma das mais utilizadas por ser uma técnica versátil, rápida e ainda permitir a padronização da concentração dos princípios ativos (CARVALHO et al., 2008; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Diante do potencial medicinal da planta *D. ambrosioides* e da ausência de produtos fitoterápicos de alta qualidade desta espécie vegetal, certificada por pesquisas a bancos de dados de patentes, como o Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), *World Intellectual Property Organization* (WIPO) e na base de pesquisa Google Patentes, este trabalho se propõe a caracterizar e desenvolver extratos vegetais padronizados de *D. ambrosioides*, e avaliar sua toxicidade em ensaios pré-clínicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (AMARANTHACEAE)

Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants (Sin. *Chenopodium ambrosioides* L.) é tradicionalmente empregada na medicina popular brasileira e faz parte da RENISUS, lista de plantas medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro. Primariamente classificada como da família Chenopodiaceae foi incorporada, por estudos filogenéticos, à família Amaranthaceae, cuja abrangência é de 2.360 espécies e cerca 170 gêneros (JUDD et al., 2002). No Brasil existem 20 gêneros nativos e aproximadamente 150 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008; FANK-DE-CARVALHO; BÁO; MARCHIORETTO, 2012).

O gênero *Chenopodium* apresenta-se como um táxon de grande número de espécies e de morfologia variável, o que justificou ampla revisão taxonômica no começo do século XXI. Os estudos confirmaram, inclusive com dados moleculares, que o gênero *Dysphania* era capaz de compreender todos os táxons glandulares de *Chenopodium*. Desse modo, passou a circunscrever os táxons com tricomas glandulares, como *Chenopodium*, em *Dysphania* de acordo com o proposto por Mosyakin e Clemants (2002), culminando na nova combinação *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, o que tem sido amplamente aceito no meio científico (MOSYAKIN; CLEMANTS, 2002; FUENTES-BAZAN; UOTILA; BORSCH, 2012; SUKHORUKOV; ZHANG, 2013; SENNA, 2015; CABI, 2018). Como a maior parte da literatura ainda se refere à denominação *Chenopodium ambrosioides* algumas informações da planta foram comparadas às do gênero *Chenopodium*, mas ao longo do trabalho a espécie é referida pelo nome científico atualizado.

Espécie nativa da América Tropical, com provável origem no México. Apresenta ampla distribuição em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (KOKANOVA-NEDIALKOVA; NEDIALKOV; NIKOLOV, 2009). *D. ambrosioides* é uma planta herbácea, anual ou perene, muito ramificada, possui um ciclo de vida anual de fácil cultivo. Sua propagação acontece por meio de sementes, tem uma produção muito intensa, o odor é desagradável e sua altura pode variar de 0,4 m a 1,5 m (LORENZI, 1982).

Nas diversas regiões em que é encontrada recebe uma variedade de nomes como ambrisina, cambrósia, ambrósia-do-méxico, apazote, cacica, canudo, chá-do-méxico, chá-dos-jesuítas, cravinho-do-mato, erva-das-cobras, erva-de-santa-maria, erva-do-formigueiro, erva-embrósia, erva-formigueira, erva pomba-rota, erva-santa, lombrigueira, mata-cobra, mentrasto, pacote, quenopódio, mastruço, mentrei, mastruz, mentruço e menstruz (COSTA, 1987; LORENZI; MATOS, 2002).

Diversos metabólitos secundários são relatados em suas partes aéreas como compostos fenólicos, antraquinonas, alcaloides, esteroides, flavonoides, flavononas, saponinas, taninos, triterpenos e terpenos (MARINS et al., 2011; OKHALE et al., 2012; BEGUM et al., 2015). Esses metabólitos são responsáveis por várias propriedades terapêuticas, tais como as atividades anti-parasitária, anti-fúngica, anti-tumoral, anti-inflamatória e antimicrobiana da planta (JARDIM et al., 2010; BARROS et al., 2013; TRIVELLATO-GRASSI et al., 2013; JESUS et al., 2018).

Primariamente foram conduzidos estudos sobre a composição do óleo essencial de *D. ambrosioides* no começo do século XX. Devido sua utilização como anti-helmintíco, o uso do óleo essencial foi difundido no mundo inteiro, desde então houve o interesse científico em comprovar tal propriedade e determinar o componente responsável pela atividade (LEVY, 1914). Smillie e Pessoa (1924) verificaram no óleo o ascaridol, com variação de 45 a 70%, e uma mistura de hidrocarbonetos líquidos, que constituía de 25 a 35% do óleo. Na fração de hidrocarbonetos líquidos identificaram cimeno, felandreno, limoneno e outros componentes.

No estudo de Jardim et al. (2008) identificaram-se seis componentes do óleo essencial nas folhas de *D. ambrosioides* brasileira: (*Z*)-ascaridol (54,0%), (*E*)-ascaridol (17,3%), α -terpineno (11,2%), *p*-cimeno (6,0%), carvacrol (2,3%) e álcool benzílico (0,4%), representando 91,2% do extrato. Em outra pesquisa no óleo essencial das partes aéreas de *D. ambrosioides* foram identificados 27

componentes. As principais substâncias foram: (Z)-ascaridol (27,27%), ρ -cimeno (19,05%), isoascaridol (14,75%), α -pineno (6,33%) e α -terpineno (5,12%) (BAI; LIU; LIU, 2011).

O ascaridol é o monoterpene bicíclico mais abundante do antigo gênero *Chenopodium* (DEMBITSKY; HKROB; HANUS, 2008). Diversos estudos sugerem que o ascaridol encontrado em extratos etanólicos de *D. ambrosioides* pode ser o principal responsável por seus efeitos antinociceptivos, sedativos e anti-inflamatórios (OLAJIDE; AWE; MAKINDE, 1997; IBIRONKE; AJIBOYE, 2007; TRIVELLATO-GRASSI et al., 2013).

Apesar do amplo uso popular, *D. ambrosioides* foi retirada da Farmacopeia Brasileira 1ª edição devido a sua toxicidade, podendo ocasionar convulsões, irritação de mucosas, vômitos, vertigens, dores de cabeça, problemas renais e hepáticos e surdez temporária (PACIORNIK, 1990). Essa toxicidade é dependente da dose e está relacionada com o ascaridol (SOUSA et al., 1991).

Estudos recentes com extratos líquidos de *D. ambrosioides* proporcionaram a identificação de compostos fenólicos, sendo que destes, os flavonoides são os mais abundantes (BARROS et al., 2013; JESUS et al., 2018). Os flavonoides têm propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais e antimicrobianas (LAY et al., 2014; PARHIZ et al., 2015; RAJENDRAN et al., 2016; YAKOUB et al., 2018). Barros et al. (2013) verificaram no extrato metanólico de partes aéreas de *D. ambrosioides* a rutina, quercetina e derivados de canferol em maior quantidade. Jesus et al. (2018) identificaram a presença dos flavonoides rutina, quercetina e crisina no extrato etanólico de folhas da espécie e nas frações clorofórmica, acetato de etila e n-butanol.

Song et al. (2015) identificaram cinco novos elementos bioativos do extrato etanólico de partes aéreas da planta, as chenopodiumaminas (A-D) e o chenopodiumosídeo A.

Devido à toxicidade de compostos presentes no óleo essencial seu uso terapêutico é desencorajado. Contudo, com o aumento de zoonoses, o óleo essencial de *D. ambrosioides* tem ganhado um novo enfoque pela ação repelente e inseticida (PAVELA et al., 2017). Há também resultados promissores para o tratamento com óleo essencial de partes aéreas de *D. ambrosioides* para leishmaniose cutânea (MONZOTE et al., 2014a), com comprovação de atividade

para formas amastigotas e promastigotas. Além de demonstrar efeito para o *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma brucei* (MONZOTE et al., 2014b).

Por outro lado, propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias foram registradas, tanto para o extrato etanólico quanto para o extrato aquoso de partes aéreas de *D. ambrosioides*. Barros et al. (2013) e Song et al. (2015) verificaram propriedades antioxidantes para o extrato aquoso obtido da infusão de partes aéreas de *D. ambrosioides*. Para o extrato metanólico observaram-se propriedades antitumorais frente às linhagens celulares de carcinoma de cólon, cervical e hepatocelular.

Ainda há estudos que demonstram atividades antibacterianas para *Helicobacter pylori*, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (LIU et al., 2013; YE et al., 2015). Jesus et al. (2018) conseguiram relacionar a presença de rutina, quercetina e crisina, nos extratos de folhas da espécie, à atividade antimicrobiana, com resultados promissores para a fração clorofórmica no combate ao *Mycobacterium tuberculosis*.

O estudo de Calado et al. (2015) constatou que o extrato etanólico de folhas de *D. ambrosioides* é capaz de reduzir a dor e a inflamação sinovial num modelo experimental com cobaias animais. Alguns estudos demonstraram atividades hipotensivas e no combate à diabetes (EDDOUKS et al., 2002; TAHRAOUI et al., 2007; ASSAIDI et al., 2014).

Além disso, a pesquisa de Jardim et al. (2010) avaliou a atividade antifúngica do extrato hexânico obtido de folhas de *D. ambrosioides*. A fração hexânica purificada em concentração de 0,1% inibiu o crescimento dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum musae*. Estes organismos são responsáveis por prejuízos econômicos em cultivos de frutas, vegetais e grãos, além de poderem representar riscos à saúde pela contaminação de micotoxinas. Já o trabalho de Shah (2014) verificou atividade antifúngica promissora para a fração acetato de etila obtida de extrato de raízes de *D. ambrosioides*, que apresentou concentrações inibitórias de 40 e 35% para os fungos *A. niger* e *Rhizopus tolenapur*, respectivamente.

Embora haja tantos indicadores da variedade de aplicações farmacológicas, o avanço de produtos a base da erva-de-santa-maria tem sido inibido pela toxicidade da planta. Entretanto, estudos com extratos aquosos e hidroalcoólicos não demonstram toxicidade em protocolos de toxicidade oral aguda em ratos, apenas em

ensaios de toxicidade subcrônica em roedores verificam-se sinais de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (SILVA et al., 2014; VALÉRIO et al., 2015). De maneira que para o desenvolvimento de extratos de alta qualidade, faz-se necessário também estudos de toxicidade.

2.2 PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS

Medicamentos fitoterápicos, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento, têm ganhado cada vez mais espaço no atendimento médico primário devido às margens de segurança, amplas atividades biológicas e baixo custo. Contudo a matéria-prima vegetal está sujeita a inúmeros fatores como contaminação, deterioração, variação dos componentes (PALAV; D'MELLO, 2006).

A quantidade e a variedade dos componentes da droga vegetal podem ser afetadas pela luminosidade, umidade, temperatura, idade e desenvolvimento da planta, sazonalidade, altitude, nutrientes, estímulos mecânicos, e ataques de patógenos e herbívoros que a planta possa ter recebido (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; METLEN; ASCHEHOUG; CALLAWAY, 2009; PAVARINI et al., 2012). Logo, o controle de qualidade da droga vegetal é de fundamental importância para a obtenção de produtos de qualidade.

Uma forma de assegurar a qualidade de um produto fitoterápico é a padronização, uma ferramenta que deve estar presente desde o cultivo até o produto acabado. No cultivo, para garantir homogeneidade do material vegetal, e nas demais etapas da produção do fitoterápico, a padronização remete a um conjunto de características intrínsecas, avaliações qualitativas e quantitativas que determinam a garantia de qualidade, eficácia, segurança e reprodutibilidade, em concordância com as normas técnicas (PALAV; D'MELLO, 2006).

De acordo com a Instrução Normativa – IN nº4, de 18 de junho de 2014, o Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico, os métodos utilizados no controle de qualidade devem estar presentes em farmacopeias reconhecidas ou serem validados. No período da publicação da IN nº 4, a validação de métodos analíticos era regida pela Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003, que foi atualizada pela Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº166 de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2014b; BRASIL, 2017a).

A validação de um método analítico permite demonstrar a confiabilidade do método em qualificar e quantificar uma substância química de referência (SQR) na amostra analisada. A SQR trata-se de uma substância ou conjunto de substâncias químicas ou biológicas com elevado grau de pureza, com padrões que permitam determinar sua identidade, qualidade, teor e potência. Neste grupo encontram-se a substância química de referência caracterizada e a substância química de referência farmacopeica (BRASIL, 2017a).

De acordo com a RDC 26/2014, a identidade vegetal é garantida no controle de qualidade durante a produção do fitoterápico através da determinação do perfil cromatográfico da amostra e da quantificação de marcadores. Estes podem ser do tipo ativo, quando relacionado com a atividade terapêutica do fitocomplexo, ou analítico, quando não existe relação estabelecida com a atividade terapêutica do fitocomplexo. O marcador escolhido deve ser ativo preferencialmente, e sua identificação garantida através da substância de referência correspondente (BRASIL, 2014a).

Estudos indicam que a maioria dos compostos fenólicos presentes nos extratos líquidos de *D. ambrosioides* são flavonoides, dentre eles destacam-se rutina, quercetina e crisina (BARROS et al., 2013, WU et al., 2016, JESUS et al., 2018). A legislação brasileira para fitoterápicos determina a escolha de um marcador preferencialmente relacionado às suas atividades terapêuticas e várias propriedades dos flavonoides estão associadas às do gênero *Chenopodium* (BARROS et al., 2013, BRASIL, 2014, JESUS et al., 2018).

No contexto de fitoterápicos que podem apresentar uma considerável variação de seus componentes, um método analítico validado se torna um elemento chave na padronização de medicamentos.

2.3 PROCESSOS EXTRATIVOS

Diversos estudos demonstram a interferência de processos extrativos no teor de metabólitos secundários em extratos vegetais. Dentre as técnicas tradicionais para produção de extratos vegetais encontram-se a maceração, percolação e extração por Soxhlet. Normalmente, estes processos necessitam de um grande volume de líquido extrator ou de aquecimento, ebulição ou refluxo, que levam a degradação dos compostos fenólicos através de reações de hidrólise, ionização e

oxidação (LI; CHEN; YAO, 2005; NAYAK et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; ZHAO et al., 2017).

A percolação é uma operação dinâmica, na qual a droga moída e intumescida é introduzida em um percolador, deixada em contato com o líquido extrator até esgotamento da droga vegetal. Geralmente empregada na extração de substâncias farmacologicamente muito ativas, presentes em pequenas quantidades ou pouco solúveis (SIMÕES et al., 2017).

Nas etapas de controle de qualidade, técnicas como a percolação são desvantajosas por serem demoradas e necessitarem de grande quantidade de líquido extrator. Métodos extrativos modernos como extração assistida por ultrassom (EAU) tornam-se atraentes por propiciarem uma extração rápida e são versáteis quanto à escala de produção, logo possibilita a redução de custo. Nos últimos anos, o método de extração assistida por ultrassom tem sido utilizado para extrair efetivamente os constituintes químicos de materiais vegetais (DONG et al., 2010; WANG et al., 2012; SIMÕES et al., 2017).

O ultrassom aumenta a eficiência de extração de compostos orgânicos possivelmente através da cavitação, que ocorre no solvente pela passagem de ondas ultrassônicas (ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2007). Isso facilita uma melhor penetração do solvente na amostra, aumentando a liberação de compostos da matriz para o solvente (MORELLI; PRADO 2012). A otimização das condições experimentais é um passo crítico no desenvolvimento de um processo de extração assistido por ultrassom com sucesso, uma vez que variáveis de processo, como, o poder do ultrassom, a temperatura e o tempo de sonicação afetam a eficiência de extração (JANG et al., 2017; MARAN et al., 2017).

Espada-Bellido et al. (2017) obtiveram êxito na otimização da extração de antocianinas e compostos fenólicos de *Morus nigra* L. (Moraceae) por EAU utilizando as variáveis metanol (50 a 100%), temperatura (10 a 70°C), amplitude (30 a 70%), ciclo (0,2-0,7s), pH do solvente (3-7), partição sólido:líquido (1,5:10, 1,5:20). Maran et al. (2017) avaliaram as condições ótimas de extração de antocianinas totais, compostos fenólicos e flavonoides para *Nephelium lappaceum* L. (Sapindaceae) na temperatura de 50°C, poder do ultrassom 20W, tempo de extração de 20 minutos, pH do solvente de 3-7, partição sólido: líquido de 1:18,6.

Diante das vantagens de trabalho e dos resultados positivos na extração de compostos fenólicos, a EAU foi escolhida para efeitos de controle de qualidade da

matéria vegetal e produção de extrato em escala analítica. Já para obtenção do extrato em maior quantidade, a percolação se mostra mais adequada e sua utilização pode ser direcionada pelos estudos de otimização de extração assistida por ultrassom.

Na literatura não há registros de estudos de otimização de extração para *D. ambrosioides*, no entanto os estudos de Barros et al. (2013) e Jesus et al. (2018) apontam a presença do flavonoide rutina em maior quantidade em extratos etanólicos de *D. ambrosioides* e Wu et al. (2016) desenvolveram um modelo de otimização de EAU para flavonoides presentes no caule de *Chenopodium hybridum* L. expressos em equivalentes de rutina, reforçando a relevância da classe para o gênero.

2.4 PROCESSOS DE SECAGEM DE EXTRATOS VEGETAIS

De acordo com Carvalho et al. (2008), no Brasil existem mais de 500 registros de medicamentos fitoterápicos e em torno de 70% destes são comercializados na forma farmacêutica sólida. A matéria-prima vegetal quase sempre é constituída por extratos secos, pois estes apresentam como vantagem maior estabilidade química, microbiológica e físico-química. Além de facilitar a padronização, permitem um aumento na concentração de ativos e apresentam capacidade de diferenciação em outras formas farmacêuticas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Um dos processos utilizados para a secagem de extratos é a secagem por aspersão (*spray drying*). É uma das técnicas mais versáteis na transformação de produtos em pó, possibilita a secagem de compostos num fluxo de milímetros por hora a dezenas de tonelada por hora. Inicialmente empregada na secagem de ovos, em meados do século XVIII, seu uso só foi difundido por volta de 1920 na indústria de secagem de leite e sabão. Atualmente está presente nos mais diversos segmentos industriais, como na indústria química, farmacêutica e alimentícia (MASTERS, 1985; CAL; SOLLOHUB, 2010).

A técnica consiste em três etapas: primeiro há dispersão do fluido (extrato líquido) resultando numa grande área superficial. Seguido de uma transferência de calor gerada por uma corrente de ar aquecida. Por último, o solvente é evaporado com respectiva formação de partículas sólidas (RANKELL; SCHIFFMAN, 2001).

A secagem em *spray dryer* permite uma escolha de ciclo adequada de acordo com o produto final a ser desenvolvido, com o controle do tamanho de partículas e uniformidade. O processo pode ocorrer continuamente sem necessidade de interrupção caso seja necessária a alteração do ciclo, além de ser rápido e com rendimento satisfatório. Outro ponto positivo é a baixa agressividade ao produto manipulado, embora o extrato seja exposto ao calor, o tempo de contato na câmara de secagem é rápido. Por último, o equipamento *spray dryer* exige um considerável investimento inicial, que é compensado pelo baixo custo de manutenção e de produção (WALTON, 2002; MEZHERICHER; LEVY; BORDE, 2010; GONG et al., 2014).

Ao empregar esta técnica pode-se otimizar os resultados, pois o *spray dryer* permite o ajuste de alguns parâmetros de processo, tais como, temperatura do ar de secagem (°C), vazão de alimentação do extrato no bico aspersor (mL/min) e proporção do adjuvante de secagem sobre o rendimento (% m/m), a umidade (%), a atividade de água e os teores (% m/m) de matéria-prima vegetal ativa nos extratos secos (WALTON, 2002).

A secagem por aspersão (*spray drying*) tem sido empregada com bastante êxito em extratos vegetais. O uso de aditivos na secagem de extratos provenientes de plantas é responsável pela estabilidade e qualidade do mesmo afetando até sua biodisponibilidade e escoabilidade. Além de aumentar o rendimento, pois extratos vegetais possuem moléculas com alto peso molecular como açúcares e ácidos orgânicos, que ficam aderidos na câmara de secagem e os adjuvantes diminuem esta adesão. Entre os aditivos mais empregados estão o dióxido de silício coloidal, maltodextrina, gelatina, goma arábica, derivados da celulose, proteínas entre outros (CAL; SOLLOHUB, 2010; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Para que as melhores propriedades físico-químicas sejam alcançadas no extrato seco são necessários alguns cuidados na secagem em *spray dryer*. Na produção do extrato seco o fluido é levado a altas temperaturas, embora o contato seja rápido é preciso avaliar o impacto deste parâmetro na qualidade do extrato seco (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

O ascaridol presente em *D. ambrosioides* é sensível ao calor, por isso quando o extrato líquido da planta for submetido à secagem por aspersão é possível que todo o composto ou parte dele seja degradado. De modo que o marcador eleito para padronização do extrato deve ser menos susceptível às condições de secagem do

spray dryer. Os estudos de Barros et al. (2013) e Jesus et al. (2018) contribuem na quantificação de flavonoides por CLAE e determinam em maior quantidade a rutina nos extratos metanólico e bruto, respectivamente. Logo, possibilitaram a escolha do flavonoide rutina como padrão analítico do presente estudo.

3.1 OBJETIVO GERAL:

Caracterização e desenvolvimento tecnológico de extratos padronizados em flavonoides, expressos como rutina, das partes aéreas de *Dysphania ambrosioides* e avaliação da toxicidade aguda.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obtenção, identificação botânica e caracterização da matéria prima vegetal;
- Determinação do perfil químico do óleo essencial das partes aéreas de *D. ambrosioides*;
- Desenvolvimento e validação parcial de método cromatográfico por CLAE para identificação e doseamento de rutina;
- Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para identificação e doseamento de flavonoides totais, expressos como rutina;
- Desenvolvimento e otimização do método de extração assistido por ultrassom de flavonoides totais, expressos como rutina;
- Obtenção, padronização e caracterização físico-química do extrato líquido concentrado das partes aéreas de *D. ambrosioides*;
- Otimização do processo de secagem em *spray dryer*, para obtenção do extrato seco das partes aéreas de *D. ambrosioides*;
- Padronização e caracterização físico-química do extrato seco;
- Avaliação da toxicidade do extrato seco padronizado frente ao microcrustáceo *Artemia salina*;
- Avaliação da toxicidade oral aguda do extrato seco padronizado em roedores.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A maioria dos experimentos foi realizada nas dependências do Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Goiás, nos seguintes laboratórios: Laboratório de Estudos Botânicos, Químicos e Biológicos de Plantas Medicinais (LabPM), vinculado ao Laboratório Multiusuário de Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde; Laboratório de Análise Instrumental, Laboratório de Ecologia, Laboratório de Pesquisa em Química e Laboratório de Secagem e Armazenamento de Produtos Vegetais.

4.1 MATERIAL VEGETAL

Para a obtenção de quantidade suficiente de material vegetal para o presente estudo, espécimes de *Dysphania ambrosioides* foram cultivados no Horto de Plantas Medicinais do Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET), na Universidade Estadual de Goiás supervisionado pela Profa. Dra. Joelma Abadia M. de Paula e no Horto de Plantas Medicinais do Jardim Botânico de Goiânia, cidade de Goiânia, Goiás, sob supervisão do Engenheiro Agrônomo Nilton Marciano Junior. Os espécimes ainda foram coletados em quintais residenciais nas regiões de Anápolis, Goiânia, Itapuranga e Pirenópolis, no estado de Goiás.

O *pool* coletado contemplava as partes aéreas da espécie vegetal com presença de caule, folhas, inflorescências e sementes. A Profa. Dra. Mirley Luciene dos Santos foi responsável pela identificação da espécie e as exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Goiás, conforme Tabela 1. As coletas foram realizadas entre os meses de dezembro do ano de 2016 e março do ano de 2017.

Tabela 1: Dados das exsicatas depositadas no herbário da Universidade Estadual de Goiás

Cidade	Local da Coleta	Coordenadas	Exsicata
Anápolis	Bairro Jundiá	16°19'52.2"S 48°56'29.7"O	11389
	Bairro São João	16°22'52.9"S 48°57'17.4"O	11391
	Bairro São Joaquim	16°20'44.4"S 48°58'25.0"O	11392
	UEG	16°17'13,8"S 48°57'22,7"O	11387
Goiânia	Jardim Botânico	16°19'36"S 48°57'10"O	11387
	Solange Park	16°42'21.9"S 49°21'35.8"O	11390
Itapuranga	Centro	15°33'49.2"S 49°57'01.6"O	11388
Pirenópolis	Vila Santa Bárbara	15°51'21.5"S 48°56'30.2"O	11873

4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

As plantas de *Dysphania ambrosioides* cultivadas no Horto de Plantas Medicinais do Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET), na Universidade Estadual de Goiás (Latitude 16°17'13,8"S; Longitude 48°57'22,7"O) e no Horto de Plantas Medicinais do Jardim Botânico de Goiânia, cidade de Goiânia, Goiás (Latitude 16°19'36"S; Longitude 48°57'10"O) foram utilizadas no estudo de caracterização morfoanatômica, como um dos parâmetros para o controle de qualidade do material vegetal. Para tanto, foram coletadas folhas adultas completamente expandidas abaixo do terceiro nó de pelo menos três indivíduos diferentes.

4.2.1 Estudo Macroscópico da Planta

Para fins de controle de qualidade foi realizada a descrição macroscópica da planta através de vista desarmada da planta *in natura* e exsicatas, de acordo com parâmetros de Oliveira, Akisue (2005) e Lorenzi, Gonçalves (2007). De modo semelhante realizou-se a descrição das folhas de *D. ambrosioides*.

4.2.2 Estudo Microscópico da Folha

Para o estudo microscópico realizaram-se secções transversais do pecíolo e da lâmina foliar de *D. ambrosioides*, previamente fixadas em FPA (formaldeído 37%, ácido propiônico e etanol 70% na proporção de 1:1:18 (v/v)) por 24 horas e conservadas em etanol 70% (v/v) (KRAUS; ARDUIN, 1997). Também foram realizadas secções paradérmicas das faces adaxial e abaxial de folhas frescas. Ambos os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio e corados com azul de Alcian e safranina (9:1) (BUTKATSCH, 1972, modificado). Para os cortes transversais ainda foram feitos testes histoquímicos com Sudan III (SASS, 1951) para substâncias lipofílicas e com cloreto férrico (JOAHANSEN, 1940) para compostos fenólicos. As lâminas foram confeccionadas com solução aquosa de glicerina (1:1) (KRAUS; ARDUIN, 1997). As imagens das lâminas foram obtidas em microscópio Leica DM 500 com câmera acoplada Leica ICC50.

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizados cortes de 3 mm da folha fresca, fixados em Karnovsky por 24h (KRAUS, ARDUIN, 1997), desidratados em série etánolica, submetidos ao ponto crítico de CO₂, metalizados em ouro. As imagens foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura modelo Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging, no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) da Universidade Federal de Goiás.

4.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

Após a limpeza, o material coletado foi submetido à secagem em estufa com circulação forçada de ar (marca Solab e modelo SL-102) à 37±5°C, até atingir o teor de umidade entre 8 a 14%, conforme especificação da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010) para caracterização de drogas vegetais. Em seguida, o material seco foi pulverizado em moinho de facas Marconi, modelo MA-580.

A droga vegetal obtida foi acondicionada em sacos plásticos escuros, identificados e armazenados ao abrigo de luz e umidade.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL

4.4.1 Identificação Microscópica

O pó obtido foi analisado segundo os critérios da Farmacopeia Brasileira 5ª edição e para a identificação das estruturas foram utilizados os reativos: Azul de Alcian/safranina (9/1) e Steinmetz (BRASIL, 2010).

4.4.2 Determinação de Teor de Voláteis

Pesou-se cerca de 1g do material vegetal e distribuiu-se uniformemente sobre o prato da balança com lâmpada de halogênio Shimadzu modelo MOC63u/Unibloc, com o tempo de leitura de cinco minutos e temperatura de 105°C. O ensaio foi realizado em triplicata conforme Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010).

4.4.3 Determinação de Cinzas Totais

Pesou-se 3 g da droga vegetal pulverizada e transferiu-se para cadinho previamente calcinado. A amostra foi distribuída uniformemente no cadinho e incinerada a 600 °C por 4h em forno tipo mufla (Quimis, modelo Q318924) ou até obtenção de cinzas brancas. O cadinho foi resfriado em dessecador e pesado. O ensaio foi realizado em triplicata conforme Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010). Calculou-se a porcentagem de cinzas com o auxílio da Equação 1:

$$\% \text{cinzas totais} = \frac{N \times 100}{P_1} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que:

P1 – peso inicial da amostra (g)

N – peso de cinzas totais da amostra (g)

4.4.4 Determinação de Cinzas Insolúveis em Ácido Clorídrico

O resíduo gerado na determinação de cinzas totais foi fervido durante 5 minutos com 25 mL de ácido clorídrico a 7% (p/v) em cadinho coberto com vidro de relógio. Em seguida, filtrou-se o líquido obtido, lavou-se com água quente até que o filtrado se mostrasse neutro. Transferiu-se o papel de filtro contendo o resíduo para o cadinho original, secou-se sobre chapa quente e incinerou-se numa temperatura de 600°C até peso constante (BRASIL, 2010). A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido clorídrico foi calculada conforme Equação 2.

$$\% \text{cinzas insolúveis em ácido clorídrico} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que:

P₁ – peso do cadinho vazio (g)

P₂ – peso do cadinho com cinzas insolúveis em HCl (g)

P₃ – peso inicial da amostra(g)

4.4.5 Determinação da Granulometria do Pó

Para a determinação da granulometria do pó (droga vegetal) foram utilizados os tamises de abertura 425µm, 850µm, 1400µm e 2000µm, ordenados de maior abertura para a menor abertura apoiados sobre um coletor. Pesou-se cerca de 25 g da droga vegetal, que foi transferido para o tamis superior e distribuído uniformemente. A vibração foi promovida pelo agitador mecânico (Bertel, modelo 2156) por cerca de 15 minutos. O experimento foi realizado em triplicata conforme Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010). O percentual retido em cada tamis foi calculado por meio da Equação 3.

$$\% \text{retida pelo tamis} = \frac{P_1 \times 100}{P_2} \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que:

P₁ = Peso da amostra retida em cada tamis (g);

P₂ = Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (g);

4.4.6 Determinação do Índice de Intumescência

Pesou-se 1 g da droga vegetal, transferiu-se para proveta de 25 mL na qual completou-se o volume de 25 mL com água destilada. A proveta foi agitada manualmente a cada 10 min, durante 1 h. Após repouso de três horas, à temperatura ambiente, verificou-se o volume final ocupado pelo pó. O ensaio foi realizado em triplicata (BRASIL, 2010). O índice foi calculado, em mililitros, pela média das determinações, em triplicata, de acordo com a Equação 4.

$$\text{Índice de intumescência} = Vf - Vi \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que:

Vf = volume final ocupado pela amostra (mL);

Vi = volume inicial ocupado pela amostra (mL).

4.4.7 Triagem Fitoquímica

A triagem fitoquímica das partes aéreas de *D. ambrosioides* foi obtida a partir de reações de caracterização de compostos fenólicos (fenóis simples, cumarinas, flavonoides, antraquinonas, taninos), compostos nitrogenados (alcaloides) e terpenos (heterosídeos cardioativos) adaptadas de Costa (2001), Matos (2009), Matos e Matos (1989) e Simões et al. (2017). A caracterização de saponinas foi realizada a partir do método indicado pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010).

4.4.8 Perfil do Óleo Essencial

A extração de óleo essencial foi realizada a partir de 50g das partes aéreas de *D. ambrosioides* por meio da hidrodestilação em aparato tipo Clevenger, pelo período de 4h. O óleo foi coletado em frasco âmbar de 2 ml, diluído em éter etílico (grau HPLC) e dessecado em sulfato de sódio anidro. Com auxílio de pipeta Pasteur o óleo foi transferido para outro frasco âmbar de 2 ml, o éter foi evaporado e seu rendimento foi calculado (Eq. 5). O procedimento foi repetido duas vezes e o óleo

essencial foi armazenado a -20°C até a análise em equipamento de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-EM).

$$U = \frac{P_1}{P_2} \times 100$$

(Eq.5)

Em que:

U= rendimento do óleo essencial

P₁= peso (g) do óleo essencial obtido

P₂= peso (g) da droga vegetal utilizada na extração

Para as análises em CG-EM o óleo foi diluído em hexano (1:10), utilizou-se cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-MS QP5050A equipado com uma coluna capilar de sílica fundida SBP-5 (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm de espessura de película, composta de 5% de fenilmetilpolisiloxano) e temperatura programada de 60 a 240 °C a uma taxa de acréscimo de 3°C/min, depois a 280 °C a 10 °C/min, terminando com 10 min a 280 °C. O gás de arraste foi o hélio, a uma taxa de fluxo de 1,0 ml/min e o modo de divisão tinha uma proporção de 1:20. A porta de injeção foi mantida a 225°C. Parâmetros operacionais significativos: temperatura da interface 240 °C, ionização por impacto de elétrons de 70 eV com faixa de massa de varredura de 40-350 m/z a uma taxa de amostragem de 1,0 varredura/s. Os constituintes foram identificados por comparação de seus índices de retenção (Eq.6) e espectros de massas autênticos (ADAMS, 2007), em relação à série de n-alcenos C8-C32 em uma corrida com temperatura programada (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963).

$$RI(x) = 100P_z + 100[(RT(x) - RT(P_z)) / (RT(P_{z+1}) - RT(P_z))]$$

(Eq.6)

Em que:

RI= índice de retenção

P_z= número de carbonos do alcano que elui antes da amostra

RT(x)= tempo de retenção da amostra

RT(P_z)= tempo de retenção do alcano que elui antes da amostra

RT(P_{z+1})= tempo de retenção do alcano que elui após a amostra

4.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RUTINA EM EXTRATOS DAS PARTES AÉREAS DE *D. ambrosioides* POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O método foi desenvolvido em um sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência da marca Varian® ProStar equipado com bomba ternária (modelo 240), injetor automático (modelo 310) e detector de UV (modelo 20599), coluna C-18 Supelco® (25cm x 4,6mm, 5µm). O padrão analítico utilizado foi a rutina (Sigma-Aldrich).

Para os estudos preliminares do perfil cromatográfico do extrato das partes aéreas de *D. ambrosioides* e desenvolvimento do método analítico, foram preparadas soluções extrativas em etanol a 70% (p/p). Resumidamente, 1g de droga vegetal foi transferido para balão volumétrico de 10mL, completou-se o volume com etanol 70% (p/p) e deixou-se em equipamento de ultrassom (UNIQUE mod. USC – 2800A, frequência 40kHz e potência 154W) durante 30 minutos a temperatura ambiente. O extrato foi filtrado com papel de filtro, logo após em membrana PVDF 0,45µm e transferido para um *vial* para respectiva leitura em CLAE.

Inicialmente adaptou-se as condições metodológicas de Barros et al. (2013), que utilizaram as fases móveis: acetonitrila (A) e solução aquosa de ácido fórmico 0,01%(B). A eluição, em gradiente, foi mantida por 5 minutos a 15% de A, depois de 15 para 20% de A em 5 minutos, de 20 a 25% de A em 10 minutos, de 25 a 35% de A em 10 minutos, de 35 a 50% de A em 10 minutos e em seguida a coluna foi reequilibrada para as condições iniciais. O fluxo foi de 0,8 mL/min, o volume de injeção foi de 20µL e o comprimento de onda foi de 370 nm.

Testou-se ainda o método adaptado da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010), em que o eluente A foi uma mistura de acetonitrila, água e ácido trifluoracético (5:95:0,01) e o eluente B, acetonitrila. O gradiente de eluição iniciou-se em 90 a 70% de A em 7 minutos, de 70 a 12% de A em 1 minuto, que foi mantido 12% de A por mais 3 minutos, de 12 a 90% em 1 minuto e mantido por mais 6 minutos. O fluxo foi de 0,7 mL/min, volume de injeção foi de 20µL, o comprimento de onda foi de 365 nm.

Ainda avaliou-se eluições isocráticas nas seguintes condições: metanol – água (1:1, v/v) contendo 0,002% (v/v) de ácido fosfórico, volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1 mL/min e detecção em 356 nm (PIANA et al., 2013). Foram avaliadas

ainda as condições metodológicas de Zu et al. (2006): metanol, acetonitrila e água em ácido acético 1% (40:15:45). O fluxo foi de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20µL, comprimento de onda de 365 nm.

Por fim, foram testadas as condições metodológicas adaptadas do método de Jesus et al. (2018). A fase móvel empregada foi metanol (A) e solução aquosa de ácido acético a 2% (B). A eluição iniciava-se em 5% de A por 2 minutos, depois seguia em gradiente de 5 a 25% de A por 4 minutos, de 25 a 40% de A por 4 minutos, de 40 a 50% de A por 4 minutos, de 50 a 60% de A por 8 minutos, de 60 a 80% de A por 6 minutos e em seguida a coluna foi reequilibrada para as condições iniciais do método. O fluxo foi de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 360nm.

4.6 SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA PARA DETECÇÃO DE RUTINA

A varredura do padrão analítico rutina foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS, da marca PerkinElmer, modelo Lambda 25, de 200 a 600 nm, a fim de determinar o melhor comprimento de onda para utilização nos métodos cromatográficos e espectrofotométricos a serem validados.

4.7 VALIDAÇÃO PARCIAL DA METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE

A validação parcial da metodologia analítica por CLAE foi conduzida segundo as preconizações da RDC nº166/2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos (BRASIL, 2017a) e do “Guia de Orientação para Registro de Medicamento Fitoterápico e Registro e Notificação de Produto Tradicional Fitoterápico” (BRASIL, 2014b). Foram validados os parâmetros de seletividade e linearidade do método. As condições cromatográficas utilizadas nesta etapa do estudo estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros do método analítico de CLAE para avaliação do marcador escolhido para o extrato das partes aéreas de *D. ambrosioides*

Parâmetros	Descrição
Coluna cromatográfica	C-18 de Fase Reversa Supelco (25cm x 4,6 mm, 5µm)
Fase móvel	Metanol (A)/ Ácido acético 2% (B) em água (gradiente inicial 5% de A e 95% de B chegando a 100% de A no tempo de 70 minutos)
Comprimento de onda	360 nm
Volume de injeção	20µL
Fluxo	1,0 mL/min

4.7.1 Adequabilidade do Sistema

Para a avaliação da adequabilidade do sistema foram feitas três injeções consecutivas do extrato etanólico de *D. ambrosioides*. Os parâmetros avaliados foram: número de pratos teóricos (N), fator de cauda/assimetria (tailing), resolução (R_s) e fator de capacidade (k') das áreas dos picos do marcador rutina na amostra.

4.7.2 Seletividade

A seletividade da metodologia foi verificada pela comparação dos cromatogramas da fase móvel (metanol e solução aquosa de ácido acético 2%), do padrão (marcador químico) e da amostra, de modo a avaliar a detecção de interferentes durante a eluição.

4.7.3 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio da curva de calibração do padrão analítico rutina. Foram feitas seis diluições do padrão em metanol, a partir da solução mãe 2.000 µg/ml e foram obtidas as seguintes concentrações: 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL. As soluções foram filtradas em membrana de PVDF 0,45 µm para os *vials* apropriados e submetidas à CLAE nas condições apresentadas na Tabela 2. Foram avaliados os critérios exigidos pela RDC

166/2017: representação gráfica das respostas em função da concentração do analito, equação da reta por análise de regressão linear, coeficiente de correlação (r) e determinação (r^2), bem como avaliação do coeficiente angular e a homocedasticidade dos dados. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Action Stat, acoplado ao Excel versão 2016.

4.7.4 Teor de rutina no extrato etanólico bruto das partes aéreas de *D. ambrosioides*.

O teor de rutina no material vegetal foi expresso como a média (\pm DP) a partir de três eluições cromatográficas independentes da amostra e calculado conforme a Equação 7. Nesta equação, C é a concentração de rutina na amostra, determinada com o auxílio da equação da reta, gerada da curva de calibração na análise de regressão linear e C_a é a concentração da amostra (matéria-prima vegetal) no extrato, ambas em ($\mu\text{g/mL}$).

$$\text{Teor (\%)} = \frac{C}{C_a} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

4.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA O DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES TOTAIS, EXPRESSOS COMO RUTINA, EM *D. ambrosioides*

Para a quantificação de flavonoides totais, expressos como rutina, na droga vegetal de *D. ambrosioides* foi utilizado o método proposto por Rolim et al. (2005) com adaptações.

Resumidamente, para a extração dos flavonoides da amostra, a 1g da droga vegetal foi adicionada quantidade suficiente para completar 10mL de etanol (70% p/p), o material foi mantido em banho de ultrassom (UNIQUE mod. USC – 2800A, frequência 40kHz e potência 154W) por 30 minutos a temperatura ambiente. O extrato foi filtrado com papel de filtro e 100 μl do filtrado foi diluído em 3900 μl de uma solução composta por metanol e ácido acético 0,02M (99:1), e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro (modelo SP22 Biospectro) a 364 nm,

utilizando como branco a solução de metanol em ácido acético 0,02M (99:1). O cálculo do teor de flavonoides totais, expressos como rutina, foi realizado com o auxílio da equação da reta, obtida por meio da análise de regressão linear, da curva de calibração do padrão rutina (Sigma Aldrich).

A validação do método espectrofotométrico foi realizada conforme parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2017a). A seletividade do método foi comprovada através de 7 leituras espectrofotométricas do extrato, em 364 nm, e comparação com a leitura do padrão rutina na concentração teórica (16 µg/ml), no mesmo comprimento de onda. O percentual de recuperação nas amostras foi calculado pela relação entre a concentração de flavonoides obtida em cada amostra e a concentração teórica do padrão, multiplicada por 100.

A linearidade do método foi determinada pela curva de calibração obtida a partir de 7 níveis de concentração do padrão rutina (1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 µg/ml), preparados em triplicata, de maneira independente.

O efeito matriz foi determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a amostra fortalecida com o padrão rutina (nas mesmas concentrações utilizadas na linearidade) e com o padrão rutina, preparadas em triplicata, de forma independente.

A precisão foi determinada a partir de 6 leituras espectrofotométricas da amostra (a 100% da concentração de flavonoides totais), preparadas individualmente e realizadas intradia (repetibilidade) e interdía (precisão intermediária).

A exatidão foi determinada pelo método da recuperação a partir da leitura espectrofotométrica da amostra com concentrações de flavonoides totais correspondentes à baixa, média e alta concentrações do intervalo linear, e fortalecida com o padrão (16 µg/ml) nestas mesmas condições, preparadas em triplicata, de maneira independente. Os resultados da exatidão foram calculados conforme Equação 8 (BRASIL, 2017a).

$$\text{Recuperação} = \frac{CA(\text{amostra adicionada}) - CA(\text{amostra})}{CTA} \times 100 \quad (\text{Eq.8})$$

Em que:

CA – concentração experimental do analito

CTA – concentração teórica do analito

A robustez do método foi analisada a partir da obtenção da concentração de flavonoides, expressos como rutina, na amostra nas condições originais do método e após pequenas variações no tempo de extração da amostra (40, 45, 50 minutos), na marca do solvente (Neon e JT Baker) e no comprimento de onda (364, 366 nm).

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados com base em parâmetros da curva analítica, calculados conforme Equações 9 e 10 (BRASIL, 2017a).

$$LD = \frac{3,3*\sigma}{IC} \qquad LQ = \frac{10*\sigma}{IC} \qquad \text{(Eq. 9 e 10)}$$

Em que:

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

σ – Desvio padrão do intercepto com o eixo Y ou desvio padrão residual da linha de regressão

IC – inclinação da curva de calibração

Todas as análises estatísticas foram realizadas conforme parâmetros preconizados pela RDC 166 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017a), ao nível de significância de 5%, com auxílio do software Action Stat (versão 3.5) acoplado ao Excel 2016.

4.9 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS DAS PARTES AÉREAS DE *D. ambrosioides*

Os extratos líquidos foram obtidos por dois processos extrativos: a) o primeiro processo, em pequena escala, por extração assistida por ultrassom (EAU), com a finalidade de otimizar o preparo de amostras para fins analíticos no controle de qualidade das partes aéreas de *D. ambrosioides*; b) o segundo processo, em maior escala, por percolação conforme parâmetros de extração determinados em estudo realizado por Neiva e colaboradores (2011). O extrato hidroalcoólico obtido foi destinado ao desenvolvimento e obtenção do extrato seco padronizado.

4.9.1 Otimização das condições de EAU dos flavonoides totais, expressos como rotina, a partir de *D. ambrosioides*

Para a otimização da EAU de flavonoides totais, expressos como rotina, em *D. ambrosioides* adotou-se o modelo Box Behnken 3³ e a metodologia de superfície de resposta (MSR). A partir de dados da literatura e estudos prévios laboratoriais foram determinadas três variáveis independentes e os três diferentes níveis de cada variável analisada. O planejamento fatorial foi executado em duas etapas, de acordo com as Tabelas 3 e 4.

Para cada planejamento o modelo estatístico gerou 15 experimentos com auxílio do software Statistica® versão 12.0 (STATSOFT, 2010), cuja execução foi realizada de forma aleatória. Para avaliação do erro puro três experimentos eram repetições do ponto central.

Tabela 3: Variáveis independentes e seus níveis, avaliados por MSR em um modelo Box-Behnken 3³, para a otimização da EAU de flavonoides totais, expressos como rotina, nas partes aéreas de *D. ambrosioides*, 1^o planejamento fatorial

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	-1
Tempo de extração (minutos)	15	30	45
Temperatura (°C)	30	35	40
Teor alcoólico (% p/p)	60	70	80

Tabela 4: Variáveis independentes e seus níveis, avaliados por MSR, em um modelo Box-Behnken 3³, para a otimização da EAU de flavonoides totais, expressos como rotina, nas partes aéreas de *D. ambrosioides*, 2^o planejamento fatorial

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	-1
Tempo de extração (minutos)	30	45	60
Temperatura (°C)	30	45	60
Teor alcoólico (% p/p)	30	50	70

O teor de flavonoides (% , m/m), expressos como rutina, foi utilizado como variável resposta (dependente). Foi determinado com o auxílio do método espectrofotométrico validado conforme item 4.8, levando-se em consideração a perda por dessecação. Para o cálculo do teor empregou-se a Equação 11:

$$\text{Teor de Flavonoides (\%)} = \frac{C}{C_a} * 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

11)

Em que:

C – concentração do padrão analítico (µg/mL)

C_a – concentração da amostra (µg/mL)

Os dados foram analisados pelo software Statistica® versão 12.0 (STATSOFT, 2010), os coeficientes foram interpretados pelo teste F. A análise dos dados foram executadas por meio de três ferramentas: análise de variância (ANOVA), análise de regressão e plotagem de superfície de resposta. No primeiro planejamento fatorial foram considerados significativos valores de $p < 0,05$ e no segundo planejamento fatorial foram considerados significativos valores de $p < 0,1$.

As condições ótimas para a EAU de flavonoides totais, expressos como rutina, das partes aéreas de *D. ambrosioides* foram determinadas dentro do intervalo das condições analisadas pela função geral de otimização. Estas condições foram validadas em triplicata avaliando a concentração de flavonoides totais, expressos como rutina, em relação ao valor predito pelo modelo.

4.9.2 Obtenção do extrato líquido por percolação

Para obtenção do extrato líquido de partes aéreas de *D. ambrosioides* por percolação foram utilizados 3 kg de droga vegetal pulverizada, colocados em maceração por 24h em etanol 70% (p/p), conforme percolação executada no estudo Neiva et al. (2011). Em seguida, o macerado foi transferido para percoladores de aço inox, completados com solução extrativa, e deixados em repouso por 4h. Então a percolação propriamente dita foi iniciada e mantida até que o líquido extrator saturasse e fosse substituído por um novo. Cada 1kg de droga vegetal consumiu 10

L de solvente, num total de 30 L. O extrato coletado foi rotulado, acondicionado em frascos plásticos e armazenado a -20°C.

O rendimento da percolação foi de 27 litros de extrato, que foi concentrado em rotaevaporador Ika 10 (temperatura 40°C, rotação de 25 rpm e pressão de 70 bar) até cerca de 10 L. O concentrado foi homogeneizado e armazenado em frasco plástico a -20°C.

4.9.3 Caracterização do Extrato Líquido (Percolado)

A caracterização do extrato líquido obtido por percolação foi feita por meio dos testes de determinação de sólidos totais, pH, densidade relativa, doseamento de flavonoides totais, expressos como rutina, e viscosidade.

4.9.3.1 Determinação de Sólidos Totais

A determinação de sólidos totais do percolado foi obtida com auxílio de analisador de umidade com aquecimento por lâmpada de halogênio Shimadzu modelo Unibloc. A análise foi feita em triplicata, em cada experimento foi pesado cerca de 1g de extrato líquido e aquecido a 105°C por aproximadamente 15 minutos. A porcentagem de sólidos totais foi expressa pela Equação 12:

$$\% \text{ sólidos totais} = 100 - U \quad (\text{Eq.12})$$

Em que:

U – Leitura do teor de voláteis indicada no display do analisador para a amostra.

4.9.3.2 Determinação do pH

A leitura do pH do extrato líquido foi realizada em triplicata pelo método potenciométrico, de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010). O equipamento utilizado foi da marca Marconi modelo MA-552 previamente calibrado com tampões pH 7,0 e 4,0.

4.9.3.3. Determinação da densidade relativa

A densidade relativa do extrato líquido foi determinada em triplicata, conforme Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010) por metodologia gravimétrica, com utilização de picnômetro de 10 ml, limpo, seco, previamente calibrado e pesado. A densidade relativa foi calculada através da razão entre massa da amostra e massa da água purificada expressa na Equação 13:

$$\text{Densidade Relativa} = \frac{(P_e - P_v)}{(P_a - P_v)} \quad (\text{Eq.13})$$

Em que:

P_e – massa do picnômetro com o extrato líquido

P_v – massa do picnômetro vazio

P_a – massa do picnômetro com água purificada

4.9.3.4 Doseamento de flavonoides totais, expressos como rutina

O doseamento de flavonoides totais, expressos como rutina, no extrato hidroalcoólico percolado de *D. ambrosioides* foi realizada de acordo com metodologia descrita no item 4.8.

4.9.3.5 Viscosidade

As medidas de viscosidade foram realizadas segundo metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010) em viscosímetro de Brookfield – DV-II + Viscosimeter, com conjunto de spindles tipo LV, operado nas condições de 100 rpm, torque 4%, temperatura ambiente.

4.10 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DAS PARTES AÉREAS DE *D. ambrosioides*.

A secagem do extrato líquido concentrado foi realizada em um equipamento tipo “mini” *Spray Dryer* LABMAQ® - modelo LM-MSD 1.0, com fluxo co-corrente.

4.10.1 Análise termogravimétrica (ATG) do padrão rotina

A análise termogravimétrica foi obtida a partir de dados consolidados da literatura para o padrão analítico rotina (COSTA et al., 2002; QI et al., 2015). Ao avaliar o efeito da temperatura na degradação da rutina pôde-se determinar melhor as condições de secagem de extrato de modo que os flavonoides fossem preservados durante o processo.

4.10.2 Delineamento experimental

A determinação das variáveis independentes para otimização da secagem por aspersão foi realizada por meio de levantamento bibliográfico, utilizando os descritores: *spray drying*, *dry extract*, *Box Behnken*, *Optimization*, *Flavonoids*, *Dysphania ambrosioides*, e *Response Surface Methodology*. Não foi encontrada uma literatura específica a respeito da otimização do processo de secagem de extratos de *D. ambrosioides*, mas sim dados referentes a outras espécies vegetais.

Foram realizados experimentos de secagem no *spray dryer* utilizando dois adjuvantes de secagem: maltodextrina e dióxido de silício coloidal (Aerosil®). Os adjuvantes foram testados nas concentrações de 20, 40 e 60% (p/p) em relação à massa de sólidos totais do extrato líquido concentrado. A incorporação dos adjuvantes de secagem às amostras de extrato líquido foi realizada com o auxílio de homogeneizador do tipo Ultra Turrax. Os parâmetros de secagem utilizados estão descritos na Tabela 5:

Tabela 5: Parâmetros de secagem no *spray dryer* utilizados na avaliação preliminar dos adjuvantes maltodextrina e Aerosil®

Parâmetro	Unidade
Diâmetro do bico	0,7 mm
Fluxo do ar comprimido	40 L/min
Pressão do ar comprimido	4,0 Kg/F
Temperatura de entrada	120°C
Fluxo de alimentação do extrato	0,25 L/h

4.10.3 Otimização da secagem dos extratos por aspersão (*Spray Drying*)

Para o processo de otimização da secagem do extrato líquido obtido das partes aéreas de *D. ambrosioides* foi empregada a metodologia de superfície de resposta (MSR) em um modelo Box Behnken (3^3), com as variáveis independentes selecionadas com base na literatura (Tabela 6).

Tabela 6: Variáveis independentes e seus níveis avaliados pela metodologia de superfície de resposta para otimização do processo de secagem por aspersão (*Spray Drying*) do extrato líquido de *D. ambrosioides*

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	-1
Concentração de adjuvante (% p/p)*	25	37,5	50
Temperatura de entrada (°C)	120	140	160
Fluxo de alimentação do extrato (L/h)	0,3	0,4	0,5

Legenda: *porcentagem em relação à massa de sólidos totais

O modelo estatístico gerou 15 experimentos, com auxílio do software Statistica® versão 12.0 (STATSOFT, 2010) cuja execução foi realizada de forma aleatória. Para avaliação do erro puro três experimentos eram repetições do ponto central. Os coeficientes foram interpretados pelo teste F. A análise dos dados foram executadas por meio de três ferramentas: análise de variância (ANOVA), análise de regressão e plotagem de superfície de resposta. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

4.10.4 Rendimento e caracterização dos extratos secos obtidos

4.10.4.1 Determinação do rendimento de secagem

O rendimento da secagem foi calculado pela relação entre o peso do extrato seco obtido na secagem pela massa de teor de sólidos totais presentes no extrato líquido utilizado no processo, expressa em porcentagem, conforme a Equação 14:

$$U = \frac{P_1}{P_2} \times 100 \quad (\text{Eq.14})$$

Em que:

U – rendimento (%)

P₁ – peso do extrato seco obtido (g)

P₂ – massa de sólidos totais (incluindo a massa de adjuvante acrescentada) presentes na amostra (g)

4.10.4.2 Determinação da perda por dessecação

A perda por dessecação dos extratos secos foi obtida com auxílio de analisador de umidade com aquecimento por lâmpada de halogênio Shimadzu modelo Unibloc. A análise foi feita em triplicata, sendo que em cada experimento foram utilizados cerca de 200 mg de extrato seco, que foram aquecidos a 105°C por aproximadamente 5 minutos.

4.10.4.3 Determinação da atividade de água

A atividade de água de cada extrato seco foi determinada em triplicata no equipamento PRE AQUA LAB modelo 450 com aproximadamente 200 mg da amostra, a 25°C.

4.10.4.4 Doseamento de flavonoides totais, expressos como rutina

O doseamento de flavonoides totais, expressos como rutina, em cada amostra de extrato seco foi realizada de acordo com metodologia descrita no item 4.8. Posteriormente convertido em teor (% m/m) pela Equação 11.

4.10.4.5 Validação das condições de secagem otimizadas

As condições de secagem foram reproduzidas em triplicata e avaliadas quanto ao rendimento, teor de umidade, atividade de água e teor dos marcadores químicos. Os resultados foram comparados aos valores preditos pelo modelo, para avaliar sua eficiência preditiva.

4.10.5 Morfologia das partículas de extrato seco analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a fotomicrografia, foram preparadas amostras em triplicata. As amostras do extrato seco foram metalizadas em ouro e a caracterização morfológica das partículas foi obtida em Microscópio Eletrônico de Varredura modelo Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging, no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) da Universidade Federal de Goiás.

4.11 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *D. ambrosioides* EM *Artemia salina*

O bioensaio em *Artemia salina* Leach é importante na padronização e no controle de qualidade de produtos botânicos e pode ser usado para avaliar a atividade de produtos naturais bioativos (ARCANJO et al., 2012). O bioensaio, utilizando concentrações previamente definidas do extrato seco padronizado de *D. ambrosioides*, foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços com o microcustáceo e foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Molina-Salinas e Said-Fernandez (2006), com adaptações.

Neste trabalho, 60 mg de cistos de *Artemia salina* foram incubados em um artemilheiro com metade de água marinha sintética, preparada com a dissolução de sal marinho em água destilada (36 g/L), acrescida de extrato de leveduras (6 mg/L) e esterilizada em autoclave. Esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *A. salina* e no preparo das demais diluições. Durante um período de 36 horas o meio foi preservado sobre saturação constante de oxigênio à temperatura ambiente e iluminação natural para a eclosão dos ovos.

As amostras (extrato seco de *D. ambrosioides* e Aerosil®) foram diluídos em 5% de propilenoglicol e salina para obter as concentrações de 2000, 1000, 500, 250 e 125 µg/mL.

Para o experimento foram utilizadas 8 colunas das microplacas, das quais 3 colunas foram reservadas para o extrato seco em concentrações decrescentes, 3 colunas para o Aerosil® com as concentrações distribuídas de forma semelhante a do extrato, e 1 coluna para o controle positivo (K₂CrO₇) e 1 coluna para o controle

negativo (água salina). Cada poço foi preenchido com 10 ± 1 náuplios suspensos em 100 μL de solução salina e completados com 100 μL do respectivo tratamento. Posteriormente, após 24 horas de incubação, realizou-se a contagem de microcrustáceos mortos ou imóveis por mais de 10 segundos. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

A toxicidade foi expressa através da concentração letal a 50% da população do microcrustáceo por meio do cálculo da CL_{50} estimada a partir da regressão linear obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração da substância teste, usando o método Probitos.

A classificação do nível de toxicidade foi estabelecida de acordo com o critério Nguta et al. (2012). O estudo divide como toxicidade forte valores de CL_{50} até 100 $\mu\text{g/mL}$, toxicidade moderada para CL_{50} entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ e toxicidade baixa para CL_{50} entre 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$, e não tóxico acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

4.12 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *D. ambrosioides* EM ROEDORES

4.12.1 Aspectos éticos

Os experimentos realizados nesse estudo foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho de Experimentação Animal (CONCEA). Foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual de Goiás (UEG), conforme protocolo nº 006/2017 (Anexo 1).

4.12.2 Animais

Foram utilizados ratos fêmeas da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*), nulíparas, com idade entre 68 e 81 dias, pesando entre 144,22 – 210,68 g. Os animais foram mantidos durante todo o período experimental no Biotério do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Estadual de Goiás (UEG). As condições de temperatura e umidade foram controladas, a luminosidade seguiu um ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 7:00 às 19:00 horas) e os animais foram tratados com água e ração a vontade.

4.12.3 Ensaio de toxicidade oral aguda

Para o estudo da toxicidade aguda foi utilizado o protocolo nº 423 da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Co-operation and Development - OEDC*). Este protocolo preconiza que para cada dose a ser testada sejam utilizados 3 ratos, preferencialmente fêmeas (OECD, 2001).

Neste estudo os animais foram divididos em dois grupos experimentais (grupo 1: controle (Aerosil®) grupo 2: Teste (dose de 300 e 2000 mg/kg) com três ratas em cada grupo. As amostras foram administradas via gavagem. Os animais foram observados por 8 horas seguidas no primeiro dia de experimento. Nos 14 dias restantes foram observados 1 hora no período da manhã.

Os sinais de toxicidade investigados foram: mudanças ou alterações na pele ou no pêlo; alterações nos olhos e nas membranas mucosas; nos sistemas circulatório, respiratório, nervoso central e autônomo. Além disso, também foram investigadas possíveis alterações no padrão comportamental e somatomotor (tremores, prostração, paralisia, respostas exageradas ao barulho ou ao toque – hiperreflexia). Ao final do período experimental todos os animais foram submetidos à necropsia. Os órgãos foram analisados quanto ao seu aspecto geral, e determinou-se a massa dos rins, fígado.

4.12.4 Preparo da amostra para administração em roedores

O extrato seco das partes aéreas de *D. ambrosioides* foi dissolvido em 10% de propilenoglicol e água, nas concentrações de acordo com o peso dos animais, a fim de se obter as doses de 300 e 2000 mg/kg. O volume de administração utilizado foi de 0,5 mL para cada 100g de massa corporal para as doses de 300 e 2000mg/kg. No grupo controle foi utilizado o Aerosil® na dose de 667 mg/Kg para verificar se o adjuvante influenciava na toxicidade do extrato, e este foi preparado em 10% de propilenoglicol e água.

4.12.5 Análise estatística

Utilizou-se a análise de variância ANOVA seguida pelo teste Student-Newman-Keuls para identificar as diferenças entre os grupos controle e experimental, através do software Statistica® versão 12.0 (STATSOFT, 2010). Para a avaliação do ganho de massa corporal e massa relativa dos órgãos foi utilizada ANOVA unifatorial e para avaliação do consumo de água e ração ANOVA para medidas repetidas. As diferenças estatisticamente significativas foram indicadas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESCRIÇÃO MORFOANATÔMICA

5.1.1 Estudo Morfológico da Planta

D. ambrosioides (Figuras 1A a 1D) é uma planta herbácea que mede em torno de 40 cm de altura, de ciclo perene, de aroma forte e característico. O caule é ramificado, de tonalidade avermelhada e piloso. As folhas são alternadas, simples, de tamanhos diferentes, sendo que na extremidade superior da planta as folhas são mais estreitas. A inflorescência (1C) é paniculosa piramidal, distribuídas em espigas axilares densas, verdes com pontuações branco-amareladas. Os frutos (1D) são do tipo aquênio, esféricos, bastante pequenos, marrom quando maduros.

De acordo com Winsor (2001) *Dysphania ambrosioides* pertence ao reino *Plantae*, divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, da ordem *Caryophyllales*, família *Amaranthaceae*, subfamília *Chenopodioideae* e gênero *Chenopodium* também conhecido por *Dysphania* pela classificação de Mosyakin e Clemants (2002). Na literatura é descrita como uma planta herbácea, chega a atingir em torno de um metro e meio de altura, pode ser perene ou anual. Há registros de inflorescência do tipo racemosa ou mesmo em formato de tirso (KISMAN, 1991; SUKHORUKOV; ZHANG, 2013; SÁ et al., 2016).

Figura1: *Dysphania ambrosioides*: A – aspecto geral, B – exsicata, C – inflorescência, D – frutos verdes



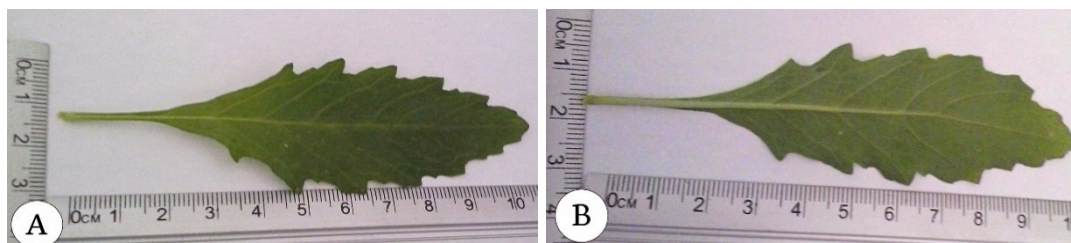
Fonte: Próprio autor (2017); PORTELA, 2018

5.1.2 Descrição Macroscópica das Folhas

As folhas são alternas e espiraladas, simples, oblongo-lanceoladas, possuem o ápice agudo e uma base atenuada, margens denteadas. As lâminas adaxial (Figura 2A) e abaxial (Figura 2B) são concolores verdes, com nervuras principal e secundárias salientes na face abaxial. As folhas possuem tamanhos diferentes, sendo que as maiores encontram-se inseridas na região inferior da planta, as folhas menores são sésseis e inseridas na extremidade superior. As folhas adultas analisadas encontram-se entre 8 e 10 cm de comprimento e apresentam de 2 a 3 cm de largura. Apresentam nervação peninervia e superfície pilosa. Possuem pecíolo alado e curto em torno de 1 a 2 cm. No trabalho de Costa e Tavares (2006), as

folhas estudadas divergiram quanto a base aguda. Na pesquisa de Blanckaert et al. (2012) foram observadas folhas com até 16 cm de comprimento e 5,5 cm de largura.

Figura 2: *Dysphania ambrosioides* – folhas. A – superfície adaxial; B - superfície abaxial



Fonte: Próprio autor (2017).

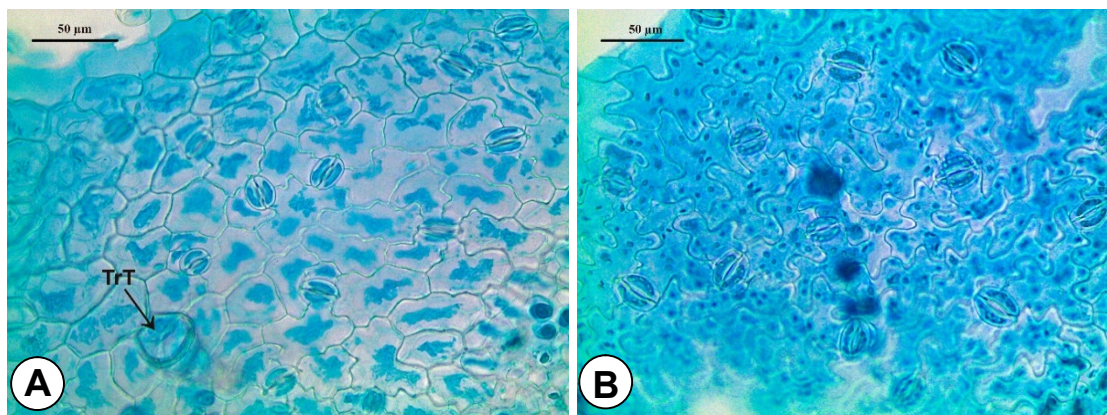
5.1.3 Descrição Microscópica da Folha

5.1.3.1 Lâmina foliar

Em vista frontal, nas secções paradérmicas, a folha exibe estômatos em ambas as faces (anfiestomática) e estes são do tipo anomocíticos em sua maioria (Figuras 3A, 3B e 4C), segundo classificação de Metcalfe e Chalk 1950. Os trabalhos de Jorge, Ferro e Koschtschak (1986); Costa e Tavares (2006) também observaram a presença de estômatos anomocíticos nas duas superfícies. Já o estudo de Bonzani et al. (2003) e Sá et al. (2016) identificaram estômatos anomocíticos e anisocíticos em ambas as superfícies. Bonzani et al. (2003) ainda verificaram a presença de estômatos tetracíticos.

As paredes celulares das células da epiderme adaxial (Figura 3A) possuem contornos retos a sinuosos. Na face abaxial, as paredes celulares da epiderme apresentam maiores sinuosidades (Figura 3B).

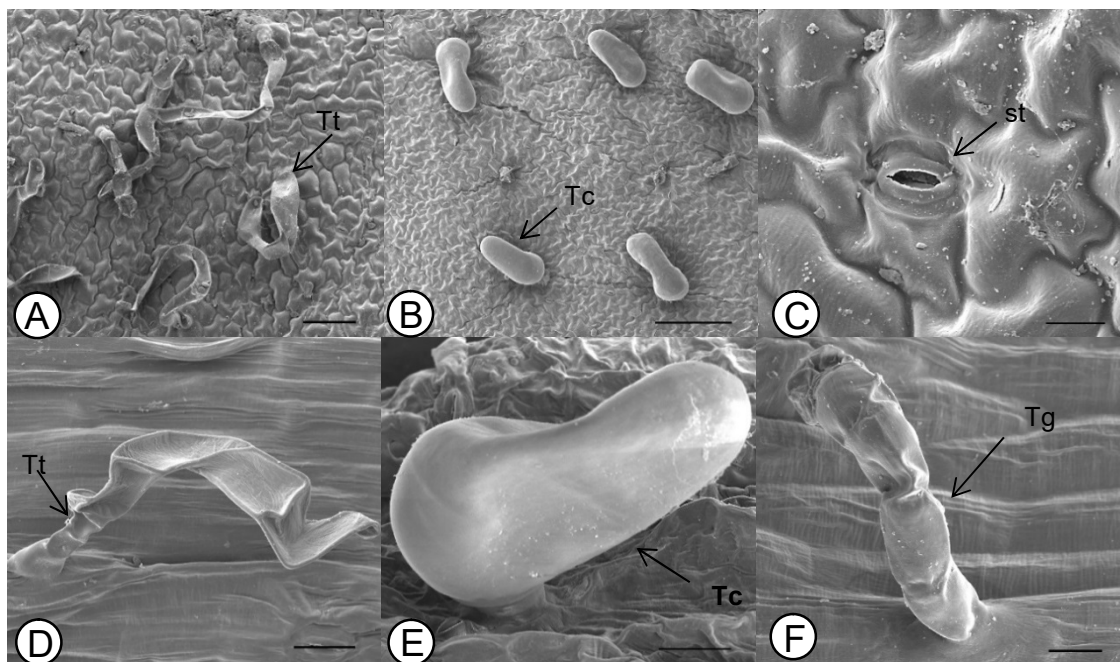
Figura 3: *Dysphania ambrosioides* - Secções paradérmicas em coloração Azul de Alcian/safranina. A – face adaxial, Trt – tricoma tector. B – face abaxial. Barra de escala = 50 µm



Os tricomas tectores (Figuras 4A, 4D) estão presentes nas duas superfícies da lâmina foliar de *D. ambrosioides*, contudo encontram-se em maiores quantidades na face adaxial da folha e em regiões do pecíolo e nervura central. São unisseriados, multicelulares, com três a cinco células, de base arredondada e um prolongamento da célula terminal em formato de foice. Os tricomas glandulares capitados (Figuras 4B, 4E) possuem uma célula basal elíptica com células intermediárias achatadas ou não e cabeça glandular. Verificou-se também a presença de tricomas glandulares (Figura 4F) unisseriados de corpos inclinados para a epiderme e presença de glândula secretora na célula terminal.

Na face abaxial observou-se o predomínio de tricomas glandulares capitados, geralmente ocorrem em regiões de depressão da folha (Figura 4E, 7), resultado semelhante ao encontrado no trabalho de Costa e Tavares (2006). Nos trabalhos de Bonzani et al. (2003) e Sá et al. (2016) verificaram a presença destes tricomas nas duas faces embora predominem na face adaxial. Ainda no trabalho de Bonzani et al. (2003) houve a constatação da presença do tricoma glandular de corpo curvado (Figura 4F) em *D. ambrosioides* como distintivo das demais espécies de *Chenopodium*.

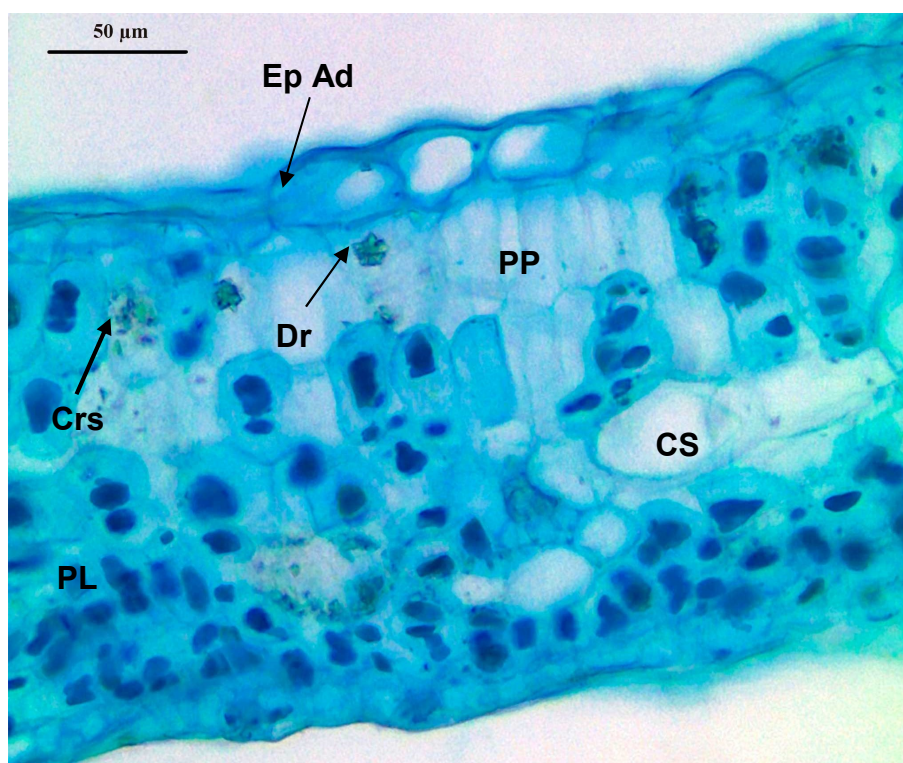
Figura 4: Fotomicrografia de *Dysphania ambrosioides* – A, face adaxial da lamina foliar com a presença de tricomas tectores (Tt). B, face abaxial da lamina foliar com a presença de tricomas glandulares capitados (Tc). C, estômato (st) anomocítico. D, tricoma tector (Tt) unisseriado multicelular com prolongamento de célula apical em formato de foíce. E, Tricoma glandular capitado (Tg). F, Tricoma glandular (Tc). Escala: A=50µm, B=100µm, C,E=10µm, F=20µm.



Em secção transversal na região de internervura (Figura 5) verificou-se a presença de epiderme com células de tamanhos diferentes, revestida por uma camada delgada de cutícula. As células da epiderme adaxial apresentavam dimensões superiores às da abaxial. O mesmo também foi observado pelos estudos de Costa, Tavares (2006) e Bonzani et al. (2003).

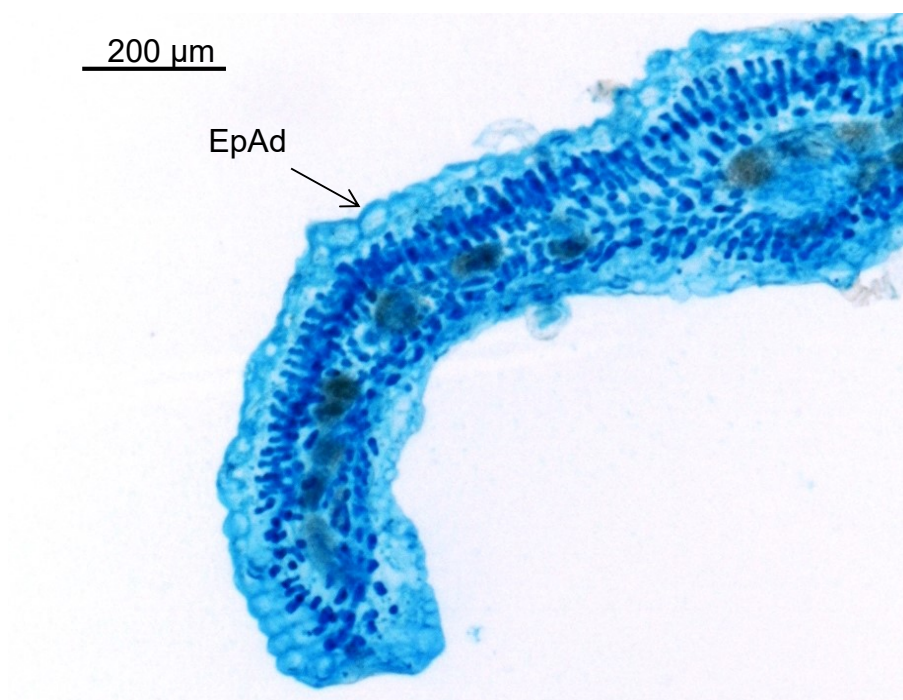
O mesofilo foliar é dorsiventral (Figura 5), com uma a duas camadas de parênquima paliçádico, cujas células têm formato cilíndrico. O parênquima lacunoso revela entre três e quatro camadas com células de tamanhos e formas diferentes, dispostas irregularmente. Ainda no mesofilo verificou-se a presença de cavidades secretoras e idioblastos contendo areia cristalina e drusas. A maioria das espécies de *Chenopodium* apresentam mesófilo foliar dorsiventral, exceto os espécimes *C. retusum* e *C. oblancoatum*, cujos mesofilos são isobilaterais (BONZANI et al., 2003). O bordo foliar (Figura 6) é arredondado fletido para face abaxial.

Figura 5: *Dysphania ambrosioides* - Secção transversal da região de internervura, coloração Azul de Alcian/Safranina.



Legenda: EpAd – epiderme adaxial, EpAb – epiderme abaxial, PP – parênquima paliçádico, PL – parênquima lacunoso, CS – cavidade secretora, Idioblastos contendo cristais (Crs) e drusas (Dr).

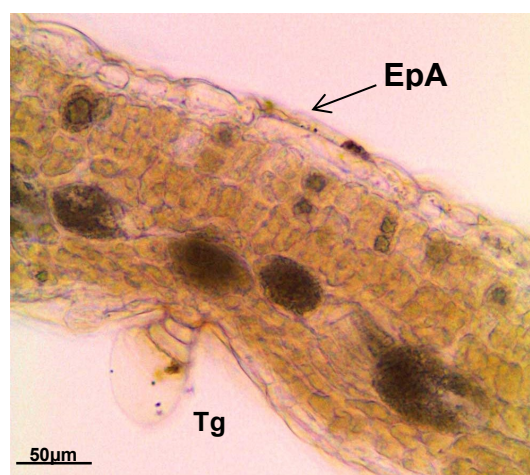
Figura 6: *Dysphania ambrosioides* - Secção transversal da região de bordo, coloração Azul de Alcian/Safranina.



Legenda: EpAd – epiderme adaxial

O estudo de Costa e Tavares (2006) e Sá et al. (2016) constataram a presença de substâncias lipofílicas em material fresco. No estudo também verificou-se a presença de compostos lipofílicos no mesofilo foliar (Figura 7). Já para a presença de compostos fenólicos através de cloreto férrico não há registros na literatura.

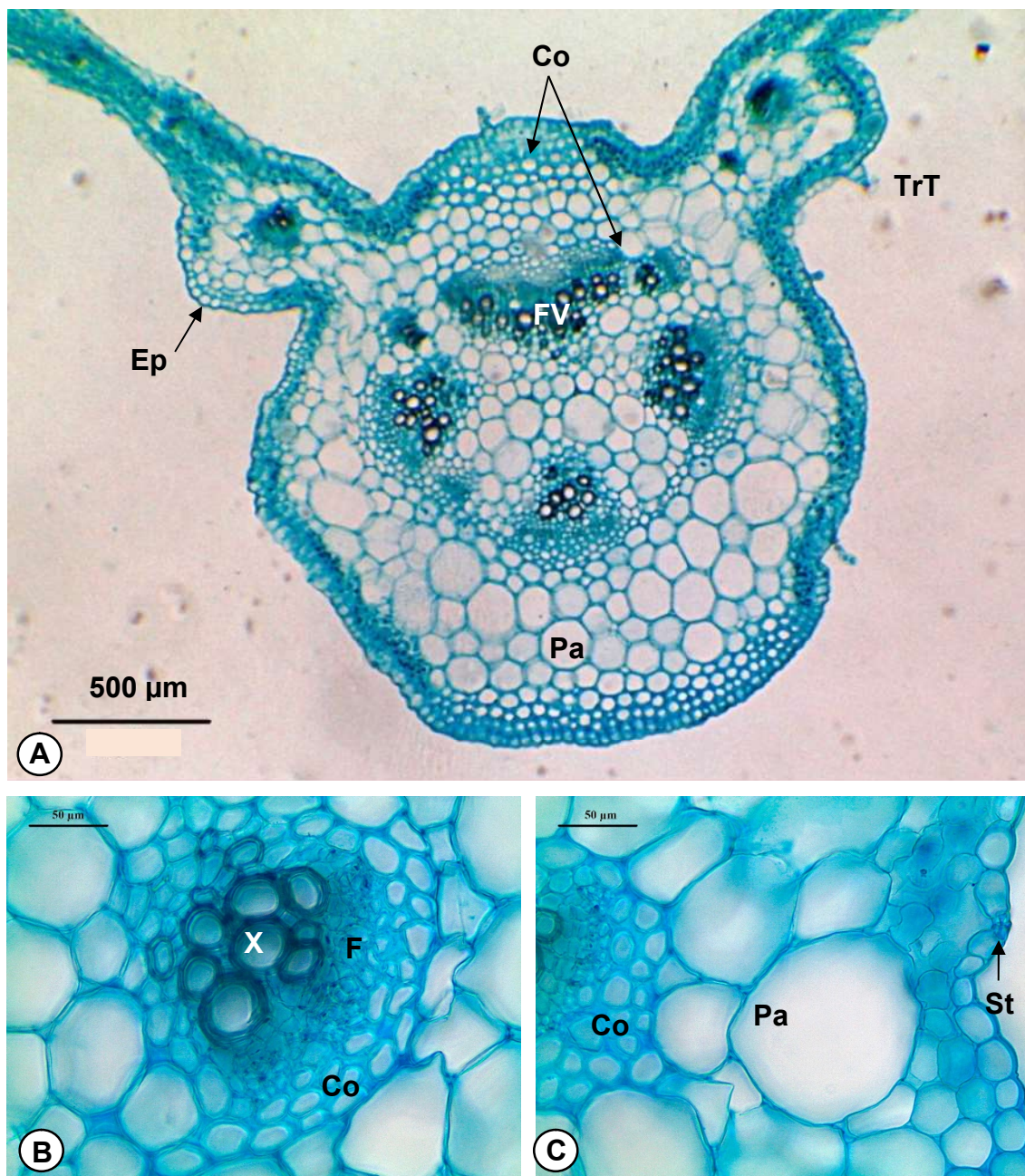
Figura 7: *Dysphania ambrosioides* - Secção transversal do internervura de coloração Sudan III.



Legenda: EpAd – epiderme adaxial, Tg - tricoma glandular captado em depressão de face abaxial

Nas secções transversais da nervura central (Figura 8A), mantém-se o formato convexo-convexo presente no pecíolo, assim como feixes vasculares do tipo colaterais (Figura 8B) dispostos em semicírculo parcialmente fechado. A epiderme é revestida de cutícula delgada, as células apresentam dimensões semelhantes, presença de estômatos (Figura 8C) e tricomas (Figura 8A).

Figura 8: *Dysphania ambrosioides* - Secção transversal da nervura central, corada com Azul de alcian e safranina. A – aspecto geral dos feixes vasculares dispostos em semicírculo parcialmente fechados. B – feixe vascular colateral. C – Epiderme com presença de estômato (St)



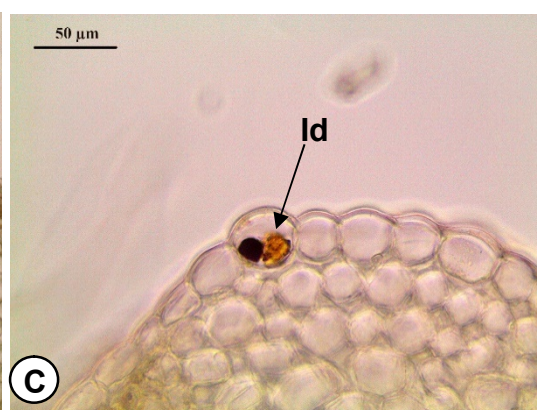
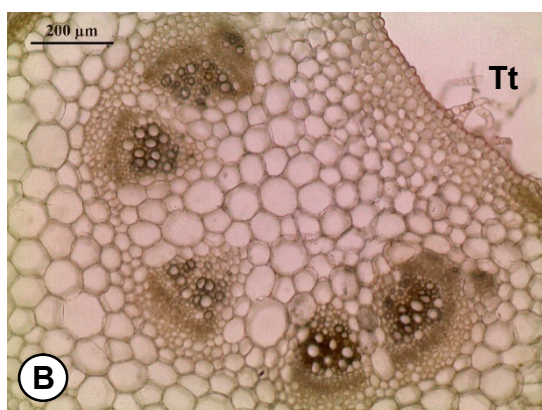
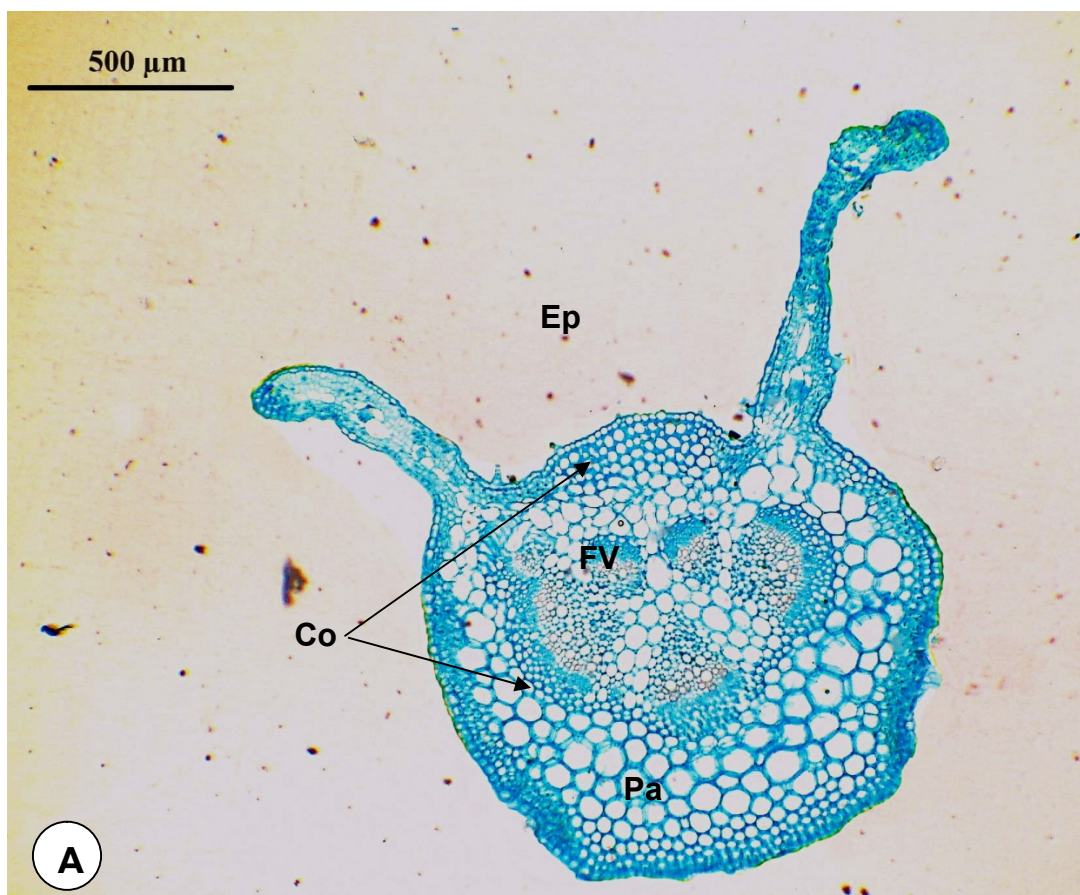
Legenda: Co – colênquima angular, Ep – epiderme, F –floema, FV - feixes vasculares, Pa – parênquima fundamental. TrT – tricomas tectores. X- xilema.

5.1.3.2 *Pecíolo*

Em secção transversal, observa-se que o pecíolo (Figura 9) é alado, apresenta formato convexo-convexo. A epiderme é uniestratificada com células de dimensões aproximadas e cutícula delgada. Ainda na epiderme são encontrados tricomas dos tipos tectores e glandulares semelhantes aos encontrados na lâmina foliar. Logo após a epiderme encontra-se o tecido de sustentação colênquima do tipo angular, entre 3 e 4 camadas, dispostas nos arcos adaxial e abaxial, alas laterais e adjacentes aos feixes vasculares floemáticos. O pecíolo é preenchido por parênquima fundamental, no qual se pode observar idioblastos (Figura 9C) contendo substâncias lipofílicas. Os feixes vasculares são do tipo colaterais abertos (Figura 9B) dispostos em semicírculos, mas também podem estar parcialmente fechados por feixes voltados para a face adaxial, conforme observado na Figura 9A.

Os resultados encontrados foram semelhante ao descrito nos trabalhos de Costa e Tavares (2006) e Sá et al. (2016). Se diferenciando apenas que no primeiro estudo houve descrição de feixes vasculares colaterais em arco parcialmente fechado, no segundo a descrição do arco aberto e neste trabalho verificou-se ambas situações.

Figura 9: *Dysphania ambrosioides* - Secção transversal do pecíolo, coloração Azul de alcian/safranina e Sudan III. A – aspecto geral. B – feixes vasculares em semicírculo. C – idioblastos (id) com substâncias lipofílicas



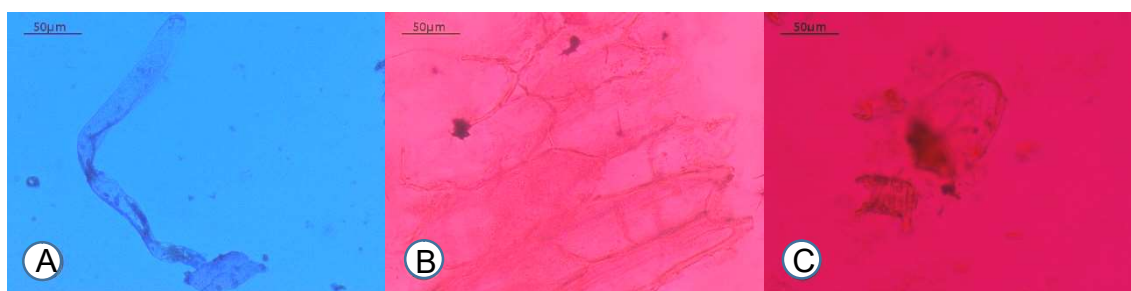
Legenda: Co – colênquima angular, Ep – epiderme, FV - feixes vasculares, Pa – parênquima, Tt – tricomas tectores, id - idioblastos com substâncias lipofílicas.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL

5.2.1 Identificação microscópica

Na análise microscópica da droga vegetal verificou-se a presença de fragmentos da epiderme (Figura 10B). Identificou-se a presença de tricomas tectores (Figura 10A) e glandulares (Figura 10C). No trabalho de Félix-Silva et al. (2012) observou-se de maneira similar os fragmentos de epiderme e tricomas tectores.

Figura 10: *Dysphania ambrosioides* – Microscopia da droga vegetal. Corante Azul de alcian e safranina: A- tricoma tector. Coloração com Steinmetz: B – epiderme, C – tricoma glandular capitado.



5.2.2 Determinação de teor de voláteis

A secagem adequada da droga vegetal é de fundamental importância no controle de qualidade, a fim de impedir possíveis contaminações e degradações dos constituintes químicos. Dessa forma, a Farmacopeia Brasileira 5ª edição estabelece um teor de umidade entre 8 e 14% (BRASIL, 2010). A umidade média obtida foi de 8,65% \pm 0,03 e desvio padrão relativo (DPR) de 0,42%, de acordo com o preconizado. Na literatura há relatos do experimento realizado a partir de folhas de *D. ambrosioides* que no Brasil apresentou teor de 8,9% e na Nigéria 10,9% (VALÉRIO et al., 2015; OKHALE et al., 2012).

5.2.3 Determinação de cinzas totais

O teor de cinzas totais de uma droga vegetal permite avaliar a presença de substâncias inorgânicas não voláteis de origem fisiológica como carbonatos, fosfatos, cloretos, e não fisiológica como areia, pedra, terra (Simões et al., 2017). O

teor médio obtido de cinzas totais foi de $11,01\% \pm 0,03$ e DPR $0,02\%$. Valor bem divergente ao relatado por Valério et al. (2015) que foi de $3,6\%$. A divergência ocorreu devido a droga vegetal da referida pesquisa ser composta por folhas e a deste estudo conter as partes aéreas de *D. ambrosioides*.

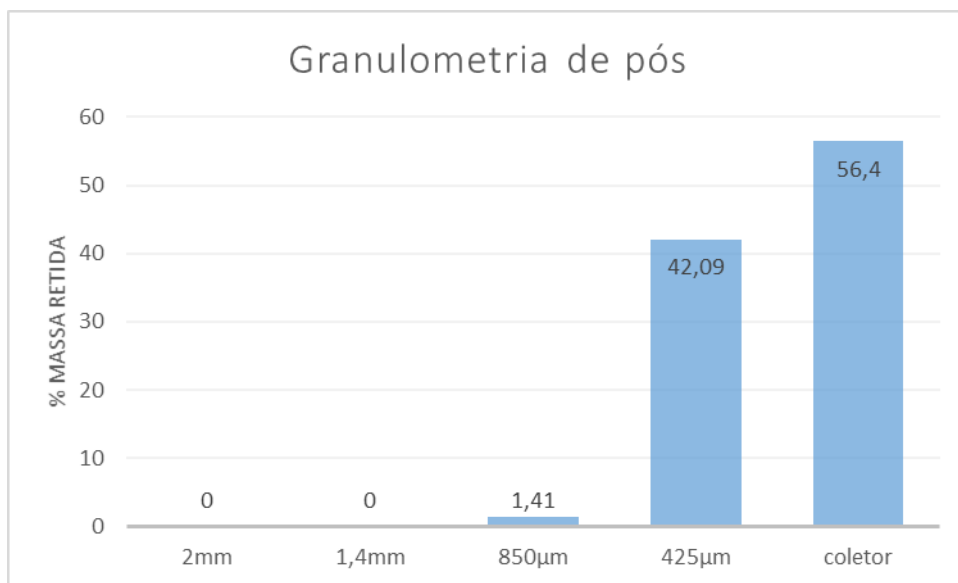
5.2.4 Determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico

A determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico tem por objetivo verificar a presença de cinzas de origem não fisiológica. Insumos naturais tendem a apresentar teores menores que 1% . Neste estudo o teor de cinzas insolúveis em ácido clorídrico foi de $0,54\% \pm 0,03$.

5.2.5 Granulometria do pó

A Farmacopeia Brasileira 5^o edição caracteriza como pó grosso aquele cuja totalidade atravessa um tamis com abertura nominal de $1700\mu\text{m}$ ou tem no máximo 40% de massa retida em malha de $355\mu\text{m}$. Neste ensaio verificou-se que até a abertura de $1400\mu\text{m}$ (Figura 11), a droga vegetal não ficou retida, caracterizando-a como pó grosso. O tamanho da partícula influencia no processo extrativo de percolação, pois quanto menor o tamanho maior a possibilidade de ocorrência do fenômeno de adsorção entre o pó e a umidade com a formação de aglomerados que impedem a passagem do líquido extrator ou torna a extração excessivamente demorada (LIST; SCHIMIDT, 1989; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Dessa forma uma granulometria com dimensões adequadas favorece a percolação.

Figura 11: Distribuição granulométrica da droga vegetal de *D. ambrosioides*



5.2.6 Determinação do índice de intumescência

O índice de intumescência permite avaliar o aumento do volume do material vegetal quando imerso em água. Este aumento pode ocorrer pela presença de mucilagens, gomas, pectina, hemicelulose (GIL, 2010). A média do índice de intumescência foi de $0,2 \pm 0,26$ ml. O baixo índice encontrado constitui um parâmetro importante na percolação, pois permite estimar a quantidade de líquido extrativo a ser adicionado durante o processo e reduz dificuldades no seu escoamento decorrentes de intumescimento (COUTO et al., 2009).

5.2.7 Triagem fitoquímica

Na triagem fitoquímica da droga vegetal proveniente de partes aéreas de *D. ambrosioides* foram verificadas a presença de flavonoides, compostos fenólicos, heterosídeos antraquinônicos, taninos, heterosídeos cardioativos (triterpenos).

Há muita divergência quanto à ocorrência de heterosídeos antraquinônicos, alcaloides, saponinas e taninos na espécie. O estudo de Felix-Silva et al. (2012) revelou a presença de cumarinas, alcaloides, taninos, flavonoides, esteroides, triterpenos no extrato aquoso de folhas de *D. ambrosioides* do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Outros estudos realizados com a planta inteira no Paquistão e com

as folhas da espécie vegetal da Nigéria além destes resultados encontraram a presença de saponinas e ausência de heterosídeos antraquinônicos (OKHALE et al., 2012; BEGUM et al., 2015).

Jesus et al. (2018) identificaram presença de flavonoides, heterosídeos antraquinônicos, alcaloides, taninos, heterosídeos digitálicos no extrato etanólico de folhas de *D. ambrosioides* de Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil. Já num estudo no município de Alegre, Espírito Santo, Brasil. em sua prospecção identificaram triterpenos, esteroides, flavonoides, compostos fenólicos, taninos, saponinas (MARINS et al., 2011). Alencar et al. (2010) encontraram flavonoides, compostos fenólicos, heterosídeos antraquinônicos, taninos e terpenoides em folhas da planta do município de Altinho, Pernambuco, Br e foi o trabalho cujos resultados mais se aproximaram deste, entretanto não houve a pesquisa para saponinas e heterosídeos cianogênicos.

Os teores de metabólitos secundários podem ser influenciados pela luminosidade, umidade, temperatura, idade e desenvolvimento da planta, sazonalidade, altitude, nutrientes, estímulos mecânicos, ataques de patógenos, de herbívoros entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; METLEN; ASCHEHOUG; CALLAWAY, 2009; PAVARINI et al., 2012). Certamente um ou mais destes fatores podem ter influenciado nas pesquisas citadas, uma vez que foram realizadas em locais diferentes e não são conhecidas as condições climáticas de cultivo e coleta.

5.2.8 Perfil do óleo essencial de partes aéreas de *Dysphania ambrosioides*.

Fatores ambientais como altitude, luminosidade, intensidade da radiação solar, umidade, estágio de desenvolvimento da planta, parte coletada, forma de armazenamento, interferem tanto na qualidade quanto na quantidade de constituintes dos óleos essenciais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; PAULUS et al., 2016).

No presente estudo evidenciou-se que a composição química do óleo essencial das partes aéreas de *D. ambrosioides* constituía-se de 82,19% de monoterpenos, 10,68% sesquiterpenos e 7,13% aldeídos, os principais componentes encontrados foram trans-glicol-ascaridol (7,88%), ascaridol (7,41%), carvacrol (3,93%), nerolidol (3,8%) e *p*-cinemo (3,7%), conforme Tabela 7. O rendimento da extração foi 0,008%, na literatura há registros de rendimentos desde

0,06% (ONOCHA; EKUNDAYO, 1999) a 1,15% (DEGENHARDT et al., 2016) para óleo essencial de folhas *D. ambrosioides*, evidenciando como fatores citados acima podem influenciar no rendimento da extração.

Entre os principais componentes do óleo essencial de *D. ambrosioides* descritos na literatura encontram-se o ascaridol e seus isômeros, α -terpineno, p-cimeno. Ao ascaridol são atribuídas inúmeras propriedades farmacológicas da espécie vegetal e pode constituir até 80% do óleo essencial em extrações feitas a partir de folhas e sementes (JARDIM et al., 2008; DEMBITSKY; SHKROB; HANUS, 2008; KANDPAL; JOSHI; JOSHI, 2016). Estudos relatam porcentagens superiores a 80% de ascaridol no óleo essencial para extrações realizadas de partes aéreas frescas (SOUZA et al., 2015; PAES et al., 2015).

Tabela 7: Composição química do óleo essencial de partes aéreas de *Dysphania ambrosioides*

Identificação	Índice de retenção	Percentual (%)
p-cimeno (monoterpeno)	1021	3,7
n-nonanal (aldeído)	1102	2,53
cimen-8-ol (monoterpeno)	1184	1,8
α -terpineol (monoterpeno)	1192	1,74
Ascaridol (monoterpeno)	1235	7,41
cis-piperitone-epóxido (monoterpeno)	1250	2,77
trans-glicol-ascaridol (monoterpeno)	1271	7,88
Carvacrol (monoterpeno)	1296	3,93
Nerolidol (sesquiterpeno)	1661	3,80

Por outro lado, Sá et al. (2014) num óleo essencial obtido a partir de folhas frescas da cidade de Recife, Pernambuco, Brasil (Br) encontraram 42,14% de α -terpineno, 31,57% de α -terpinenil-acetato, 7,90% de timol e apenas 0,87% de ascaridol. Uma pesquisa análoga na cidade de Lavras, Minas Gerais, Brasil, detectou 40,73% de α -terpineno, 21,81% de p-cimeno, 12,49% de trans-ascaridol (SANTIAGO et al., 2016). Já um estudo do lêmên com óleo obtido a partir de folhas

secas os principais compostos encontrados foram o ascaridol (54,2%), isoascaridol (27,7%) e *p*-cimeno (8,1%) (AL-KAF et al., 2016).

Chekem et al. (2010), em estudo realizado em Camarões, obtiveram um óleo a partir de partes aéreas frescas cuja composição era de 0,7% de ascaridol, 51,3% de α -terpineno, 23,4% de *p*-cimeno, 15,3% de *p*-menta-1,8-dieno. A pesquisa sugere a existência de diferentes quimiotipos de *D. ambrosioides*, que adicionados a fatores ambientais acarretam tamanha variação na composição dos óleos.

Outro fator a ser considerado é a termossensibilidade do ascaridol, quando o composto é submetido a uma temperatura de 150 °C forma o isoascaridol e ainda não foi possível medir a interferência desta isomerização na quantificação de ascaridol (CAVALLI et al., 2004).

5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RUTINA POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA

O desenvolvimento de um método analítico constitui uma importante ferramenta no controle de qualidade de fitoterápicos. E precisa contemplar situações como extrações das substâncias de interesse provenientes de uma matriz complexa, fotoestabilidade, estabilidade térmica, a inexistência de substância de referência, a variação da composição química, época do ano, localidade (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010), para que enfim permita a identificação e doseamento do marcador químico tanto na droga vegetal, quanto no produto intermediário e produto acabado (YAN et al., 2014).

Métodos cromatográficos têm sido adotados como forma de identificação e doseamento de marcadores químicos por garantirem rapidez, confiabilidade e reprodutibilidade das análises. Para substâncias voláteis emprega-se a cromatografia gasosa, contudo a técnica é limitada quando o analito não pode ser volatilizado. Por outro lado, a cromatografia a líquido de alta eficiência permite que a maioria dos metabólitos secundários sejam analisados (SIMÕES et al., 2017).

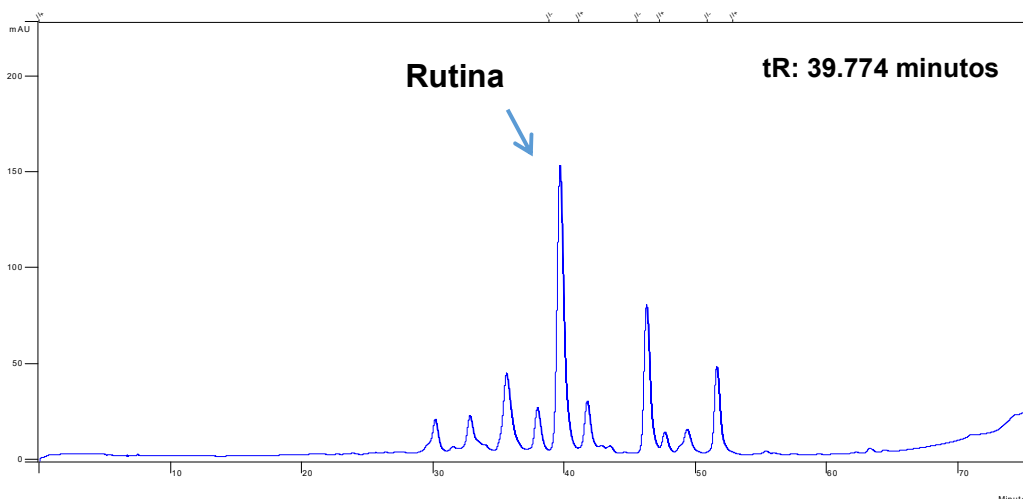
Inicialmente cogitou-se como marcador o ascaridol com a finalidade de avaliar o impacto do terpeno no extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *D. ambrosioides*, no entanto, dificuldades em obter ou mesmo isolar a substância de referência trouxe a necessidade de escolha de um novo marcador. Após contato com estudo de

Barros et al. (2013) verificou-se que no perfil cromatográfico do liofilizado de partes aéreas *D. ambrosioides* identificou-se a presença de inúmeros flavonoides sendo rutina e quercetina os majoritários.

O método cromatográfico utilizado consistia em um gradiente de fase móvel acetonitrila e água acidificada com ácido fórmico a 0,01%. No extrato hidroalcolico identificou-se somente a rutina. No presente trabalho a utilização deste método com adaptações mostrou-se inadequado para o isolamento do pico correspondente à rutina no cromatograma. Outros métodos voltados para identificação da rutina também foram testados como o método adaptado da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010) e de Piana et al. (2013). Todos os métodos citados não foram eficientes na separação de rutina no extrato bruto de *D. ambrosioides* de acordo com o observado na Figura 12.

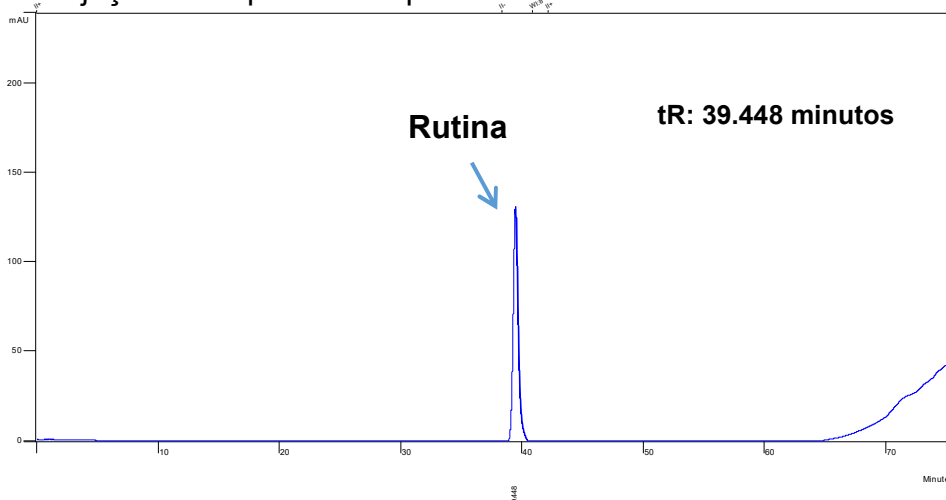
Por fim, as condições metodológicas adaptadas do método de Jesus et al. (2018) permitiram a separação adequada da rutina. A fase móvel empregada foi água acidificada em ácido acético 2% e metanol, em gradiente. O fluxo foi de 1,0 mL/min, o volume de injeção foi de 20 μ L e o comprimento de onda foi de 360nm. Para o extrato bruto de partes aéreas de *D. ambrosioides* (Figura 13) foi identificada a rutina (Figura 14) como marcador químico (TR=39,448). Deste modo, estabeleceu-se uma metodologia para determinação do flavonoide rutina no extrato bruto de *D. ambrosioides* por CLAE, que está em processo de validação de acordo com procedimentos estabelecidos pela ANVISA como forma de agregar valor ao controle de qualidade da planta.

Figura 13: Cromatograma do extrato bruto obtido a partir da droga vegetal de partes aéreas de *D. ambrosioides* Método Jesus et al. (2018) adaptado.



Condições cromatográficas: eluição em gradiente de metanol e ácido acético 2%, fluxo de 1,0 mL/min, o volume de injeção de 20 μ L e o comprimento de onda de 360 nm.

Figura 14: Cromatograma do padrão rutina. Método Jesus et al. (2018) adaptado: eluição em gradiente de metanol e ácido acético 2%, fluxo de 1,0 mL/min, o volume de injeção de 20 μ L e o comprimento de onda de 360 nm.

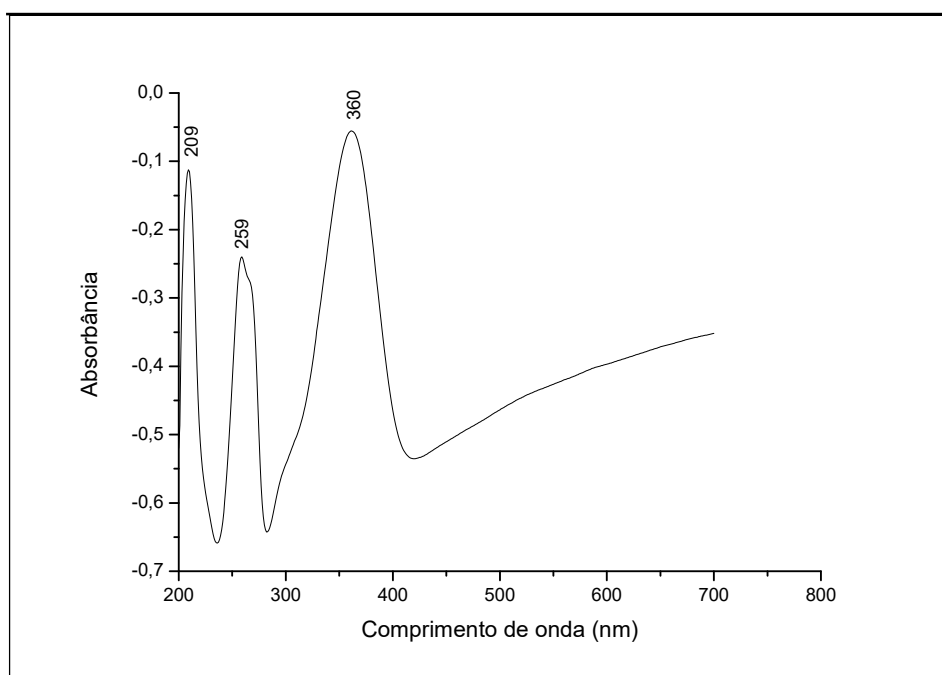


5.3.1 Identificação de constituintes e seleção do marcador químico

Embora existam vários estudos sobre as atividades farmacológicas do extrato de *D. ambrosioides*, nota-se uma carência de métodos validados para identificação e doseamento de marcadores químicos. A escolha do marcador foi direcionada por duas pesquisas a de Barros et al. (2013) e Jesus et al. (2018). O último foi determinante no sentido de obter separação satisfatória e com pico mais intenso para o flavonoide rutina.

O marcador químico apresenta núcleo cromóforo que absorve fortemente na região do ultravioleta (UV), mediante a varredura espectrofotométrica foram identificados picos de absorção na região de 209nm, 259nm e 360nm (Figura 15). O primeiro pico sofreu interferência da fase móvel, pois é a região de absorção do metanol (LANÇAS, 2009). Já o pico 2 reflete a faixa de absorção da banda II do núcleo flavânico e o pico 3 a faixa da banda I do núcleo (SIMÕES et al., 2017). Como na faixa de absorção da banda I houve uma maior intensidade de absorção, adotou-se o comprimento de 360 nm para identificação de rutina no extrato bruto de partes aéreas de *D. ambrosioides*.

Figura 15: Espectro de varredura do padrão rutina



5.3.2 Validação parcial de metodologia analítica cromatográfica

5.3.2.1 Adequabilidade do sistema

A verificação da adequabilidade do sistema (*System Suitability*) é de suma importância e deve ser realizado antes e durante as análises, a fim de garantir que o sistema (bomba, injetor, detector e coluna) esteja operando de maneira adequada (PALLASTRELLI, 2013).

A Tabela 8 apresenta os valores obtidos para os parâmetros avaliados na adequabilidade do sistema com base em três injeções consecutivas da solução amostra do extrato bruto das partes aéreas de *D. ambrosioides*. Vários fatores podem interferir no correto desempenho do sistema, como, características químicas da fase móvel e fase estacionária, pH da fase móvel, tamanho das partículas, volume de injeção, entre outros (PALLASTRELLI, 2013).

Tabela 8: Valores médios (\pm DP) dos critérios de adequabilidade do sistema (*System suitability*) obtidos para o extrato etanólico das partes aéreas de *D.ambrosioides*

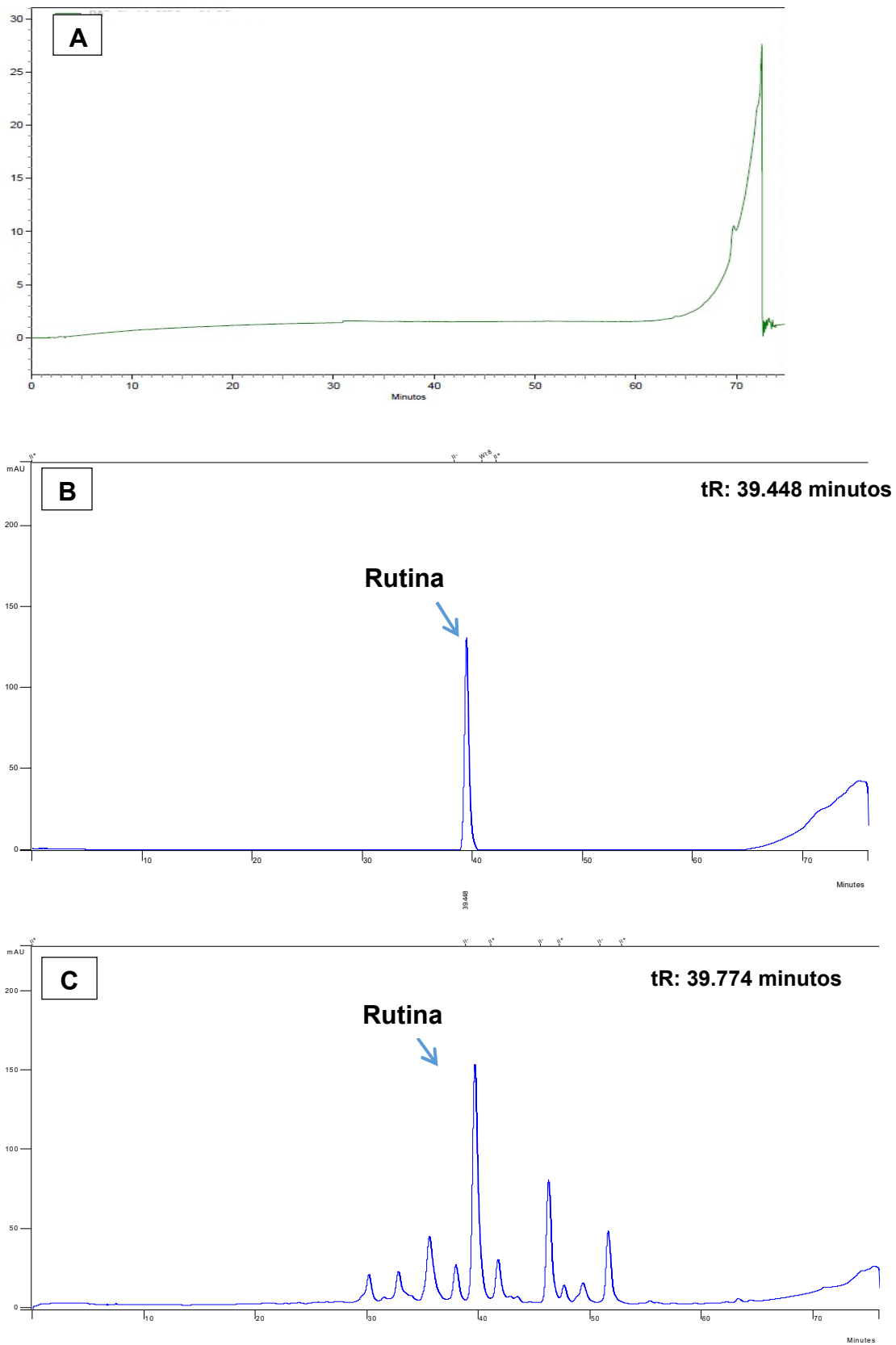
System suitability				
	Fator de cauda (tailing)	Resolução (Rs)	Pratos teóricos	Fator de capacidade (k')
Pico da rotina no extrato	1.15 ($\pm 0,09$)	2,96 ($\pm 0,18$)	35001 ($\pm 4,41$)	30.76 ($\pm 0,08$)
Limites ICH (2005)	≤ 2	≥ 2	> 2000	> 2

Todos os parâmetros de *system suitability* se mostraram dentro dos valores preconizados, demonstrando que o método escolhido é adequado para separação e quantificação correta do marcador rotina no extrato de *D. ambrosioides*, estando, portanto, apto para fornecer resultados confiáveis nas demais etapas de validação.

5.3.2.2 Seletividade

A seletividade do método foi comprovada mediante a comparação dos cromatogramas do diluente (metanol e solução aquosa de ácido acético à 2%), da solução do padrão rotina e do extrato etanólico bruto de *Dysphania ambrosioides* (Figura 16).

Figura 16: Perfis cromatográficos via CLAE do diluente (A), da solução padrão rutina (B) e do extrato etanólico bruto de *D.ambrosioides* (C)



Condições: coluna C18; Eluição gradiente; Fase móvel: metanol e água em ácido acético a 2%; Fluxo de 1,0 mL/min; Comprimento de onda: 360nm; Volume de injeção: 20µL.

A seletividade de um método se deve à capacidade deste em identificar ou quantificar uma substância de interesse, no caso de materiais vegetais, o método deve ser capaz também de diferenciar o material de interesse de outras substâncias semelhantes (BRASIL, 2017a). No teste realizado não foi observada a interferência do diluente durante a eluição, não houve detecção de outros componentes no tempo de retenção do marcador rutina a 360nm, demonstrando que o método escolhido é seletivo.

5.3.2.3 Linearidade

O método mostrou-se linear no intervalo de 31,25 a 1000 µg/mL (Figura 17), com a seguinte equação representativa: $y = 13572x - 113420$ ($R = 0,9981$ e $R^2 = 0,9998$), estimada pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinário (MMQO). A escolha do MMQO foi definida após considerar a variância das respostas (absorvâncias) para cada concentração de rutina empregada no intervalo (C), ao nível de significância de 5%. A Tabela 9 contém as áreas dos picos do padrão rutina utilizadas para a construção da curva de calibração.

Figura 17: Curva de calibração média do padrão rutina.

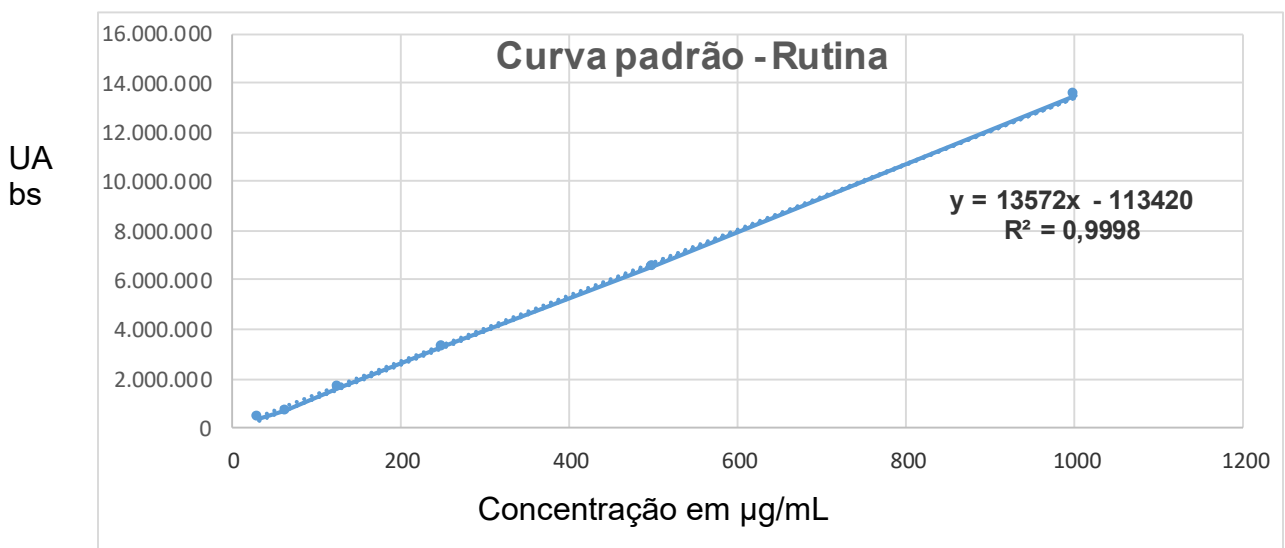


Tabela 9: Áreas dos picos do padrão rotina utilizadas na construção da curva padrão

Rutina (µg/mL)	Área rotina (mAU.s)	Média	DPR (%)
31,25 31,25 31,25	373.623 369.024 377.481	373.376	0.92
62,5 62,5 62,5	741.770 643.774 667.476	684.340	6.10
125 125 125	1.707.261 1.585.262 1.592.507	1.628.343	3.43
250 250 250	3.360.851 3.278.390 3.238.521	3.292.587	1.54
500 500 500	7.094.699 6.009.695 6.528.402	6.544.265	6.77
1000 1000 1000	14.182.106 12.995.759 13.368.539	13.515.468	3.66

Legenda: DPR – Desvio Padrão Relativo

A homocedasticidade dos dados foi confirmada pelo cálculo da constância das variâncias (C) das concentrações, cujo valor foi de 0,546, portanto inferior ao valor de C crítico (0,616), determinado como limite para o experimento (BRASIL, 2017b).

A ANOVA mostrou que o coeficiente angular foi estatisticamente diferente de zero ($p = 7,87 \times 10^{-21}$) (Tabela 12) e o coeficiente linear não foi estatisticamente diferente de zero ($p = 0,265$), demonstrando a linearidade do método. A análise dos resíduos é demonstrada na Figura 18, demonstra a distância entre os valores reais do intervalo linear e os valores estimados. Para tanto, os resíduos além de homocedásticos devem apresentar uma distribuição independente, confirmada neste estudo, pelo teste de Durbin-Watson ($p = 0,946$). Dessa forma, pode-se inferir que o método é capaz de gerar respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de flavonoides (BRASIL, 2017b).

Figura 18: Gráficos de dispersão de resíduos para a linearidade do método cromatográfico.

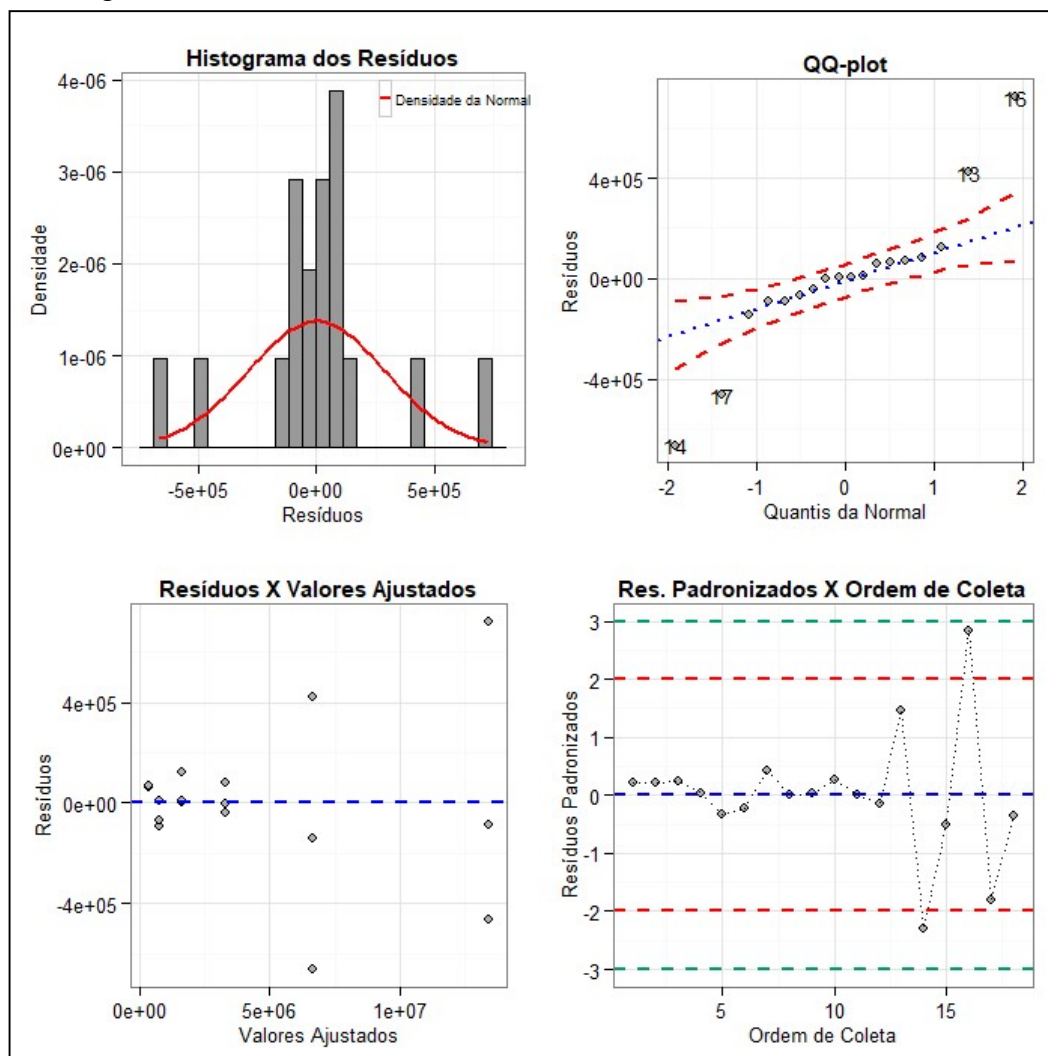


Tabela 10: Dados da ANOVA obtidos pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários para a linearidade, na quantificação de rutina pelo método cromatográfico

	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Concentração de rutina (µg/mL)	1	$3,80 \times 10^{14}$	$3,80 \times 10^{14}$	4238,53	$7,87 \times 10^{-21}$
Resíduos	16	$1,43 \times 10^{12}$	89583521587		

Legenda: GL- graus de liberdade

Portanto, todos os dados demonstrados acima se mostraram em conformidade com as especificações da RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos, demonstrando a capacidade do

método em ser linear, determinando áreas diretamente proporcionais à concentração do marcador na amostra.

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS, EXPRESSOS COMO RUTINA, NAS PARTES AÉREAS DE *D. ambrosioides*

5.4.1 Seletividade

A seletividade do método foi comprovada através de 7 leituras espectrofotométricas do extrato, em 364 nm, e comparação com a leitura do padrão rutina na concentração teórica (16 µg/ml), no mesmo comprimento de onda.

Os resultados para a seletividade do método espectrofotométrico são apresentados na Tabela 11. Após as leituras dos 7 extratos preparados na mesma concentração teórica do padrão rutina verificou-se o teor de recuperação médio de 100,95% e Desvio Padrão Relativo (DPR) de 3,41%, demonstrando a seletividade do método, ou seja, sua capacidade em quantificar flavonoides totais mesmo na presença de componentes da matriz (BRASIL, 2017^a).

Tabela 11: Dados de seletividade para quantificação de flavonoides totais, expressos como equivalentes de rutina, nas folhas de *D. ambrosioides* para o método espectrofotométrico

Extrato	Absorvância (nm)	Concentração (µg/mL)	Recuperação (%)
Extrato 1	0,362	16,280	101,75
Extrato 2	0,345	15,592	97,45
Extrato 3	0,350	16,188	101,175
Extrato 4	0,371	16,738	104,6125
Extrato 5	0,340	15,362	96,0125
Extrato 6	0,358	16,144	100,19
Extrato 7	0,373	16,876	105,475
Média	0,357	16,168	100,95
DPR (%)	3,543	3,407	3,426

Legenda: DPR – desvio padrão relativo

5.4.2 Linearidade

O método mostrou-se linear no intervalo analisado (Figura 19), com a seguinte equação representativa: $y = 0,0218x + 0,0051$ ($R=0,9994$), estimada pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinário (MMQO). A escolha do MMQO foi definida após considerar a variância das respostas (absorvâncias) para cada concentração de rutina empregada no intervalo (C), ao nível de significância de 5%. O valor de C calculado foi de 0,474, portanto inferior ao valor de C crítico que é de 0,561 (BRASIL, 2017b), confirmando a constância na variância, ou seja, a homocedasticidade dos dados. A ANOVA mostrou que o coeficiente angular foi estatisticamente diferente de zero ($p = 2,206 \times 10^{-29}$) (Tabela 12) e o coeficiente linear não foi estatisticamente diferente de zero ($p = 0,166$), demonstrando a linearidade do método. A análise dos resíduos é demonstrada na Figura 20. Essa análise quantifica a distância entre os valores reais do intervalo linear e os valores estimados. Para tanto, espera-se que os resíduos além de homocedásticos, tenham uma distribuição normal, confirmada neste estudo, pelo teste de Anderson-Darling ($p = 0,05$). Os parâmetros estatísticos avaliados confirmam que o método é capaz de gerar respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de flavonoides (BRASIL, 2017b).

Figura 19: Curva de calibração média do padrão rutina no intervalo de concentração de 1,25 a 40 μ g/ml para o comprimento de onda de 364nm

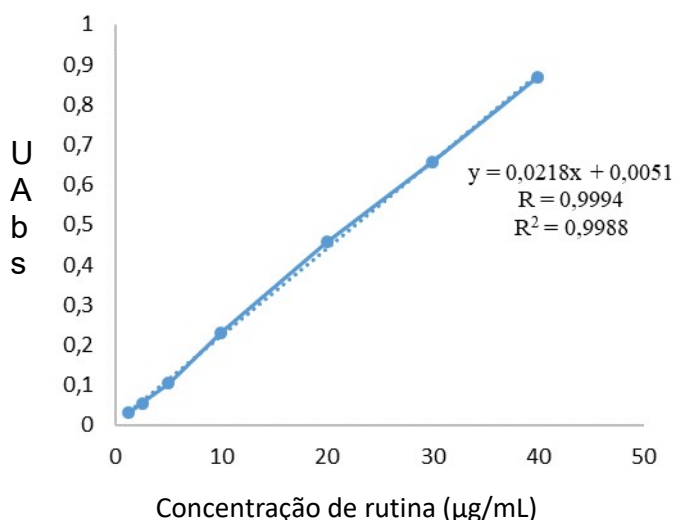


Figura 20: Gráficos de dispersão de resíduos para a linearidade do método espectrofotométrico

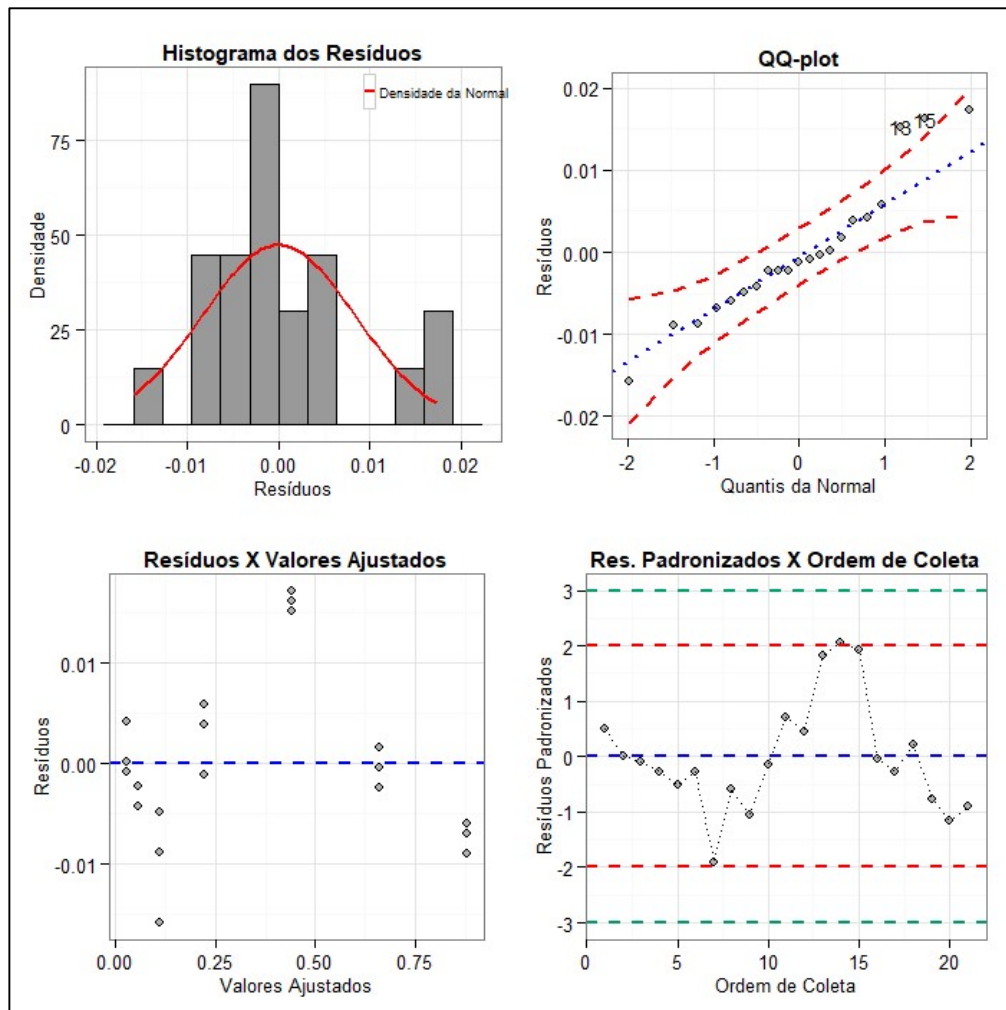


Tabela 12: Dados de ANOVA obtidos pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários para a linearidade, na quantificação de flavonoides totais, expressos como equivalentes de rutina, pelo método espectrofotométrico

	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Concentração de rutina (µg/mL)	1	1,915147518	1,915147518	16462,89718	2,206x10 ⁻²⁹
Resíduos	19	0,002210292	0,000116331		

Legenda: GL- graus de liberdade

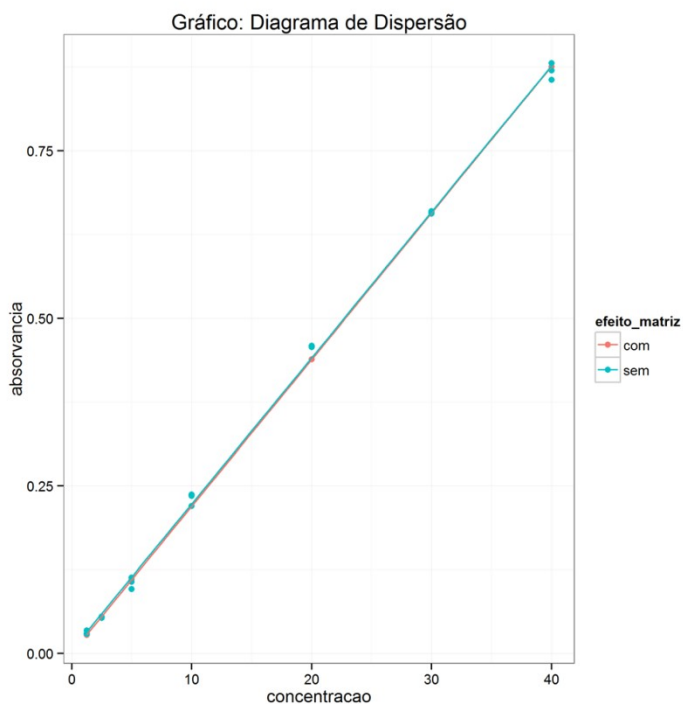
5.4.3 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção indica a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas no método. O limite de quantificação é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas no método (BRASIL, 2017a). Para o presente estudo, os limites de detecção e quantificação, estimados com base no desvio padrão do intercepto com o eixo y, foram de 0,535 e 1,622 µg/mL, respectivamente. Esses mesmos limites estimados com base no desvio padrão dos resíduos foram de 1,632 e 4,947 µg/mL, respectivamente.

5.4.4 Efeito Matriz

O efeito de componentes da matriz sobre a resposta analítica deve ser determinado, especialmente, para amostras constituídas por matrizes complexas (BRASIL, 2017a), como os extratos vegetais. O paralelismo das retas, determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com o padrão analítico e com a amostra fortificada com o padrão analítico nos mesmos níveis de concentração da linearidade, é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz (BRASIL, 2017a). O diagrama de dispersão gerado para as duas curvas de calibração é demonstrado na Figura 21. Os testes de comparação (Teste de F) das curvas demonstraram não haver diferença significativa, ao nível de 5% de significância, para a igualdade do intercepto ($p = 0,212$), paralelismo das retas ($p = 0,588$) e coincidência ($p = 0,382$), confirmando a ausência de efeito de componentes da matriz na resposta analítica.

Figura 21: Diagrama de dispersão das absorvâncias (364nm) em função das concentrações de flavonoides, construído a partir do padrão rutina e da amostra fortificada com o padrão rutina, nos mesmos níveis de concentração da linearidade (1,25 – 40 µg/mL).



5.4.5 Precisão, Exatidão e Robustez

Na determinação da precisão do método (Tabela 13), no dia 1 (analista 1) obteve-se Desvio Padrão Relativo (DPR) de 9,85% para as concentrações de flavonoides totais nas seis amostras preparadas a 100% da concentração do teste. No dia 2 (analista 2) o DPR foi de 13,07% e o DPR inter-dia foi de 12,24%.

Os resultados da exatidão, obtidos pelo método de recuperação são demonstrados na Tabela 14. As amostras fortalecidas com o padrão rutina apresentaram recuperação média de 91,106% \pm 5,45 e DPR de 5,99%.

Na robustez, o DPR para as concentrações de flavonoides totais obtidas em 364nm foi de 8,66% e em 366nm de 8,64%; em relação ao tempo de extração o DPR intersolvente no comprimento de onda de 364nm foi de 5,85%, e em 366nm foi de 3,52% e o DPR entre os comprimentos de onda foi de 2,69%. O guia de orientação para registro de medicamento fitoterápico e registro e notificação de produto tradicional fitoterápico (BRASIL, 2014b) preconiza que o valor máximo aceitável de DPR na validação de métodos analíticos deve ser definido de acordo

com o método empregado, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, entretanto, os resultados de DPR não devem ser superiores a 15%. Portanto, o método demonstrou ser adequado para a quantificação de flavonoides totais em *D. ambrosioides*.

Tabela 13: Dados de precisão para a quantificação de flavonoides totais, expressos como equivalentes de rutina, pelo método espectrofotométrico

Extrato	Absorvância (364 nm)	Concentração (µg/mL)
Intra-dia (Analista 1, dia 1)		
1	0,312	14,07798
2	0,315	13,98624
3	0,360	16,27982
4	0,345	15,59174
5	0,401	18,11468
6	0,340	15,36239
Média	0,345	15,56881
DPR (%)	9,488	9,84945
Intra-dia (Analista 2, dia 2)		
1	0,380	17,19725
2	0,320	14,44495
3	0,424	19,21560
4	0,317	14,30734
5	0,418	18,94037
6	0,411	18,61927
Média	0,378	17,12080
DPR (%)	12,891	13,06732
Inter-dia		
Média	0,361	16,34480
DPR (%)	12,065	12,23758

DPR: Desvio padrão relativo.

Tabela 14: Dados da exatidão para a quantificação de flavonoides totais, expressos como equivalentes de rutina, pelo método espectrofotométrico

Nível de concentração da amostra em relação ao intervalo linear (%)	Concentração de flavonoides totais na amostra (µg/mL)	Concentração de flavonoides totais na amostra fortalecida com o padrão rutina (µg/mL)	Recuperação (%)
baixa	5,45413	20,86697	96,33028
	5,22477	21,09633	99,19725
	5,36239	21,14220	98,62385
média	7,28899	21,32569	84,57569
	7,19725	21,50917	88,87615
	7,42661	21,00459	86,29587
alta	7,83945	21,92202	88,01606
	7,65596	21,87615	88,87615
	7,74771	22,01376	89,16284
Concentração teórica do padrão rutina		16 µg/ml	
		Média	91,10601
		DPR (%)	5,99097

DPR: Desvio padrão relativo

5.5 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS

Neste estudo foram utilizadas duas técnicas extrativas na produção de extratos hidroetanólicos a partir das partes aéreas de *D. ambrosioides*, a primeira obtida através da extração assistida por ultrassom (EAU) visando desenvolvimento e otimização da técnica e a segunda obtida pela maceração seguida de percolação da droga vegetal, produzida para o desenvolvimento tecnológico de extratos secos.

5.5.1 Otimização das condições de EAU de flavonoides totais a partir das partes aéreas de *D. ambrosioides*.

A ANOVA e a regressão linear/quadrática múltipla empregando a Metodologia de Superfície de Resposta demonstraram que na primeira bateria de experimentos o

modelo empregado foi significativo ($p=0,0011$), sem falta de ajuste ($p=0,076227$) e o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,84827 e o r^2 ajustado de 0,57 para flavonoides totais. Na Tabela 15 observa-se um efeito linear significativo ($p<0,05$) do tempo (1L), temperatura (2L) e teor alcóolico (3L) e um efeito quadrático significativo na variável tempo e na interação temperatura (2L)/ teor alcóolico(3L).

Tabela 15: Análise de variância para a primeira bateria de experimentos do modelo de regressão quadrática polinomial para a extração assistida por ultrassom de flavonoides totais, expressos como equivalentes de rutina, nas partes aéreas de *D. ambrosioides*

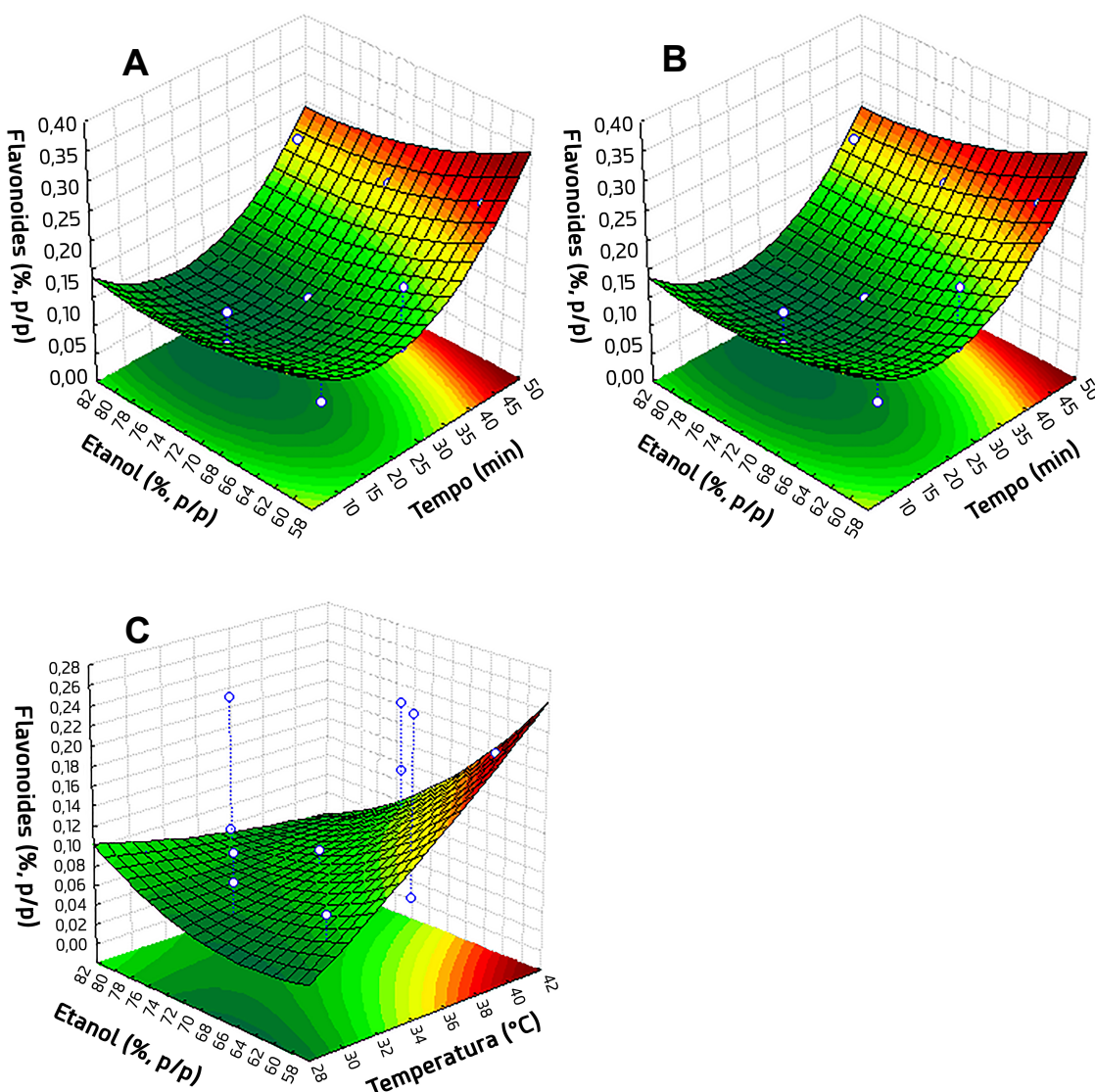
Fator	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F	p
1L	0.021084	1	0.021084	81.1372	0.0121*
1Q	0.015558	1	0.015558	59.8710	0.0163*
2L	0.005783	1	0.005783	22.2563	0.0421*
2Q	0.000043	1	0.000043	0.1648	0.7241
3L	0.007230	1	0.007230	27.8253	0.0341*
3Q	0.001434	1	0.001434	5.5177	0.1433
1L e 2L	0.000373	1	0.000373	1.4340	0.3538
1L e 3L	0.000432	1	0.000432	1.6619	0.3263
2L e 3L	0.005141	1	0.005141	19.7834	0.0470*
Falta de ajuste	0.009574	3	0.003191	12.2817	0.0762
Erro puro	0.000520	2	0.000260		0.0121
Soma quadrados total	55513.26	14			

Legenda: 1 - tempo de extração (minutos); 2 - temperatura (°C); 3 - teor alcóolico (% p/p); L - linear; Q - quadrático; * $p\leq 0,05$

Os gráficos de superfície de resposta (Figuras 22A, 22B e 22C) destacam os efeitos das variáveis independentes sobre os teores de flavonoides da primeira bateria de experimentos. A Figura 22A mostra que a extração máxima de flavonoides foi observada a temperaturas acima de 30°C e de 40 minutos de extração, demonstrando o efeito linear dos parâmetros. Na Figura 22B, o máximo de extração de flavonoides foi alcançado acima de 40 minutos de extração e teores de etanol de 60% (p/p). A Figura 22C mostra que os maiores teores de flavonoides

foram observados em temperaturas superior a 36°C em teores de etanol inferiores a 60% (p/p), mostrando a interação entre temperatura e teor de etanol. O modelo indicou que as melhores condições de extração dos flavonoides estavam fora da área experimental, por isso novas condições foram propostas.

Figura 22: Gráficos de superfície de resposta (A – C) do primeiro experimento de extração assistida por ultrassom (EAU) de flavonoides, expressos como equivalentes de rutina, das partes aéreas de *D. ambrosioides*



A ANOVA e a regressão linear/quadrática múltipla empregando a MSR da segunda bateria de experimentos demonstraram que o modelo empregado foi significativo ($p = 0,0033$), sem falta de ajuste ($p = 0,31321$), o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,77362 e o r^2 ajustado de 0,37 para flavonoides totais. Na

Tabela 16, considerando significativo valor de $p \leq 0,1$, observa-se um efeito linear significativo do tempo (1L) e da temperatura (2L) sobre os teores de flavonoides totais.

Tabela 16: Análise de variância para a segunda bateria de experimentos para o modelo de regressão quadrática polinomial para flavonoides totais, expressos como equivalentes de rutina

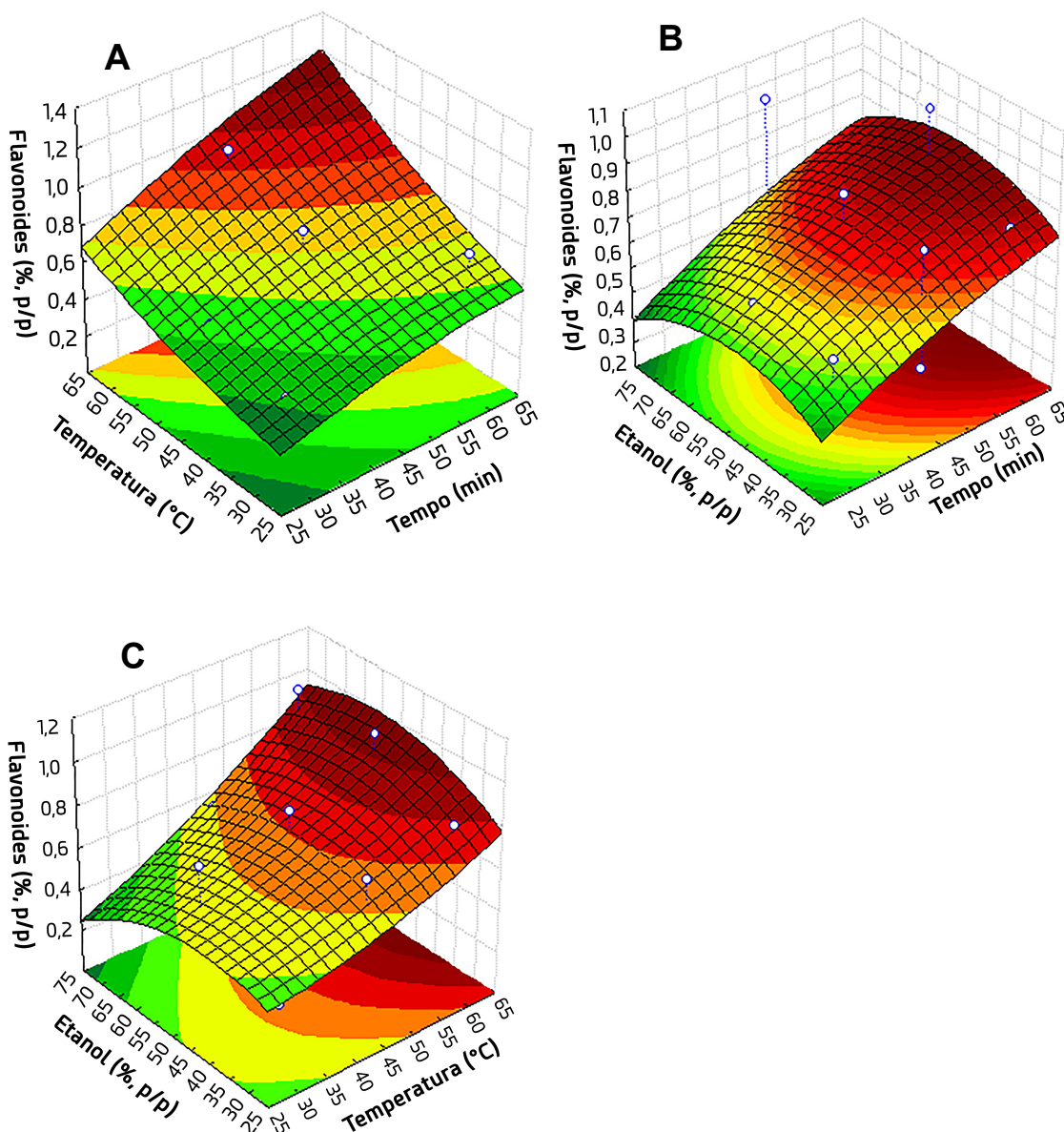
Fator	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F	P
1L	0.167441	1	0.167441	10.4427	0.0839*
1Q	0.001855	1	0.001855	0.1157	0.7661
2L	0.275945	1	0.275945	17.2097	0.0535*
2Q	0.002587	1	0.002587	0.1614	0.7268
3L	0.001072	1	0.001072	0.0669	0.8201
3Q	0.028840	1	0.028840	1.7986	0.3119
1L e 2L	0.005744	1	0.005744	0.3582	0.6103
1L e 3L	0.000368	1	0.000368	0.0229	0.8935
2L e 3L	0.011377	1	0.011377	0.7095	0.4883
Falta de ajuste	0.113107	3	0.037702	2.3513	0.3123
Erro puro	0.032069	2	0.016034		
Soma quadrados total	0.641281	14			

Legenda: 1 - tempo de extração (minutos); 2 - temperatura (°C); 3 - teor alcoólico (% p/p); L - linear; Q - quadrático; * $p \leq 0,1$

O efeito linear do tempo de extração e da temperatura sobre os teores de flavonoides totais, expressos como equivalentes de rutina, ficou evidenciado na Figura 23A. As Figuras 23B e 23C mostram que os teores alcoólicos exerceram pouca influência na extração de flavonoides e mais uma vez destaca o efeito linear dos parâmetros tempo e temperatura, pois a eficiência máxima de extração ocorreu próxima aos pontos altos destas variáveis. De modo que as melhores condições de extração para as variáveis analisadas neste estudo, determinadas pela função geral de otimização do modelo foram: tempo de extração de 59,308 minutos, temperatura de 57,335°C e teor alcoólico de 56,968% (p/p). Nestas condições o teor de flavonoides, expressos em equivalentes de rutina, predito pelo modelo foi de

1,012%. Essas condições foram validadas em triplicata e obteve-se uma média de 1,091% e um DPR 0,17%, o equivalente a 107,81% do valor previsto, demonstrando a validade do modelo.

Figura 23: Gráficos de superfície de resposta (A – C) do segundo experimento de extração assistida por ultrassom (EAU) de flavonoides, expressos como equivalentes de rutina, das partes aéreas de *D. ambrosioides*



Investigações recentes sobre a otimização de EAU para flavonoides de espécies variadas mostraram alguns resultados consistentes com o presente trabalho. As condições ótimas para os EAU dos flavonoides do caule de *Chenopodium hybridum* foram alcançadas a temperaturas de 78,69 °C, teor de

etanol de 76,62% e tempo de extração de 30 min. Para folhas de *Camellia fascicularis*, as condições ótimas para a EAU de flavonoides foram atingidas na temperatura de 72,3 °C, teor de etanol de 40% e tempo de extração de 1,6h. Entretanto, para as partes aéreas de *Cryptotaenia japonica*, as condições ótimas para a EAU dos flavonoides foram atingidas no tempo de extração de 70 min e teor de etanol de 55% (Lu et al., 2015, Wu et al., 2016, Liu et al., 2018).

Na otimização da EAU dos flavonoides das partes aéreas de *D. ambrosioides*, não foi possível avaliar temperaturas acima de 60 °C, devido às limitações do equipamento de ultrassom; no entanto, a análise gráfica das superfícies de resposta indica a possibilidade de extrações de eficiência máxima em temperaturas superiores a 60 °C (Figuras 23A, 23C). Em relação ao teor de etanol, de acordo com a primeira de série de experimentos, para teor de etanol acima de 70% (p/p), a extração de flavonoides diminui e, de acordo com a série secundária, para teor de etanol entre 30 e 70% (p/p) eficiência semelhante é mostrada na extração de flavonoides, comparável aos resultados dos dois estudos citados acima (Lu et al., 2015, Liu et al., 2018).

As misturas água/etanol, com maior aumento na proporção de água, apresentaram melhor desempenho na extração de polifenóis a partir de materiais à base de plantas. Obviamente, devido à alta constante dielétrica da água, que aumenta os índices de polaridade das soluções de água/etanol.

A metodologia de superfície de resposta aliada ao modelo Box Behnken tem demonstrado não só reduzir o número de experimentos para alcançar as melhores condições de extração, mas também confiabilidade dos resultados na extração de compostos em materiais vegetais (WANG et al., 2013, LU et al., 2015, PAULA et al., 2016, JANG et.al, 2017).

5.5.2 Caracterização extrato líquido concentrado

O rendimento do extrato líquido obtido por percolação a partir de 3kg de droga vegetal foi de 27 L. O extrato líquido foi concentrado em rotaevaporador até o volume de 10L. Em seguida estão os resultados (Tabela 17) da triplicata de caracterização do extrato líquido concentrado de *D. ambrosioides*.

O extrato líquido concentrado apresentou pH 5,77, teor de sólidos médio de 2,27% \pm 0,091, DPR 4,03%, densidade média de 0,8968g/cm³ \pm 0,008 e um DPR 0,895% e viscosidade de 0,38 cp \pm 0,03 e DPR 8,11%.

Tabela 17: Caracterização do extrato líquido concentrado obtido de partes aéreas de *D. ambrosioides*

Replicata	Teor de sólidos (%p/p)	pH	Viscosidade (cP)	Densidade (g/ml)
1	2,17	5,66	0,37	0,66
2	2,35	5,80	0,41	0,64
3	2,29	5,85	0,35	0,65
Média	2,27	5,77	0,38	0,65
DP	0,09	0,10	0,03	0,01
DPR	4,04	1,71	8,11	1,53

Legenda: DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo

A caracterização do extrato líquido produz informações importantes para fins de controle de qualidade e contribui para o desenvolvimento de fitoterápicos. Uma vez de posse de informações como teor de sólidos, pH, viscosidade e densidade pode-se ter parâmetros para o desenvolvimento de produto de melhor qualidade. Para finalidade de produção de extrato seco, estes fatores influenciam na estabilidade, biodisponibilidade, rendimento, tamanho das partículas do extrato (MASTERS, 1985; JAFARI et al., 2008; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010), entre outros aspectos.

5.6 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DAS PARTES AÉREAS DE *D. ambrosioides*

5.6.1 Análise termogravimétrica (ATG) do padrão rotina

O estudo de Costa et al. (2002) demonstra que, na curva de decaimento da rotina com ar atmosférico, da temperatura de 50 a 261°C ocorre perda de massa de 4,3%, entre 261 a 609°C a decomposição da rotina chega a 69,5%. Quando a ATG é realizada com gás nitrogênio, a perda de massa entre as temperaturas de 25 a 139°C é de 5%, mas na faixa de 139 a 304°C a decomposição da rotina chega a

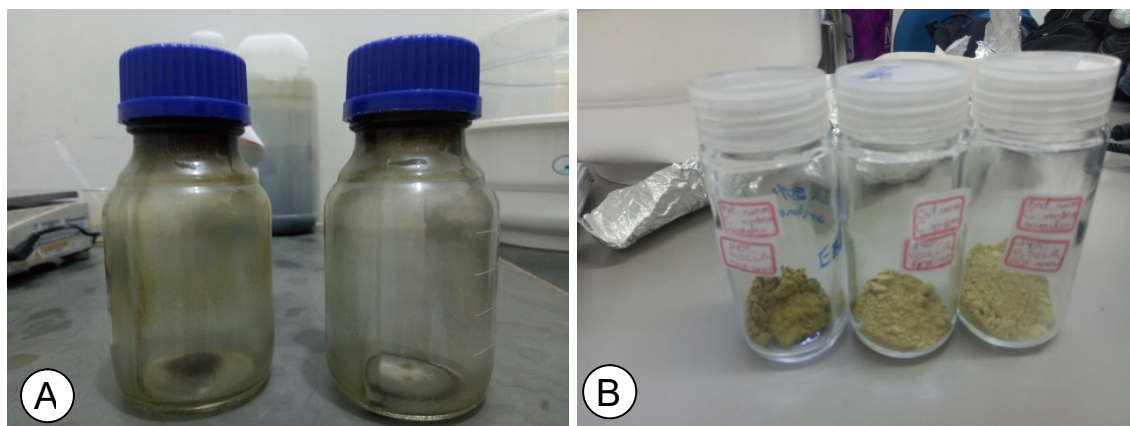
15,8% e a curva de decaimento se mantem estável até 892°C. Em outro estudo que realizou a análise com nitrogênio gasoso, o processo de fusão e decomposição da rutina ocorreu na temperatura de 274,41°C, com perda de massa próxima aos 10% (QI et al., 2015). Tendo em vista que a secagem do extrato por aspersão ocorre na câmara de secagem em presença de ar atmosférico aquecido, para preservação dos flavonoides estabeleceu-se a faixa de temperatura entre 120 e 160°C.

5.6.2 Determinação de parâmetros de secagem

A definição de parâmetros para a otimização da secagem do extrato está intrinsicamente relacionada à qualidade final do extrato. Resultados alcançados nos trabalhos de Cortés-Rojas, Souza, Oliveira (2015); Borges et al. (2017); Pires, Pena (2017) auxiliaram na escolha de alguns parâmetros deste estudo, complementada com estudos experimentais preliminares, mencionados a seguir.

A escolha do adjuvante de secagem influencia na melhora de rendimento e nas características do produto final. No presente estudo a secagem com maltodextrina nas concentrações de 20, 40 e 60% do teor de sólidos, não foram capazes de melhorar o rendimento do extrato ou mesmo auxiliar na atomização do extrato. Já os extratos secos com Aerosil® nas mesmas concentrações contribuíram para a formação dos mesmos e melhora de rendimento, conforme demonstrado na Figura 24. Observações laboratoriais demonstraram que concentrações de Aerosil® acima de 25% do teor de sólidos levaram à formação de extratos secos com melhores características.

Figura 24: Aspecto dos extratos secos de partes aéreas de *D. ambrosioides*, obtidos com diferentes adjuvantes de secagem. A – secagem com maltodextrina; B – secagem com Aerosil®



Outra variável a ser considerada é a temperatura de entrada do ar no *spray dryer*, pois ela determinará a temperatura de saída. Embora altas temperaturas de entradas do ar favoreçam a formação de uma membrana semipermeável nas gotas, elas podem ocasionar imperfeições na superfície do produto seco como rachaduras que podem levar a liberação precoce de produtos, degradação de compostos voláteis e termossensíveis (JAFARI et al., 2008; CARMO; FERNANDES; BORGES, 2015). A temperatura de saída também pode ser controlada pelo fluxo de alimentação, um fluxo mais alto acarreta uma temperatura de saída mais baixa (MASTERS, 1985; RANKELL; SCHIFFMAN, 2001).

5.6.3 Otimização da secagem dos extratos por aspensão (*Spray Drying*)

Neste trabalho foram avaliados, simultaneamente, comportamento das variáveis independentes, concentração de adjuvante, temperatura de entrada e fluxo de alimentação, frente às variáveis respostas, rendimento, teor de voláteis, atividade de água e teor de flavonoides, conforme o modelo experimental Box Behnken (3³). Os resultados dos 15 experimentos estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18: Matriz experimental do modelo Box Behnken (3³), rendimento e ensaios de caracterização dos extratos secos de partes aéreas de *D. ambrosioides* obtidos por aspersão

Nº	CA (%p/p)*	TE(°C)	FA (L/h)	R (%)	TV(%)	AW	Flavonoides (%)
1	25	120	0,4	35,636	9,877	0,427	9,173
2	50	120	0,4	37,063	8,143	0,448	5,595
3	25	160	0,4	25,731	11,207	0,464	8,435
4	50	160	0,4	36,299	8,107	0,431	8,263
5	25	140	0,3	30,454	11,147	0,445	6,602
6	50	140	0,3	35,926	8,380	0,448	5,897
7	25	140	0,5	33,345	10,027	0,453	5,682
8	50	140	0,5	41,409	8,510	0,424	11,763
9	37,5	120	0,3	32,992	9,647	0,439	5,538
10	37,5	160	0,3	32,832	8,027	0,403	6,905
11	37,5	120	0,5	55,904	8,823	0,415	5,483
12	37,5	160	0,5	35,872	8,413	0,405	9,651
13	37,5	140	0,4	33,312	8,853	0,420	10,089
14	37,5	140	0,4	36,192	9,107	0,424	9,202
15	37,5	140	0,4	34,976	8,693	0,419	8,142

Legenda: CA- concentração do adjuvante; TE- temperatura de entrada; FA- fluxo de alimentação; R- rendimento; TV- teor de voláteis; AW- atividade de água.*porcentagem de Aerosil® em relação a massa de sólidos totais. Condições das secagens: diâmetro do bico aspersor de 0,7 mm, fluxo do ar comprimido 40L/min, pressão do ar comprimido de 4,0 Kg/F.

As análises de variância (ANOVA) e regressão linear múltipla foram verificadas em conjunto com a metodologia de superfície de resposta. A ANOVA permite comparar a variação das repostas aos erros randômicos inerentes à mensuração dessas repostas e mensurar a significância da regressão usada para prever repostas, de acordo com a variabilidade experimental (BEZERRA et al., 2008). Na análise estatística foi verificada que dos parâmetros analisados, a atividade de água demonstrou falta de ajuste ($p=0,04$), de modo que na Tabela 19 estão descritos os efeitos mais relevantes e respectivas significâncias.

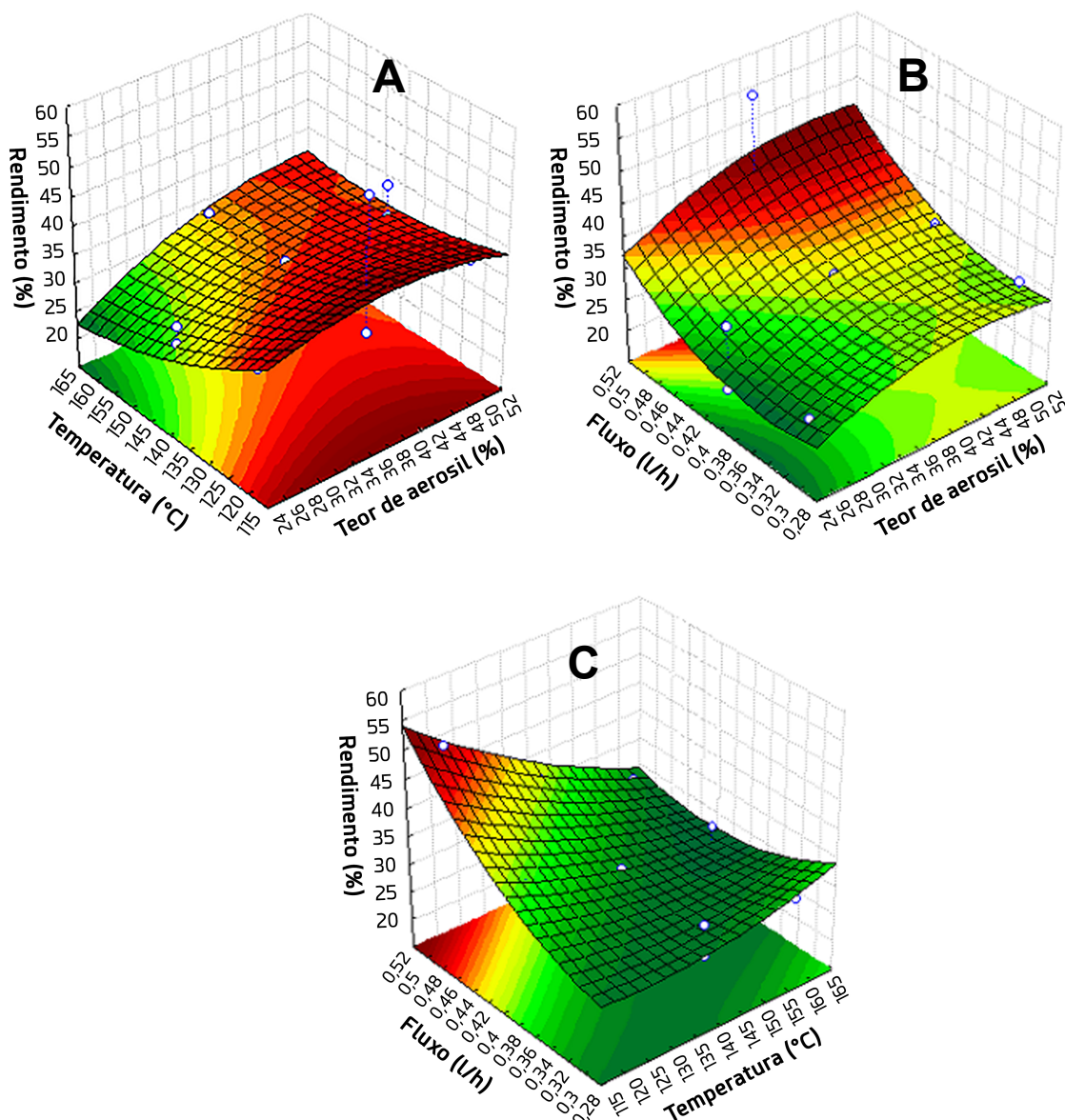
Tabela 19: Sumário dos efeitos das variáveis independentes e suas significâncias (ANOVA) sobre as respostas analisadas no planejamento Box-Benhken 3³ para obtenção de extrato seco de *D. ambrosioides* por aspersão

Parâmetro	Rendimento		Teor de voláteis		Teor de Flavonoides	
	p	efeito	p	efeito	p	efeito
1L	0,024708*	6,38275	0,0033*	-2,55917	0,615268	0,406379
1Q	0,072976	2,63046	0,019836*	-0,75861	0,568541	0,343181
2L	0,017109*	-7,71525	0,337831	-0,18417	0,113655	1,866318
2Q	0,186945	-1,48604	0,103876	0,30972	0,206758	0,934779
3L	0,013897*	8,58150	0,654763	-0,07667	0,109400	1,909249
3Q	0,054579	-3,08729	0,294308	-0,15278	0,122179	1,315029
1L e 2L	0,087179	4,57050	0,081776	-0,68333	0,222789	1,703045
1L e 3L	0,464640	1,29600	0,784644	0,06500	0,073542**	3,393764
2L e 3L	0,020524*	-9,93600	0,101010	0,60500	0,287459	1,400246
Falta de ajuste	0,112957	-	0,082978	-	0,189142	-

Legenda: *Nível de significância $p < 0,05$, ** $p < 0,1$. 1- concentração de adjuvante, 2- temperatura de entrada, 3- fluxo de alimentação, L- linear, Q- quadrática.

As variáveis, concentração de Aerosil® (1), temperatura de entrada (2) e fluxo de alimentação (3) exerceram efeito linear significativo sobre o rendimento de secagem. O modelo foi significativo ($p = 0,000133$) e não demonstrou falta de ajuste ($p = 0,112957$), apontou um coeficiente de determinação (r^2) de 0,90884 e r^2 ajustado de 0,74476. O efeito linear dos parâmetros foi observado na análise de superfície de resposta, o rendimento é aumentado à medida que a concentração de adjuvante (Figura 25A e B) é elevada, o mesmo é observado para o fluxo de alimentação (Figura 25C). Já na temperatura de entrada (Figura 25A) é observado um efeito linear negativo nas temperaturas mais baixas apresentaram menor rendimento. Na análise estatística foi observada uma relação significativa entre a temperatura de entrada e fluxo de alimentação (Figura 25C), de modo que os maiores rendimentos foram alcançados em temperaturas inferiores a 125°C e fluxo de alimentação superiores a 0,44 L/h.

Figura 25: Gráficos de superfície de resposta para rendimento (A – C) em função das variáveis independentes na obtenção de extrato seco das partes aéreas de *D. ambrosioides* por aspersão

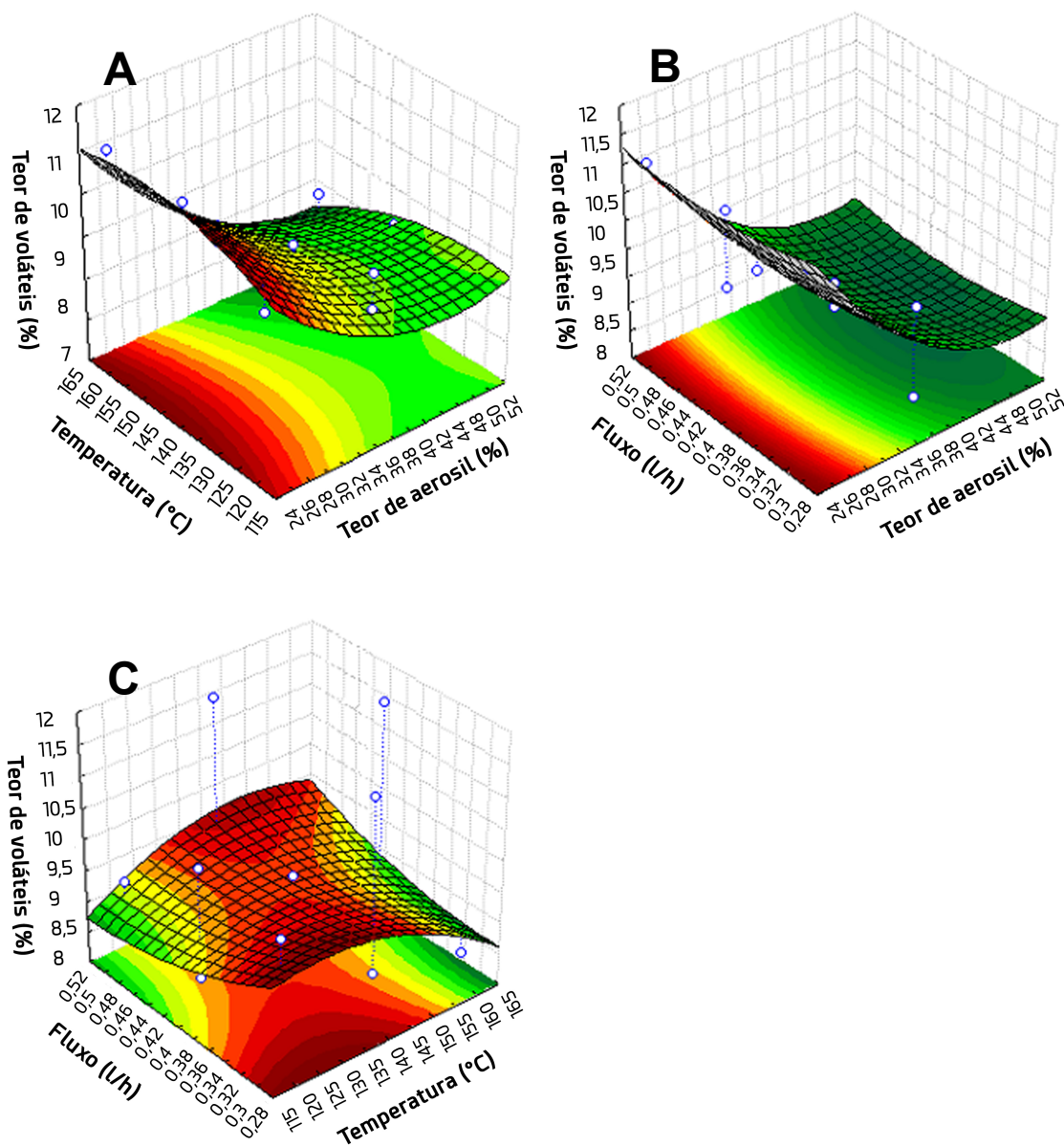


Legenda: (A) concentração do adjuvante (% p/p)* e temperatura de entrada (°C); (B) concentração do adjuvante (% p/p)* e fluxo de alimentação (L/h); (C) temperatura de entrada (°C) e fluxo de alimentação (L/h). *porcentagem de Aerosil® em relação a massa de sólidos totais.

A concentração de Aerosil® exerceu efeitos lineares e quadráticos negativos sobre o teor de voláteis. O modelo foi significativo ($p = 0,000042$) e não demonstrou falta de ajuste ($p = 0,082978$), apontou um coeficiente de determinação (r^2) de 0,91515 e r^2 ajustado de 0,76242. Os gráficos de superfície de resposta, descritos nas Figuras 26 A e 26 B, sugerem que as condições adequadas do teor de voláteis foram alcançadas em concentrações de adjuvante superiores a 30% da massa do

teor de sólidos do extrato, independente do valor do parâmetro analisado dentro do intervalo estabelecido. Já na Figura 26 C, os melhores teores foram alcançados nos intervalos com fluxo de alimentação superior a 0,4 L/h e temperatura inferior a 120°C e fluxo de alimentação inferior a 0,48 L/h e temperatura superior a 155°C, não evidenciando nenhum efeito significativo entre as variáveis individuais ou interação entre elas conforme dados estatísticos da Tabela 19.

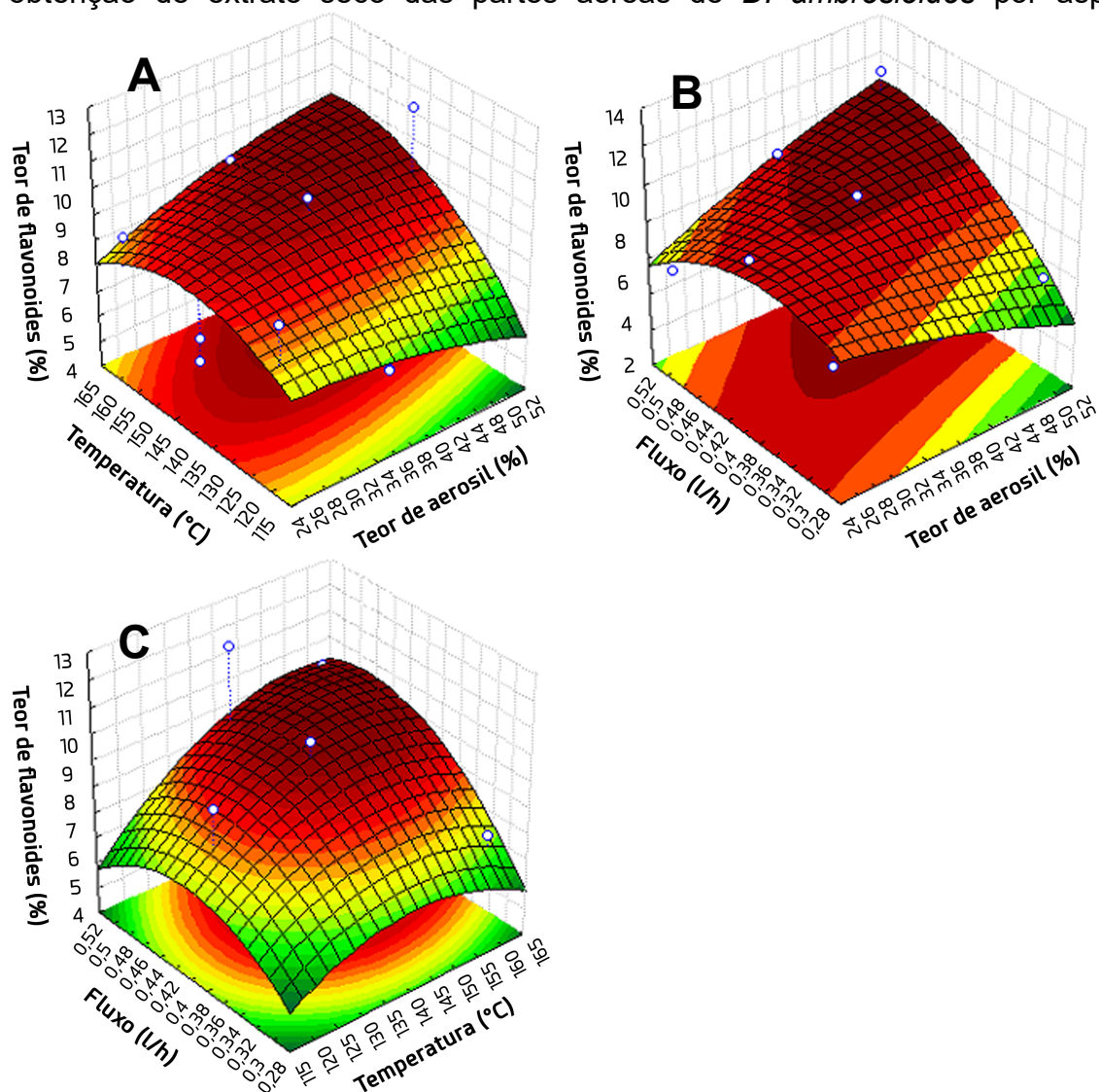
Figura 26: Gráficos de superfície de resposta para teor de voláteis (A – C) em função das variáveis independente na obtenção de extrato seco das partes aéreas de *D. ambrosioides* por aspersão



Legenda: (A) concentração do adjuvante (% p/p)* e temperatura de entrada (°C); (B) concentração do adjuvante (% p/p)* e fluxo de alimentação (L/h); (C) temperatura de entrada (°C) e fluxo de alimentação (L/h). *porcentagem de Aerosil® em relação a massa de sólidos totais.

O teor de flavonoides, expressos como equivalentes de rutina, não apresentou relações significativas para as variáveis, concentração de Aerosil® (1), temperatura de entrada (2) e fluxo de alimentação (3). Entretanto, a interação dos parâmetros Aerosil® e fluxo de alimentação foi significativa ($p=0,07$) quando se considerou o valor de p menor que 0,1. O experimento foi significativo ($p = 0,001437$) e não demonstrou falta de ajuste ($p = 0,189142$), apontou um coeficiente de determinação (r^2) de 0,73323 e r^2 ajustado de 0,25303. Na análise de superfície de resposta, conforme Figura 27B, foi observada uma relação significativa entre concentração de adjuvante e fluxo de alimentação, indicando que os maiores teores foram alcançados em concentração de adjuvante superior a 30% e fluxo de alimentação superiores a 0,38 L/h. Nas Figuras 27A e 27C embora verifique boas condições de extração de flavonoides não se verifica possíveis efeitos das variáveis analisadas.

Figura 27: Gráficos de superfície de resposta para flavonoides totais (A – C), expressos como equivalentes de rutina, em função das variáveis independentes na obtenção de extrato seco das partes aéreas de *D. ambrosioides* por aspersão



Legenda: (A) concentração do adjuvante (% p/p)* e temperatura de entrada (°C); (B) concentração do adjuvante (% p/p)* e fluxo de alimentação (L/h); (C) temperatura de entrada (°C) e fluxo de alimentação (L/h). *porcentagem de Aerosil® em relação a massa de sólidos totais.

Embora altas temperaturas de entrada possam gerar a degradação dos componentes do extrato, o parâmetro não apresentou efeito significativo em relação às variáveis observadas. No entanto, nota-se que os melhores teores de flavonoides foram alcançados em temperaturas superiores a 130°C (Figuras 27 A e 27C), o que está de acordo com a análise termogravimétrica descrita na literatura, cuja decomposição do marcador escolhido ocorre significativamente em temperaturas superiores a 261°C (COSTA et al., 2002).

5.5.4 Rendimento e caracterização dos extratos secos obtidos nas condições de secagem otimizadas

As condições de otimização foram determinadas a partir dos dados dos gráficos de superfície de resposta e função geral de otimização descritos na Tabela 20, a uma desejabilidade de 0,739467. Em seguida foram comparados aos resultados dos valores observados. As condições previstas para as variáveis independentes foram: concentração de adjuvante 50% (p/p), temperatura de entrada de 148°C, fluxo de alimentação 0,5 L/h.

Tabela 20: Valores preditos para otimização do rendimento e dados de caracterização do extrato seco obtido de partes aéreas de *D. ambrosioides* por aspersão

Variáveis independentes Otimizadas	Valores	R (%)	TV (%)	TF (%)
Concentração adjuvante (% p/p)*	50			
Temperatura de entrada (°C)	148	41,16	8,42	11,14
Fluxo de alimentação (L/h)	0,5			

Legenda: R- rendimento, TV- teor de voláteis; TF- teor de flavonoides.*porcentagem de Aerosil® em relação a massa de sólidos totais.

As condições previstas pelo modelo foram validadas por meio da análise do rendimento e caracterização de 3 secagens para que a reprodutibilidade fosse observada. Os dados da triplicata são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21: Valores observados de rendimento e dados de caracterização do extrato seco obtido de partes aéreas de *D. ambrosioides* por aspersão

Secagens	Rendimento (%)	Teor de Voláteis (%)	Teor de flavonoides (%)
1	46,14	7,12	9,68
2	47,31	7,46	8,86
3	46,04	7,64	8,97
Média	46,50	7,41	9,17
DPR	1,52	3,57	4,85
%*	112,97	87,97	82,32

Legenda: DPR: desvio padrão relativo; %* porcentagem em relação ao valor predito. Condições das secagens: diâmetro do bico aspersor de 0,7 mm, fluxo do ar comprimido 40L/min, pressão do ar comprimido de 4,0 Kg/F; concentração de adjuvante: 50% (p/p), temperatura de entrada de 148°C, fluxo de alimentação: 0,5 L/h.

Os resultados observados na triplicata demonstraram ser promissores quanto ao modelo escolhido. O rendimento apresentou valor superior ao esperado, de acordo com o Tonon e Brabet (2009) altas temperaturas de entrada contribuem para o aumento do diâmetro das partículas do extrato seco, logo a expansão do volume. Embora para o teor de voláteis tenha atingido 87,97% do valor predito é um bom indicativo de qualidade, pois o extrato com menor umidade está sujeito a menos contaminações. O teor de flavonoides apresentou valores satisfatórios ao modelo.

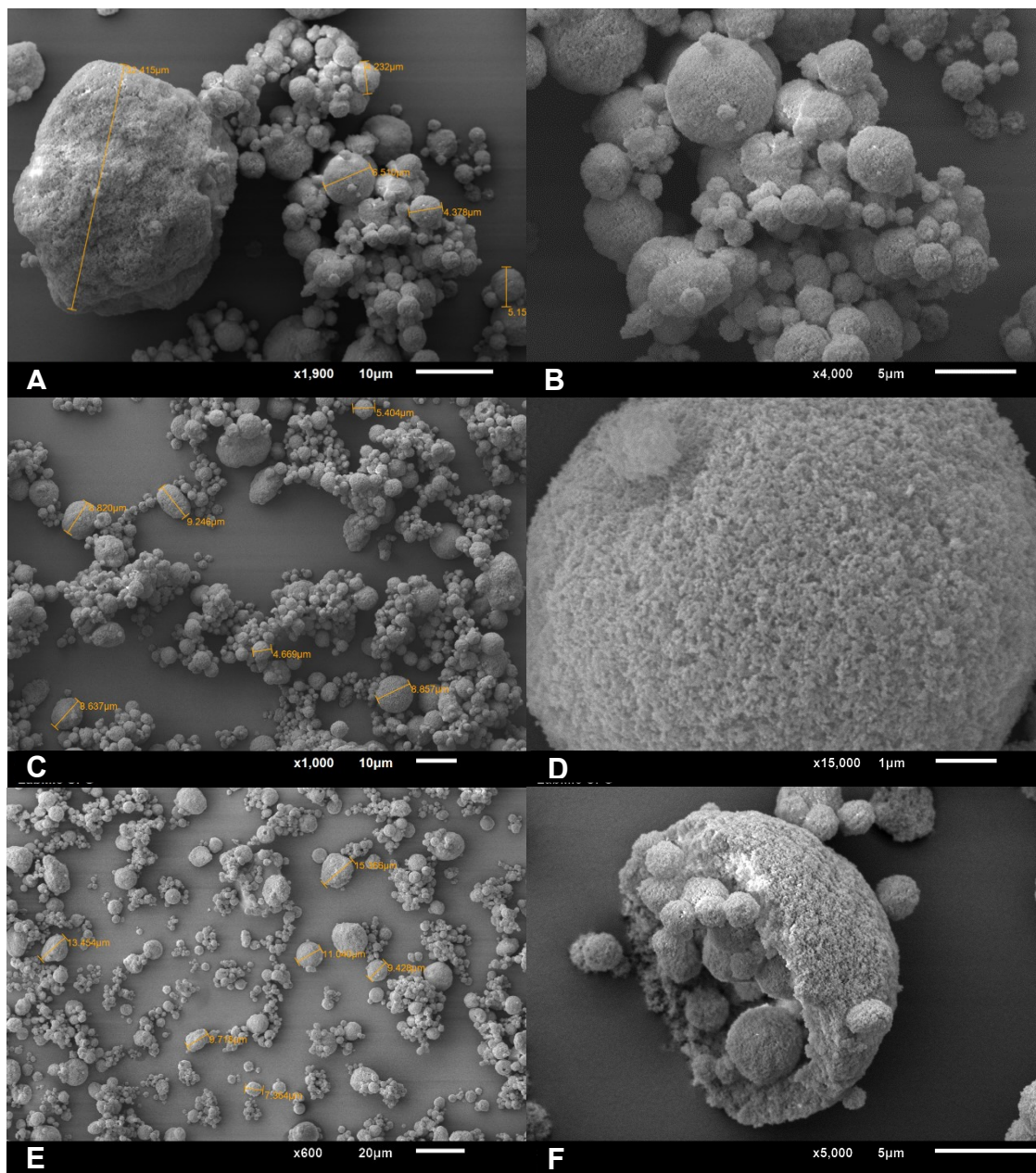
5.6.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Quanto à caracterização morfológica das partículas do extrato seco obtidas de partes aéreas de *D. ambrosioides* (Figura 28) verificaram-se a presença de estruturas aglomeradas compostas de grãos individuais de superfície porosa unidos por poeira submicrométrica do mesmo material, de tamanhos e formas variados. Os formatos dos grãos variavam de irregulares a esféricos e o tamanho de 1,4 μm a partículas com dimensões superiores a 22,7 μm de diâmetro.

A formação de partículas pequenas é uma característica da secagem em *spray dryer*. O tamanho médio das partículas é influenciado pelo tipo de atomização escolhida, viscosidade, condições de secagem, concentração e propriedades do extrato. Quanto mais viscoso o produto a ser seco, maior o tamanho das gotículas, logo das partículas formadas (MASTERS, 1985; JAFARI et al., 2008).

No extrato seco também foi observado que as esferas maiores eram preenchidas por esferas menores (Figura 28F). Característica que pode ser explicada pela permeabilidade e elasticidade da superfície da esfera, gerando grãos com a superfície imperfeita ou fragmentada, sólidas ou ocas (OLIVEIRA; PETROVICK et al., 2010).

Figura 28: Fotomicroscopia eletrônica de varredura de extrato seco de *D. ambrosioides* A/B – fotomicrografia da 1ª replicata; C/D - fotomicrografia da 2ª replicata; E/F - fotomicrografia da 3ª replicata.



5.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *D. ambrosioides* EM *Artemia salina*

O extrato seco de *D. ambrosioides* e o Aerosil® não ocasionaram mortes de artemias nas concentrações testadas (2000, 1000, 500, 250 e 125 μg/mL). Em decorrência da ausência de mortes não foi possível estimar a CL₅₀, mas sugere-se que está acima das concentrações analisadas. O estudo de Nguta et al. (2012)

classifica que extratos vegetais com CL 50 superior a 1000 µg/ml são atóxicos corroborando para classificação do extrato seco de *D. ambrosioides* como atóxico.

Estudo com extrato hidroalcolico das partes aéreas de *D. ambrosioides* em *Artemia salina* estimaram a CL₅₀ de 356,6µg/ml e 1.058µg/ml (SOUSA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017). O ascaridol, um dos compostos presentes no óleo essencial de *D. ambrosioides* é responsável por diversas atividades biológicas e tóxicas da planta, se degrada em altas temperaturas (CAVALLI et al. 2004). Como a secagem do extrato ocorreu a uma temperatura de 150°C pode ter contribuído para a ausência de toxicidade do extrato. Pode-se sugerir que a ausência de altas temperaturas no preparo da amostra evita que os componentes presentes no óleo essencial sejam volatilizados, o que torna possível o cálculo da CL₅₀ para *D. ambrosioides*.

5.8 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *D. ambrosioides* EM RATAS *Wistar*

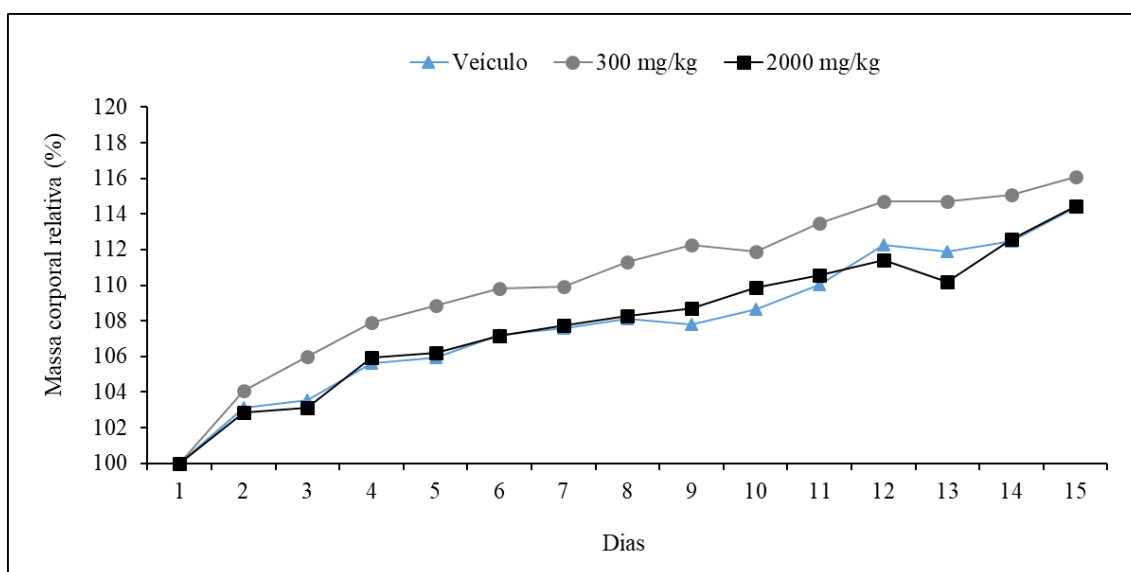
Os sinais clínicos comportamentais apresentados pelos animais durante as primeiras horas, evidenciados pelo *screening hipocrático*, após a administração do extrato foram: no grupo controle os animais apresentaram hiperatividade, diminuição de resposta a pressão da cauda, e comportamento compulsivo. Na dose de 300mg/kg observou-se dificuldade na respiração (hiperventilação), e redução de resposta à pressão da cauda. Na dose de 2000mg/kg observou-se nos primeiros 15 minutos que a respiração das mesmas estava ofegante, e persistiu a redução de resposta à pressão da cauda. A persistência da analgesia da cauda em especial nas doses maiores do extrato é explicada em parte pelas propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória da planta (IBIRONKE; AJIBOYE, 2007; TRIVELLATO-GRASSI et al., 2013; CALADO et al., 2015).

Durante o ensaio não foram verificadas mortes dos animais nos grupos estudados, nem mesmo durante a etapa de repetição do ensaio. De forma que o extrato seco padronizado para flavonoides obtido de partes aéreas de *D. ambrosioides* é classificado na categoria "5", com DL₅₀ estimada entre 2000 a 5000 mg/Kg, de acordo com o guia n° 423 da OECD. Este guia considera DL₅₀ superiores a 2000 mg/Kg como praticamente atóxicas, e não recomenda a continuidade do experimento para a dose de 5000 mg/Kg. Uma vez que a dose é de difícil

solubilidade e administração, além da necessidade de proteção da vida animal utilizada em laboratório (OECD, 2001).

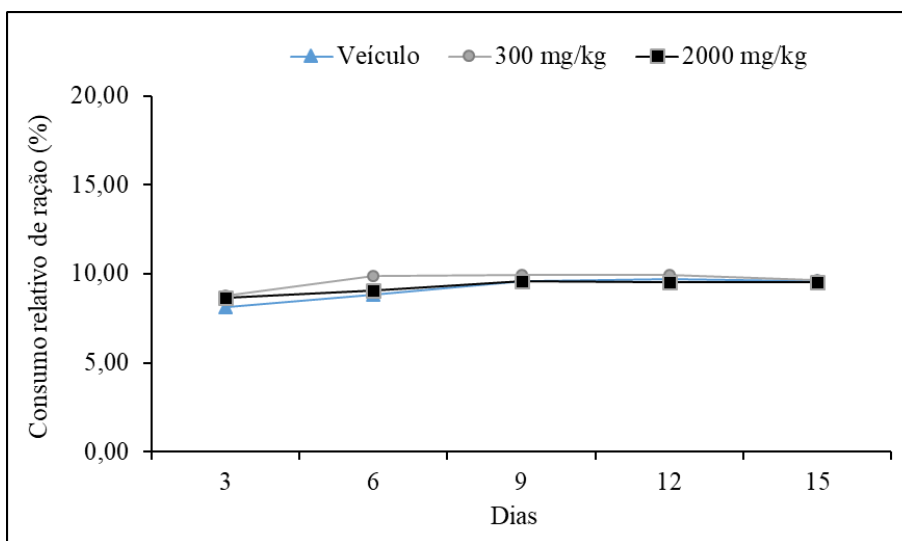
Na análise estatística ANOVA *one way* para o ganho de massa corporal não foi demonstrada interferência do tratamento sobre os grupos analisados ($F_{2,15} = 0,28$; $p = 0,76$). Para a ANOVA de medidas repetidas, quanto a massa corporal relativa, também não foi demonstrado efeito do tratamento sobre os grupos ($F_{2,15} = 2,16$; $p = 0,15$) e não apresentou interação significativa quando foi analisado o efeito do tratamento sobre os dias ($F_{26,195} = 0,71$; $p = 0,85$), o que pode ser notado na Figura 29. No entanto o fator dias demonstrou significativo no decorrer do ensaio ($F_{13,195} = 79,44$; $p < 0,01$).

Figura 29: Gráfico de massa corporal relativa durante o experimento de toxicidade oral aguda do extrato seco de *D. ambrosioides* em ratas *Wistar*



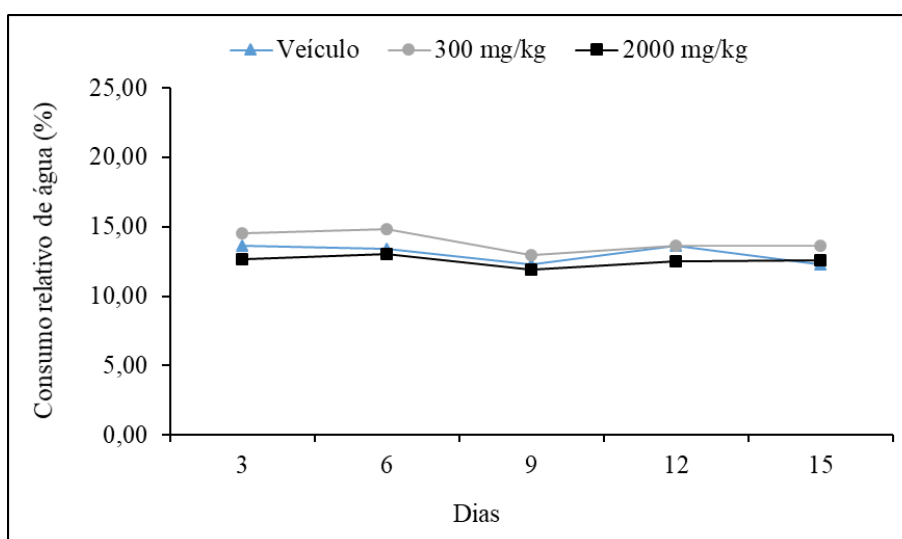
Ao analisar o efeito dos tratamentos sobre o consumo de ração, na ANOVA unifatorial não foi constatada interação ($F_{2,15} = 0,80$; $p = 0,47$). Ao avaliar o consumo de ração relativo a cada 3 dias, a ANOVA para medidas repetidas não demonstrou efeito do tratamento ($F_{2,15} = 0,34$; $p = 0,71$) e nem interação entre dias e tratamento ($F_{8,60} = 0,79$; $p = 0,61$). Entretanto o fator dias, analisado separadamente, demonstrou ser significativo ($F_{4,60} = 11,03$; $p < 0,01$), conforme Figura 30.

Figura 30: Gráfico consumo de ração relativo a 3 dias durante o experimento de toxicidade oral aguda do extrato seco de *D. ambrosioides* em ratas *Wistar*



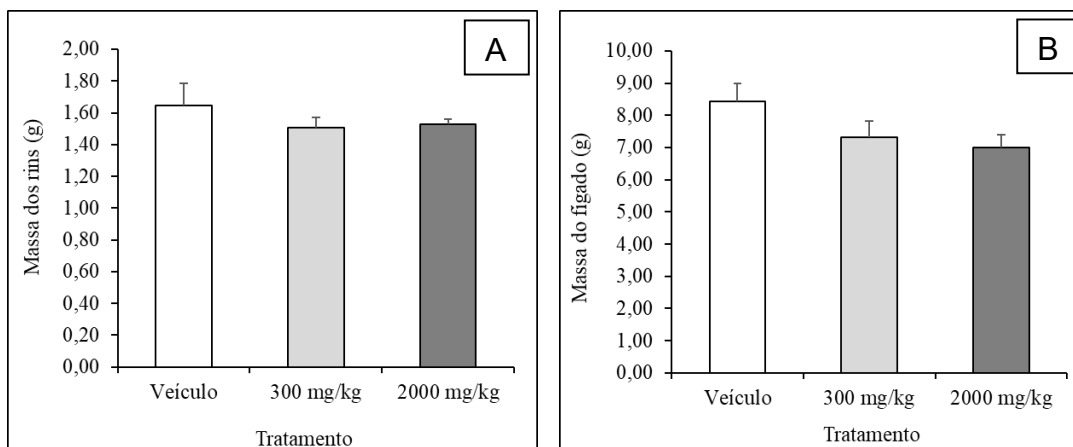
Na análise do consumo relativo de água a cada 3 dias, em detrimento do tratamento, a ANOVA unifatorial não foi significativa ($F_{2,15} = 1,05$; $p = 0,37$). Na ANOVA para medidas repetidas não foi demonstrado efeito do tratamento ($F_{2,15} = 0,85$; $p = 0,45$), também não houve efeito para o fator dias ($F_{4,60} = 1,91$; $p = 0,12$), e nem interação entre dias e tratamento ($F_{8,60} = 0,33$; $p = 0,95$). Os resultados podem ser visualizados na Figura 31.

Figura 31: Gráfico do consumo de água relativo a 3 dias durante o experimento de toxicidade oral aguda do extrato seco de *D. ambrosioides* em ratas *Wistar*



O gráfico da média das massas de órgãos internos (rins e fígado) dos animais utilizados no experimento está expresso na Figura 32. Na análise de massa relativa dos órgãos, a ANOVA unifatorial não apontou diferenças entre os grupos para a massa dos rins ($F_{2,15} = 0,71$; $p = 0,50$) e fígado ($F_{2,15} = 2,36$; $p = 0,13$).

Figura 32: Gráfico da massa dos rins (A) e fígado (B) relativa durante o experimento de toxicidade oral aguda do extrato seco de *D. ambrosioides* em ratos *Wistar*



Na literatura não há registros de ensaios de toxicidade de dose única para o extrato seco de partes aéreas de *D. ambrosioides*. No entanto trabalhos com extratos aquosos e etanólicos de folhas de *D. ambrosioides* já demonstram a ausência de toxicidade oral aguda em roedores para a planta (SILVA et al., 2014; VALÉRIO et al., 2015).

Em ensaios de toxicidade subcrônica em camundongos, utilizando o extrato hidroetanólico de folhas de *D. ambrosioides*, em que foram avaliados tratamentos com doses de até 2.500 mg/Kg não foram verificados sinais de toxicidade (PEREIRA et al., 2010; VALÉRIO et al., 2015). Já no ensaio de toxicidade subcrônica com ratos do extrato aquoso de folhas de *D. ambrosioides* com doses de até 3000 mg/Kg verificou-se sinais de hepatotoxicidade (SILVA et al., 2014). A toxicidade de *D. ambrosioides* é vinculada a presença do ascaridol no óleo essencial da planta, que é termossensível (CAVALLI et al., 2004). Logo o processo de secagem em *spray dryer* pode constituir uma alternativa para minimizar a toxicidade associada ao componente. De modo que se fazem necessários estudos mais conclusivos sobre a segurança do extrato em exposição prolongada.

Por outro lado, os flavonoides avaliados no estudo não sofreram degradação com a temperatura do processo de secagem e nem influenciaram na toxicidade do extrato seco, apesar de estarem concentrados, conforme demonstrado anteriormente nos cálculos do doseamento de flavonoides nas etapas de obtenção dos extratos etanólico e seco. A concentração de flavonoides certamente potencializará as propriedades da planta associadas ao metabólito, como atividades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antitumoral (LAY et al., 2014; PARHIZ et al., 2015; RAJENDRAN et al., 2016; YAKOUB et al., 2018). De modo que são necessários novos estudos que dimensionem o benefício da técnica aplicada.

Os estudos de identificação botânica dos espécimes de *Dysphania ambrosioides* (Sin.: *Chenopodium ambrosioides*) utilizados no presente trabalho permitiram verificar que se trata de uma planta herbácea, de caule ramificado, folhas alongadas e denteadas, inflorescência paniculada e frutos esféricos, compatíveis com a família Amaranthaceae. A lâmina foliar apresenta parênquima paliçádico dorsiventral característico do antigo gênero *Chenopodium* e três a cinco camadas de parênquima esponjoso. A epiderme é anfiestomática, com cutícula fina e tricomas tectores e glandulares. Entre os tricomas glandulares destaca-se o tricoma glandular de corpo curvado com glândula secretória na célula distal, distintivo da espécie *D. ambrosioides*.

Na caracterização da droga vegetal foram determinados parâmetros para controle de qualidade, como teor de voláteis de $8,65\% \pm 0,03$, cinzas totais de $11,01\% \pm 0,03$, cinzas insolúveis em ácido clorídrico de $0,54\% \pm 0,03$ e índice de intumescência de $0,2 \text{ ml} \pm 0,26$. O perfil químico do óleo essencial revelou o ascaridol e seus isômeros como componentes majoritários.

Para o extrato etanólico bruto de partes aéreas de *D. ambrosioides*, um método analítico em cromatografia a líquido de alta eficiência para identificação e doseamento do marcador rutina foi validado parcialmente quanto à seletividade e linearidade, demonstrando-se promissor para a validação dos demais parâmetros. Um método analítico espectrofotométrico foi validado para doseamento de flavonoides totais, expressos como equivalentes de rutina, no extrato etanólico bruto da planta, que atendeu os critérios legais, sendo um método rápido, barato e de fácil execução. Embora o método não tenha sido comparado a outros para doseamento do teor de flavonoides, os resultados foram promissores quanto à sua utilidade na quantificação de flavonoides nesta planta.

O processo de extração assistida por ultrassom foi eficiente na obtenção de extratos etanólicos, das partes aéreas de *D. ambrosioides*, ricos em flavonoides. Esse processo extrativo pode ser útil nas etapas de controle de qualidade da droga vegetal por permitir trabalhar em escalas menores, economizando solventes, além de ser rápido e eficiente. O modelo experimental Box-Behnken (3³) aliado à

metodologia de superfície de resposta contribuiu para demonstrar os efeitos das variáveis, tempo de extração, teor etanólico e temperatura de extração, sobre o conteúdo de flavonoides extraídos. De modo que as melhores condições de extração para as variáveis analisadas foram: tempo de extração de 60 minutos, temperatura de 57°C e teor etanólico de 57% (p/p).

Para a produção do extrato seco por aspersão (*spray drying*) as melhores condições, dentro das variáveis estudadas, foram: concentração de adjuvante (Aerosil®) de 50% (p/p), temperatura de entrada de 148°C, fluxo de alimentação de 0,5 L/h. Na análise morfológica as partículas do extrato seco apresentaram formatos e tamanhos variados, além de superfície porosa.

Quanto aos ensaios de toxicidade, no ensaio de toxicidade em *Artemia salina*, o extrato seco foi considerado atóxico. No experimento de toxicidade oral aguda em ratas, o extrato seco se enquadra na categoria “5”, de baixa toxicidade com DL₅₀ entre 2000 a 5000 mg/kg. No entanto, há necessidade de estudos de toxicidade subcrônica e materno-fetal para avaliar o impacto do uso prolongado do extrato.

Em suma, o estudo permitiu determinar parâmetros promissores quanto ao desenvolvimento tecnológico de extratos padronizados das partes aéreas de *D. ambrosioides* que serão úteis desde a etapa de coleta até o desenvolvimento de fitoterápicos de alta qualidade. Os dados são relevantes para a saúde pública brasileira, pois o SUS já manifesta interesse em adotar a planta em seu sistema.

REFERÊNCIAS

ACTION STAT. Versão 3.5.152.34 Estatcamp- Consultoria em estatística e qualidade. São Carlos: Equipe Estatcamp, 2014. Disponível em: <http://www.portalaction.com.br/>.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oils components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, 2007.

ALENCAR, N.L.; ARAÚJO, T.A.S; AMORIM E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. The inclusion and selection of medicinal plants in traditional pharmacopoeias evidence in support of the diversification hypothesis. **Economic Botany**, v. 64, n. 1, p. 68-79, 2010.

AL-KAF, A. C.; CROUCH, R.A.; DENKERT, A.; PORZEL, A.; AL-HAWSHABI, O.S.S.; ALI, N.A.A.; SETZER, W.N.; WESSJOHANN, L. Chemical composition and biological activity of essential oil of *Chenopodium ambrosioides* from Yemen. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, n. 4, p. 20-22, 2016.

ARCANJO, D.D.R.; ALMEIDA, M.M.B.; LOPES, M. DE F. G.; NOGUEIRA, C. M.D.; MAGALHÃES, C. E. DE C.; MORAIS, N. M. T. DE. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.

ASSAIDI, A.; LEGSSYER, A.; BERRICHI, A.; AZIZ, M.; MEKHFI, H.; BNOUHAM, M.; ZIYYATDE, A. Hypotensive property of *Chenopodium ambrosioides* in anesthetized normotensive rats. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2014.

BAI, C.Q.; LIU, Z.L.; LIU, Q.Z. Nematicidal constituents from the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* aerial parts. **E-Journal Chemistry**, v. 8, n. S1, p. S143-S148, 2011.

BARROS, L., PEREIRA, E., CALHELHA, R.C., DUEÑAS, M., CARVALHO, A.M., SANTOS-BUELGA, C. AND FERREIRA, I.C. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1732-1740, 2013.

BEGUM, H. A.; HAMAYUN, M.; ZAMAN, K.; ANWER HUSSAIN, A.; RUAF, M. et al. Phytochemical evaluation of ethnobotanically selected medicinal plants of Mardan, Pakistan. **Journal of advanced botany and zoology**, v. 3, n. 1, p. 1-5 2015.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR,L.R; ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.

BLANCKAERT, I I.; PAREDES-FLORES, M.; ESPINOSA-GARCÍA, F.; PIÑERO, D.; LIRA, R. Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi-arid region of Mexico. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, p. 557-573, 2012.

BONZANI, E.; BARBOZA, G.E.; BUGATTI, M.A.; ARIZA-ESPINAR, L. Morpho-histological studies in the aromatic species of *Chenopodium* from Argentina. **Fitoterapia**, v. 74, p. 207-25, 2003.

BORGES, L. L., MARTINS, F. S., CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Optimization of the Spray-Drying Process for Developing Jabuticaba Waste Powder Employing Response Surface Methodology. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, e12276, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 39, de 5 de junho de 2008. Regulamento para a Realização de Pesquisa Clínica. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 5.ed., v.1, Brasília, DF: ANVISA, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos**. Versão 2, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília. Capítulo I, Seção III, 2014a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014. Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2014b.

BRASIL. Ministério da Saúde. RENISUS - **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais**. Brasília, DF: MS, 2009. Disponível:<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf> Acesso: em 27 de maio, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para Tratamento Estatístico da Validação Analítica**. Nº 10, Versão 1, 2017b.

BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.

CABI. *Dysphania ambrosioides* (Mexican tea). In: Invasive Species Compendium. Acesso 11 de agosto de 2018. Disponível em: <<https://www.cabi.org/isc/datasheet/113977>>

CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 575-586, 2010.

CALADO, G.P.; LOPES, A.J.O.; COSTA JUNIOR, L.M.; LIMA, F.DAS C.A.; SILVA, L.A.; PEREIRA, W.S.; AMARAL, F.M.M DO; GARCIA, J.B.S.; CARTÁGENES, M. DO S. DE S.; NASCIMENTO, F.R.F. *Chenopodium ambrosioides* L. reduces synovial inflammation and pain in experimental osteoarthritis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1-18, 2015.

CARMO, E.; FERNANDES, R.; BORGES, S. Microencapsulação por spray drying, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. **Journal of Chemical Engineering and Chemistry**, v. 1, p. 30-44, 2015.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E. E., MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-9, 2008.

CAVALLI, J.; TOMI, F.; BERNADINI, A.F.; CASANOVA, J. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 5, p. 275-279, 2004.

CHEKEM, M. S. G.; LUNGA, P.K.; TAMOKOU, J. DE D.; KUIATE, J.R.; TANE, P.; VILAREM, G.; CERNY, M. Antifungal properties of *Chenopodium ambrosioides* essential oil against *Candida* species. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 9, p. 2900-2909, 2010. <http://doi.org/10.3390/ph3092900>

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

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 2. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1987.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3v. 2ªed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.

COSTA, E.M.; FILHO, J.M.B.; NASCIMENTO, T.G., MACEDO, R.O. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. **Thermochim Acta**, v. 392-393, p. 79-84, 2002.

COSTA, M.V.L.; TAVARES, E.S. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) - Erva-de-Santa-Maria. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 63-71, 2006.

COUTO, R.O.; VALGAS, A.B.; BARA, M.T.F.; PAULA, J.R. de. Caracterização Físico-Química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 3, p. 59-69, 2009.

DEGENHARDT, RUTH T.; FARIAS, I. V.; GRASSI, L. T.; FRANCHI JR.; GILBERTO C.; NOWILL, A. E.; BITTENCOURT, C. M. DA S.; WAGNER, T. M.; SOUZA, M.M. DE; CRUZ, A.B.; MALHEIROS, A. Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides*. **Revista brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 56-61, Feb. 2016.

DEMBITSKY, V.; SHKROB, I; HANUS, L.O. Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký Olomouc Czechoslovakia**, v.152, n. 2, p. 209-215, 2008.

DONG, J.; LIU, Y.; LIANG, Z.; WANG, W. Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. **Ultrason Sonochemistry**, v. 17, p. 61–5, 2010.

EDDOUKS, M.; MAGHRANI, M.; LEMHADRI, A.; OUAHIDI, M.-L.; JOUAD, H. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 97-103, 2002.

ESPADA-BELLIDO, E.; FERREIRO-GONZÁLEZ, M.; CARRERA, C.; PALMA, M.; BARROSO, C.G; BARBERO, G.F. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. **Food Chemistry**, v. 219, p. 23-32, 2017.

FANK-DE-CARVALHO, S.M.; BÁO, S.N.; MARCHIORETTO, M.S. Amaranthaceae as a bioindicator of Neotropical Savannah diversity. In: LAMEED, G.A. **Biodiversity Enrichment in a Diverse World**, Rijeka: InTech, p. 235-262, 2012. DOI: 10.5772/48455. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/biodiversity-enrichment-in-a-diverse-world/amaranthaceae-as-a-bioindicator-of-neotropical-savannah-diversity>

FELIX-SILVA, J.; TOMAZ, I.M.; SILVA, M.G.; SANTOS, K.S.C.R.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; CARVALHO, M.C.R.D.; SOARES, L.A.L.; FERNANDES-PEDROSA, M.F. Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 3, p. 548-555, 2012.

FUENTES-BAZAN, S.; UOTILA, P.; BORSCH, T. A novel phylogeny-based generic classification for *Chenopodium sensu lato*, and a tribal rearrangement of Chenopodioideae (Chenopodiaceae). **Willdenowia**, Berlin, v. 42, n. 1, p. 5-24, June 2012.

GADANO, A.; GURNI, A.; LOPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. In vitro genotoxic evaluation of medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal Ethnopharmacol**, v. 81, p.11-16, 2002.

GIL, E. S. **Controle fisico-quimico de qualidade de medicamentos**. 3.ed, São Paulo: Pharmabooks, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONG, P.; ZHANG, L.; HAN, X.; SHIGWEDHA, N.; SONG, W.; YI, H.; DU, M.; CAO, C. Injury mechanisms of lactic acid bacteria starter cultures during spray drying: a review. **Drying Technology**, v. 32, p. 793-800, 2014.

IBIRONKE, G.F.; AJIBOYE, K.I. Studies of anti-inflammatory and analgesic properties of *Chenopodium ambrosioides* leaf extract in rats. **International Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 1 p. 111-115, 2007.

IMS. Institute for Healthcare Informatics. **Outlook global medicines through 2021: balancing cost and value**. 2016.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816-835, jun. 2008.

JANG, S.; LEE, A.Y.; LEE, A.R.; CHOI, G.; KIM, H.K. Optimization of ultrasound-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice using response surface methodology. **Integrative Medicine Research**, v. 6, n. 4, p. 388-394, 2017.

JARDIM, C.M.; JHAM, G.N.; DHINGRA, O.D.; FREIRE, M.M. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 9, p. 1213-1218, 2008.

JARDIM, C. M.; JHAM, G. N.; DHINGRA, O. D.; FREIRE, M. M. Chemical composition and antifungal activity of the hexane extract of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, n. 10, p. 1814-1818, 2010 .

JESUS, R.S.; PIANA, M.; FREITAS, R.B.; BRUM, T.F.; ALVES, C.; BELKE, B.V.; MOSSMANN, N.J.; CRUZ, R.C.; SANTOS, R.C.V.; DALMOLIN, T.; BIANCHINI, B.V.; CAMPOS, M.; BAUERMAN, L. DE F. *In vitro* antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC–DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo , v. 49, n. 2, p. 296-302, June 2018.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, p.193, 1940.

JORGE, L.I.F.; FERRO, V. de O; KOSCHTSCHAK, M.R.W. Diagnose comparativa das espécies *Chenopodium ambrosioides* L. (erva-de-santa-maria) e *Coronopus*

didymus (L.) Sm (mastruço): principais características morfo-histológicas e químicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 2, p. 143-153, 1986.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J.. **Plant Systematics - a phylogenetic approach**. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

KANDPAL, V.; JOSHI, P.K.; JOSHI, N. GC-MS analysis of seed essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. collected from Himalayan region. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 19, n. 1, p. 258-261, 2016.

KISMAN, K. G. **Plantas Infestantes e Nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira. São Paulo, p. 608, 1991.

KOKANOVA-NEDIALKOVA, Z; NEDIALKOV, P.T; NIKOLOV, S.D. The genus *Chenopodium*: Phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology. **Pharmacognosy Reviews**, v. 3, p. 280-306, 2009.

KRAUS. J. E., ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal** Seropédica, RJ: Edur, 1997. 198p.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria na Indústria Farmacêutica**.1v, Lisboa: Ed.Fundação Calustre Gulbenkian, 2001.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas, SP: Ed. Atómo, 2009.

LAY, M. M., KARSANI, S. A., MOHAJER, S., SRI NURESTRI ABD MALEK, S.N. Phytochemical constituents, nutritional values, phenolics, flavonols, flavonoids, antioxidant and cytotoxicity studies on *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl fruits. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 1-12, 2014.

LEVY, R.L. Oil of *Chenopodium* in the treatment of hookworm infections. **Journal of the American Medical Association**, v. 63, p. 1946-9, 1914.

LI, H.; CHEN, B.; YAO, S. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). **Ultrason Sonochemistry**, v. 12, n. 4, p. 295-300, 2005.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. Quality assurance of phytopharmaceuticals. In: _____. **Phytopharmaceutical Technology**. London: Heyden Son Limited, 1989. p. 341-359.

LIU, W.; LIU, Y.; ZHANG, X.-Z.; LI, N.; CHENG, H. In vitro bactericidal activity of *Jinghua weikang* capsule and its individual herb *Chenopodium ambrosioides* L. against antibiotic-resistant *Helicobacter pylori*. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 19, n.1, p. 54-57, 2013.

LIU, Y., LUO, X., LAN, Z., TANG, J., ZHAO, P., KAN, H. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant capacities of flavonoids from *Camellia fascicularis* leaves. **CyTA – Journal of Food**, v. 16, p. 105-112, 2018.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. São Paulo: Ed. Nova Odessa, 1982.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Plantarum, 2002.

LORENZI, H.; GONÇALVES, F.J. **Morfologia vegetal: Organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos de Flora, 2007.

LU, J., XU, Y., YANG, M., FU, X., LUO, F., LI, Z. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Flavonoids from *Cryptotaenia japonica* Hassk. and Evaluation of Antioxidant Activity. **Journal of Agriculture Science**, v. 7, p. 138-146, 2015.

MARAN, J.P.; MANIKANDAN, S.; NIVETHA, C.V.; DINESH, R. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, Supplement 1, p. S1145-S1157, 2017.

MARINS, A.K.M.; VIEIRA, D.F.; QUADROS, I.P. DA S.; PINHEIRO, P.F.; QUEIROZ, V.T. DE; COSTA, A.V. Prospecção fitoquímica das partes aéreas da Erva-de-Santa-Maria (*Chenopodium ambrosioides* L.). In: **Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e Encontro Latino Americano de Pós Graduação**, Alegre, Espírito Santo, v.15, p.1-5, 2011.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**. 4. ed. Londres: George Godwin, 1985.

MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. **Farmacognosia**. Fortaleza: UFC, 1989.

MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: UFC, 2009.

MEZHERICHER, M.; LEVY, A.; BORDE, I. Spray drying modelling based on advanced droplet drying kinetics. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 49, n.11, p. 1205-1213, 2010.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of Dicotyledons**. Oxford: Oxford Press, 1950. v.2

METLEN, K. L.; ASCHEHOUG, E. T.; CALLAWAY, R. M. Plant behavioural ecology:dynamic plasticity in secondary metabolites. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 6, p. 641-653, 2009.

MOLINA-SALINAS, G. M.; SAID-FERNÁNDEZ, S. A. Modified microplate cytotoxicity assay with brime shrimp larvae (*Artemia salina*). **Pharmacologyonline**, v.3, p. 633-638, 2006.

MONZOTE, L.; PASTOR, J.; SCULL, R.; GILLE, L. Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Phymedicine**, v. 21 p.1048-1052, 2014a.

MONZOTE, L.; GARCÍA, M.; PASTOR, J.; GIL, L.; SCULL, R.; MAES, L.; COS, P.; GILLE, L. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main components: activity against *Leishmania*, their mitochondria and other microorganisms. **Experimental Parasitology**, v. 136, p. 20-26, 2014b.

MORELLI, L.L.; PRADO, M.A. Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. **Ultrason Sonochemistry**, v. 19, p. 1144-9, 2012.

MOSYAKIN, S. L., CLEMENTS, S. E. New nomenclatural combinations in *Dysphania* R. Br. (Chenopodiaceae): taxa occurring in North America. **Ukrainsky Botanichny Zhurnal**, v. 59, p. 380-385, 2002.

NAYAK, B.; DAHMOUNE, F.; MOUSSI, K; REMINI, H.; DAIRI, S.; AOUN, O.; KHODIR, M. Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. **Food Chemistry**, v. 187, p. 507-516, 2015.

NEIVA, V.S.; RIBEIRO, M.N. DE S.; CARTÁGENES, M. DO S. DE S.; MORAES-COUTINHO, D. F.; NASCIMENTO, F. R. F; REIS, A. S.; AMARAL, F.M.M. DO. Estudos pré-clínicos de atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* L. e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. **Revista de Ciências da Saúde**, v.13, n. 2, p. 155-165, 2011.

NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **Pharmacologyonline**, v. 14, n. 2, p. 358-361, 2012.

OECD's - Guideline for the Testing of Chemicals – no 423: “**Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**”. (Adopted: 17th December 2001). Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948370.pdf>>. Acesso em: 4 nov. 2016.

OKHALE, S.E.; EGHAREVBA, H.O., ONA, E. C.; KUNLE, O. F. Phytochemical and proximate analyses and thin layer chromatography fingerprinting of the aerial part of *Chenopodium ambrosioides* Linn. (Chenopodiaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 2, p. 2289-2294, 2012.

OLAJIDE, O.A.; AWE, S.O.; MAKINDE, J.K. Pharmacological screening of the methanolic extract of *Chenopodium ambrosioides*. **Fitoterapia**, v. 68, n. 6, p. 529-532, 1997.

OLIVEIRA, E.; SILVA, M.; SPRENGER, L; PEDRASSANI, D. In vitro activity of the hydroalcoholic extract of *Chenopodium ambrosioides* against engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, e0222016, 2017.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

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, ago/set. 2010.

OLIVEIRA, V.B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C.F.; PAULA, C.S.; DUARTE, A.F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu , v. 18, n. 1, supl. 1, p. 230-239, 2016.

ONU. Organização das Nações Unidas. Resolution A/Res/70/1: **Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development**. 2015. Acesso 28 de janeiro de 2018. Disponível em: http://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E

ONOCHA, P. A.; EKUNDAYO, O. Essential oil constituents of *Chenopodium ambrosioides* L. leaves from Nigeria. **The Journal of Essential Oil Research**, New York, v. 11, n. 2, p. 220-222, 1999.

PACIORNIK, E.F. **A planta nossa de cada dia**: plantas medicinais descrição e uso. 2.ed. Curitiba: Gráfica Copygraf, 1990.

PAES, J.P.P.; RONDELLI, V. M., COSTA, A. V.; VIANNA, U. R.; QUEIROZ, V. T. DE. Caracterização química e efeito do óleo essencial de erva-de-santa-maria sobre o ácaro-rajado de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 346-354, Jun. 2015.

PALAV, Y.K.; D'MELLO, P. Standardization of selected Indian medicinal herbal raw materials containing polyphenols as major phytoconstituent. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 4, p. 506-509, 2006.

PALLASTRELLI, M. B. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos enantiosseletivos para separação e determinação do esmolol e sotalol**. 2013. 228p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

PARHIZ, H., ROOHBAKHSH, A., SOLTANI, F., REZAEI, R., IRANSHAHI, M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the *Citrus* Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 323–331, 2015.

PAULA, J. A. M., BRITO, L. F., CAETANO, K. L.F.N.C., RODRIGUES, M.C.M., BORGES, L.L., CONCEIÇÃO, E.C. Ultrasoundassisted extraction of azadirachtin from dried entire fruits of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) and its determination by a validated HPLC-PDA method. **Talanta**, v. 149, p. 77-84, 2016.

PAULUS, D. VALMORBIDA, R.; FERREIRA, S.B.; ZORZZI, I.C.; NAVA, G.A. Biomassa e composição do óleo essencial de manjeriço cultivado sob malhas fotoconversoras e colhido em diferentes épocas. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 46-53, Mar. 2016.

PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S.P.; NIEHUES, M.; LOPES, N.P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1–4, p. 5-16, 2012.

PAVELA, R.; MAGGI, F.; LUPIDI, G. MBUNTCHA, H.; WOGUEM, V.; WOMENI, H.; BARBONI, L.; TAPONDJOU, L.A.; BENELLI, G. *Clausena anisata* and *Dysphania ambrosioides* essential oils: from ethno-medicine to modern uses as effective insecticides. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-11, 2017.

PEREIRA, W.S.; RIBEIRO, B.P.; SOUSA, A.I.P.; SERRA, I.C.P.B.; MATTAR, N.S.; FORTES, T.S.; REIS, A.S.; SILVA, L.A.; BARROQUEIRO, E.S.B.; GUERRA, R.N.M.; NASCIMENTO, F.R.F. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 602–605, 2010.

PIANA, M.; ZADRA, M.; BRUM, T.F.; BOLIGON, A.A.; GONÇALVES, A.F.; CRUZ, R.C. DA; FREITAS, R.B.; CANTO, G.S. DO; ATHAYDE, M.L. Analysis of rutin in the extract and gel of *Viola tricolor*. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 5, p. 406-11, 2013.

PIRES F.C.S., PENA R.S. Optimization of spray drying process parameters for tucupi powder using the response surface methodology. **Journal oh Food Science and Technology**, v. 54, n. 11, p. 3459-3472, 2017.

QI, Y.; JIANG, M.; CUI, Y.-L.; ZHAO, L.; LIU, S. Novel reduction of Cr(VI) from wastewater using a naturally derived microcapsule loaded with rutin–Cr(III) complex. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 336-345, 2015.

RANKELL, A.S.; SCHIFFMAN, R.F. Secagem. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**, v. 1, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

ROLIM, A., MACIEL, C.P., KANEKO, T.M., CONSIGLIERI, V.O., SALGADO-SANTOS, I.M., VELASCO, M.V. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* A. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) commercial extract **Journal AOAC International**, v. 88, p. 1015-9, 2005.

ROSTAGNO, M.A.; PALMA, M.; C.G. BARROSO; C.G. Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 265-272, 2007.

SÁ, R. D.; GALVÃO, M.A.M.; FERREIRA, M.R.A.; SOARES, L.A.L.; RANDAU, K.P. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Chenopodium ambrosioides*

L. grown in Recife-PE, Brazil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 95, n. 3, p. 855-866, 2014.

SÁ, R. D.; SANTANA, A.S.C.O., SILVA, F.C.L., SOARES, L.A.L.; RANDAU, K.P. Anatomical and histochemical analysis of *Dysphania ambrosioides* supported by light and electron microscopy. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 533-543, Oct. 2016.

SANTIAGO, J.A. CARDOSO, M. DAS G.; BATISTA, L.R.; CASTRO, E.M. DE; TEIXEIRA, M.L.; PIRES, M.F. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L.: secretory structures, antibacterial and antioxidant activities. **Acta Scientiarum Biological Science**, v. 38, n. 2, p. 139-147, April-June, 2016.

SASS, J.E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: Iowa State College Press, 1951.

SENNA, L. *Dysphania* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Acesso em 28 de junho de 2018. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB139867>>.

SHAH, H. Antibacterial and antifungal activities of the crude extracts from the stem of *Chenopodium ambrosioides* Linn, an indigenous medicinal plant. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 8, p. 231-234, 2014.

SILVA, M.G.C. DA; AMORIM, R.N.; CÂMARA, C.C.; FONTENELE NETO, J.D.; SOTO-BLANCO, B. Acute and sub-chronic toxicity of aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides* leaves in rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, p. 979-84, 2014.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento** 2 ed. São Paulo: Editora Grupo A SP, 2017. 502p.

SMILLIE, W.G.; PESSOA, S.B. A study of the anthelmintic properties of the constituents of the oil of *Chenopodium*. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 24, n. 5, p. 359-70, 1924.

SONG, K.; ZHANG, J. ZHANG, P.; WANG, H.-Q.; LIU, CHAO; LI, B.-M.; KANG, J.; CHEN, R.-Y. Five new bioactive compounds from *Chenopodium ambrosioides*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 17, n. 5, p. 482-490, 2015.

SOUSA, M.P.; MATOS, M.E.O., MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Edições UFC, 1991.

SOUSA, Z. L.; OLIVEIRA, F.F.; CONCEIÇÃO, A. O.; SILVA, L.A.M.; ROSSI, M.H.; SANTOS, J. S.; ANDRIOLI, J.L. Biological activities of extracts from *Chenopodium ambrosioides* Lineu and *Kielmeyera neglecta* saddi. **Annals of clinical Microbiology and Antimicrobials**, London, v. 11, n. 20, p. 1-7, 2012.

SOUZA, L.P. ZAGO, H.B.; COSTA, A.D.; STINGUEL, P.; VALBON, W.R. Composição química e atividade acaricida do óleo essencial de erva-de-santa-maria sobre o ácaro-rajado. **Revista Caatinga**, v.28, n.1, p.160-166, mar. 2015.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: Guia ilustrado para identificação de famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. Seropédica: Instituto Plantarum, 2008.

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

STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 12. Disponível em: <http://www.statsoft.com>. Acesso: 20 de junho de 2018.

SUKHORUKOV, A.P.; ZHANG, M. Fruit and Seed Anatomy of *Chenopodium* and Related Genera (Chenopodioideae, Chenopodiaceae/Amaranthaceae): Implications for Evolution and Taxonomy. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, e61906, 2013.

TAHRAOUI, A.; EL-HILALY, J.; ISRAILI, Z.H.; LYOUSSEI, B. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (*Errachidia province*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 105-117, 2007.

TONON, R. V.; BRABET, C. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 444-450, 2009.

TRIVELLATO-GRASSI, L.; MALHEIROS, A.; MEYRE-SILVA, C.; BUSS, Z. DA S.; MONGUILHOTT, E.D.; FRÖDE, T.S.; SILVA, K.A. DA; SOUZA M.M DE. From popular use to pharmacological validation: a study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 127-138, 2013.

VALÉRIO, E. DA S.; RAMOS BARBOSA, W.L.; FINGER, R.M.; MUZITANO, M.F.; ARAÚJO, M.H. DE; VASCONCELOS, F. DE; TEIXEIRA, F.M. Physicochemical characterization, microbiological quality control and toxicity evaluation of the hydroethanolic extract from *Chenopodium ambrosioides* Linn. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n.10, p. 4190-4197, 2015.

VAN DEN DOOL, H., KRATZ, P.D. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

WALTON, D.E. Spray-Dried particle morphologies. **Developments in Chemical Engineering and Mineral Processing**, v. 10, n. 3/4, p. 323-348, 2002.

WINSOR, M. P. Cain on Linnaeus: The scientist-historian as unanalysed entity. **Studies in History and Philosophy of Biology and biomedical Sciences**, v. 32, n. 2, p. 239-254, 2001.

WANG, X.S.; WU, Y.F.; DAI, S.L.; CHEN, R.; SHAO Y. Ultrasound-assisted extraction of geniposide from *Gardenia jasminoides*. **Ultrason Sonochemistry**, v.19, p.1155–9, 2012.

WANG, X., WU, Y., CHEN, G., YUE, W., LIANG, Q., WU, Q. Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology, **Ultrason Sonochememistry**, v. 20, p. 846-854, 2013.

YAN, B.; LI, Y.; GUO,Z.; QU, Z. Quality by design for herbal drugs: a feedforward control strategy and an approach to define the acceptable ranges of critical quality attributes. **Phytochemical analysis**, v. 25, n. 1, p. 59-64, 2014.

YE, H. LIU, Y.; LI, N.; YU, J.; CHENG H.; LI, J.; ZHANG, X.Z. Anti-Helicobacter pylori activities of *Chenopodium ambrosioides* L. *in vitro* and *in vivo*. *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, n. 14, p. 4178-4183, 2015.

WHO. **Traditional Medicine Strategy 2002-2005**. Acesso em 21 de outubro de 2016. Disponível em: http://www.wpro.who.int/health_technology/book_who_traditional_medicine_strategy_2002_2005.pdf

WHO. **Traditional Medicine Strategy 2014-2023**. 2014. Acesso em 19 de agosto de 2016. Disponível em: http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/

WU, Y., HU, H.B., WANG, C.L., MA, S.R., L L ZHANG, L.L. Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoids compounds from *Chenopodium hybridum* L. stem with response surface methodology. **IOP Conferences Series: Earth and Environmental Science**, v. 41, p. 1-9, 2016.

YAKOUB, A.R.B., ABDEHEDI, O., JRIDI, M.; ELFALLEH, W., NASRI, M., FERCHICHI, A. Flavonoids, phenols, antioxidant, and antimicrobial activities in various extracts from Tossa jute leave (*Corchorus olitorus* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 118, p. 206-213, 2018.

ZHAO, C.; LI, X.; MIAO, J.; JING, S.; LI, X. HUANG, L.; GAO, W. The effect of different extraction techniques on property and bioactivity of polysaccharides from *Dioscorea hemsleyi*. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 102, p. 847-856, 2017.

ZU, Y.; LI, C.; FU, Y.; ZHAO, C. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. **Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 41, p. 714-719, 2006.

Anápolis, 04 de dezembro de 2017.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE
PESQUISA DO PROTOCOLO N. 006/2017**

I - Finalidade do projeto de pesquisa:
II - Identificação:
<input type="checkbox"/> Título do projeto: Avaliação da toxicidade oral do extrato padronizado a partir de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (Amaranthaceae)
<input type="checkbox"/> Pesquisador Responsável/ Unidade: Joelma Abadia Marciano de Paula
<input type="checkbox"/> Pesquisadores Participantes: Vanessa Cristiane de Santana Amaral; Thaís Moreira Silva Ferreira e Maria Patrícia Vilaça
<input type="checkbox"/> Unidade onde será realizado: Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET) da UEG.
<input type="checkbox"/> Data de apresentação a CEUA: 07/08/2017
III - Objetivos e justificativa do projeto:
Objetivo Geral Desenvolvimento tecnológico do extrato seco padronizado em ascaridol, das partes aéreas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L., e avaliação da sua toxicidade. Objetivos específicos e metas <input type="checkbox"/> Obtenção e caracterização da matéria-prima vegetal; <input type="checkbox"/> Estudo farmacognóstico e determinação dos parâmetros de qualidade <input type="checkbox"/> Desenvolvimento e otimização do método de extração assistido por ultrassom do ascaridol; <input type="checkbox"/> Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para a identificação e quantificação de ascaridol nos diferentes extratos;

- Obtenção, padronização e caracterização físico-química do extrato líquido concentrado de *C. ambrosioides*;
- Otimização do processo de secagem em *spray dryer*, para obtenção do extrato seco de *C. ambrosioides*;
- Padronização e caracterização físico-química do extrato seco de *C. ambrosioides*;
- Avaliação da toxicidade do extrato seco padronizado de *C. ambrosioides* sobre o microcrustáceo *Artemia salina*;
- Avaliação da toxicidade oral aguda do extrato seco padronizado de *C. ambrosioides* em roedores;
- Formação de recursos humanos na graduação e pós-graduação *stricto sensu*, realização de pedidos de patentes de produtos e/ou processos, divulgação dos resultados em eventos científicos e periódicos.

IV - Sumário do projeto:

Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:

O método empregado no presente estudo já se configura como um método alternativo, dentro dos preceitos de redução do número de animais em experimentos dessa natureza.

Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):

Rattus norvegicus Wistar, 12 fêmeas de 180 a 250g de peso.

Espécie e número total de animais utilizados:

Rattus norvegicus 12

Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:

Neste biotério os animais serão mantidos em gaiolas de polietileno e utilizados nos experimentos após um período mínimo de quinze dias de adaptação a este local. A temperatura ambiente será controlada em 22 + ou - 2 °C e a iluminação artificial mantida segundo um ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00 h). Os animais se alimentarão com ração e água *ad libitum* durante todo o estudo. Os animais serão mantidos em caixas de polipropileno (41 cm de comprimento x 34 cm de largura x 16 cm de altura).

Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:

Os riscos aos pesquisadores incluem acidentes durante o manuseio dos animais e se caracterizam, principalmente, por mordidas e arranhões. Além disso, pode ocorrer eventual contato com fluidos biológicos (sangue, fezes, urina) e com reagentes durante a preparação do extrato.

Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:

Com o intuito de promover o bem-estar dos animais eles permanecerão acomodados sempre em ambiente limpo, com maravalha, água e ração *ad libitum*. O status corporal, o peso e o consumo de água e ração dos animais serão avaliados diariamente para análise das condições de saúde e decisão da continuidade ou não do animal nos experimentos, para diminuir a dor e o sofrimento, como também para melhorar a qualidade dos resultados experimentais. O procedimento de manejo será realizado por pessoas bem treinadas para a execução dessas técnicas.

Método de eutanásia:

Descrição: Os animais serão eutanasiados por meio da administração de uretana na dose letal de 5 mL/kg via intraperitoneal.

Destino do animal:

Eutanasiados

IV – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

Quanto a documentos:

Completo

Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:

Todos os experimentos desse estudo estão de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

V - Parecer da CEUA:

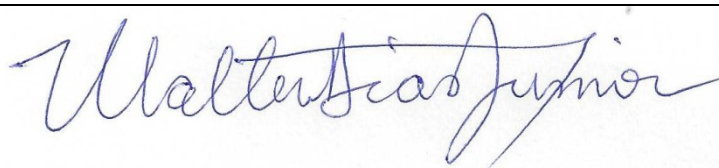
Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Estadual de Goiás, após análise, considerou **APROVADO**, o projeto acima referido, o qual foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes, smj dessa Comissão.

O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UEG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) após sua conclusão. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à

CEUA-PrP-UEG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para **conclusão em 30/06/2018**.

VI - Data da reunião:

Reunião realizada no dia: 04/12/2017



Prof. Dr. Walter Dias Júnior

Coordenador da CEUA/UEG