



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

MAIARA PRATES DE ALMEIDA

OBTENÇÃO DE COMPRIMIDOS CONTENDO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO *spray dried* PADRONIZADO DE
***Lippia alba* (MILLER) N. E. BROWN**

Vitória da Conquista, BA

2019

MAIARA PRATES DE ALMEIDA

**OBTENÇÃO DE COMPRIMIDOS CONTENDO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO *spray dried* PADRONIZADO DE
Lippia alba (MILLER) N. E. BROWN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito
para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Freire Leite

Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Angélica Gomes Ferraz

Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA

2019

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

A447

Almeida, Maiara Prates de.

Obtenção de comprimidos contendo extrato hidroalcoólico *spray dried* padronizado de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown. / Maiara Prates de Almeida - 2019.
87 f.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Freire Leite

Coorientadora: Prof.ª Dr.ª Angélica Gomes Ferraz

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2019.

1. *Lippia alba*. 2. Medicamentos Fitoterápicos. I. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Leite, Mateus Freire. III. Ferraz, Angélica Gomes. IV. Título.

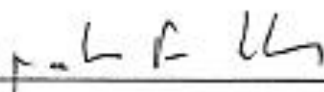
CDU: 582.929.4

MAIARA PRATES DE ALMEIDA

OBTENÇÃO DE COMPRIMIDOS CONTENDO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO *spray dried* PADRONIZADO DE *Lippia alba* (MILLER)
N. E. BROWN

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 06/12/2019.



Prof. Dr. Mateus Freire Leite (Orientador)
(Universidade Federal de Alfenas-MG)



Prof. Dr. Juliano Geraldo Amaral (examinador)
(Universidade Federal da Bahia)



Prof. Dr. André Luís Morais Ruela (examinador)
(Universidade Federal de Ouro Preto)

Á minha querida família, com todo o meu amor e reconhecimento por tudo que sou e o que serei graças ao cuidado, amor e carinho de vocês.

AGRADECIMENTOS

Por ter fé e confiar na divina bondade do Pai, agradeço a Ele por todas as vitórias alcançadas, pois “Sabemos que todas as coisas contribuem juntamente para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito” (Rm 8:28). Por me mostrar que o tempo de Deus é o mais importante, por me dar a oportunidade de trabalho para o bem e também de aprender e valorizar as coisas mais importantes da vida.

Ao meu alicerce, minha família. Agradeço aos meus pais por me inspirarem na luta diária, no trabalho, honestidade e amor. Tenho em vocês o exemplo de bondade e sabedoria, de compreensão e confiança. Obrigada por tudo que fizestes para construção da nossa família. A minha mãe, por ser minha maior incentivadora, por sempre ter lutado na busca de uma boa educação e do melhor para eu e minhas irmãs. Ao meu pai, por ser um exemplo de heroísmo, de vencer as dificuldades da vida e que nunca mediu esforços pela união da família.

Às minhas irmãs, por todo apoio concedido, incentivo, amor, amizade, risadas compartilhadas e também confidências. Vocês são as melhores irmãs que eu poderia ter tido. Ao meu sobrinho, Hugo, pelos momentos de descontração, brincadeiras, cuidado e amor de Tia.

Ao meu noivo, Raviêr, por me apoiar e incentivar. Ser o meu porto seguro nos momentos de desespero e me confortar sempre que eu precisasse. Obrigado por todo amor, por tudo que fazes pela minha vida. Amo você!

Ao meu orientador professor Dr. Mateus Freire Leite por todos os conhecimentos compartilhados durante esses anos de parceria. Pela confiança na realização deste trabalho, por acreditar que ele seria possível. Agradeço pelo exemplo de profissional que és, pela integridade e sabedoria. Obrigada, por tudo.

À professora Dr^a. Angélica Ferraz Gomes, por todo auxílio, por aceitar ser a minha coorientadora e sempre me ajudar, nos momentos de dúvidas e em que precisei de auxílio. Agradeço confiança no manejo do HLPC e por permitir que ao auxilia-la com a orientação das alunas de iniciação, eu conseguisse trabalhar competências ainda não desenvolvidas. Seu apoio foi imensurável e sou eternamente grata pelo que faz no projeto da *Lippia alba*.

Ao professor Dr. Juliano Geraldo Amaral, pela amizade, por abraçar este trabalho como se fosse seu, por toda a disponibilidade, mesmo diante das dificuldades, erros e acertos, nas orientações e milhares de explicações, até que tudo estivesse perfeito. Agradeço, por tudo, por todos os ensinamentos que com você tive durante esses anos de convivência. Sem dúvidas com o exemplo de professor que é, eu me inspirarei por toda vida, pois foram muitos os aprendizados.

À querida, Lorena Alves de Oliveira Silva, por embarcarmos juntas nesse desafio, por se tornar uma grande amiga, cúmplices e confidentes. Agradeço a Deus por ter tido ao meu lado alguém para dividir um momento tão importante em minha vida.

Aos técnicos, Lucimara, Robson, Sérgio e Janeide, pelo profissionalismo, por confiarem em meu trabalho e pela disponibilidade sempre que precisei.

Aos professores Dr. Geraldo Alves da Silva e Dr. Marcelo Aparecido da Silva, da Universidade Federal de Alfenas, pelo auxílio no processo de secagem do extrato por spray dryer. Muito obrigada!

À Lara Zimmermann, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela triagem virtual da atividade ansiolítica dos compostos majoritários da *Lippia alba*.

À Universidade Federal da Bahia – IMS/CAT, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, professores e técnicos-administrativos, pelo auxílio e competência. Por se dedicarem para melhora contínua da pesquisa e educação no Instituto Multidisciplinar em Saúde.

Aos colegas do mestrado: Nívea, Danielba, Thiago, Luana, Suzete, Magda, Marisol, Bruno e Roberta. Por caminharmos juntos e tornarem os momentos mais descontraídos e tranquilos.

Aos alunos de iniciação científica Girlane, Débora, Brenda, Maria Alice, Larissa, Sayuri e Fyama, por toda ajuda disponibilizada e a Tassy e Catarina. Obrigada pelos momentos de descontração no laboratório e por me divertirem nos momentos difíceis. Aprendi bastante ao ajudá-los.

À Gabriela Santana pelo auxílio com a identificação das plantas utilizadas no trabalho.

À amiga Indira Correia, por me incentivar e não medir esforços em me ajudar, seja no início desse jornada, quanto ao fim dela, por ser tão amiga e compreensiva. Muito obrigada pela sua amizade.

Por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho de mestrado. Muito obrigada!

RESUMO

ALMEIDA, Maiara Prates de. Obtenção de comprimidos contendo extrato hidroalcoólico *spray dried* padronizado de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown. 87 f. il. 2019. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2019.

A *Lippia alba* pode ser considerada uma espécie vegetal promissora ao desenvolvimento de um novo medicamento. Conhecida como erva-cidreira, apresenta diversas atividades farmacológicas tais como a anestésica e sedativa. Dentre as principais classes de metabólitos especiais não voláteis identificados nesta espécie encontram-se os iridoídeos, flavonóides e fenilpropanóides. O acteosídeo é o fenilpropanoide majoritário presente nas folhas de *L. alba*, podendo ser um marcador analítico para a planta. As ações farmacológicas desta substância são atividade antioxidante, ansiolíticas e até neuroprotetiva. O presente estudo objetivou o desenvolvimento e caracterização físico-química de comprimidos obtidos a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *L. alba* seco por *spray drying*. Análises assistidas por computador (predição PASS e *docking* molecular) foram realizadas com os 15 compostos identificados nesta espécie para descobrir os fitoconstituintes responsáveis pela ação ansiolítica e definir seu o marcador biológico. Em relação à matéria prima vegetal, foi preparado o extrato hidroalcoólico das folhas de *L. alba* através da percolação. O extrato foi seco por *spray drying* (SDLA). Cálculos do índice de Carr (IC) e razão de Hausner (RH) foram utilizados para caracterizar o pó obtido (SDLA) e as formulações desenvolvidas. Além disso, o ângulo de repouso foi calculado para os adjuvantes utilizados, o extrato e para formulação escolhida. Para realizar a análise quantitativa do marcador selecionado foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE. Os parâmetros de controle de qualidade dos comprimidos desenvolvidos foram avaliados segundo a Farmacopeia Brasileira. Para selecionar o meio de dissolução, foram realizados o teste de solubilidade do insumo farmacêutico ativo, o extrato, a partir da quantificação do acteosídeo. Os resultados da predição PASS apontaram uma possível ação ansiolítica do acteosídeo. Em relação aos extratos obtidos, o extrato SDLA 7 e a formulação 9 apresentaram-se excelentes para o IC e RH, sendo o extrato SDLA 7 selecionado para o desenvolvimento e a formulação 09 para a compressão direta. O método quantitativo desenvolvido foi validado de acordo as diretrizes vigentes. Os comprimidos obtidos foram aprovados quanto aos testes de controle de qualidade submetidos. O teste de solubilidade apresentou maior solubilidade com menor indicativo de degradação no meio HCl 0,1M, sendo este o meio utilizado para dissolução. O produto desenvolvido apresentou liberação de 84,06% em 30 minutos no ensaio de dissolução. Dessa forma, obteve-se um produto tradicional fitoterápico a partir do extrato seco por *spray drying* a partir do extrato das folhas de *L. alba*, utilizando o acteosídeo como marcador, aprovado nos testes de controle de qualidade com um método validado para quantificação do ativo.

Palavras-chave: *Lippia alba*; Comprimidos; Fitoterápicos; Validação; Acteosídeo; CLAE; Erva-cidreira.

ABSTRACT

ALMEIDA, Maiara Prates de. Obtaining tablets containing standard spray dried hydroalcoholic extract from *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown. 87 f. il. 2019. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2019.

One of the promising native species to develop a new drug is *Lippia alba*. This plant is popularly known as “erva-cidreira” and among the pharmacological activities of the plant are anesthetic and sedative. The main classes of special non-volatile metabolites identified in this species are the iridoids, flavonoids and also phenylpropanoids. Acteoside is a major phenylpropanoid present in the leaves of *L. alba* and can be an analytical marker for this plant. Its pharmacological actions range from antioxidant, anxiolytic and even neuroprotective activity. The present study aims for the development and chemical-physical characterization of tablets obtained from spray-dried *L. alba* hydroalcoholic extract. Computer-aided analyzes (PASS prediction and molecular docking) were performed with the 15 compounds identified in this species to discover the phytochemicals responsible for anxiolytic action and define their biological marker. The hydroalcoholic extract of leaves of *L. alba* was prepared through percolation. The extract was spray-dried (SDLA). Carr index (CI) and Hausner ratio (HR) were used to characterizing the powder obtained (SDLA), and the formulations developed. The angle of repose was calculated for the adjuvants used, the extract and for the chosen formulation. To perform the quantitative analysis of the selected marker, an analytical method by HPLC was developed and validated. The quality control parameters of the tablets developed were evaluated according to the Brazilian Pharmacopeia. To select the dissolution medium, the solubility test of the active pharmaceutical ingredient, the extract, was performed based on the quantification of the acteoside. The results of the PASS prediction pointed to a possible anxiolytic action of the acteoside. The SDLA 7 extract and formulation 9 were excellent for CI and HR, with SDLA 7 extract being selected for development and formulation 9 for direct compression. The quantitative method developed was validated according to the current guidelines. The tablets obtained were approved for the quality control tests submitted. The solubility test showed greater solubility with less indication of degradation in the 0.1M HCl medium, which is the medium used for dissolution. The developed product showed 84.06% release in 30 minutes in the dissolution test. A traditional herbal product was obtained from the spray-dried extract from *L.alba* leaf extract, using acteoside as a marker, approved in quality control tests with a validated method for quantification of active.

Keywords: *Lippia alba*; Tablets; Herbal medicines; Validation; Acteoside; HLPC.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
µg	Micrograma
µg mL⁻¹	Micrograma por mililitros
µL	Microlitros
µm	Micrometro
ALCB	Herbário Alexandre Leal Costa
CAT	Campus Anísio Teixeira
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de arranjo de diodos
DSC	Dióxido de Silício Coloidal
DAD	Detector de arranjo de diodo
GOLD	<i>Genetic Optimization for Ligand Docking</i>
IC	Índice de Carr
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IMS	Instituto Multidisciplinar em Saúde
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LSS	Lauril Sulfato de Sódio
M	Molar
MCC	Celulose Microcristalina
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mL min⁻¹	Mililitros por minuto
Mm	Milímetros
Nm	Nanômetros
°C	Grau Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
Pa	Provável atividade
Pi	Provável inatividade
r	Coefficiente de correlação
r²	Coefficiente de determinação
RH	Razão de Hausner
RPM	Rotações por minuto
RSMD	<i>Root mean square deviation</i>
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SDLA	Extrato seco por <i>spray drying</i>
SQR	Substância Química de Referência
TR	Tempo de Retenção
UFBA	Universidade Federal da Bahia
PASS	<i>Prediction of activity spectra for substances</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
Formas Farmacêuticas Sólidas	17
Fitoterápicos	22
A espécie <i>Lippia alba</i>	24
Validação Analítica	31
3 OBJETIVOS	33
Objetivo Geral	33
Objetivos Específicos	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
Escolha do marcador químico através da predição do espectro de atividade biológica e <i>docking</i> molecular	34
Obtenção do extrato seco por <i>spray drying</i> padronizado a partir das folhas de <i>Lippia alba</i> ..	34
Material Vegetal	34
Obtenção do extrato hidroalcoólico de <i>Lippia alba</i>	35
Secagem por <i>spray drying</i> do extrato hidroalcoólico de <i>Lippia alba</i>	35
Obtenção dos comprimidos a partir do extrato seco por <i>spray drying</i> das folhas de <i>Lippia alba</i>	36
Escolha dos Adjuvantes	36
Determinação do ângulo estático de repouso e densidade bruta	36
Determinação da densidade aparente, Índice de Carr e Razão de Hausner dos extratos de <i>Lippia alba</i> secos por <i>spray drying</i>	36
Mistura do Pó	37
Compressão	37
Validação de metodologia analítica para quantificação do Acteosideo no extrato padronizado de <i>Lippia alba spray drying</i> e nos comprimidos de <i>Lippia alba</i>	37
Seletividade	37
Linearidade	38
Precisão	38
Exatidão	38
Limite de Detecção e Quantificação	39
Robustez	39
Análise Estatística da Validação Analítica	39

Controle de qualidade físico-químico dos comprimidos desenvolvidos a partir do extrato de <i>Lippia alba</i> seco por <i>spray drying</i>	39
Determinação do peso médio do comprimido.....	39
Determinação da dureza.....	39
Friabilidade.....	39
Desintegração.....	40
Teste de Solubilidade do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA).....	40
Análise quantitativa do extrato seco por <i>spray drying</i> e comprimidos de <i>Lippia alba</i>	40
Preparo da Substância Química de Referência (SQR) e amostras contendo o extrato <i>Lippia alba</i>	41
Teste de dissolução.....	41
Doseamento do extrato de <i>Lippia alba</i> e comprimidos contendo o extrato de <i>Lippia alba</i>	41
REFERÊNCIAS.....	43
CAPÍTULO 1.....	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de fitoterápicos inclui várias etapas e envolve um processo interdisciplinar, multidisciplinar e muitas vezes interinstitucional. As áreas de conhecimento envolvidas vão desde a antropologia, botânica, biologia, agrologia, fitoquímica, química, farmacologia, toxicologia e tecnologia farmacêutica (TOLEDO et al., 2003), como também fisiologia e farmacocinética. Porém, políticas claras que proporcionem ações e fomento do governo na área de fitoterápicos são entraves antigos; contudo são necessárias, não só para o desenvolvimento do setor, como também para o desenvolvimento social e econômico do país (HEINZMANN *et al.*, 2007).

Uma das espécies medicinais nativas promissoras ao desenvolvimento de um novo medicamento é a *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex P. Wilson (CAMILLO, 2017). Esta planta popularmente conhecida como erva-cidreira, é uma espécie pertencente à família Verbenaceae, distribuída na América do Sul e Central. Constitui-se de um arbusto que alcança 1 a 2 metros de altura, podendo também ser chamada de falsa-melissa, cidreira do campo, alecrim do campo e cidreira brava (HENNEBELLE et al., 2008a; LORENZI; MATOS, 2008; MATOS, 2002). Devido a presença de componentes como o citral nos óleos essenciais extraídos das folhas desta espécie, a mesma, pode ser confundida com a *Melissa officinalis*, devido ao odor cítrico característico proveniente dos óleos (JULIÃO et al., 2003).

As atividades farmacológicas das folhas desta espécie foram avaliadas em diversos trabalhos na tentativa de comprovar os efeitos relatados nos estudos etnofarmacológicos (FÁTIMA et al., 2010; OLIVEIRA; BARROS; NETO, 2010; PINTO; AMOROZO; FURLAN, 2006) tais como teste de atividade no sistema cardiovascular (GAZOLA et al., 2004; MAYNARD et al., 2011), atividade antioxidante (HENNEBELLE et al., 2008b), ansiolítica (HATANO et al., 2012; ZÉTOLA et al., 2002), analgésica e anti-inflamatória (VIANA et al., 1998), antibacteriana (AGUIAR et al., 2008), antiviral (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005), anti-úlceras (PASCUAL M. E. et al., 2001) e anticonvulsivante (SOARES, 2001).

Estudos realizados quanto aos componentes fixos presentes na planta, revelaram que as principais classes de metabólitos especiais identificados nesta espécie são os fenilpropanoides, iridoides e flavonoides (GOMES et al., 2018; HENNEBELLE et al., 2008b; TIMÓTEO et al., 2015; ZÉTOLA et al., 2002) No entanto, existem ainda poucos estudos que avaliam a atividade das substâncias fixas isoladas a partir desta

planta, sendo que a maioria dos testes realizados foram com os compostos majoritários presentes nos óleos essenciais. Dentre os compostos fixos avaliados os que apresentaram maior atividade *in vitro* no SNC foram a luteolina-7-*O*-diglucuronídeo (HENNEBELLE et al., 2008b) e o verbascosídeo ou acteosídeo (DAELS-RAKOTOARISON et al., 2000; NETO et al., 2009; RAZAVI; ZARGARANI; HOSSEINZADEH, 2017), evidenciando que os componentes não voláteis também podem estar relacionados com o efeito sedativo e ansiolítico da planta.

Gomes e colaboradores (2019) realizaram o estudo sazonal desta espécie e foi observada variações na produção de componentes fixos nos extratos. No inverno, houve a predominância do fenilpropanoide acteosídeo (quase 90%) e no verão do flavonoide tricina-7-*O*-diglucuronídeo. (GOMES et al., 2019). Em relação à atividade farmacológica de um dos principais componentes presente nos extratos desta espécie, o acteosídeo, demonstrou seus efeitos no SNC em estudo no qual essa substância apresentou afinidade pelos receptores dopaminérgicos, benzodiazepínicos e morfínicos (DAELS-RAKOTOARISON et al., 2000). Além destes resultados em ensaios *in vitro*, o acteosídeo identificado em outras espécies vegetais também demonstrou atividade antioxidante, ansiolíticas (COSTA DE MELO et al., 2019) e até neuroprotetiva (JI et al., 2019; KOO et al., 2006; NETO et al., 2009; PENG et al., 2015). Portanto, essa substância pode ser eleita como um importante marcador para esta espécie, uma vez que, além de apresentar atividade biológica, é também o composto majoritário em diversas amostras desta planta (GOMES et al., 2018, 2019; TIMÓTEO et al., 2015).

A RDC N° 26 de 13 de maio de 2014 define marcador como uma substância ou classe de substâncias que podem ser utilizadas como referência no controle de qualidade de um fitoterápico. O marcador pode ser do tipo ativo, quando relacionado com a atividade terapêutica do fitocomplexo, ou analítico, quando não demonstrada, até o momento, sua relação com a atividade terapêutica do fitocomplexo (BRASIL, 2014). Desta forma, o acteosídeo pode ser classificado tanto como um marcador analítico quanto marcador ativo, o que é o ideal para o controle de qualidade de produtos fitoterápicos.

De acordo com RDC N° 26, produtos tradicionais fitoterápicos são obtidos com o emprego de matérias primas vegetais cuja segurança e efetividade está baseada no uso seguro e efetivo, publicados na literatura técnico-científica, com um período mínimo de 30 anos (BRASIL, 2014). A espécie *L. alba* atende a esse requisito, pois para a mesma existem publicações sobre seu uso desde 1985, conforme levantamento realizado no

portal de periódico da CAPES (COSTA et al., 1989; DE MONTELLANO; BROWNER, 1985; MIGUEL et al., 1989;). Além disso, nesta resolução, para uma planta poder ter seu uso autorizado como produto tradicional fitoterápico a mesma deve ser citada em algumas referências sugeridas pela mesma, sendo a *Lippia alba* encontrada em muitas destas publicações (BIESKI; DE LA CRUZ, 2005; DUKE; BOGENSCHUTZ-GODWIN; OTTESEN, 2009; MATOS, 2002) além de estar presente também no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2018a).

O Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira traz informações relevantes quanto a indicações, orientações para o preparo e o modo de uso, entre outros. Este formulário contém informações baseadas em vasta literatura científica que tratam de dados de eficácia e segurança das plantas mencionadas, sendo passível para prescrição médica, já que possui o respaldo do uso e segurança pela legislação (BRASIL, 2018a).

Neste contexto, em relação à segurança e efetividade do produto tradicional fitoterápico a espécie *L. alba* atende aos requisitos exigidos e, portanto, é promissora ao desenvolvimento de um novo medicamento.

As formas farmacêuticas sólidas são muito utilizadas pela população, em formatos de comprimidos ou cápsulas, devido a sua praticidade e exatidão das doses unitárias (LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, 2001; SINKA et al., 2009) Por esse motivo, escolheu-se a forma farmacêutica comprimido para o desenvolvimento do produto.

Grande parte dos fitoterápicos desenvolvidos é em formas farmacêuticas sólidas, de modo que a matéria-prima utilizada é constituída por extratos vegetais secos por diferentes técnicas, sendo que a secagem por aspersão (*spray drying*) permite que se obtenha maior estabilidade físico-química e microbiológica, devido à retirada de água, a padronização do extrato, quanto aos seus componentes ativos (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Dessa forma, a secagem de extrato vegetal por atomização (*spray dryer*) é uma das alternativas para obter um pó com características adequadas ao desenvolvimento de uma forma farmacêutica sólida, relacionadas à baixa higroscopia e aumento da fluidez da formulação, como também a facilidade no processo de compressão por via direta, o que favorece a produção deste medicamento fitoterápico. A vantagem da obtenção do extrato seco por *spray drying* reside, também, na manutenção da estabilidade dos constituintes conferida ao extrato com o uso desta técnica. Além da obtenção e

padronização do extrato que será utilizado como matéria prima para o desenvolvimento do comprimido

Porém, ao desenvolver um novo medicamento, com novos marcadores, faz-se necessário a identificação e quantificação do marcador analítico, no extrato e no produto. Deve-se submeter a amostra a testes analíticos, que garantirão confiabilidade ao método desenvolvido e, assim, um produto eficaz. Portanto, a validação analítica do método precisa ser realizada, seguindo os critérios e normas internacionais e a legislação vigente (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Assim, a proposta do presente trabalho foi o desenvolvimento de um produto tradicional fitoterápico com extrato seco por *spray drying* da espécie *Lippia alba*, na forma farmacêutica comprimido e a validação analítica do método para quantificação do composto majoritário e tanto no extrato, quanto no produto desenvolvido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Formas Farmacêuticas Sólidas

As formas farmacêuticas sólidas são amplamente utilizadas pela população; podem ser compreendidas em pó, sachê, cápsulas, comprimidos, drágeas e comprimidos revestidos. Devido a forma em que se apresentam, possuem vantagens quanto a facilidade de administração, neste caso, a via oral, como também ao preparo, maior exatidão das doses unitárias, além de questões como o armazenamento e maior estabilidade físico-química quando comparados as formas líquidas e semissólidas (LACHMAN et al., 2001).

A preparação de um comprimido, por exemplo, é um processo complexo e multiparamétrico, no qual são realizadas verificações em processos para garantir a qualidade daqueles que foram produzidos (SABRI et al., 2018). Contudo, podem ser fabricados em larga escala e são compactos, facilitando assim seu transporte e armazenamento (AULTON; TAYLOR, 2013). Elas também costumam não apresentar, na maioria das vezes, odor e sabor desagradáveis como acontece com seus correspondentes líquidos de administração oral (ALLEN JUNIOR; ANSEL; POPOVICH, 2007).

Os excipientes são substâncias consideradas inertes que tem a função de auxiliar na produção de uma forma farmacêutica sólida. A escolha destes, de forma ideal para o objetivo proposto, no caso a produção de um comprimido, é de suma importância. Dentre a classificação de excipientes que podem ser utilizados temos os diluentes, desintegrantes, lubrificantes, aglutinantes, entre outros. Estes garantem uma constituição mais homogênea do pó, proporcionam peso ao comprimido, além de permitir uma resistência mecânica adequada, mas que consiga desintegrar frente aos fluidos gástricos (ALLEN JUNIOR; ANSEL; POPOVICH, 2007; PATEL; SHAH; UPADHYAY, 2011).

Os diluentes são exemplos de excipientes, muito utilizado e que conseguem dar carga ao comprimido. Eles garantem carga à formulação e podem, assim, auxiliar no escoamento do pó, a depender das características de fluxo do diluente escolhido, como por exemplo, a lactose anidra, celulose microcristalina e amido. Já os desintegrantes são substâncias que proporcionarão que os comprimidos se desfaçam frente a um líquido e podem influenciar no processo de desintegração e dissolução do medicamento (DUKE; BOGENSCHUTZ-GODWIN; OTTESEN, 2009; FERREIRA, 2011; PATEL; SHAH; UPADHYAY, 2011).

As substâncias aglutinantes garantem uma maior coesividade entre as partículas, o que permite uma melhora na compressibilidade da mistura de pós. Podemos citar a polivinilpirrolidona (PVP), carboximetilcelulose (CMC), a lactose e celulose microcristalina (MCC) como excipientes aglutinantes, sendo os dois últimos bons diluentes (FERREIRA, 2011; PATEL; SHAH; UPADHYAY, 2011).

Outros exemplos de excipientes incluem os lubrificantes e absorventes. Os lubrificantes permitem que a formulação deslize e, assim, melhora o escoamento do pó, pelo alimentador da compressora. Essas substâncias são antiaderentes, o que facilita o processo de compressão e ejeção do comprimido e como exemplo tem o estearato de magnésio e o lauril sulfato de sódio (LSS). Outro adjuvante muito utilizado é o deslizante dióxido de silício coloidal (DSC). Este possui a capacidade de ser lubrificante e absorvente, podendo absorver a umidade residual do pó, o que garante uma mistura mais seca e assim, conseqüentemente, mais fluida, devido à ausência de partículas de água (ALLEN JUNIOR; ANSEL; POPOVICH, 2007; FERREIRA, 2011; PATEL; SHAH; UPADHYAY, 2011; QUODBACH; KLEINEBUDDE, 2016). Tais excipientes podem ser considerados excelentes ativadores de fluxo no que tange o processo de compressão de um pó por via direta, por exemplo.

Para a produção de um comprimido existem vias a serem utilizadas, são elas a compressão por via direta e pela granulação, que pode ser via úmida ou via seca. Para a compressão direta, as características de fluxo da matéria prima utilizada são fundamentais, devendo escoar livremente pela compressora e assim encher a matriz de forma eficaz. Independente da via escolhida, o processo de compactação envolve várias etapas como o enchimento da matriz, a compressão e a ejeção dos comprimidos. Porém, muitos fármacos não apresentam as características necessárias para serem comprimidos diretamente, portanto, a alternativa é a granulação (GOH; HENG; LIEW, 2018; LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, 2001).

Contudo, outros fármacos ainda conseguem ser manipulados, com adição de excipientes com boas características para a compressão direta. Processo que, viabiliza a produção dos comprimidos em larga escala e que é vantajoso do ponto de vista industrial, diante da facilidade de produção e menor quantidade de processos a serem realizados.

Quando se tratam da produção de um comprimido as propriedades do fluxo de pós, como também a forma das partículas são pontos importantes a serem destacados. O bom fluxo de uma formulação garante que se tenha uma mistura mais homogênea, com

bom escoamento pela câmara de compressão e, conseqüentemente, se tem comprimidos com peso uniformes, dureza e friabilidade adequadas (SIERRA-VEGA; ROMANACH; MÉNDEZ, 2019). Para isso, além da escolha de bons excipientes, a determinação do ângulo de repouso, da taxa de fluxo e índice de compressibilidade são fundamentais nos estudos de pré-formulação (MEGARRY et al., 2019).

O comportamento de um pó é multifacetado, a forma das partículas e o seu tamanho influenciam suas características de fluxo (SABRI et al., 2018). Os estudos de pré-formulação são essenciais no desenvolvimento farmacotécnico. Tal procedimento evita gastos desnecessários com testes para chegar a uma formulação ideal. Portanto, as medidas de fluxo são bem vindas e facilitam o bom delineamento da produção de uma forma farmacêutica sólida, como por exemplo, o comprimido.

O parâmetro de medição do fluxo de um pó é o ângulo de repouso. O valor do ângulo irá nos informar sobre como a formulação poderá se comportar dentro de uma matriz de compressão. Um dos métodos utilizados para obter o ângulo de repouso é através do cálculo da tangente do ângulo. À medida que o pó esco sobre uma superfície de diâmetro conhecido, obtém-se uma relação trigonométrica entre a altura (h) e o raio (r), isto nos dará a tangente do ângulo (α) que é determinado pela função inversa da tangente. A tangente do ângulo de repouso pode ser calculada, então, por $\text{tg} = h/r$ (figura 1) (LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, 2001; USP, 2007).

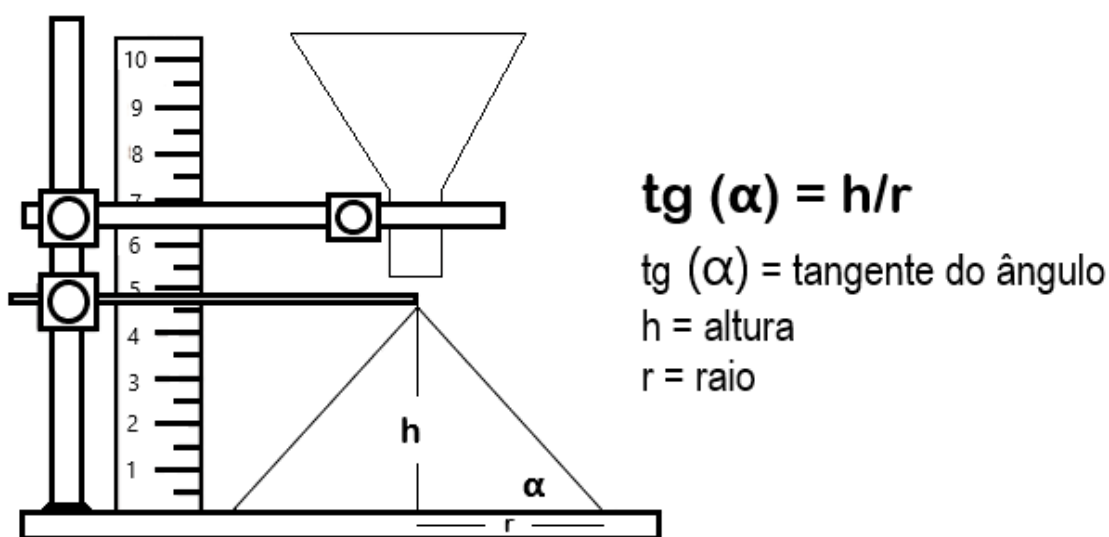


Figura 1: Ilustração e fórmula para determinação do ângulo de repouso.

O resultado do ângulo de repouso pode variar a depender do tamanho das partículas do pó e a sua distribuição, como também o teor da umidade de um insumo

farmacêutico ativo (IFA) ou da mistura. Ângulos com valores menores que 30° já são considerados excelentes para a compressão via direta (AULTON; TAYLOR, 2013; LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, 2001).

O índice de compressibilidade de uma formulação pode ser obtido a partir das densidades bruta e compactada dos pós. A relação massa-volume de um pó é essencial no processo de desenvolvimento, visto que uma partícula pode conter ar nos espaços inter e intrapartículas. Ao definir a densidade relativa de um pó, é possível observar como ele se comportará ao ser submetido a uma força de compressão. A densidade pode aumentar durante o processo de compressão, onde todos os espaços entre as partículas são eliminados (LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, 2001).

Os resultados dos cálculos do Índice de Carr (IC) (1) e Razão de Hausner (RH) (2) irão indicar se o pó é excelente ou não para a compressão. Estes são dois parâmetros, junto ao ângulo de repouso, utilizados para investigação do fluxo do pó (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2019; USP, 2007).

$$\text{Índice de Carr (\%)} = \frac{\text{densidade de compactação} - \text{densidade bruta}}{\text{densidade de compactação}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Razão de Hausner} = \frac{\text{densidade de compactação}}{\text{densidade bruta}} \quad (2)$$

Um insumo farmacêutico ativo, em sua maioria, pode representar boa parte da formulação, como também é o único componente que não pode ser substituído. Os IFAs apresentam propriedades de fluxo consideradas baixas para o processo de compressão direta. A adição de excipientes à formulação e a granulação, podem melhorar o fluxo de uma mistura de pós (MEGARRY et al., 2019).

O desenvolvimento de comprimidos a partir de extratos vegetais constitui um desafio, devido a problemas relacionados às características do extrato, a forma de secagem, a elevada higroscopia, o que afeta o fluxo dos pós e o processo de compressão. A secagem por *spray drying* consiste na transformação de um fluido, com evaporação do solvente e a formação da partícula sólida (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; SINGH; VAN DEN MOOTER, 2016). Ao obter esse extrato, em forma sólida, e ao submetê-lo a um processo de compressão, necessita-se do auxílio de excipientes para a melhoria das características do pó obtido.

Ao ter um extrato seco por *spray drying* e se propor a desenvolver um comprimido, não só os aspectos farmacotécnicos, já discutidos são relevantes. Os testes de qualidade em que as formas farmacêuticas sólidas passam refletem em seus

resultados uma correlação com o bom delineamento de uma formulação. Dentre eles temos a determinação do peso, através do peso médio dos comprimidos produzidos, o teste de friabilidade e dureza, desintegração e dissolução. Todos estes estão descritos na Farmacopeia Brasileira, que especifica limites para aprovação de um lote produzido ou não (BRASIL, 2019).

Diante destes testes de controle de qualidade, o teste de dissolução é um dos mais notórios. A dissolução de um medicamento sólido é definida como a quantidade de fármaco que passa para a solução, durante um período de tempo (MARCOLONGO, 2003). Portanto, a formulação de um fármaco deve, não somente favorecer a produção do mesmo, mas permitir que este seja dissolvido e liberado sem maiores problemas.

Considerando, então, a dissolução de um medicamento *in vivo* Amidon (1995) correlacionou a dissolução de um fármaco *in vitro* com sua biodisponibilidade *in vivo*. Ele assumiu que tanto a permeabilidade, quanto a solubilidade controlam a absorção de um fármaco (AMIDON et al., 1995). Desta forma, houve, então, a subdivisão dos fármacos em quatro categorias:

- Classe I: alta permeabilidade e alta solubilidade;
- Classe II: alta permeabilidade e baixa solubilidade;
- Classe III: baixa permeabilidade e alta solubilidade;
- Classe IV: baixa permeabilidade e baixa solubilidade.

Um dos pontos importantes a serem destacados é a solubilidade de um fármaco, para uma possível classificação biofarmacêutica. A determinação da solubilidade ocorre através da submissão da maior dose posológica em 250 mL de meio aquoso em faixa de pH 1,0 a 6,8, considerando este o volume médio de líquido utilizado por uma pessoa a administrar um medicamento via oral (FDA, 2017).

Quando se desenvolve um novo medicamento, as informações quanto a solubilidade e permeabilidade de uma substância pode, ainda, não ter sido elucidada. O processo de desenvolvimento farmacotécnico torna-se complexo, visto que a escolha do marcador, quando se trata de um fitoterápico, e dos excipientes adequados para bons resultados tanto na compressão, quanto para a dissolução são fundamentais. Dessa forma, têm-se a garantia de um medicamento com boa biodisponibilidade ao ser administrado.

O acteosideo, marcador analítico da *Lippia alba*, apresenta alta solubilidade em água e rápida absorção gastrointestinal. Tais informações são relevantes para sustentação da escolha da forma farmacêutica comprimido, como também para a

atividade farmacológica pretendida, já que o acteosídeo também apresenta boa distribuição nos tecidos, incluindo o cérebro (ALPIEVA et al., 2014; WEN et al., 2015).

Fitoterápicos

Os medicamentos fitoterápicos são produtos obtidos a partir de uma planta medicinal com finalidade profilática, curativa ou paliativa (BRASIL, 2018a). O uso de plantas medicinais no Brasil tem caráter histórico e a imensa biodiversidade que o país possui possibilitou que a população brasileira utilize plantas medicinais para o tratamento de diversas patologias. O preparo de infusos, xaropes, tinturas, decoctos, constitui uma prática cultural, passada de geração para geração, tornando-se algo tradicional, a depender da localidade do país (LORENZI; MATOS, 2008).

O uso de plantas medicinais pela população brasileira para o tratamento de doenças sejam elas agudas ou crônicas é bastante comum. O Brasil tem uma das maiores biodiversidades em relação aos outros países do mundo, o que justifica o interesse de pesquisadores brasileiros que vêm publicando artigos científicos sobre plantas medicinais nos últimos 30 anos. Apesar do avanço do desenvolvimento de fitoterápicos neste período e da parceria entre a comunidade científica com a indústria, o mercado de drogas derivadas de plantas medicinais ainda é pequeno, representando cerca de 5% dos medicamentos comercializados (DUTRA et al., 2016).

A etnofarmacologia, que tem por definição basear-se na exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem (BRUHN; HOLMSTEDT, 1982), caracteriza-se pelo estudo das relações humanas com plantas medicinais, valorizando o conhecimento tradicional e as práticas médicas da sociedade estudada. Portanto, com o seu advento, o estudo das hipóteses quanto as atividades farmacológicas presentes nas plantas medicinais e as possíveis substâncias relacionadas, torna o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos promissor.

Diante do surgimento de novas tecnologias, a preferência por uso de produtos naturais, por parte da população e o desenvolvimento de medicamentos em que seus ativos derivam de plantas medicinais tem aumentado (NEWMAN; CRAGG, 2016). Em 2006, com a publicação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, houve o incentivo para o estudo de plantas medicinais, cultivo das mesmas, além de fomentar a pesquisa,

desenvolvimento tecnológico e inovação na área; como também a implantação da fitoterapia nos serviços de saúde do SUS como uma prática integrativa (BRASIL, 2006a, 2006b).

Porém, para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico são necessárias a junção de conhecimentos nas áreas antropologia, botânica, biologia, agrologia, fitoquímica, química, farmacologia, toxicologia e tecnologia farmacêutica (TOLEDO et al., 2003), como também fisiologia e farmacocinética. Além disso, para o registro do fitoterápico deve-se considerar a legislação vigente.

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26 de 13 de maio de 2014 define critérios para a o registro de um medicamento fitoterápico. É necessária a comprovação de estudos clínicos e não clínicos que evidenciem o uso seguro e efetivo da planta medicinal por um período de no mínimo 30 anos (BRASIL, 2014). Esta resolução determina que para uma planta poder ter seu uso autorizado como produto tradicional fitoterápico a mesma deve ser citada em algumas referências sugeridas pela resolução, sendo a espécie *Lippia alba*, encontrada em muitas destas publicações (BIESKI; DE LA CRUZ, 2005; BRASIL, 2006c; DUKE; BOGENSCHUTZ-GODWIN; OTTESEN, 2009; MATOS, 2002). Além disso, essa espécie também está presente no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2018a).

Portanto, é de suma importância ressaltar que a definição de um marcador químico ou biológico para a planta se faz necessário ao desenvolvimento, visto que os processos de controle de qualidade físico-químicos necessitam ser realizados. A *Lippia alba*, possui um composto majoritário já evidenciado em diversos estudos, o acteosídeo (GOMES et al., 2018, 2019; TIMÓTEO et al., 2015). Para o desenvolvimento deste fitoterápico, o acteosídeo pode ser classificado tanto como um marcador analítico quanto marcador ativo da planta em estudo.

Diante de tais aspectos, o desenvolvimento de fitoterápicos é um processo que exige estudo e dedicação. A biodiversidade é imensa, e temos diversos ativos presentes na maioria das plantas medicinais, porém alguns possuem atividade farmacológica e outros não. Portanto, para o registro de uma forma farmacêutica contendo uma planta, sendo esta considerada pelo conhecimento empírico, medicinal, as evidências científicas referentes a mesma devem ser analisadas.

A espécie *Lippia alba*

A *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex P. Wilson, popularmente conhecida como erva-cidreira, é uma espécie pertencente à família Verbenaceae, distribuída na América do Sul e Central (figura 2). Constitui-se de um arbusto que alcança 1 a 2 metros de altura, podendo também ser chamada de falsa-melissa, cidreira do campo, alecrim do campo e cidreira brava (HENNEBELLE et al., 2008a; LORENZI; MATOS, 2008; MATOS, 2002). Devido a presença de substâncias como o citral nos óleos essenciais, esta espécie pode ser confundida com a *Melissa officinalis*, devido ao odor cítrico característico proveniente dos óleos (JULIÃO et al., 2003).



Figura 2: *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex P. Wilson (Foto do autor).

A espécie é amplamente utilizada na medicina popular devido as suas atividades farmacológicas. Estudos etnofarmacológicos realizados trazem a *Lippia alba* como uma das plantas mais utilizadas pela população brasileira. O uso tradicional dessa espécie é passado de geração em geração, para o tratamento de diversas condições clínicas, sendo, muitas vezes a *L. alba* a mais utilizada dentre as citadas nos estudos etnofarmacológicos. As indicações relatadas para a *Lippia alba* variam desde a atividade calmante, ansiolítico, anti-hipertensivo, uso para enxaqueca até má digestão e ação levemente expectorante (MATOS, 2002; PINTO; AMOROZO; FURLAN, 2006; RODRIGUES; GUEDES, 2006; TAREAU; PALISSE; ODONNE, 2017; VARGAS et al., 2019; VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006).

Os estudos realizados com o intuito de avaliar a atividade farmacológica da *Lippia alba* trazem evidências quanto as ações farmacológicas da planta. Entre elas estão as atividades antiulcerogênica (PASCUAL et al., 2001), antiespasmódica (BLANCO et al., 2013), anestésica (SOUZA et al., 2017) e sedativa (VALE et al., 2002; ZÉTOLA et al., 2002), além de antioxidantes (HENNEBELLE et al., 2008b; OLIVEIRA et al., 2018) e antibacteriana (ARA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2018).

Apesar da grande variedade de estudos voltados para o óleo essencial da *Lippia alba*, os seus constituintes fixos ainda possuem poucos elucidados quanto aos testes biológicas e suas atividades farmacológicas. Sabe-se que a planta foi primeiramente classificada em quimiotipos devido a variação quanto a composição química de seus óleos essenciais (MATOS, 1996).

Matos estabeleceu três quimiotipos para classificação da planta quanto a sua atividade farmacológica. O quimiotipo I foi classificado como cidreira brava e possui elevados teores de mirceno e citral, tendo atividade levemente tranquilizante e espasmolítica, devido a presença do citral, e atividade analgésica relativa ao mirceno. Já o quimiotipo II, conhecida como cidreira-carmelitana ou falsa-melissa, caracteriza-se pela presença de limoneno e citral, o que seria sugerido a ação calmante, espasmolítica e anticonvulsivante. A cidreira-comum, conhecida também como falsa-melissa, seria determinada como quimiotipo III. Possui em seu óleo essencial carvona e mirceno como principais componentes. A carvona seria responsável pela leve ação expectorante (MATOS, 2002).

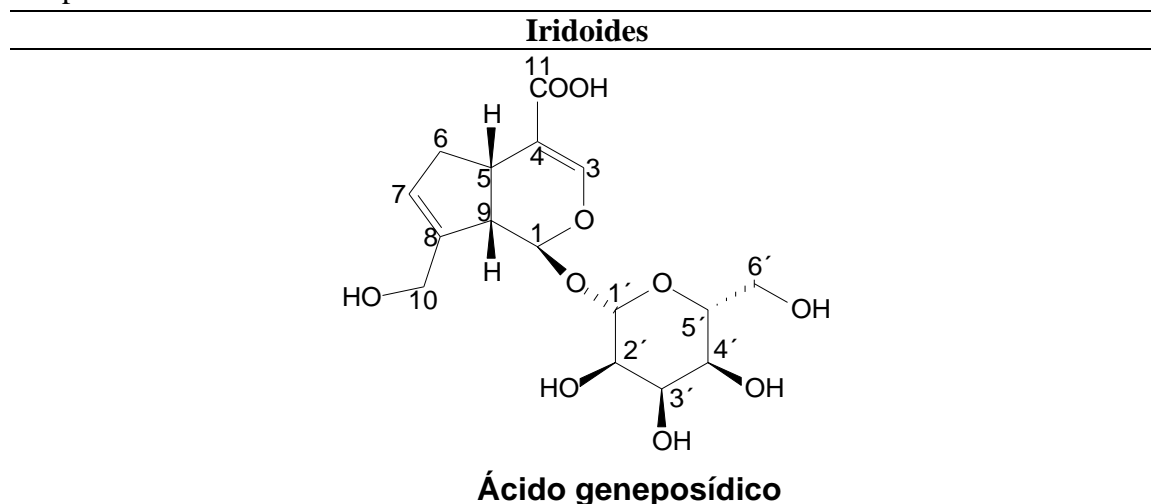
Porém, diante dos avanços obtidos na pesquisa e o crescente número de publicações relacionadas a *Lippia alba* e seus constituintes químicos, foram estabelecidos novas classificações quanto aos quimiotipos para a espécie, considerando os componentes majoritários dos seus óleos essenciais.

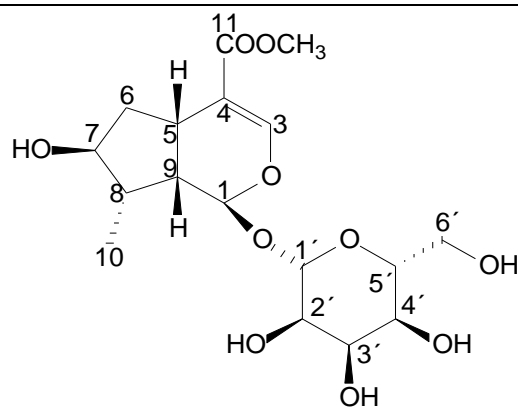
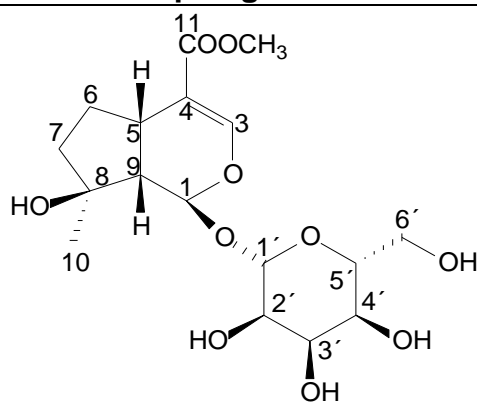
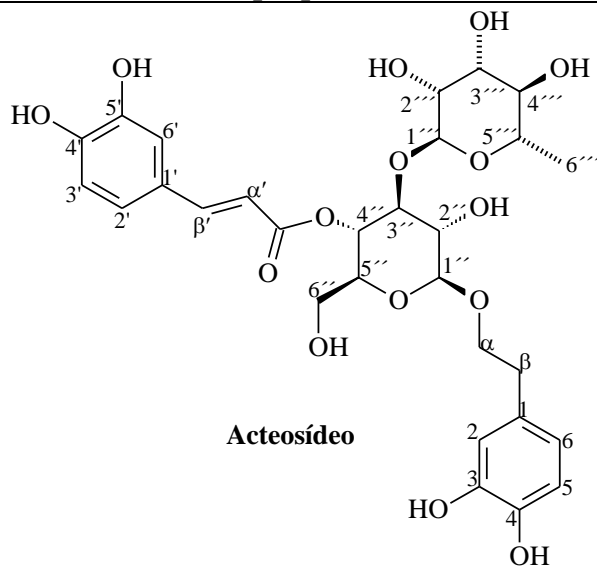
A medida que Matos (1996) classificou a *L. alba* em três quimiotipos, Hennebelle (2006) sugeriu em seu estudo uma classificação diferente. Foi sugerido sete quimiotipos diferentes para a espécie, os quais foram classificados a partir do seu composto majoritário e também em subtipos. Tais estudos sugerem que dentro de uma mesma espécie fatores relacionados a morfologia e variabilidade química, fatores ambientais podem até influenciar na produção de óleos essenciais pela planta. Isso dificulta o processo de padronização e classificação da espécie em quimiotipos distintos (HENNEBELLE et al., 2006; MATOS, 1996; SCHOCKEN, 2007; YAMAMOTO, 2006).

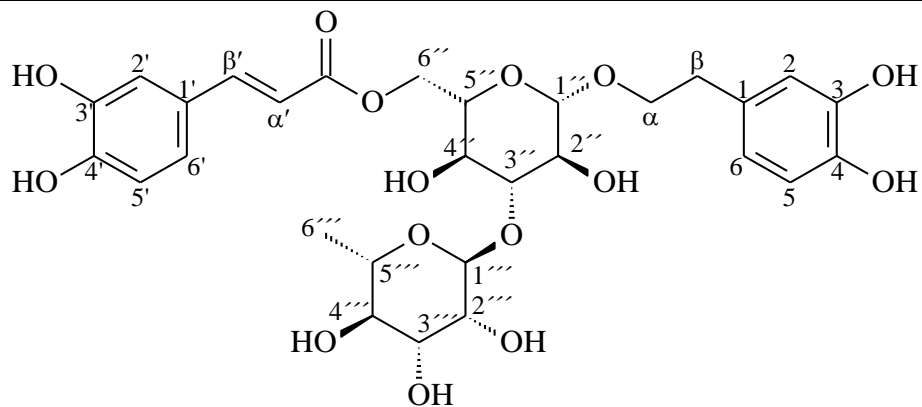
Os estudos dos compostos fixos da *Lippia alba* vem avançando. Apesar da grande quantidade de publicações relacionadas à produção de óleo essencial, classificação da planta em quimiotipos (BLANCO et al., 2013; HATANO et al., 2012; SOUSA et al., 2015; VALE et al., 1999, 2002) e estudo da sazonalidade da espécie (GOMES et al., 2019; YAMAMOTO, 2006), a produção de compostos fixos e publicações relacionadas a essa área são ainda pequenas relacionadas aos óleos essenciais.

As principais classes de metabólitos especiais encontrados nos extratos das folhas desta planta são os iridoides, flavonoides e fenilpropanoides. Desta forma, podemos citar algumas substâncias não voláteis mais comumente identificadas tais como, os iridoides ácido geneposídico, mussaenosídeo e 8-epi-loganina; os flavonoides luteolina-7-*O*-glucuronídeo, tricina-7-*O*-diglucuronídeo, crisoeriol-7-*O*-diglucuronídeo, tricina-7-*O*-glucuronídeo e apigenina 7-*O*-glucuronídeo e os fenilpropanoides acteosídeo e isoacteosídeo (tabela 1) O acteosídeo (verbascosídeo) é o composto não volátil majoritário encontrado em todos os quimiotipos desta espécie, seguido pelo ácido geneposídico (GOMES et al., 2019; TIMÓTEO et al., 2015).

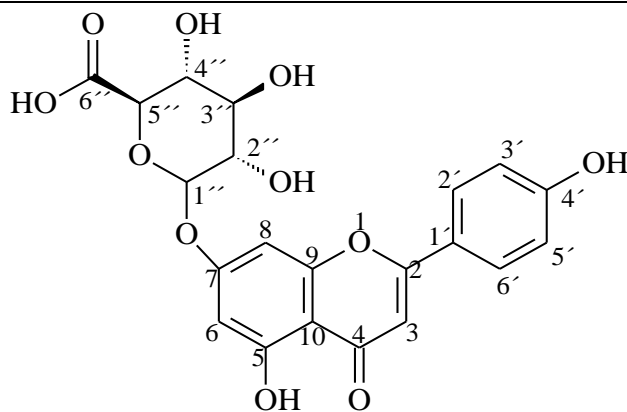
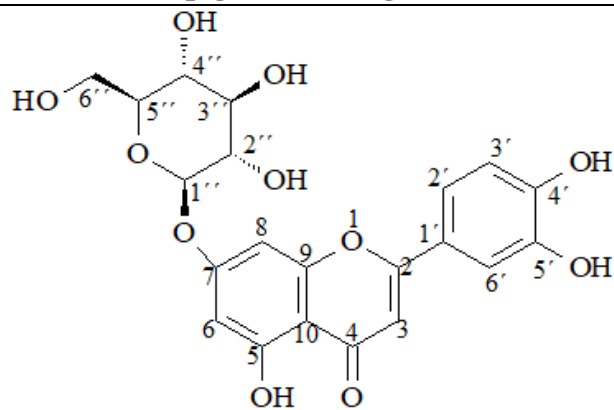
Tabela 1: Principais compostos não voláteis identificados na espécie *L. alba* e suas respectivas estruturas.

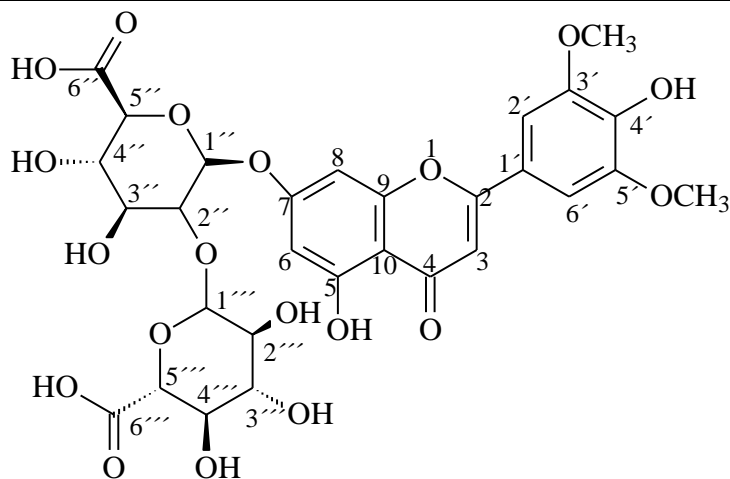


**Epi loganina****Mussaenosídeo****Fenilpropanoides****Acteosídeo**

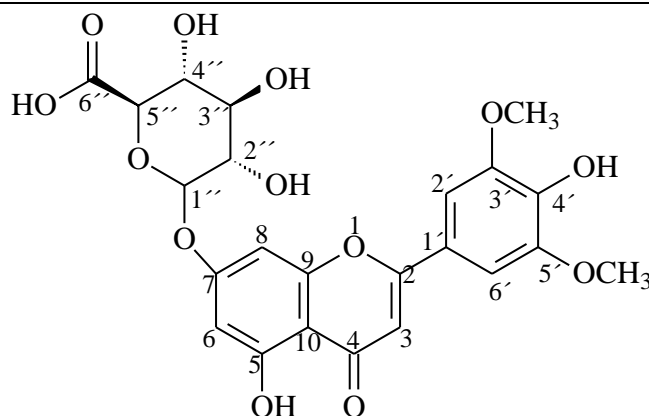
**Isoacteosídeo**

Flavonoides

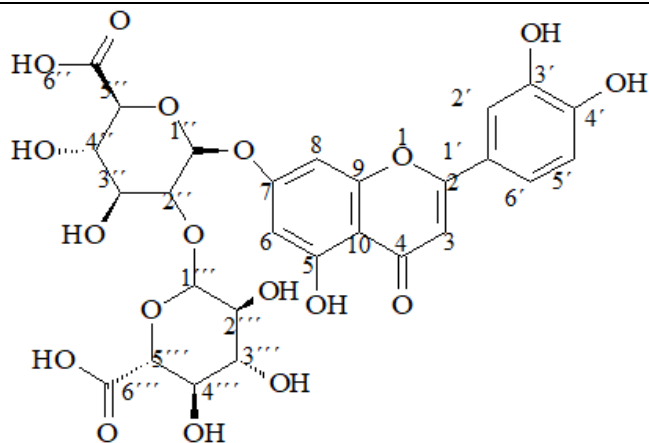
**Apigenina 7-O- glucuronídeo****Luteolina 7-O-glucosídeo**



Tricina-7-O-diglucuronídeo



Tricina-7-O-glucuronídeo



Crisoeriol-7-O-diglucuronídeo

O acteosídeo é um composto glicosilado, um fenilpropanoide, solúvel em água (ALIPIEVA et al., 2014), que foi identificado e quantificado na *Lippia alba*, em quantidades superiores a outras substâncias (GOMES et al., 2018, 2019; TIMÓTEO et al., 2015). Suas ações farmacológicas, já estudadas, constam desde atividade

antioxidante, ansiolíticas e até neuroprotetiva, presentes não só na *L. alba* como em outras espécies vegetais (COSTA DE MELO et al., 2019; JI et al., 2019; KOO et al., 2006; NETO et al., 2009; PENG et al., 2015).

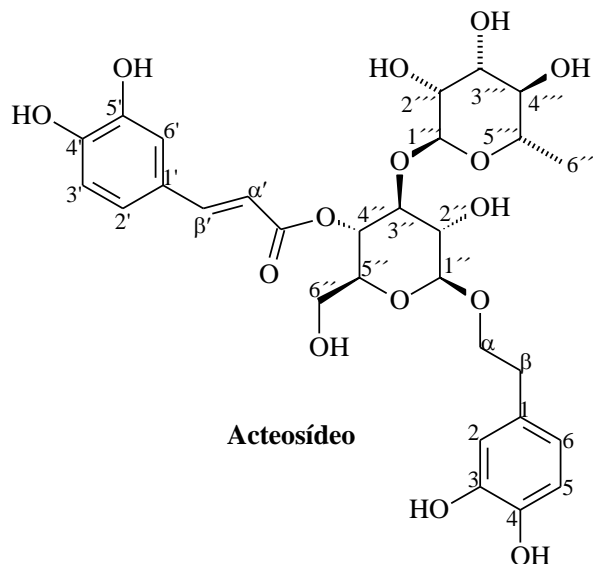


Figura 3: Estrutura química do Acteosídeo.

Em estudo avaliando a atividade anticonvulsivante dos extratos de *L. alba* de diferentes quimiotipos, foi sugerido que tais propriedades podem estar relacionadas a complexos fitoquímicos não voláteis, como fenilpropanoides e flavonoides, e também a alguns compostos voláteis, limoneno, citral, carvona e mirceno (NETO et al., 2009). As atividades farmacológicas da planta, como a atividade ansiolítica e também sedativa foram investigadas e demonstraram possível atividade no sistema nervoso central. (CARVALHO, 2006; HATANO et al., 2012; HENNEBELLE et al., 2008b; ZÉTOLA et al., 2002).

Para a atividade sedativa a substância com maior afinidade sugerida foi a luteolina-7-*O*-diglucoronídeo, um flavonoide, que apresentou melhores resultados nos ensaios de ligação de receptores benzodiazepínicos e GABA_A (HENNEBELLE et al., 2008b). Já Carvalho (2006) evidenciou que a fração butanólica de extratos das folhas de *L. alba*, contendo acteosídeo, reduziu a letalidade durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol, possuiu efeito hipotérmico e sedativo em camundongos, sugerindo, em partes, os efeitos centrais da planta (CARVALHO, 2006). Tais estudos indicam a ação da *L. alba* no sistema nervoso central.

Em estudos que avaliaram a atividade ansiolítica de outras plantas medicinais, que continham o acteosídeo como principal composto, concluiu-se que a atividade

farmacológica estaria ligada a presença deste fenilpropanoide nestas plantas (CARMONA et al., 2019; COSTA DE MELO et al., 2019). Além disso, em outros estudos o acteosídeo apresentou alta afinidade para receptores benzodiazepínicos, dopaminérgicos e morfínicos (DAELS-RAKOTOARISON et al., 2000) e exibiu efeitos ansiolíticos, hipnótico e relaxante muscular devido a sua interação com receptores GABA_A (RAZAVI; ZARGARANI; HOSSEINZADEH, 2017).

Porém, não há estudos conclusivos sobre qual composto fitoquímico seria o responsável pelas atividades farmacológicas da *Lippia alba*. Diante dos estudos já realizados com o acteosídeo e pelo fato de ser o componente majoritário desta espécie vegetal, essa substância foi escolhida como o marcador para *L. alba*. (GOMES, 2017).

Lippia alba apresenta diversas vantagens para a produção de um fitoterápico, tais como as atividades farmacológicas já citadas e a facilidade de cultivo e obtenção desta espécie em larga escala (YAMAMOTO, 2006). No entanto, ainda se faz necessário a padronização do extrato, bem como o desenvolvimento e validação de metodologia analítica mais acessível para a análise dos componentes presentes nos extratos desta planta. Até o momento, já foram publicados dois métodos analíticos por CLAE para a realização da análise quantitativa dos extratos desta espécie (GOMES et al., 2019; TIMÓTEO et al., 2015). No entanto, tais metodologias utilizam como fase móvel o solvente acetonitrila, que além do custo elevado, apresenta maior toxicidade em relação a outros solventes orgânicos comumente utilizados em CLAE. O desenvolvimento de metodologia analítica utilizando o solvente metanol, por exemplo, como fase orgânica, apresentaria maiores vantagens pois, além de ter um custo muito menor que a acetonitrila é também menos tóxico. Diante desse fatores, no presente trabalho esse solvente será utilizado como fase móvel no desenvolvimento da metodologia analítica por CLAE.

Validação Analítica

A validação de um método analítico tem por objetivo demonstrar que o método desenvolvido é adequado ao uso pretendido, seja na quantificação e identificação de substâncias biológicas ou medicamentosas, ou de impurezas. Ao se propor a realizar a produção de um novo medicamento, que irá conter novas substâncias a serem estudadas, o desenvolvimento de um método analítico, a depender da substância e dos métodos instrumentais que se tem, se torna necessário (BRASIL, 2017; VIRANI et al., 2014).

A Resolução da Diretoria Colegiada nº 166, de 24 de Junho de 2017, dispõe sobre a validação de métodos analíticos aplicados a insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos. Classifica a validação como uma verificação de um método por meio de ensaios analíticos que irá garantir a confiabilidade analítica do método escolhido ou desenvolvido para obtenção de um resultado seguro (BRASIL, 2017).

Alguns parâmetros analíticos devem ser considerados no momento da validação. São eles a seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção e robustez. Cada parâmetro garantirá ao analista resultados que trará confiabilidade ao método desenvolvido, dentro de um intervalo estabelecido, visto que os resultados destes passam por análises estatísticas com critérios específicos a serem seguidos segundo normas internacionais e a legislação vigente (BRASIL, 2017; CASSIANO et al., 2009; ICH, 2005).

Devem ser seguidos consensos para o desenvolvimento de um método para validação analítica, além da escolha de métodos instrumentais que garantirão a quantificação e identificação do composto a ser validado (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Para a *Lippia alba*, a espécie estudada neste trabalho, há reportados na literatura duas metodologias validadas. Ambas apresentam a quantificação dos compostos químicos de interesse neste trabalho, porém apesar de utilizarem o Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), as condições cromatográficas são diferentes, o que incita o desenvolvimento de um novo método, não só para quantificar a substância não volátil, o acteosideo, como também para quantificar esse composto no novo produto tradicional fitoterápico desenvolvido (GOMES et al., 2019; TIMÓTEO et al., 2015).

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver comprimidos a partir do extrato seco por *spray drying* das folhas de *L. alba*.

Objetivos Específicos

- Selecionar o marcador para esta espécie através da predição do espectro de atividade biológica e *docking* molecular das substâncias encontradas mais frequentemente nesta espécie.

- Obter extrato seco por *spray drying* e padronizado a partir das folhas de *L. alba*.

- Obter e desenvolver comprimidos a partir do extrato seco por *spray drying* de folhas de *L. alba*.

- Desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE para quantificação do marcador no extrato seco padronizado e na formulação desenvolvida.

- Realizar o controle de qualidade físico-químico dos comprimidos desenvolvidos a partir do extrato padronizado de folhas de *L. alba*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Escolha do marcador químico através da predição do espectro de atividade biológica e *docking* molecular

Análises *in silico*, assistidas por computador (predição PASS e *docking* molecular) foram realizadas para descobrir possivelmente os fitoconstituintes responsáveis pelos efeitos farmacológicos da *Lippia alba*. As estruturas dos 15 compostos (ácido geneposídico, mussaenosídeo, epi-loganina, acteosídeo, isoacteosídeo, luteolina-7-*O*-glucosídeo, apigenina 7-*O*-glucuronídeo, apigenina 7-*O*-diglucuronídeo, crisoeriol 7-*O*-diglucuronídeo, tricina-7-*O*-diglucuronídeo, limoneno, carnova, linalol, citral, mirceno), já identificados para a planta (GOMES, 2017) foram coletadas da base de dados PubChem. As substâncias foram submetidas à avaliação das atividades ansiolíticas e sedativas com o auxílio do programa PASS. Este servidor prediz o espectro de atividade de um composto como atividade provável (Pa) e provável inatividade (Pi), com base na análise da relação estrutura-atividade do conjunto de moléculas usadas para validação que consiste em mais de 205.000 compostos, mostrando mais de 3.750 tipos de atividades biológicas. Os cálculos de acoplamento foram realizados com o complexo receptor-agonista 4COF (MILLER; ARICESCU, 2014) com o software GOLD. A região no espaço para a realização do *docking* molecular foi ajustada sobre o inibidor. As melhores soluções de encaixe foram salvas e poses consensuais foram usadas para explicação da melhor pose de interação.

Obtenção do extrato seco por *spray drying* padronizado a partir das folhas de *Lippia alba*

Material Vegetal

A espécie foi cultivada no campus da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Instituto Multidisciplinar em Saúde (IMS), Campus Anísio Teixeira (CAT) em Vitória da Conquista, Bahia. A coleta deste material ocorreu nos meses de setembro e outubro de 2017. A exsicata foi depositada no Herbário Mongoyós do mesmo Instituto (#1536) e no Herbário Alexandre Leal Costa - ALCB no Instituto de Biologia, em Salvador, Bahia (#ALCB 130052). A planta possui cadastro no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) com o número AAEFC3B.

Obtenção do extrato hidroalcoólico de *Lippia alba*

O extrato hidroalcoólico de *L. alba* foi obtido a partir da extração por percolação das folhas da planta. As folhas foram submetidas a secagem ao ar livre e posteriormente à redução de tamanho de partícula através da trituração das mesmas com auxílio de um Moinho de Facas (HydroSan®). O pó obtido das folhas secas sofreu o processo de percolação em uma solução hidroalcoólica a 80% e concentrada utilizando evaporador rotativo Buschi®, modelo R100, com banho de aquecimento Buschi®, modelo B100, funcionando com temperatura de $40 \pm 10^\circ\text{C}$. A seleção desta concentração da solução extrativa foi definida a partir dos resultados de ensaio ansiolítico em animais realizados por Zétola & cols (2002), no qual os extratos das folhas de *L. alba* preparados a partir de soluções hidroalcoólicas a 80% apresentaram maior atividade. (ZÉTOLA et al., 2002).

Secagem por *spray drying* do extrato hidroalcoólico de *Lippia alba*

O extrato hidroalcoólico de *Lippia alba* foi submetido a secagem por *spray drying* preparando-se inicialmente, com 32 % de dióxido de silício coloidal, seguindo as condições operacionais: temperatura do ar de entrada, 162°C ; temperatura do ar de saída, 101°C ; aspiração a 70%; alimentação a 3% e fluxo a 30 mm. Cada extrato de *Lippia alba* seco por *spray drying* foi chamado de SDLA. Os parâmetros seguintes foram ajustados ao longo do processo de secagem definidos de acordo com os resultados obtidos para cada extrato seco, como está demonstrado na tabela 2.

Tabela 2: Extratos secos por *spray drying*, excipientes utilizados e parâmetros testados.

	SDLA1	SDLA2	SDLA3	SDLA4	SDLA5	SDLA6	SDLA7
Excipientes							
Extrato de <i>Lippia alba</i>	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Dióxido de Silício Coloidal	3,2 g	1,6 g	1,07 g	1,6 g	1,07 g	3,2 g	3,6 g
MCC ph101	-	1,6 g	1,07 g	1,6 g	1,07 g	-	-
Amido de milho	-	-	1,07 g	-	1,07 g	-	-
Parâmetros							
Temp. do ar de entrada	162°C	162°C	143°C	143°C	150°C	150°C	150°C
Temp. do ar de saída	101°C	101°C	88°C	90°C	94°C	90°C	90°C
Aspirador	70%	70%	60%	60%	60%	78%	78%
Alimentação	3%	3%	3%	3%	10%	7%	7%
Fluxo	30 mm	30 mm	30 mm	30 mm	35 mm	35 mm	35 mm

MCC: Celulose Microcristalina.

Obtenção dos comprimidos a partir do extrato seco por *spray drying* das folhas de *Lippia alba*

Escolha dos Adjuvantes

Ao extrato de *L. alba* adicionou-se adjuvantes, sendo inicialmente selecionados os mais correntemente utilizados, como amido (Mapric®), lactose anidra (Fagron®), celulose microcristalina (Fagron®) e dióxido de sílcio coloidal (Fagron®), observando o critério de escolha que foi a inexistência de interações entre os adjuvantes, os resultados do ângulo de repouso de cada excipiente e os seus índices de compressibilidade.

Determinação do ângulo estático de repouso e densidade bruta

O ângulo de repouso foi determinado com auxílio do caracterizador de pós PTG, modelo S3 (Pharma test®). O equipamento foi utilizado para obter informações sobre o ângulo de repouso, massa, volume e, assim, a densidade bruta. Ele constitui-se de uma base horizontal, com um suporte fixo, com adaptador para funil, um funil e uma balança acoplada. Foi determinada a altura do cone formado pelo empilhamento do pó que passa através do funil, com diâmetro de orifício de 25 mm. O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando-se 30g de pó de cada formulação, ao qual foram dispensadas por gravidade através do funil formando um cone. A relação trigonométrica entre a altura (h) e o raio (r) é a tangente do ângulo (α), que é determinado pela função inversa da tangente e nos deu o ângulo de repouso do pó. A tangente do ângulo de repouso foi dada por $\alpha = h/r$. O teste do ângulo de repouso foi realizado para os excipientes, como também, para o melhor extrato de *L. alba* seco por *spray drying* e da formulação de escolha para compressão.

Determinação da densidade aparente, Índice de Carr e Razão de Hausner dos extratos de *Lippia alba* secos por *spray drying*

Para encontrar a densidade aparente dos extratos obtidos por *spray drying* contendo de *L. alba*, utilizou-se uma proveta de 25 ml, na qual foi feita a compactação vertical manual, submetendo o pó a 100 batidas ritmadas dentro da proveta, a fim de comprimi-lo. A relação massa pesada e volume lido na proveta foram calculados.

Com os resultados da densidade bruta e densidade aparente foram calculados os índices de compressibilidade, o Índice de Carr (IC) (1) e Razão de Hausner (RH) (2), a partir da relação entre as duas densidades.

$$\text{Índice de Carr (\%)} = \frac{\text{densidade de compactação} - \text{densidade bruta}}{\text{densidade de compactação}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Razão de Hausner} = \frac{\text{densidade de compactação}}{\text{densidade bruta}} \quad (2)$$

Mistura do Pó

A mistura de pós foi realizada em equipamento misturador modelo Mini misturador em “V” (Lemaq®), a 28 rotações por minuto, durante 30 minutos.

Compressão

A compressão foi realizada em compressora monopunção Monopress (Lemaq®), com punção circular de 12 mm de diâmetro.

Validação de metodologia analítica para quantificação do Acteosídeo no extrato padronizado de *Lippia alba* spray drying e nos comprimidos de *Lippia alba*

A validação analítica foi realizada com base em legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e as normas internacionais da *International Conference on Harmonization (ICH)* (BRASIL, 2017; ICH, 2005). Os pontos avaliados foram Exatidão, para o Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) e para o Produto Terminado, Precisão Intermediária e Repetibilidade, Seletividade, Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Linearidade e Robustez. Porém, foi necessário o desenvolvimento da metodologia analítica.

Seletividade

A seletividade do método analítico foi obtida através da identificação do acteosídeo, pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV do padrão e das amostras analisadas (branco, matriz, diluente, extrato e comprimido). A espécie vegetal *Ocimum gratissimum* L. (Figura 4), depositada no herbário Mongoyós (# 4158), foi escolhida para a distinção do material de interesse, *Lippia alba*, de outras espécies vegetais semelhantes. Essa análise foi realizada através da comparação do espectro UV-Vis do pico observado no extrato desta planta no mesmo tempo de retenção do acteosídeo (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

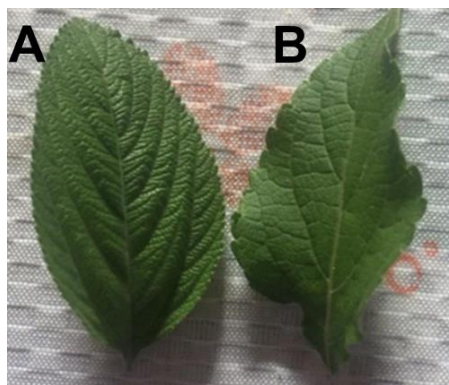


Figura 4: Folha de *Lippia alba* (A) e *Ocimum gratissimum* L. (B) (Foto do autor).

Linearidade

A linearidade foi determinada por meio de 5 concentrações diferentes da Substância Química de Referência (SQR) Acteosídeo (HWI group®), preparadas em triplicata. O acteosídeo foi preparado em uma solução com Metanol:Água (1:9) nas seguintes concentrações $2,10 \mu\text{g mL}^{-1}$; $6,30 \mu\text{g mL}^{-1}$; $10,50 \mu\text{g mL}^{-1}$; $14,70 \mu\text{g mL}^{-1}$; $18,90 \mu\text{g mL}^{-1}$, partindo de uma mesma solução mãe da SQR a $210 \mu\text{g mL}^{-1}$. Foram analisados o gráfico das respostas em função da concentração do analito; o gráfico de dispersão dos resíduos; a equação da reta; coeficiente de correlação (r) e de determinação (r^2), coeficiente angular (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Precisão

- Repetibilidade

Foi avaliada em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e analista, onde se realizou a injeção de 6 réplicas, individualmente preparadas, da solução a 100% da concentração do teste. Cumprindo os critérios de aceitação de acordo a legislação (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

- Intermediária

Foi realizada a injeção de 6 réplicas, individualmente preparadas, da solução a 100%, em dois dias diferentes, realizada por operadores distintos (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Exatidão

Para o estudo da exatidão do método foi realizada sua determinação para IFA, o extrato *Lippia alba* seco por *spray drying*, e para o produto terminado, comprimido de *Lippia alba*. Verificou-se a exatidão através de determinações das concentrações baixa ($6,30 \mu\text{g mL}^{-1}$), média ($10,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e alta ($14,70 \mu\text{g mL}^{-1}$), contemplando o intervalo

linear do método analítico, com três réplicas em cada nível (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Limite de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados baseando-se em parâmetros da curva analítica, calculados pelas fórmulas que preconiza a legislação (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Robustez

Foi determinada através de pequenas variações das condições analíticas do método, sendo aplicada a mudança da composição da fase móvel, passando a ser Ácido Fórmico 1,0% e variação na vazão para 0,8 mL min⁻¹ (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Análise Estatística da Validação Analítica

A realização da análise estatística dos resultados obtidos para a validação analítica do método foi realizada com o auxílio do software ActionStat Pro®.

Controle de qualidade físico-químico dos comprimidos desenvolvidos a partir do extrato de *Lippia alba* seco por *spray drying*

Determinação do peso médio do comprimido

Para a determinação do peso médio foram pesados 20 comprimidos, individualmente, sendo permitido o limite de variação de $\pm 5,0\%$ para comprimidos com peso acima de 250 mg, conforme determinado pela Farmacopeia Brasileira (2019) (BRASIL, 2019).

Determinação da dureza

A determinação de dureza foi realizada com uma amostra de 10 comprimidos, submetendo cada unidade à força aplicada diametralmente pelo durômetro (Nova Ética®), tipo mola espiral. O resultado do teste é informativo (BRASIL, 2019).

Friabilidade

O teste de friabilidade foi realizado pesando-se 20 comprimidos. Estes foram transferidos para o friabilômetro (Nova Ética®) e submetidos a 100 rotações em um período de 4 minutos (25 rpm). Após o fim do teste os comprimidos foram novamente pesados e foi calculada a perda em porcentagem da massa dos comprimidos, sendo permitida a perda máxima de 1,5% (BRASIL, 2019).

Desintegração

Para o ensaio de desintegração foi utilizado o aparelho desintegrador (Nova Ética®) de comprimidos com seis provas. Considerou-se a metodologia empregada para comprimidos não revestidos. Foram utilizados seis unidades dos comprimidos, em que cada comprimido foi colocado em um dos seis tubos da cesta. A cesta contendo as amostras de comprimidos foi submetida a movimentos verticais em meio líquido, água, a $37 \pm 1,0$ °C por 30 minutos (BRASIL, 2019).

Teste de Solubilidade do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA)

Para a determinação da solubilidade do extrato de *Lippia alba* seco por *spray drying* foi realizado o teste seguindo os parâmetros contidos no Guia de Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Novos e Similares (BRASIL, 2018b). Tal teste foi realizado com o intuito de prever a solubilidade do extrato e assim realizar os testes de controle de qualidade do medicamento produzido. Foram utilizados meios dentro da faixa de pH fisiológico – 1,0 a 6,8 – sendo eles: ácido clorídrico (HCl) 0,1M, água purificada e tampão fosfato pH 6,8. Adicionou-se a quantidade da IFA relativa a dose do medicamento no produto, 100 mg do extrato, em 250 mL do meio, em triplicata. Submeteram-se as amostras a uma Incubadora de Bancada com Agitação Orbital – Q816M20, na temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas e mediu-se o pH, além de quantificar o marcador do extrato em cromatógrafo líquido.

Análise quantitativa do extrato seco por *spray drying* e comprimidos de *Lippia alba*

O marcador utilizado para o ensaio quantitativo foi o acteosídeo. Este foi selecionado por ser o componente majoritário presente nesta planta (GOMES et al., 2019; TIMÓTEO et al., 2015) e por ter sido apontado como a substância com maior atividade ansiolítica através da triagem virtual realizada para as principais substâncias encontradas nesta espécie. Para tanto, durante o desenvolvimento do método analítico por CLAE-DAD foram testadas diferentes fases móveis, gradiente e fluxo, priorizando o uso do metanol como fase orgânica em função do menor custo e toxicidade desse solvente em relação à acetonitrila, como também o uso do ácido fórmico em substituição ao ácido trifluoroacético. O equipamento utilizado foi CLAE-DAD - Shimadzu®, coluna cromatográfica Shimpack (Shimadzu®) com 5 µm de tamanho de partícula, 4,6 mm de diâmetro e 150 mm de comprimento. A vazão selecionada foi de $0,900 \text{ mL min}^{-1}$, fase móvel foi composta por solução de ácido fórmico P.A. (CRQ®) a 0,9% (solvente A) e metanol grau HPLC (MeOH) (J.T.Baker®) (solvente B), com o

seguinte perfil de eluição: 0-30 min.: 20-55% B (gradiente linear), 30-35 min.: 55-100% B (gradiente linear), 35-40 min.: 100-98% B (gradiente linear); 40-45 min.: 98-20% B (gradiente linear); 45-48 min.: 20% B (isocrático). O volume de injeção foi de 20 µL. O comprimento de onda para registro do cromatograma e detecção do acteosídeo foi o 325 nm.

Esta metodologia foi empregada tanto para realizar a análise dos extratos obtidos a partir da planta, quanto para a análise dos comprimidos desenvolvidos.

Preparo da Substância Química de Referência (SQR) e amostras contendo o extrato *Lippia alba*

As amostras da SQR do Acteosídeo (HWI group®) e do extrato de *Lippia alba* a serem analisadas no CLAE foram pesadas, diluídas em uma solução de Metanol (MeOH) e Água (H₂O) na proporção 1:9, levadas a lavadora ultrassônica por 30 minutos, para o extrato e assim, foram filtradas com filtro a 0,45 µm e injetadas o volume de 20 µL no CLAE.

Teste de dissolução

O teste de dissolução de formas farmacêuticas sólidas permite que seja determinada a quantidade da substância ativa dissolvida em meio aquoso, previamente determinado. Para o ensaio de dissolução foi utilizado o dissolutor (Nova Ética®) de comprimidos e o meio de dissolução foi o HCl 0,1M, selecionado a partir dos resultados obtidos com o Teste de Solubilidade do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) e segundo os critérios do Guia de Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Novos e Similares (BRASIL, 2018b). Foi utilizado o aparatos pá, com volume de meio 500 mL e a rotação de 50 rpm conforme estabelecido pela agência regulatória (BRASIL, 2018b). Foram utilizadas seis cubas nas quais foi adicionado um comprimido em cada cuba contendo meio líquido aquoso a $37 \pm 0,5$ °C. A agitação constante foi mantida, coletando-se as amostras do meio de dissolução ao final de 30 minutos para quantificação do padrão Acteosídeo (BRASIL, 2019).

Doseamento do extrato de *Lippia alba* e comprimidos contendo o extrato de *Lippia alba*

Diluiu-se 100 mg da amostra em balão volumétrico de 100 mL em uma solução de metanol e água (1:9), levou-se para a lavadora ultrassônica por 30 minutos até a completa solubilização do extrato. Realizou-se uma nova diluição em um balão volumétrico de 10 mL, filtrou-se a amostra com filtro a 0,45 µm (Chromafil® Xtra PES-45/25) e injetou 20 µL no CLAE. Este procedimento foi realizado em triplicata

conforme descrito anteriormente em análise quantitativa do extrato seco por spray drying e comprimidos de *Lippia alba*.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. S. et al. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 436–440, 2008.
- ALIPIEVA, K. et al. Verbascoside - A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1065–1076, 2014.
- ALLEN JUNIOR, L. V. .; ANSEL, H. C. .; POPOVICH, N. G. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ALMEIDA, J. R. DE. **Planejamento, ensaio e otimização in silico de novos protótipos inibidores da enzima acetilcolinesterase**. Ribeirão Preto, 2015. 156 p. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.
- AMIDON, G. L. et al. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. **Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. et al. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v. 76, n. 3–4, p. 374–378, 2005.
- ARA, N. et al. In vitro antimicrobial and cytotoxic activities of leaves and flowers extracts from *Lippia alba*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 12, p. 87–90, 2009.
- AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines**. 4th. ed. [s.l.] Churchill Livingstone, 2013.
- BIESKI, I. G. C.; DE LA CRUZ, M. **Quintais Medicinais mais Saúde menos Hospitais**. Cuiabá: Governo do Estado de Mato Grosso, 2005.
- BLANCO, M. A. et al. Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 803–809, 2013.
- BRASIL. **Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006 - Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde.**, 2006a.
- BRASIL. **POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>
- BRASIL. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento da Assistência Farmacêutica., 2006c.
- BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 31, de 11 de Agosto de 2010.**, 2010. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0031_11_08_2010.pdf/5e157d15-d3d5-4bb9-98db-5667e4d9e0c8>. Acesso em: 8 out. 2019

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 - Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.**BRASIL, 2014.

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017 - Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.**, 2017.

BRASIL. **Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira.** 1ª ed. Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2018a.

BRASIL. **Guia De Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Novos e Similares**, Brasília: Ministério da Saúde, 2018b. Disponível em: <<https://pesquisa.anvisa.gov.br/.%0Ahttp://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3364628/Proposta+de+Guia+de+Dissolucao+-+06.04.2018.pdf/c15476e5-82aa-402f-aa95-24bf246dccc0?version=1.0>>

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira.** Brasília: Ministério da Saúde, 6ª edição, 2019.

BRITISH PHARMACOPOEIA. The British Pharmacopoeia Comission, 2019.

BRUHN, J. G.; HOLMSTEDT, B. O. Ethnopharmacology - A Challenge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, p. 251–256, 1982.

CAMILLO, F. C. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson uma espécie nativa promissora para a introdução em programas nacionais de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 10, n. 4, p. 21–27, 2017.

CARMONA, F. et al. *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) powdered leaves are effective in treating anxiety symptoms: A phase-2, randomized, placebo-controlled clinical trial. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 242, p. 112060, 5 out. 2019.

CARVALHO, R. S. M. DE. **Investigação da atividade farmacológica central dos extratos aquoso e hidroalcoólico, da fração butanólica e do verbascosídeo de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown (falsa melissa) - Verbenaceae.** Florianópolis, 2006, 96 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

COSTA DE MELO, N. et al. Anxiolytic and Antidepressant Effects of the Hydroethanolic Extract from the Leaves of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke: A Study on Zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 3, p. 106, 11 jul. 2019.

COSTA, M. et al. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of São Paulo. Part II. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 27, p. 25–33, 1989.

DA SILVA JÚNIOR, A. Q. et al. Seasonal and circadian evaluation of a citral-

chemotype from *Lippia alba* essential oil displaying antibacterial activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 85, n. May, p. 35–42, 2019.

DAELS-RAKOTOARISON, D. et al. Neurosedative and Antioxidant Activities of Phenylpropanoids from *Ballota nigra*. **Arzneimittel-Forschung**, v. 50, n. 01, p. 16–23, 28 dez. 2000.

DE MONTELLANO, B. R. O.; BROWNER, C. H. Chemical bases for medicinal plant use in Oaxaca, Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, n. 1, p. 57–88, 1985.

DUKE, J. A.; BOGENSCHUTZ-GODWIN, M. J.; OTTESEN, A. R. **Duke's Handbook of medicinal plants of Latin America**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2009.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil : Pharmacological studies , drug discovery , challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

FÁTIMA, C. DE et al. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. v. 127, p. 674–684, 2010.

FDA. **Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system guidance for industry**. Center for Drug Evaluation and Research. United States, 2017.

FERREIRA, A. **Guia Prático Da Farmácia Magistral**. 4^a ed. Brasil: PHARMABOOKS EDITORA, 2011.

GAZOLA, R. et al. *Lippia alba* , *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 477–480, 2004.

GOH, H. P.; HENG, P. W. S.; LIEW, C. V. Understanding effects of process parameters and forced feeding on die filling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 122, n. February, p. 105–115, 2018.

GOMES, A. F. **Nova metodologia analítica para análise qualitativa e quantitativa de metabólitos bioativos de *Lippia alba* e do seu produto fitoterápico desenvolvido**. Salvador, 2017. 128p. Tese de Doutorado - Instituto de Química - Universidade Federal da Bahia.

GOMES, A. F. et al. Simultaneous determination of iridoids , phenylpropanoids and flavonoids in *Lippia alba* extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Microchemical Journal**, v. 138, p. 494–500, 2018.

GOMES, A. F. et al. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. **Food Chemistry**, v. 273, n. September, p. 186–193, 2019.

HATANO, V. Y. et al. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R) - (-) -carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. March, 2012.

HENN, J. G. et al. Toxicological evaluation of a standardized hydroethanolic extract

from leaves of *Plantago australis* and its major compound, verbascoside. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, n. February 2018, p. 145–156, 2019.

HENNEBELLE, T. et al. The Essential Oil of *Lippia alba*: Analysis of Samples from French Overseas Departments and Review of Previous Works. **Chemistry & Biodiversity**, v. 3, n. 10, p. 1116–1125, out. 2006.

HENNEBELLE, T. et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, 2008a.

HENNEBELLE, T. et al. Antioxidant and Neurosedative Properties of Polyphenols and Iridoids from *Lippia alba*. **Phytotherapy Research**, v. 258, n. August 2007, p. 256–258, 2008b.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**. ICH Harmonised Guideline, 2005.

JAIPAKDEE, N. et al. Preparation of *Curcuma comosa* tablets using liquisolid techniques: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 553, n. 1–2, p. 157–168, 2018.

Ji, S.-L. et al. Antioxidant activity of phenylethanoid glycosides on glutamate-induced neurotoxicity. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, p. 1–11, 4 jul. 2019.

JULIÃO, L. S. et al. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmaco**, p. 36–38, 2003.

KOO, K. A. et al. Acteoside and its aglycones protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity. **Life Sciences**, v. 79, n. 7, p. 709–716, 10 jul. 2006.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LACHMAN, L. et al. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. [s.l.] Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. [s.l.] Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. São Paulo, 2003. 117 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

MATOS, F. J. A. As ervas-cidreira do Nordeste do Brasil - Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) - Parte II. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 77, p. 137–141, 1996.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas : sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. Ceará, Editora UFC, 2002.

MAYNARD, L. G. et al. Chemical composition and vasorelaxant effect induced by the

essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. (Verbenaceae) in rat mesenteric artery. **Indian journal of pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 694–8, 2011.

MEGARRY, A. J. et al. A big data approach to pharmaceutical flow properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, n. July 2018, p. 337–345, 2019.

MIGUEL, E. et al. A checklist of the cultivated plants of Cuba. **Die Kulturpflanze**, v. 37, n. 2, p. 211–357, 1989.

MILLER, P. S.; ARICESCU, A. R. Crystal structure of a human GABAA receptor. **Nature**, v. 512, n. 7514, p. 270–5, 21 ago. 2014.

NETO, A. C. et al. The role of polar phytocomplexes on anticonvulsant effects of leaf extracts of *Lippia alba* (Mill .) N . E . Brown chemotypes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 933–939, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

OLIVEIRA, G. T. DE et al. Phytochemical characterisation and bioprospection for antibacterial and antioxidant activities of *Lippia alba* Brown ex Britton & Wilson (Verbenaceae). **Natural Product Research**, v. 6419, n. December 2017, p. 0, 2018.

OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; NETO, J. M. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras , semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, n. 28, p. 282–301, 2010.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. August 2009, p. 641–650, 2010.

PASCUAL, M. E. et al. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Il Farmaco**, v. 56, p. 501–504, 2001.

PATADIA, R. et al. Dissolution criticality in developing solid oral formulations: From inception to perception. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 30, n. 6, p. 495–534, 2013.

PATEL, H.; SHAH, V.; UPADHYAY, U. New pharmaceutical excipients in solid dosage forms – A review. **International Journal of Pharmacy and Life Sciences**, v. 2, n. 8, p. 1006–1019, 2011.

PATEL, S.; KAUSHAL, A. M.; BANSAL, A. K. Compression physics in the formulation development of tablets. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 23, n. 1, p. 1–65, 2006.

PENG, X. et al. The Mechanism of Memory Enhancement of Acteoside (Verbascoside) in the Senescent Mouse Model Induced by a Combination of D -gal and AlCl₃. **Phytotherapy Research**, v. 1144, n. October 2014, p. 1137–1144, 2015.

PINTO, E. D. P. P.; AMOROZO, M. C. D. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 751–762, 2006.

- QUODBACH, J.; KLEINEBUDDE, P. A critical review on tablet disintegration. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 21, n. 6, p. 763–774, 2016.
- RAZAVI, B. M.; ZARGARANI, N.; HOSSEINZADEH, H. Anti-anxiety and hypnotic effects of ethanolic and aqueous extracts of *Lippia citriodora* leaves and verbascoside in mice. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 7, n. 4, p. 353–365, 2017.
- RODRIGUES, A. C. C.; GUEDES, M. L. S. Utilização de plantas medicinais no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas – Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 1–7, 2006.
- SABRI, A. H. et al. Understanding tablet defects in commercial manufacture and transfer. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, n. May, p. 1–6, 2018.
- SCHOCKEN, N. R. L. **Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown**. Campinas, 2007. 82 p. Dissertação de Mestrado - Instituto Agrônomo Pós Graduação.
- SIERRA-VEGA, N. O.; ROMANÑACH, R. J.; MÉNDEZ, R. Feed frame: the last processing step before the tablet compaction. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 118728, 2019.
- SINGH, A.; VAN DEN MOOTER, G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 100, p. 27–50, 2016.
- SINKA, I. C. et al. The effect of processing parameters on pharmaceutical tablet properties. **Powder Technology**, v. 189, n. 2, p. 276–284, 2009.
- SIQUEIRA-LIMA, P. S. et al. Central nervous system and analgesic profiles of *Lippia* genus. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 29, n. 1, p. 125–135, 2019.
- SOARES, L. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown ex Britt. & Wils.(Falsa-melissa) Verbenaceae**. Florianópolis. 2001. 189 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina.
- SOUSA, D. G. et al. Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 8, p. 697–702, ago. 2015.
- SOUZA, C. D. F. et al. Physiological responses of *Rhamdia quelen* (Siluriformes : Heptapteridae) to anesthesia with essential oils from two different chemotypes of *Lippia alba*. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. March, p. 1–10, 2017.
- TAREAU, M. A.; PALISSE, M.; ODONNE, G. As vivid as a weed... Medicinal and cosmetic plant uses amongst the urban youth in French Guiana. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 203, p. 200–213, 2017.
- THOORENS, G. et al. Microcrystalline cellulose, a direct compression binder in a quality by design environment - A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, n. 1–2, p. 64–72, 2014.
- TIMÓTEO, P. et al. A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three

- chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. **Food Chemistry**, v. 175, p. 366–373, 2015.
- TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, n. January 2003, 2003.
- USP, U. P. C. **USP30-NF25 USP PHARMACOPEIA**. 30. ed. [s.l: s.n.].
- VALE, T. G. et al. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 167, p. 127–133, 1999.
- VALE, T. G. et al. Central effects of citral , myrcene and limonene , constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill .) N . E . Brown. **Phytomedicine**, p. 709–714, 2002.
- VARGAS, E. C. A. et al. Uso de Plantas com Fins Terapêuticos por Usuários de uma Unidade Pré-Hospitalar Pública de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Online de Pesquisa**, v. 11, n. 5, p. 1129–1134, 2019.
- VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, A. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa , Porto Alegre , RS , Brasil. v. 20, n. 2, p. 367–382, 2006.
- VIANA, G. S. B. et al. Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. **Pharmaceutical Biology**, v. 36, n. 5, 1998.
- VIRANI, P. et al. Updated Review : Validation and Method Validation Parameters. **Pharmatutor Magazine**, v. 2, n. 10, p. 27–37, 2014.
- WEN, Y. et al. Pharmacokinetics, Biodistribution, Excretion and Plasma Protein Binding Studies of Acteoside in Rats. **Drug Research**, v. 66, n. 3, p. 148–153, 2015.
- YAMAMOTO, P. Y. **INTERAÇÃO GENÓTIPO X AMBIENTE NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** Campinas, 2006. 71 p. Dissertação de Mestrado - Instituto Agrônomo Pós Graduação.
- ZÉTOLA, M. et al. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* - Verbenaceae (Brazilian false melissa). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 207–215, 2002.
- ZHANG, W. et al. Pharmacokinetics of acteoside following single dose intragastric and intravenous administrations in dogs. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 8, p. 634–640, 2015.

CAPÍTULO 1

Obtenção de comprimidos contendo extrato hidroacoólico de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown seco por *spray dried*

Maiara Prates de Almeida¹; Angélica Gomes Ferraz¹; Juliano Geraldo Amaral¹; Lara Zimmermann³; Geraldo Alves da Silva²; Marcelo Aparecido da Silva²; Mateus Freire Leite^{1,2}.

¹ Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira, Instituto Multidisciplinar em Saúde. Vitória da Conquista - Bahia

² Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Farmácia. Alfenas – Minas Gerais.

³ Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – Santa Catarina.

Autor para correspondência: mateusfl@gmail.com

Resumo

A *Lippia alba* pode ser considerada uma espécie vegetal promissora ao desenvolvimento de um novo medicamento. Conhecida como erva-cidreira, apresenta diversas atividades farmacológicas tais como a anestésica e sedativa. Dentre as principais classes de metabólitos especiais não voláteis identificados nesta espécie encontram-se os iridoides, flavonoides e fenilpropanoides. O acteosídeo é o fenilpropanoide majoritário presente nas folhas de *L. alba*, podendo ser um marcador analítico para a planta. As ações farmacológicas desta substância são atividade antioxidante, ansiolíticas e até neuroprotetiva. O presente estudo objetivou o desenvolvimento e caracterização físico-química de comprimidos obtidos a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *L. alba* seco por *spray drying*. Análises assistidas por computador (predição PASS e *docking* molecular) foram realizadas com os 15 compostos identificados nesta espécie para descobrir os fitoconstituintes responsáveis pela ação ansiolítica e definir seu o marcador biológico. Em relação à matéria prima vegetal, foi preparado o extrato hidroalcoólico das folhas de *L. alba* através da percolação. O extrato foi seco por *spray drying* (SDLA). Cálculos do índice de Carr (IC) e razão de Hausner (RH) foram utilizados para caracterizar o pó obtido (SDLA) e as formulações desenvolvidas. Além disso, o ângulo de repouso foi calculado para os adjuvantes utilizados, o extrato e para formulação escolhida. Para realizar a análise quantitativa do marcador selecionado foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE. Os parâmetros de controle de qualidade dos comprimidos desenvolvidos foram avaliados segundo a Farmacopeia Brasileira. Para selecionar o meio de dissolução, foram realizados o teste de solubilidade do insumo farmacêutico ativo, o extrato, a partir da quantificação do acteosídeo. Os resultados da predição PASS apontaram uma possível ação ansiolítica do acteosídeo. Em relação aos extratos obtidos, o extrato SDLA 7 e a formulação 9 apresentaram-se excelentes para o IC e RH, sendo o extrato SDLA 7 selecionado para o desenvolvimento e a formulação 09 para a compressão direta. O método quantitativo desenvolvido foi validado de acordo as diretrizes vigentes. Os comprimidos obtidos foram aprovados quanto aos testes de controle de qualidade submetidos. O teste de solubilidade apresentou maior solubilidade com menor indicativo de degradação no meio HCl 0,1M, sendo este o meio utilizado para dissolução. O produto desenvolvido apresentou liberação de 84,06% em 30 minutos no ensaio de dissolução. Dessa forma, obteve-se um produto tradicional fitoterápico a partir do extrato seco por *spray drying* a partir do extrato das folhas de *L. alba*, utilizando o acteosídeo como marcador, aprovado nos testes de controle de qualidade com um método validado para quantificação do ativo.

Palavras-chave: *Lippia alba*; Comprimidos; Fitoterápicos; Validação; Acteosídeo; CLAE; Erva-cidreira.

1. Introdução

A *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex P. Wilson, conhecida como erva-cidreira, é um arbusto aromático, pertencente à família Verbenaceae, nativa da América Central e do Sul, (HENNEBELLE et al., 2008a; LORENZI; MATOS, 2008). As atividades farmacológicas mais relatadas para esta espécie são antiulcerogênica (PASCUAL et al., 2001), antiespasmódica (BLANCO et al., 2013), anestésica (SOUZA et al., 2017) e sedativa (VALE et al., 2002; ZÉTOLA et al., 2002), além de antioxidantes (HENNEBELLE et al., 2008b; OLIVEIRA et al., 2018) e antibacteriana (ARA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2018).

Dentre os estudos farmacológicos, em sua maioria temos os relacionados à atividade dos óleos essenciais da *L. alba*, mas também dos extratos das folhas dos seus diferentes quimiotipos. Destacam-se entre eles os ensaios que visam demonstrar seus efeitos sedativos, ansiolíticos e anestésicos (HATANO et al., 2012; HENNEBELLE et al., 2008b; SOUZA et al., 2017; VALE et al., 2002; ZÉTOLA et al., 2002). Ainda assim, poucos são aqueles realizados com as substâncias não voláteis isoladas a partir da *Lippia alba*. A sua maioria relaciona-se a predominância dos compostos majoritários presentes nos óleos essenciais, na qual formulações foram, também, desenvolvidas (DA SILVA JÚNIOR et al., 2019; SOUSA et al., 2015).

Apesar disso, o interesse pelos compostos fixos da planta tem aumentado. Alguns estudos revelaram a presença de fenilpropanoides, iridoides e flavonoides na *Lippia alba* como principais constituintes fixos, e relacionaram a presença destes às atividades farmacológicas (GOMES et al., 2018; HENNEBELLE et al., 2008b; TIMÓTEO et al., 2015; ZÉTOLA et al., 2002). Uma das substâncias majoritárias encontradas na *Lippia alba* é o acteosídeo. Este é um composto glicosilado, um fenilpropanoide (ALIPIEVA et al., 2014), que foi identificado e quantificado nesta espécie, em quantidades superiores a outras substâncias (GOMES et al., 2018, 2019; TIMÓTEO et al., 2015). Suas ações farmacológicas, já relatadas, variam desde atividade antioxidante, ansiolíticas e até neuroprotetiva, presentes não só na *L. alba* mas também em outras espécies vegetais (COSTA DE MELO et al., 2019; JI et al., 2019; KOO et al., 2006; NETO et al., 2009; PENG et al., 2015).

Em estudo avaliando a atividade anticonvulsivante dos extratos de *L. alba* de diferentes quimiotipos, foi sugerido que tais propriedades podem estar relacionadas a complexos fitoquímicos não voláteis, como fenilpropanoides e flavonoides, e também a alguns compostos voláteis tais como limoneno, citral, carvona e mirceno (NETO et al.,

2009). Além disso, foram investigadas as atividades no sistema nervoso central, como a atividade ansiolítica e também sedativa (CARVALHO, 2006; HATANO et al., 2012; HENNEBELLE et al., 2008b; ZÉTOLA et al., 2002).

Dessa forma, pode-se sugerir o acteosídeo como marcador químico da espécie vegetal, pois a substância pode ser utilizada como referência no controle de qualidade de um produto tradicional fitoterápico (BRASIL, 2014), visto os estudos relatados.

A via oral foi considerada a via de administração de medicamentos preferida e frequentemente empregada. Dentre outras formas farmacêuticas, o comprimido apresenta-se como a principal, devido a sua facilidade de administração, flexibilidade no desenvolvimento farmacotécnico, melhor custo-benefício e alta adesão por parte dos pacientes (JAIPAKDEE et al., 2018). Além disso, a via oral torna-se preferencial, tanto do ponto de vista farmacocinético, quanto dinâmico, visto que o acteosídeo tem rápida absorção gastrointestinal, como também para a atividade farmacológica pretendida, já que apresenta boa distribuição nos tecidos, incluindo o cérebro (ALPIEVA et al., 2014; WEN et al., 2015).

O desenvolvimento de um fitoterápico caracteriza-se por um processo complexo e multidisciplinar. Portanto, no trabalho em questão, predizer o espectro de atividade biológica e *docking* molecular da planta é essencial para selecionar o marcador biológico para esta espécie.

Ao definir o marcador, é possível padronizar o extrato e, desta forma, se estabelecer parâmetros quantitativos tanto para o extrato seco por *spray drying*, quanto para o produto acabado desenvolvido. A vantagem da obtenção do extrato seco por *spray drying* reside na manutenção da estabilidade dos constituintes conferida ao extrato com o uso desta técnica. Além da obtenção e padronização do extrato que será utilizado como matéria prima para o desenvolvimento do comprimido, é necessário o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a quantificação do princípio ativo, o que permite a realização do controle de qualidade dos comprimidos desenvolvidos, para segurança de um produto eficaz.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Acteosídeo (HWI group®), Água purificada, Amido (Mapric®), Celulose Microcristalina ph 101 (MCC) (Fagron®), Dióxido de sílcio coloidal (DSC) (Fagron®), Fosfato de potássio monobásico (Proquímicos®), Hidróxido de Sódio

(Isofar®), Lactose Anidra (Fagron®), Lauril Sulfato de Sódio (Mapric®), Metanol grau HPLC (MeOH) (J.T.Baker®), Ácido clorídrico (CRQ®), Ácido fórmico P. A. (CRQ®).

2.2 Métodos

2.2.1 Escolha do marcador químico através da predição do espectro de atividade biológica e *docking* molecular

Análises *in silico*, assistidas por computador (predição PASS e *docking* molecular) foram realizadas para descobrir possivelmente os fitoconstituintes responsáveis pelos efeitos farmacológicos da *Lippia alba*. As estruturas dos 15 compostos (ácido geneposídico, mussaenosídeo, epi-loganina, acteosídeo, isoacteosídeo, luteolina-7-*O*-glucosídeo, apigenina 7-*O*-glucuronídeo, apigenina 7-*O*-diglucuronídeo, crisoeriol 7-*O*-diglucuronídeo, tricina-7-*O*-diglucuronídeo, limoneno, carnova, linalol, citral, mirceno), já identificados para a planta (GOMES, 2017) foram coletadas da base de dados PubChem. As substâncias foram submetidas à avaliação das atividades ansiolíticas e sedativas com o auxílio do programa PASS. Este servidor prediz o espectro de atividade de um composto como atividade provável (Pa) e provável inatividade (Pi), com base na análise da relação estrutura-atividade do conjunto de moléculas usadas para validação que consiste em mais de 205.000 compostos, mostrando mais de 3.750 tipos de atividades biológicas. Os cálculos de acoplamento foram realizados com o complexo receptor-agonista 4COF (MILLER; ARICESCU, 2014) com o software GOLD. A região no espaço para a realização do *docking* molecular foi ajustada sobre o inibidor. As melhores soluções de encaixe foram salvas e poses consensuais foram usadas para explicação da melhor pose de interação.

2.2.2 Obtenção do extrato seco por *spray drying* padronizado a partir das folhas de *Lippia alba*

2.2.2.1 Material Vegetal

A espécie foi cultivada no campus da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Instituto Multidisciplinar em Saúde (IMS), Campus Anísio Teixeira (CAT) em Vitória da Conquista, Bahia. A coleta deste material ocorreu nos meses de setembro e outubro de 2017. Sua exsicata foi depositada no Herbário Mongoyós do mesmo Instituto (#1536) e no Herbário Alexandre Leal Costa - ALCB no Instituto de Biologia, em Salvador, Bahia (#ALCB 130052). A planta possui cadastro no SisGen (Sistema

Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) com o número AAFC3B.

2.2.2.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico de *Lippia alba*

O extrato hidroalcoólico de *L. alba* foi obtido a partir da extração por percolação das folhas da planta, em uma solução hidroalcoólica a 80% (ZÉTOLA et al., 2002) e concentrada utilizando Buschi®, modelo R100, com banho de aquecimento Buschi®, modelo B100, funcionando com temperatura de $40 \pm 10^\circ\text{C}$.

2.2.2.3 Secagem por *spray drying* do extrato hidroalcoólico de *Lippia alba*

O extrato hidroalcoólico de *Lippia alba* submetido secagem por *spray drying* foram preparados inicialmente, com 32 % de dióxido de silício coloidal, seguindo as condições operacionais: temperatura do ar de entrada, 162°C ; temperatura do ar de saída, 101°C ; aspiração a 70%; alimentação a 3% e fluxo a 30 mm. Cada extrato de *Lippia alba* seco por *spray drying* foi chamado de SDLA. Os parâmetros seguintes foram ajustados ao longo do processo de secagem definidos de acordo com os resultados obtidos para cada extrato seco, como está demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Extratos secos por *spray drying*, excipientes utilizados e parâmetros testados.

	SDLA1	SDLA2	SDLA3	SDLA4	SDLA5	SDLA6	SDLA7
Excipientes							
Extrato de <i>Lippia alba</i>	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Dióxido de Silício Coloidal	3,2 g	1,6 g	1,07 g	1,6 g	1,07 g	3,2 g	3,6 g
MCC ph101	-	1,6 g	1,07 g	1,6 g	1,07 g	-	-
Amido de milho	-	-	1,07 g	-	1,07 g	-	-
Parâmetros							
Temp. do ar de entrada	162°C	162°C	143°C	143°C	150°C	150°C	150°C
Temp. do ar de saída	101°C	101°C	88°C	90°C	94°C	90°C	90°C
Aspirador	70%	70%	60%	60%	60%	78%	78%
Alimentação	3%	3%	3%	3%	10%	7%	7%
Fluxo	30 mm	30 mm	30 mm	30 mm	35 mm	35 mm	35 mm

MCC: Celulose Microcristalina.

2.2.3 Obtenção dos comprimidos a partir do extrato seco por *spray drying* de folhas de *Lippia alba*

2.2.3.1 Estudos de pré-formulação

Ao extrato de *L. alba* adicionou-se adjuvantes, sendo inicialmente selecionados os mais correntemente utilizados, observando o critério de escolha que foi a inexistência

de interações entre os adjuvantes, os resultados do ângulo de repouso de cada excipiente e os seus índices de compressibilidade, o índice de Carr (IC) e a razão de hausner (RH).

A densidade aparente dos extratos foi obtida utilizando uma proveta de 25 ml, onde foi feita a compactação vertical manual, submetendo o pó a 100 batidas ritmadas dentro da proveta. A relação massa pesada e volume lido na proveta foram calculados. Com os resultados da densidade bruta e densidade aparente foram calculados os índices de compressibilidade, o índice de Carr e razão de Hausner, a partir da relação entre as duas densidades (Figura 1).

$$\text{Índice de Carr (\%)} = \frac{\text{densidade de compactação} - \text{densidade bruta}}{\text{densidade de compactação}} \times 100$$

$$\text{Razão de Hausner} = \frac{\text{densidade de compactação}}{\text{densidade de bruta}}$$

Figura 1: Fórmulas para obtenção do Índice de Carr e Razão de Hausner.

Já o teste do ângulo de repouso foi realizado para os excipientes, como também, para o melhor extrato de *L. alba* seco por *spray drying* e da formulação de escolha para a compressão. Ele foi determinado com auxílio do caracterizador de pós PTG, modelo S3 (Pharma test®). O equipamento foi utilizado para obter informações sobre o ângulo de repouso, massa, volume e, assim, a densidade bruta. O equipamento proporcionou informações sobre o ângulo de repouso, massa, volume e, assim, a densidade bruta.

2.2.3.2 Mistura do Pó e Compressão

A mistura de pós foi realizada em equipamento misturador modelo Mini misturador em “V” (Lemaq®), a 28 rotações por minuto, durante 30 minutos. Assim, compressão foi realizada em compressora monopunção Monopress (Lemaq®), com punção circular de 12 mm de diâmetro.

2.2.4 Validação de Metodologia Analítica para quantificação do Acteosideo no extrato e nos comprimidos de *Lippia alba*

A validação analítica foi realizada com base em legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e as normas internacionais da *International Conference on Harmonization* (ICH) (BRASIL, 2017; ICH, 2005). Os pontos avaliados foram exatidão, para o Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) e para o produto terminado,

precisão intermediária e repetibilidade, seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade e robustez.

2.2.4.1 Seletividade

A seletividade do método analítico foi obtida através da identificação do acteosídeo, pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV do padrão e das amostras analisadas (branco, matriz, diluente, extrato e comprimido). A espécie vegetal *Ocimum gratissimum* L., depositada no herbário Mongoyós (# 4158), foi escolhida para a distinção do material de interesse, *Lippia alba*, de outras espécies vegetais semelhantes. Essa análise foi realizada através da comparação do espectro UV-Vis do pico observado no extrato desta planta no mesmo tempo de retenção do acteosídeo (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

2.2.4.2 Linearidade

A linearidade foi determinada por meio de 5 concentrações diferentes da Substância Química de Referência (SQR) Acteosídeo (HWI group®) preparadas em triplicata. O acteosídeo foi preparado em uma solução com Metanol:Água (1:9) nas seguintes concentrações 2,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 6,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 10,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 14,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 18,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$, partindo de uma mesma solução mãe da SQR a 210 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foram analisados o gráfico das respostas em função da concentração do analito; o gráfico de dispersão dos resíduos; a equação da reta; coeficiente de correlação (r) e de determinação (r^2), coeficiente angular (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

2.2.4.3 Precisão

- Repetibilidade

Foi realizada a injeção de 6 réplicas, individualmente preparadas, da solução a 100% da concentração do teste. Cumprindo os critérios de aceitação de acordo a legislação (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

- Intermediária

Foi realizada a injeção de 6 réplicas, individualmente preparadas, da solução a 100%, em dois dias diferentes, realizada por operadores distintos (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

2.2.4.4 Exatidão

Para o estudo da exatidão do método foi realizada sua determinação para IFA, o extrato *Lippia alba spray drying*, e para o produto terminado, comprimido de *Lippia*

alba. Verificou-se a exatidão através de determinações das concentrações baixa (6,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$), média (10,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e alta (14,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$), contemplando o intervalo linear do método analítico, com três réplicas em cada nível (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

2.2.4.5 Limite de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados baseando-se em parâmetros da curva analítica, calculados pelas fórmulas que preconiza a legislação (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

2.2.4.6 Robustez

Foi determinada através de pequenas variações das condições analíticas do método, sendo aplicada a mudança da composição da fase móvel, passando a ser ácido fórmico 1,0% e variação na vazão para 0,8 mL min^{-1} (BRASIL, 2017).

2.2.4.7 Análise Estatística da Validação Analítica

A realização da análise estatística dos resultados obtidos para a validação analítica do método foi realizada com o auxílio do software ActionStat Pro®.

2.2.5 Controle de qualidade físico-químico dos comprimidos de *Lippia alba*

2.2.5.1 Determinação do peso médio do comprimido, dureza e friabilidade

Para a determinação do peso médio foram pesados 20 comprimidos, individualmente, sendo permitido o limite de variação de $\pm 5,0\%$ para comprimidos com peso acima de 250 mg. Já para a dureza utilizou-se uma amostra de 10 comprimidos, submetendo cada unidade à força aplicada diametralmente pelo durômetro (Nova Ética®), tipo mola espiral. O resultado do teste é informativo. O teste de friabilidade foi realizado pesando-se 20 comprimidos que foram transferidos para o friabilômetro (Nova Ética®) e submetidos a 100 rotações em um período de 4 minutos (25 rpm). Após o fim do teste os comprimidos foram novamente pesados e foi calculada a perda em porcentagem da massa dos comprimidos, sendo permitida a perda máxima de 1,5% (BRASIL, 2019).

2.2.5.2 Desintegração

Foram utilizadas seis unidades dos comprimidos, em desintegrador com seis provas (Nova Ética®). Cada comprimido não revestido foi colocado em um dos seis tubos da cesta. A cesta contendo as amostras de comprimidos foi submetida a

movimentos verticais em meio líquido, água purificada, a $37 \pm 1,0$ °C por 30 minutos (BRASIL, 2019).

2.2.5.3 Teste de Solubilidade do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA)

Para a determinação da solubilidade do extrato de *Lippia alba* seco por spray drying foi realizado o teste seguindo os parâmetros contidos no Guia de Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Novos e Similares (BRASIL, 2018b). Foram utilizados meios dentro da faixa de pH fisiológico – 1,0 a 6,8 – sendo eles: ácido clorídrico (HCl) 0,1M, água purificada e tampão fosfato pH 6,8. Adicionou-se a quantidade da IFA relativa a dose do medicamento no produto, 100 mg, em 250 mL do meio, em triplicata. Submeteram-se as amostras a uma incubadora de bancada com agitação orbital – Q816M20, na temperatura de 37 ± 1 °C por 24 horas e mediu-se o pH, além de quantificar o marcador do extrato em cromatógrafo líquido.

2.2.5.4 Análise quantitativa do extrato seco por *spray drying* e comprimidos de *Lippia alba*

O marcador utilizado para o ensaio quantitativo foi o acteosídeo. Este foi selecionado por ser o componente majoritário presente nesta planta (GOMES et al., 2019; TIMÓTEO et al., 2015) e por ter sido apontado como a substância com maior atividade ansiolítica através da triagem virtual realizada para as principais substâncias encontradas nesta espécie. Para tanto, durante o desenvolvimento do método analítico por CLAE-DAD foram testadas diferentes fases móveis, gradiente e fluxo, priorizando o uso do metanol como fase orgânica em função do menor custo e toxicidade desse solvente em relação à acetonitrila, como também o uso do ácido fórmico em substituição ao ácido trifluoroacético. O equipamento utilizado foi CLAE-DAD - Shimadzu®, coluna cromatográfica Shimpack (Shimadzu®) com 5 µm de tamanho de partícula, 4,6 mm de diâmetro e 150 mm de comprimento. A vazão selecionada foi de $0,900 \text{ mL min}^{-1}$, fase móvel foi composta por solução de ácido fórmico P.A. (CRQ®) a 0,9% (solvente A) e metanol grau HPLC (MeOH) (J.T.Baker®) (solvente B), com o seguinte perfil de eluição: 0-30 min.: 20-55% B (gradiente linear), 30-35 min.: 55-100% B (gradiente linear), 35-40 min.: 100-98% B (gradiente linear); 40-45 min.: 98-20% B (gradiente linear); 45-48 min.: 20% B (isocrático). O volume de injeção foi de 20 µL. O comprimento de onda para registro do cromatograma e detecção do acteosídeo foi o 325 nm.

Esta metodologia foi empregada tanto para realizar a análise dos extratos obtidos a partir da planta, quanto para a análise dos comprimidos desenvolvidos.

2.2.5.5 Preparo da Substância Química de Referência (SQR) e amostras contendo o extrato *Lippia alba*

As amostras da SQR do acteosídeo (HWI group®) e do extrato de *Lippia alba* a serem analisadas no CLAE foram pesadas, diluídas em uma solução de Metanol (MeOH) e Água (H₂O) na proporção 1:9, levadas a lavadora ultrassônica por 30 minutos, para o extrato e assim, foram filtradas com filtro a 0,45 µm e injetadas o volume de 20 µL no CLAE.

2.2.5.6 Teste de dissolução

O teste de dissolução de formas farmacêuticas sólidas permite que seja determinada a quantidade da substância ativa dissolvida em meio aquoso, previamente determinado. Para o ensaio de dissolução foi utilizado o dissolutor (Nova Ética®) de comprimidos e o meio de dissolução foi o HCl 0,1M, selecionado a partir dos resultados obtidos com o Teste de Solubilidade do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) e segundo os critérios do Guia de Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Novos e Similares (BRASIL, 2018b). Foi utilizado o aparatos pá, com volume de meio 500 mL e a rotação de 50 rpm conforme estabelecido pela agência regulatória (BRASIL, 2018b). Foram utilizadas seis cubas nas quais foi adicionado um comprimido em cada cuba contendo meio líquido aquoso a $37 \pm 0,5$ °C. A agitação constante foi mantida, coletando-se as amostras do meio de dissolução ao final de 30 minutos para quantificação do padrão Acteosídeo (BRASIL, 2019).

2.2.5.7 Doseamento do extrato de *Lippia alba* e comprimidos contendo o extrato de *Lippia alba*

Diluiu-se 100 mg da amostra em balão volumétrico de 100 mL em uma solução de metanol e água (1:9), levou-se para a lavadora ultrassônica por 30 minutos até a completa solubilização do extrato. Realizou-se uma nova diluição em um balão volumétrico de 10 mL, filtrou-se a amostra com filtro a 0,45 µm (Chromafil® Xtra PES-45/25) e injetou 20 µL no CLAE. Este procedimento foi realizado em triplicata conforme descrito anteriormente em Análise quantitativa do extrato seco por spray drying e comprimidos de *Lippia alba*.

3. Resultados e Discussão

3.1 Seleção do marcador biológico através da predição do espectro de atividade biológica e *docking* molecular

Previamente foi realizada a predição do espectro de atividade biológica dos principais compostos identificados nas folhas de *L. alba* através do servidor PASS, no qual o acteosídeo apresentou a melhor interação com o receptor GABA, dentre os compostos avaliados. A predição do espectro de atividade biológica através do servidor PASS pode ser utilizada para predição de diferentes tipos de atividades farmacológicas (ALMEIDA, 2015). A análise do ancoramento molecular do acteosídeo apresentou duas interações de hidrogênio Ser46 e Thr202 e sete interações de Van der Waals (Figura 2). O cálculo de redocking foi inferior a 2 Å para benzamida (RMSD = 0,6472 Å) (Figura 3), validando os procedimentos de docking. Sugere-se, então, através das análises dos resultados obtidos com a predição do servidor PASS, que o acteosídeo apresenta além da inibição do receptor GABA já reportado na literatura (SIQUEIRA-LIMA et al., 2019), possivelmente ação ansiolíticas devido uma inibição da enzima GABA-transaminase, Pa 0,668.

O acteosídeo possivelmente possa estar atuando como ansiolítico através de dois mecanismos de ação, sendo que estudos adicionais precisam ser realizados, para comprovação dos resultados adquiridos através da predição pelo PASS, visto que não se tem reportado na literatura até o momento atividade inibitória do acteosídeo frente a enzima GABA-transaminase.

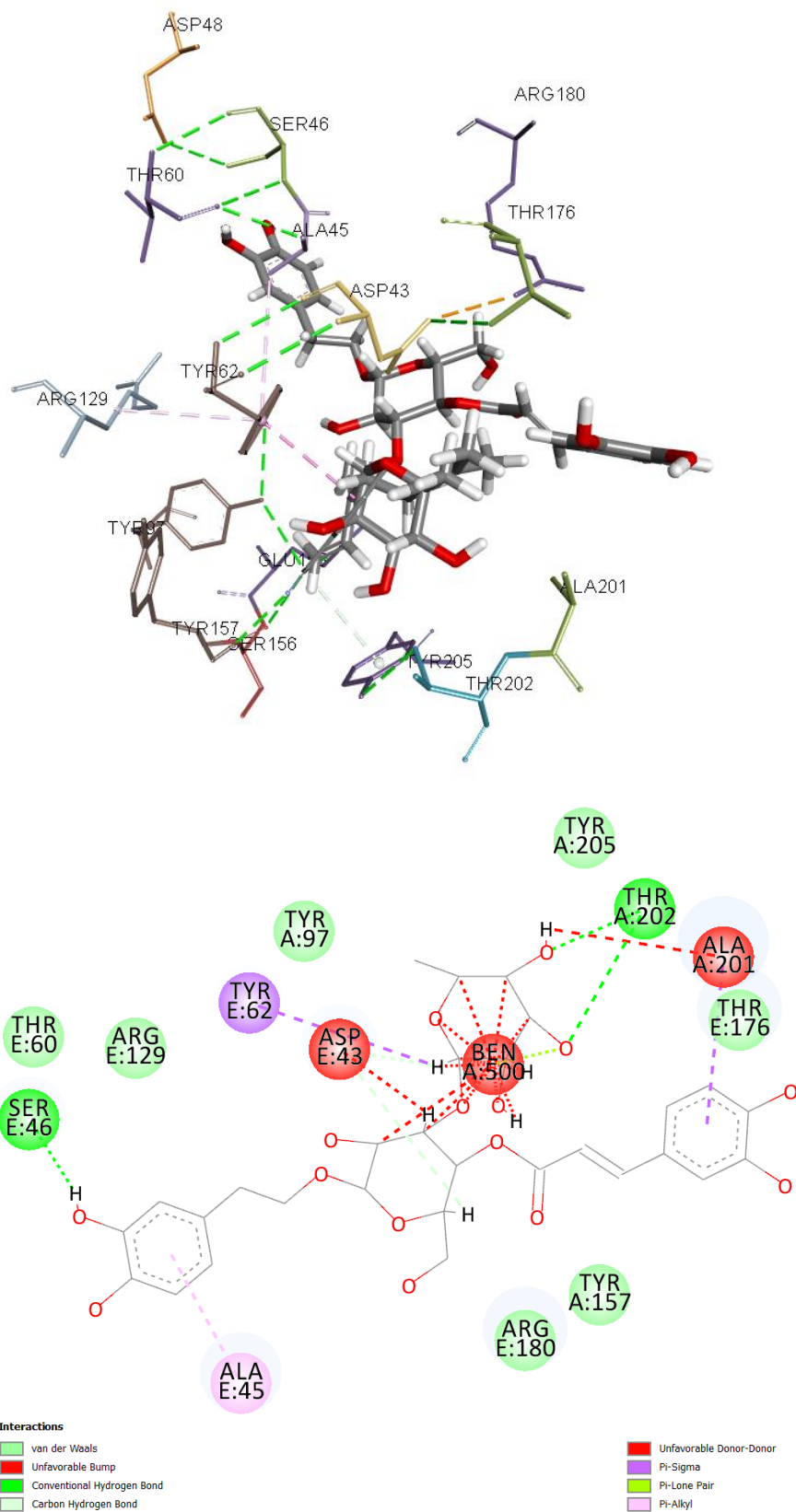


Figura 2: Interação do Acteosideo com os aminoácidos do sitio ativo do receptor GABA.

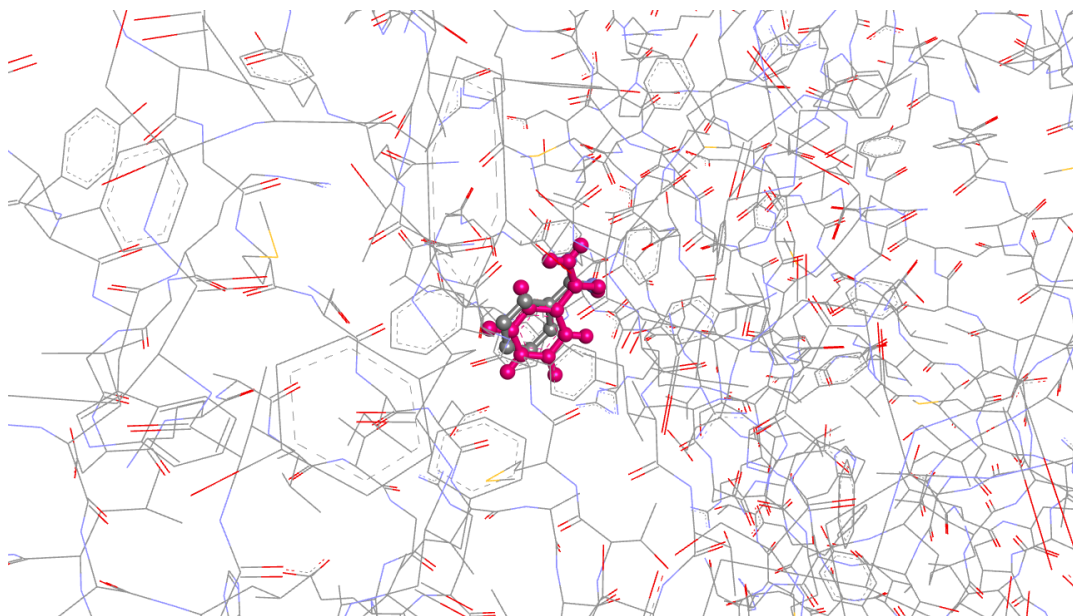


Figura 3: Figura realizada com o programa *Discovery Studio Visualizer* da estrutura cristalográfica 4COF utilizada na realização da docagem molecular, do inibidor agonista benzamida (cinza) do receptor GABA e a estrutura re-docada no sítio ativo (pink).

3.2 Obtenção do extrato seco por *spray drying* padronizado a partir das folhas de *Lippia alba*

O extrato hidroalcoólico de *Lippia alba* submetido a secagem por *spray drying* passou por um processo de desenvolvimento. Testes foram realizados com alguns excipientes, em diferentes concentrações, e também com mudanças nos parâmetros do equipamento. Zétola et al. (2002) em seu estudo realizaram o preparo de dois extratos mantendo os mesmos processos de secagem no equipamento, mas com diferentes concentrações de adjuvantes. Baseando-se em seus resultados, o primeiro teste realizado o SDLA 1, utilizou apenas o dióxido de silício coloidal, para o auxílio na secagem do pó. Tal excipiente é capaz de absorver umidade de pós-higroscópicos e melhorar o fluxo de uma formulação, por ser um bom deslizante, reduzindo a fricção e coesão entre as partículas (PATEL; SHAH; UPADHYAY, 2011).

Os extratos secos por aspersão foram submetidos a avaliação do índice de Carr e razão de Hausner (tabela 2) o que auxiliou no processo de desenvolvimento das formulações. Tal processo foi simultâneo ao de secagem dos extratos e os resultados obtidos, na compressão, sofreu influência do extrato utilizado.

Tabela 2: IC e RH dos extratos de *Lippia alba* secos por *spray drying* e a sua classificação.

	SDLA 1	SDLA 2	SDLA 3	SDLA 4	SDLA 5	SDLA 6	SDLA 7
IC	31,944	31,000	24,706	43,000	45,000	15,000	10,000
RH	1,469	1,449	1,328	1,754	1,818	1,176	1,111
	Muito	Muito		Muito,	Muito,		
Classificação	fraco	fraco	Tolerável	muito	muito	Bom	Excelente
				fraco	fraco		

SDLA: extrato seco de *Lippia alba* seco por *spray drying*; IC: Índice de Carr; RH: Razão de Hausner.

A razão de hausner e o índice de carr são parâmetros onde é calculada a razão entre a densidade bruta e compactada do pó. Tais índices permitem, de maneira rápida e por um método simples, predizer sobre a compressibilidade do pó e suas características de fluxo. Valores entre 1-10 e 1,00-1,11 para índice de carr e razão de hausner, respectivamente, o pó é considerado excelente, já aqueles que são > 38 e $> 1,60$, também para índice de carr e razão de hausner, respectivamente, tem péssimo fluxo (AULTON; TAYLOR, 2013; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2019; USP, 2007). Considerando que ao obter os resultados destes indicadores, é possível avaliar como o pó irá se comportar ao passar para o processo de produção, com o auxílio do IC e RH o desenvolvimento das formulações é direcionado a melhorar aspectos nos quais o extrato poderia comprometer o escoamento do pó e o enchimento completo da matriz, devido as suas características como baixa fluidez e alta higroscopia (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

A tabela 2 demonstra que o extrato SDLA 1 não apresentou IC e RH satisfatório. Isso se deve ao fato do extrato ter se apresentado mais higroscópico, o que prejudica também o seu fluxo e posterior processo de produção. Tais aspectos permanecerão nos extratos seguintes (SDLA 1 a SDLA 5). Apesar de realizadas algumas modificações, com o acréscimo de alguns adjuvantes, dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina (MCC) ph 101 e amido, para auxiliar e melhorar a densidade do extrato e, assim, os IC e RH, os mesmos não se apresentaram favoráveis à compressão. Tais aspectos se devem a natureza dos adjuvantes utilizados, visto que houve uma diminuição do dióxido de silício coloidal e acréscimo dos outros dois diluentes o amido que foram adicionados com o intuito de deixar o pó menos denso e a celulose microcristalina ph 101 para auxiliar na secagem sem reduzir muito a densidade, bem como sem comprometimento do fluxo do extrato (PATEL; SHAH; UPADHYAY, 2011).

Os extratos secos desenvolvidos SDLA 1 a SDLA 5 obtiveram classificação de muito fraco a muito, muito fraco, já os extratos SDLA 6 e SDLA 7 foram os melhores, com classificação bom (tabela 2) (AULTON; TAYLOR, 2013; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2019; USP, 2007). Os extratos SDLA6 e SDLA7 obtiveram melhores resultados de fluxo, segundo os índices. Apesar da concentração do excipiente ser igual para SDLA1 e SDLA6, os parâmetros de secagem foram modificados, o que influenciou diretamente no fluxo do pó (tabela 2). A temperatura do ar de secagem, da entrada e conseqüentemente de saída, e o fluxo podem ter produzido gotículas grandes que influenciaram na higroscopia dos extratos produzidos (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Já entre o SDLA6 e SDLA7 houve mudança em relação à concentração de dióxido de silício coloidal, que é um pó bastante volumoso e com baixa densidade, mas que por ser um bom deslizante e absorvente tem propriedades fundamentais ao processo de desenvolvimento (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; PATEL; SHAH; UPADHYAY, 2011), influenciando na formulação e escolha do extrato seco com características de melhor fluidez, o SDLA 7.

A definição dos parâmetros no equipamento e a escolha dos adjuvantes, as propriedades relacionadas às características do material de entrada e do processamento deste, são fatores fundamentais na secagem por aspersão (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Alguns podem até secar o pó, porém ao serem submetidos ao desenvolvimento de um comprimido não são as melhores escolhas.

3.3 Obtenção dos comprimidos a partir do extrato seco por *spray drying Lippia alba*

As formulações foram desenvolvidas com a mistura de extrato seco por *spray drying* e adjuvantes, em concentrações definidas de acordo com a funcionalidade de cada um. A escolha da melhor formulação foi baseada em estudos de pré formulação, com a análise do ângulo de repouso e dos resultados dos IC e RH dos extratos (tabela 3). É possível observar que os excipientes utilizados apresentaram boa classificação quanto a fluxo do pó (AULTON; TAYLOR, 2013). Os resultados apresentados corroboram a utilização destes na formulação, o que garantiu fluxo ao extrato seco e favoreceu a compressão.

Tabela 3: Ângulo de repouso (α); Índice de Carr (IC) e Razão de Hausner (RH) dos adjuvantes.

Adjuvantes	α	IC	RH	Classificação
Amido	27,30°	3,78%	1,00	Excelente
Lactose Anidra	32,30°	11,72%	1,13	Bom
MCC ph 101	35,30°	5,36%	1,06	Bom/Excelente
DSC	35,33°	15,98%	1,19	Bom/Razoável

MCC: Celulose microcristalina; DSC: Dióxido de Sílicio Coloidal. Classificação baseada em dados do Aulton e Taylor (2013).

Considerando então o bom fluxo do extrato e dos adjuvantes, o processo de compressão direta foi escolhido para a produção dos comprimidos. Fatores relacionados à praticidade na produção e economia no processo (THOORENS et al., 2014), além dos bons índices de compressibilidade do extrato foram determinantes para a escolha da via. Já que para o sucesso do processo de compressão direta a mistura do pó deve apresentar certas propriedades, como alta flexibilidade, baixa tendência a segregação e alta compactabilidade (PATEL; KAUSHAL; BANSAL, 2006). Como se sabe que as IFAs costumam não apresentar boas propriedades de fluxo e se submetidas à compressão direta, sem adjuvantes, difícil obter bons resultados; a compressão direta aliada a correta escolha dos adjuvantes foi fundamental para um processo de compressão eficaz (MEGARRY et al., 2019).

Tabela 4: Formulações dos comprimidos com extratos hidroalcoólicos de *Lippia alba* secos por *spray drying*.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09
Peso total do comprimido (mg)	550	500	500	500	500	450	450	500	500
SDLA	SDLA1	SDLA2	SDLA3	SDLA4	SDLA5	SDLA5	SDLA5	SDLA6	SDLA7
FC	1,54	1,80	1,80	1,53	1,53	1,53	1,53	1,53	1,60
Excipientes									
Ext. de <i>L. alba</i> (%)	36,36	72,00	72,00	61,20	61,20	61,20	61,20	30,60	32,00
Amido (%)	20,00	20,00	12,00	20,00	15,00	23,00	38,80	23,00	23,00
Lactose anidra (%)	15,00	5,00	5,00	5,00	8,00	-	-	18,00	18,00
MCC ph 101 (%)	27,64	3,00	11,00	13,80	15,80	15,80	-	28,40	27,00
LSS (%)	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-
Total (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100

SDLA: extrato seco de *Lippia alba* seco por *spray drying* correspondente a 100 mg, ; FC: fator de correção; MCC ph 101: celulose microcristalina ph 101; LSS: lauril sulfato de sódio.

Podem-se observar as diferentes concentrações dos componentes das formulações na tabela 4. O desenvolvimento das formulações seguiu o desenvolvimento dos extratos secos pela técnica de *spray drying*. A formulação 01 além dos adjuvantes utilizados para melhora do fluxo e auxílio na compressão, amido e MCC ph 101, tem o lauril sulfato de sódio (LSS) utilizado para auxiliar na dissolução do comprimido (PATEL; SHAH; UPADHYAY, 2011).

A presença da MCC ph 101 permitiu a melhora do fluxo da formulação e uma excelente compressibilidade, por permitir a deformação plástica após a compressão, já que atuou como um aglutinante e também como um desintegrante, favorecendo a absorção de água e assim, a desintegração do comprimido (JAIPAKDEE et al., 2018; THOORENS et al., 2014).

O extrato SDLA 1 demonstrou-se bastante volumoso e higroscópico, já os demais, SDLA 2 ao 5, utilizaram adjuvantes com o intuito de melhorar tais aspectos. Apesar do extrato SDLA 5 não ter apresentando bom IC e RH, ele foi utilizado como teste nas formulações 05, 06 e 07, em que concentrações diferentes dos adjuvantes e o peso final do comprimido foram testados. Portanto, a mudança do peso final do comprimido para 450 mg, nas formulações 06 e 07 visavam um preenchimento mais adequado da matriz de compressão, porém os resultados não foram satisfatórios, retornando a 500 mg.

Para o extrato SDLA 7 e a formulação escolhida (09), foi realizada a caracterização do fluxo de pós por meio da determinação do ângulo de repouso. A partir desse resultado é possível prever o comportamento do pó ao ser levado para a compressora, se ele é ideal para a via de compressão escolhida e caso indicasse fluxo pobre, seria possível, através de modificações na formulação, com ajustes nas escolhas e concentrações dos excipientes, melhorá-lo. Aulton e Taylor (2013) consideram um pó com excelente fluxo aquele que apresenta ângulo entre 25 – 30°, e resultados acima de 66° são considerados com baixo fluxo. O ângulo para o extrato foi 16,0° e para a formulação 09 foi 15,7° (tabela 5), considerado um ângulo excelente para ambos. Apesar de próximos, observamos que a adição dos excipientes melhorou o ângulo, diminuindo-o, e favorecendo o processo de compressão. As mesmas propriedades também podem ser confirmadas através do IC e RH do extrato e da formulação, apesar da melhora significativa dos índices com a adição dos adjuvantes, no caso na formulação (tabela 4) (AULTON; TAYLOR, 2013; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2019; USP, 2007).

Tabela 5: Ângulo de repouso do SDLA 7, formulação 09 e a sua classificação.

	α	IC	RH	Classificação
SDLA 7	16,0°	10,0 %	1,11	Excelente
Formulação 09	15,7°	6,2 %	1,06	Excelente

SDLA: extrato seco de *Lippia alba* seco por *spray drying*; α : Ângulo de Repouso; IC: Índice de Carr; RH: Razão de Hausner. Classificação baseada em dados do Aulton e Taylor (2013).

Alguns estudos trazem informações de teste *in vivo* realizado com ratos (CARVALHO, 2006; RAZAVI; ZARGARANI; HOSSEINZADEH, 2017; ZHANG et al., 2015), com dosagens estabelecidas de *Lippia alba*. Porém, refletindo no desenvolvimento farmacotécnico e à medida que foram realizados os testes das formulações, iniciamos com 200 mg de extrato, mas, a dose final definida foi de 100 mg de extrato de *Lippia alba* com comprimido peso total de 500 mg. Tal peso variou nas formulações 06 e 07 para 450 mg, para tentar encher a matriz de compressão de forma eficaz, devido a características do extrato (tabela 4) (GOH; HENG; LIEW, 2018). Apesar disso, os resultados com o peso final 500 mg foram melhores (figura 9).

**Figura 4:** Comprimidos de *Lippia alba* (Foto do autor).

3.4 Validação de Metodologia Analítica para quantificação do Acteosídeo no extrato padronizado de *Lippia alba spray drying* e em comprimido de *Lippia alba*

O desenvolvimento do método analítico seguiu especificações do International Conference on Harmonisation (ICH) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2017; ICH, 2005). Todos os testes visaram a quantificação do marcador acteosídeo, tanto para o extrato, quanto para o produto desenvolvido.

Foi realizada a seletividade do método, por meio da sua identificação na substância química de referência e no extrato de *Lippia alba* seco por *spray drying* (Figuras 5 e 6), para analisar se os parâmetros escolhidos para o método estão adequados a identificação e quantificação do marcador em estudo.

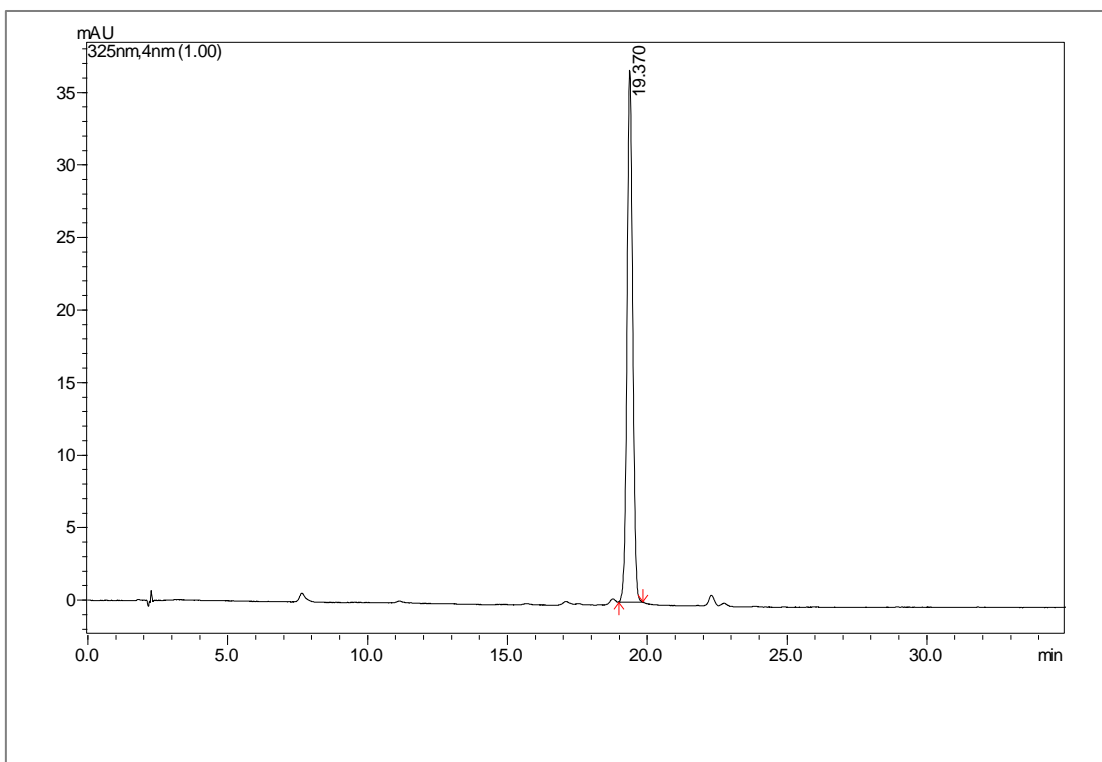


Figura 5: Cromatograma obtido da análise da SQR Acteosídeo, a partir do CLAE. Acteosídeo TR = 19,370 min. a 325 nm.

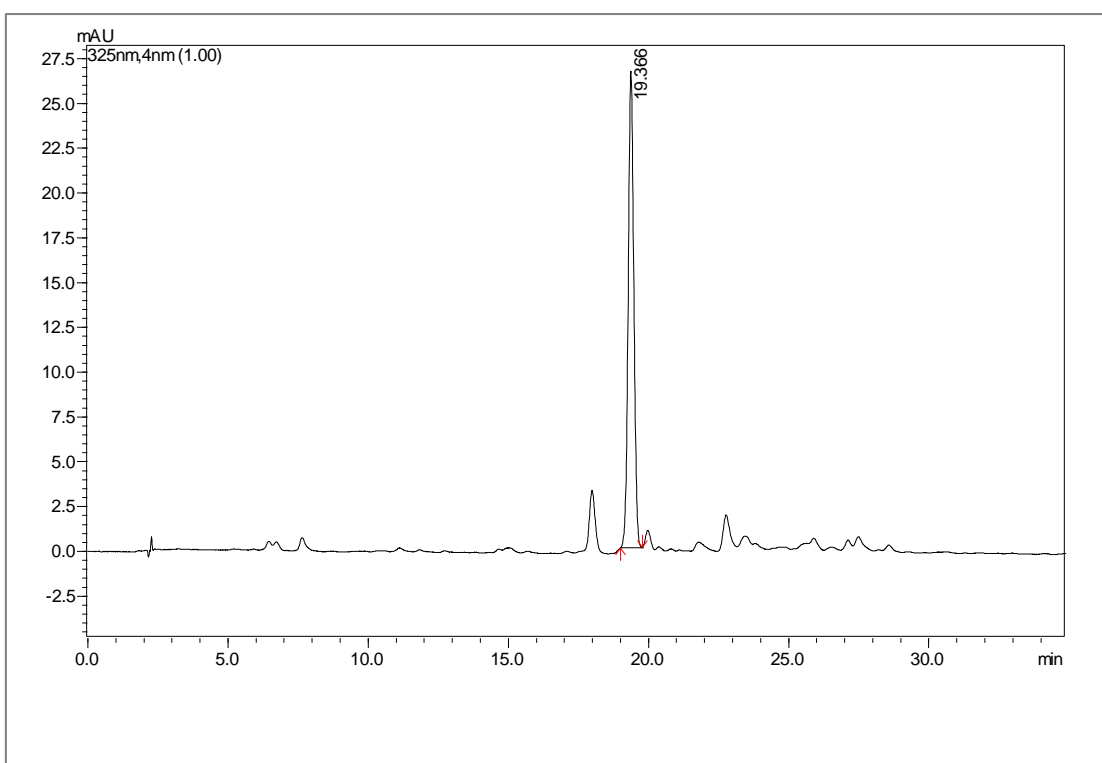


Figura 6: Cromatograma obtido da análise do Acteosídeo para o extrato de *Lippia alba* seco por spray drying, a partir do CLAE. Acteosídeo TR = 19,366 min. a 325 nm.

As análises realizadas para a seletividade do método com a identificação do acteosídeo SQR, o branco, a matriz, no caso o dióxido de silício coloidal, e a análise sem a matriz complexa (extrato) estão demonstradas na figura 6. Pode-se observar que o método é seletivo para o acteosídeo, mesmo diante de tantos fatores.

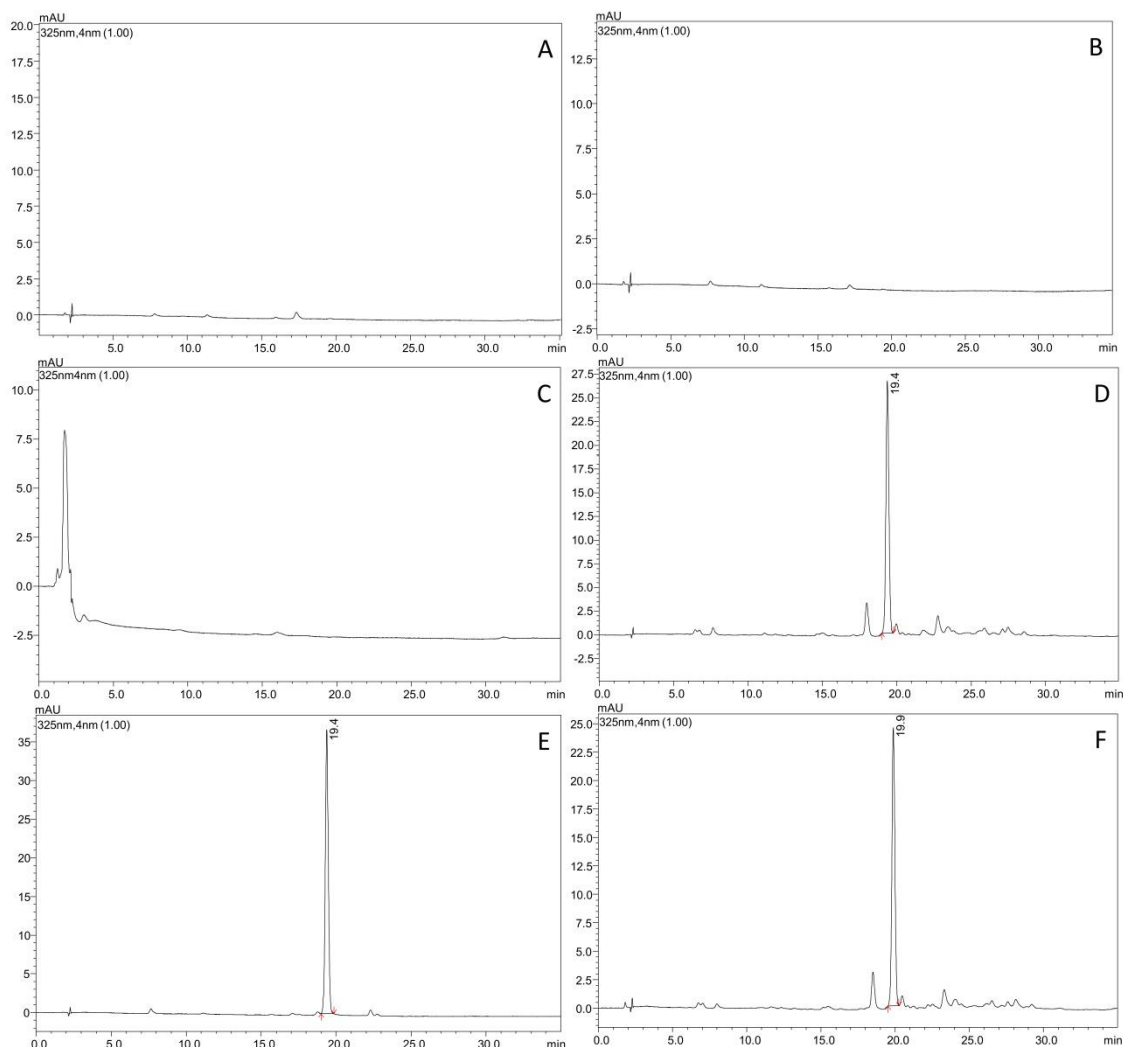


Figura 7: Cromatogramas referentes ao teste de seletividade, sendo A: branco; B: matriz; C: diluente – DSC; D: extrato de *Lippia alba* a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; E: SQR Acteosídeo a $14,70 \mu\text{g mL}^{-1}$; F: Comprimido de *Lippia alba* a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Foi analisada também uma espécie vegetal semelhante, a espécie *Ocimum gratissimum*, mais conhecida como Alfavaca, que poderia apresentar-se como adulterante no produto. O espectro UV-Vis obtido para esta planta no mesmo tempo de retenção do acteosídeo demonstrou um perfil diferente em relação ao espectro UV-Vis do Acteosídeo (figura 8). A partir deste resultado podemos concluir que o método é seletivo.

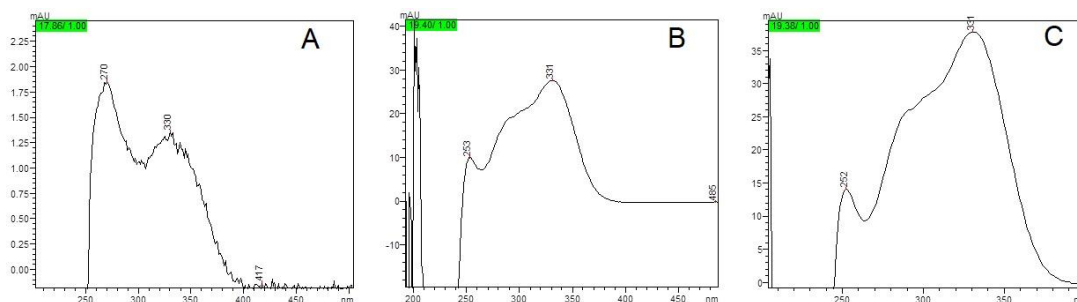


Figura 8: Espectros de absorção no ultravioleta do A: *Ocimum gratissimum*; B: *Lippia alba*; C: SQR Acteosídeo.

Para a linearidade foi construída a curva de calibração do padrão acteosídeo, na faixa de concentração de 2,10 a 18,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tal faixa tem relação com os testes de doseamento do produto, como a quantificação do acteosídeo no teste de dissolução. O teste de dissolução expõe o ativo a uma grande diluição, optando-se por uma ampla faixa de trabalho (BRASIL, 2017).

Os parâmetros avaliados para a linearidade, realizados conforme legislação vigente, foram: a equação da reta, estimada pelo método dos mínimos quadrado; e seus coeficientes de correlação (r) e determinação (r^2), o gráfico de dispersão dos resíduos e a avaliação da significância do coeficiente angular, com o resultado da homocedasticidade dos dados. Todos os resultados foram aprovados segundo o preconizado pela legislação e as normas técnicas internacionais (tabela 6) (BRASIL, 2017; ICH, 2005). Obteve-se a equação da reta pela média das três curvas analíticas, com equação $y = 32184x - 2670,1x$. A partir da curva obteve-se a representação gráfica da dispersão dos resíduos, em que se tem os resultados em uma banda de confiança, sugerindo a normalidade para os erros experimentais. Para a análise de regressão linear foi obtido um p-valor menor que o nível de significância (5%). A homocedasticidade dos dados foi obtida, garantindo que há uma homogeneidade da variância dos resíduos, supõe-se, então que a variância dos erros experimentais é homocedástica.

Tabela 6: Resultados dos parâmetros analíticos analisados na validação do método para quantificação do acteosídeo.

Parâmetro		Resultados
Faixa de trabalho		2,10 a 18,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Equação da reta		$y = 32184x - 2670,1x$
Coeficiente de correlação (r)		0,999
Coeficiente de determinação (r^2)		0,998
Limite de Detecção (LD)		0,5880 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Limite de Quantificação (LQ)		2,1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Precisão	Dias	0,945
Intermediária	Analistas	0,996
Repetibilidade		98,67 ($\pm 2,25$) %
Exatidão IFA		100,05 ($\pm 1,39$) %
Exatidão comprimido		95,84 ($\pm 3,95$) %
Robustez	Ác. fórmico 1,0%	0,1436
	Vazão 0,8 mL min^{-1}	0,2085

A faixa de trabalho escolhida para a validação do método se deu a partir dos estudos de linearidade, além de consideramos a aplicação pretendida. Visto que, este trabalho trata-se do desenvolvimento de um comprimido, que é submetido ao teste de dissolução, consideramos uma faixa de trabalho que levou em conta – 20% da menor concentração esperada a + 20% da maior concentração esperada, a partir do perfil de dissolução. Portanto, utilizamos uma ampla faixa que varia de 2,10 a 18,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$, considerando as diluições ocorridas durante o processo de dissolução.

Para os parâmetros de precisão intermediária, a análise dos dias (0,945) e analistas (0,996), e da robustez, variação ácido fórmico (0,1436) e vazão (0,2085) obteve-se um p-valor $> 0,05$, demonstrando que não há diferença significativa entre os operadores e o dia em que foi realizado o teste, assim como entre os parâmetros de mudança de fluxo e de pH da fase móvel.

Devido ao método ser utilizado para o doseamento, a exatidão foi realizada para a IFA e para o produto finalizado. Ambos os resultados apresentaram boa recuperação, para a IFA obteve-se 100,05% de recuperação, e para o comprimido 95,84%. Contudo, se trata de uma forma farmacêutica, com adjuvantes, no caso a matriz e uma matriz complexa, o extrato.

Já para os limites de quantificação e detecção apresentados, demonstraram que o método é adequado para análise do acteosídeo, apesar da concentração baixa trabalhada.

3.5 Controle de qualidade físico-químico dos comprimidos de *Lippia alba*

Os comprimidos obtidos a partir da formulação escolhida, formulação 09, foram submetidos ao controle de qualidade físico-químico do produto final. A determinação do peso médio e dureza dos comprimidos permite a compreensão do comportamento do pó frente a força plástica no qual o pó é submetido ao ser comprimido. Tais processos estão intimamente ligados com outros dois testes, friabilidade e desintegração. Caso o comprimido não apresente dureza e peso suficiente, estes testes influenciam nos resultados da friabilidade e desintegração. Todos estes aspectos têm íntima relação com o processo de produção, nos estudos de pré-formulação, além da escolha adequada de excipientes para a via adequada de compressão (PATEL; KAUSHAL; BANSAL, 2006). A formulação 09 foi aprovada nos testes de peso médio, dureza, friabilidade e desintegração segundo a Farmacopeia brasileira (tabela 7) (BRASIL, 2019).

Tabela 7: Parâmetros do controle de qualidade físico-químico dos comprimidos de *Lippia alba*.

Teste	Resultado
Peso médio	506,17 (\pm 5,21)
Dureza	45,75 (\pm 4,42) N
Friabilidade	0,18%
Desintegração	6 min.
Doseamento do extrato	10,90 (\pm 0,10) $\mu\text{g mL}^{-1}$ – 100,00%
Doseamento do Comprimido	98,94 (\pm 3,82) %
Dissolução	84,06 (\pm 7,17) %

O peso médio para comprimidos não revestidos, com peso acima de 250 mg, deve ter limites de variação de até \pm 5,0%, sendo que o comprimido de *Lippia alba* apresentou média de 506,17 mg, podendo ter uma variação entre 480,86 mg a 531,47 mg, portanto, avaliando a variação de peso dos comprimidos, o lote do produto cumpriu o teste. Já para a friabilidade, observou-se que o comprimido não se apresentou friável, já que o resultado ficou abaixo do limite determinado pela ANVISA, no caso 1,50% (tabela 7). Para a dureza, apesar de o teste ser informativo, os comprimidos tiveram dureza considerável, com 45,75 N. Por ser proporcional à força de compressão e inversamente proporcional a porosidade, apesar de se ter utilizado um extrato de uma

planta para a obtenção dos comprimidos, este por ser seco por *spray drying* favoreceu os resultados obtidos, tanto de dureza, quanto friabilidade e peso médio, diferente do observado com desenvolvimento de comprimidos que utilizaram extrato de *L. alba* liofilizado (BRASIL, 2019; GOMES, 2017).

O teste de desintegração também foi aprovado segundo os parâmetros farmacopeicos. O comprimido com extrato de *Lippia alba* seco por *spray drying* apresentou desintegração em 6 minutos. Tal resultado demonstra que o uso da técnica de *spray drying* favoreceu não só o processo de obtenção da forma farmacêutica sólida, como também obteve ótimos parâmetros da qualidade, visto que Gomes (2017) no desenvolvimento de uma formulação sólida com extrato de *Lippia alba* obteve problemas ao tentar desintegrar o comprimido (GOMES, 2017).

A produção de fitoterápicos com extratos secos pela técnica de *spray drying* é a mais indicada, visto que os testes da qualidade do produto obtido foram aprovados. Por termos um extrato seco e com excelente fluxo, isso favoreceu o desenvolvimento eficaz de uma forma farmacêutica sólida. Portanto, observa-se a produção de um comprimido, por uma via de compressão eficaz, a via direta, o que minimiza os processos e custos de produção, já que obtivemos uma formulação com fluxo adequado.

Já para doseamento do extrato de *Lippia alba* e dos comprimidos, aplicou-se a metodologia validada para a quantificação do acteosídeo. Este foi padronizado em uma concentração de $10,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ de acteosídeo presente no extrato de *Lippia alba*. Os valores obtidos encontram-se na tabela 7. Observamos que o comprimido tem uma quantidade recomendável de acteosídeo, frente ao doseamento do extrato, revelando que a formulação 09, com o seu conjunto de adjuvantes, tem 98,94% de acteosídeo, o que demonstra a qualidade da mistura de pós, a eficiência do método de compressão direta e como o fluxo dos pós foi importante, já que o comprimido obtido apresentou-se uniforme quanto aos parâmetros de quantificação do marcador.

O processo de mistura dos pós é essencial na etapa de produção. Qualquer alteração, como a falta de homogeneidade do pó, pode acarretar em diminuição do teor do acteosídeo, comprometendo a qualidade dos comprimidos e seu efeito farmacológico. Henn (2019), em estudo no qual validou metodologia para o acteosídeo observou uma degradação da substância frente ao aumento da temperatura do forno no cromatógrafo líquido (HENN et al., 2019). Além disso, a quantidade de acteosídeo presente no extrato pode ser afetada pela variação sazonal da planta, além da produção do composto frente às condições ambientais. Em estudos recentes Gomes et al. (2017)

obtiveram uma maior concentração de acteosídeo no inverno e os comprimidos produzidos a partir do extrato liofilizado de *L. alba* continha maior quantidade de acteosídeo, para uma dose de 100 mg (GOMES, 2017; GOMES et al., 2019).

A determinação da solubilidade do insumo farmacêutico ativo (IFA) seguiu parâmetros referentes à solubilidade de uma IFA frente a um meio aquoso, com pH variando de 1,0 a 6,8, por um período de 24h (BRASIL, 2018b; FDA, 2017; USP, 2007). Os resultados estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8: Análises da solubilidade (%) do ativo e pH da solução antes e depois de 24h de teste.

	Tempo 0		Após 24h	
	Solubilidade	pH	Solubilidade	pH
H₂O	109,0 (± 29,0) %	6,4 (± 0,02)	68,9 (± 3,3) %	7,0 (± 0,26)
HCl 0,1M	135,0 (± 37,6) %	1,8 (± 0,06)	101,6 (± 22,4) %	1,8 (± 0,04)
TF pH 6,8	103,7 (± 8,1) %	6,6 (± 0,10)	71,4 (± 10,2) %	6,9 (± 0,04)

H₂O = Água purificada; HCl = Ácido clorídrico; TF = Tampão fosfato pH 6,8

Observou-se que houve pequenas variações no pH da água e Tampão fosfato pH 6,8. Para HCl 0,1M não houve alteração. Ao realizar a determinação do acteosídeo por CLAE, no qual verificou-se a completa solubilidade do composto e sua possível degradação após 24h de teste, o meio que o extrato apresentou maior solubilidade foi o HCl 0,1M (tabela 8). Apesar de o acteosídeo ser solúvel em água e apresentar boa distribuição gastrointestinal (ALPIEVA et al., 2014; WEN et al., 2015), neste estudo utilizou-se um extrato, que se caracteriza por ser uma matriz complexa, com outras substâncias presentes e também com o excipiente que auxiliou no processo de secagem por *spray drying*, o dióxido de sílicio coloidal. De acordo com os resultados obtidos, o extrato pode ser classificado como classe I ou classe III, devido à alta solubilidade do mesmo.

O teste de dissolução baseou-se em critérios estabelecidos pelo Guia de dissolução aplicável a medicamentos genéricos, novos e similares. Neste, para medicamentos classe I (alta solubilidade/alta permeabilidade) e classe III (alta solubilidade/baixa permeabilidade) o meio indicado é o HCl 0,01M, utilizando o aparato pá, em rotação 50 ou 70 RPM, a 37°C (BRASIL, 2018b).

Para este estudo, utilizou-se HCl 0,1M devido ao resultado obtido com o teste de solubilidade da IFA, por ter um pH ser mais ácido, no limite inferior da faixa solicitada

para a determinação da solubilidade, no caso, 1,0 e 6,8, além da maior utilização deste em monografias farmacopeicas. O teste foi realizado com rotação do aparato a 50 RPM. A definição apropriada dos vários parâmetros que são envolvidos no teste de dissolução e a compreensão do impacto destes, nos resultados e análises é fundamental para escolhas adequadas (PATADIA et al., 2013).

Os comprimidos utilizados no teste de dissolução foram aprovados, apresentando dissolução média de 84,06 (\pm 7,17) %. Apesar de ser um novo medicamento, observa-se que este é um medicamento de liberação imediata, em que liberou mais de 75% do ativo em 30 minutos (BRASIL, 2010). No entanto, são necessários maiores estudos acerca do perfil de liberação do produto tradicional fitoterápico, para maior compreensão do comportamento do acteosídeo frente à dissolução.

Os comprimidos obtidos com o extrato hidroalcoólico de *Lippia alba* seco por *spray drying* foram aprovados nos testes em que foram submetidos. O processo de desenvolvimento da formulação por ocorrer de forma simultânea a secagem dos extratos permitiu que o delineamento das concentrações de adjuvantes fosse calculado para minimizar os possíveis erros e problemas que poderiam surgir nos processos de compressão e controle de qualidade.

4. Conclusão

Os estudos de *docking* molecular permitiram a escolha do acteosídeo como marcador para esta planta. Desta forma, uma metodologia analítica por CLAE-DAD foi desenvolvida e validada para realizar a quantificação dessa substância tanto na matéria prima vegetal (extrato seco por *spray drying* das folhas), como no produto acabado desenvolvido.

Obtivemos um extrato seco por *spray drying* com características de fluxo excelentes o que favoreceu o desenvolvimento da formulação de escolha por meio da compressão por via direta. Dentre as formulações desenvolvidas a 09 foi escolhida por apresentar índices de compressibilidade classificados como excelente. O ângulo de repouso determinado para o extrato e formulação de escolha revelou um fluxo do pó também com classificação excelente. Tais parâmetros favoreceram a obtenção de comprimidos, com 12mm de diâmetro, por compressão direta. Os comprimidos passaram por testes de controle de qualidade, seguindo a legislação, e estes foram aprovados.

Os procedimentos analíticos propostos foram validados conforme estabelecido pela ICH e ANVISA para a quantificação do acteosídeo no extrato de *Lippia alba* seco por *spray drying* e no comprimido contendo o extrato. O protocolo de validação desenvolvido neste trabalho é útil para quantificação no produto tradicional fitoterápico obtido e pode ser utilizado para possíveis estudos futuros com o comprimido obtido.

Assim, foi possível obter de forma satisfatória um novo produto oriundo de uma espécie vegetal, com atividade farmacológica importante e na forma farmacêutica sólida, aplicável industrialmente em função da utilização de extrato seco por *spray drying*.

Referências Bibliográficas

- AGUIAR, J. S. et al. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 436–440, 2008.
- ALPIEVA, K. et al. Verbascoside - A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1065–1076, 2014.
- ALLEN JUNIOR, L. V. .; ANSEL, H. C. .; POPOVICH, N. G. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ALMEIDA, J. R. DE. **Planejamento, ensaio e otimização in silico de novos protótipos inibidores da enzima acetilcolinesterase**. Ribeirão Preto, 2015. 156 p. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.
- AMIDON, G. L. et al. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. **Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. et al. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v. 76, n. 3–4, p. 374–378, 2005.
- ARA, N. et al. In vitro antimicrobial and cytotoxic activities of leaves and flowers extracts from *Lippia alba*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 12, p. 87–90, 2009.
- AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines**. 4th. ed. [s.l.] Churchill Livingstone, 2013.
- BIESKI, I. G. C.; DE LA CRUZ, M. **Quintais Medicinais mais Saúde menos Hospitais**. Cuiabá: Governo do Estado de Mato Grosso, 2005.
- BLANCO, M. A. et al. Antispasmodic effects and composition of the essential oils from

two South American chemotypes of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 803–809, 2013.

BRASIL. **Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006 - Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a.

BRASIL. **POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>

BRASIL. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento da Assistência Farmacêutica., 2006c.

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 31, de 11 de Agosto de 2010**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0031_11_08_2010.pdf/5e157d15-d3d5-4bb9-98db-5667e4d9e0c8>. Acesso em: 8 out. 2019

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 - Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017 - Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. **Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira**. 1ª ed. Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2018a.

BRASIL. **Guia De Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Novos e Similares**, Brasília: Ministério da Saúde, 2018b. Disponível em: <<https://pesquisa.anvisa.gov.br/%0Ahttp://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3364628/Proposta+de+Guia+de+Dissolu%C3%A7%C3%A3o++06.04.2018.pdf/c15476e5-82aa-402f-aa95-24bf246dccc0?version=1.0>>

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Ministério da Saúde, 6ª edição, 2019.

BRITISH PHARMACOPOEIA. The British Pharmacopoeia Commission, 2019.

BRUHN, J. G.; HOLMSTEDT, B. O. Ethnopharmacology - A Challenge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, p. 251–256, 1982.

CAMILLO, F. C. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson uma espécie nativa promissora para a introdução em programas nacionais de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 10, n. 4, p. 21–27, 2017.

CARMONA, F. et al. *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) powdered leaves are effective in treating anxiety symptoms: A phase-2, randomized, placebo-controlled clinical trial. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 242, p. 112060, 5 out. 2019.

CARVALHO, R. S. M. DE. **Investigação da atividade farmacológica central dos extratos aquoso e hidroalcoólico, da fração butanólica e do verbascosídeo de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown (falsa melissa) - Verbenaceae.** Florianópolis, 2006, 96 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

COSTA DE MELO, N. et al. Anxiolytic and Antidepressant Effects of the Hydroethanolic Extract from the Leaves of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke: A Study on Zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 3, p. 106, 11 jul. 2019.

COSTA, M. et al. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of São Paulo. Part II. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 27, p. 25–33, 1989.

DA SILVA JÚNIOR, A. Q. et al. Seasonal and circadian evaluation of a citral-chemotype from *Lippia alba* essential oil displaying antibacterial activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 85, n. May, p. 35–42, 2019.

DAELS-RAKOTOARISON, D. et al. Neurosedative and Antioxidant Activities of Phenylpropanoids from *Ballota nigra*. **Arzneimittel-Forschung**, v. 50, n. 01, p. 16–23, 28 dez. 2000.

DE MONTELLANO, B. R. O.; BROWNER, C. H. Chemical bases for medicinal plant use in Oaxaca, Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, n. 1, p. 57–88, 1985.

DUKE, J. A.; BOGENSCHUTZ-GODWIN, M. J.; OTTESEN, A. R. **Duke's Handbook of medicinal plants of Latin America.** Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2009.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil : Pharmacological studies , drug discovery , challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

FÁTIMA, C. DE et al. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. v. 127, p. 674–684, 2010.

FDA. **Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system guidance for industry.** Center for Drug Evaluation and Research. United States, 2017.

FERREIRA, A. **Guia Prático Da Farmácia Magistral.** 4^a ed. Brasil: PHARMABOOKS EDITORA, 2011.

GAZOLA, R. et al. *Lippia alba* , *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 477–480, 2004.

- GOH, H. P.; HENG, P. W. S.; LIEW, C. V. Understanding effects of process parameters and forced feeding on die filling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 122, n. February, p. 105–115, 2018.
- GOMES, A. F. **Nova metodologia analítica para análise qualitativa e quantitativa de metabólitos bioativos de *Lippia alba* e do seu produto fitoterápico desenvolvido**. Salvador, 2017. 128p. Tese de Doutorado - Instituto de Química - Universidade Federal da Bahia.
- GOMES, A. F. et al. Simultaneous determination of iridoids, phenylpropanoids and flavonoids in *Lippia alba* extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Microchemical Journal**, v. 138, p. 494–500, 2018.
- GOMES, A. F. et al. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. **Food Chemistry**, v. 273, n. September, p. 186–193, 2019.
- HATANO, V. Y. et al. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. March, 2012.
- HENN, J. G. et al. Toxicological evaluation of a standardized hydroethanolic extract from leaves of *Plantago australis* and its major compound, verbascoside. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, n. February 2018, p. 145–156, 2019.
- HENNEBELLE, T. et al. The Essential Oil of *Lippia alba*: Analysis of Samples from French Overseas Departments and Review of Previous Works. **Chemistry & Biodiversity**, v. 3, n. 10, p. 1116–1125, out. 2006.
- HENNEBELLE, T. et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, 2008a.
- HENNEBELLE, T. et al. Antioxidant and Neurosedative Properties of Polyphenols and Iridoids from *Lippia alba*. **Phytotherapy Research**, v. 258, n. August 2007, p. 256–258, 2008b.
- ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**. ICH Harmonised Guideline, 2005.
- JAIPAKDEE, N. et al. Preparation of *Curcuma comosa* tablets using liquisolid techniques: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 553, n. 1–2, p. 157–168, 2018.
- JL, S.-L. et al. Antioxidant activity of phenylethanoid glycosides on glutamate-induced neurotoxicity. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, p. 1–11, 4 jul. 2019.
- JULIÃO, L. S. et al. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmaco**, p. 36–38, 2003.
- KOO, K. A. et al. Acteoside and its aglycones protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity. **Life Sciences**, v. 79, n. 7, p. 709–716, 10 jul. 2006.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LACHMAN, L. et al. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. [s.l.] Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. [s.l.] Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. São Paulo, 2003. 117 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

MATOS, F. J. A. As ervas-cidreira do Nordeste do Brasil - Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) - Parte II. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 77, p. 137–141, 1996.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. Ceará, Editora UFC, 2002.

MAYNARD, L. G. et al. Chemical composition and vasorelaxant effect induced by the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. (Verbenaceae) in rat mesenteric artery. **Indian journal of pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 694–8, 2011.

MEGARRY, A. J. et al. A big data approach to pharmaceutical flow properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, n. July 2018, p. 337–345, 2019.

MIGUEL, E. et al. A checklist of the cultivated plants of Cuba. **Die Kulturpflanze**, v. 37, n. 2, p. 211–357, 1989.

MILLER, P. S.; ARICESCU, A. R. Crystal structure of a human GABAA receptor. **Nature**, v. 512, n. 7514, p. 270–5, 21 ago. 2014.

NETO, A. C. et al. The role of polar phytocomplexes on anticonvulsant effects of leaf extracts of *Lippia alba* (Mill .) N . E . Brown chemotypes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 933–939, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

OLIVEIRA, G. T. DE et al. Phytochemical characterisation and bioprospection for antibacterial and antioxidant activities of *Lippia alba* Brown ex Britton & Wilson (Verbenaceae). **Natural Product Research**, v. 6419, n. December 2017, p. 0, 2018.

OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; NETO, J. M. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras , semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, n. 28, p. 282–301, 2010.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. August 2009, p. 641–650, 2010.

- PASCUAL, M. E. et al. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **II Farmaco**, v. 56, p. 501–504, 2001.
- PATADIA, R. et al. Dissolution criticality in developing solid oral formulations: From inception to perception. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 30, n. 6, p. 495–534, 2013.
- PATEL, H.; SHAH, V.; UPADHYAY, U. New pharmaceutical excipients in solid dosage forms – A review. **International Journal of Pharmacy and Life Sciences**, v. 2, n. 8, p. 1006–1019, 2011.
- PATEL, S.; KAUSHAL, A. M.; BANSAL, A. K. Compression physics in the formulation development of tablets. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 23, n. 1, p. 1–65, 2006.
- PENG, X. et al. The Mechanism of Memory Enhancement of Acteoside (Verbascoside) in the Senescent Mouse Model Induced by a Combination of D -gal and AlCl₃. **Phytotherapy Research**, v. 1144, n. October 2014, p. 1137–1144, 2015.
- PINTO, E. D. P. P.; AMOROZO, M. C. D. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 751–762, 2006.
- QUODBACH, J.; KLEINEBUDDE, P. A critical review on tablet disintegration. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 21, n. 6, p. 763–774, 2016.
- RAZAVI, B. M.; ZARGARANI, N.; HOSSEINZADEH, H. Anti-anxiety and hypnotic effects of ethanolic and aqueous extracts of *Lippia citriodora* leaves and verbascoside in mice. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 7, n. 4, p. 353–365, 2017.
- RODRIGUES, A. C. C.; GUEDES, M. L. S. Utilização de plantas medicinais no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas – Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 1–7, 2006.
- SABRI, A. H. et al. Understanding tablet defects in commercial manufacture and transfer. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, n. May, p. 1–6, 2018.
- SCHOCKEN, N. R. L. **Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (MILL) N. E. Brown**. Campinas, 2007. 82 p. Dissertação de Mestrado - Instituto Agrônomo Pós Graduação.
- SIERRA-VEGA, N. O.; ROMANACH, R. J.; MÉNDEZ, R. Feed frame: the last processing step before the tablet compaction. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 118728, 2019.
- SINGH, A.; VAN DEN MOOTER, G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 100, p. 27–50, 2016.
- SINKA, I. C. et al. The effect of processing parameters on pharmaceutical tablet properties. **Powder Technology**, v. 189, n. 2, p. 276–284, 2009.

SIQUEIRA-LIMA, P. S. et al. Central nervous system and analgesic profiles of *Lippia* genus. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 29, n. 1, p. 125–135, 2019.

SOARES, L. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia alba* (Miller) NE Brown ex Britt. & Wils.(Falsa-melissa) Verbenaceae**. Florianópolis. 2001. 189 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina.

SOUSA, D. G. et al. Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 8, p. 697–702, ago. 2015.

SOUZA, C. D. F. et al. Physiological responses of *Rhamdia quelen* (Siluriformes : Heptapteridae) to anesthesia with essential oils from two different chemotypes of *Lippia alba*. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. March, p. 1–10, 2017.

TAREAU, M. A.; PALISSE, M.; ODONNE, G. As vivid as a weed... Medicinal and cosmetic plant uses amongst the urban youth in French Guiana. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 203, p. 200–213, 2017.

THOORENS, G. et al. Microcrystalline cellulose, a direct compression binder in a quality by design environment - A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, n. 1–2, p. 64–72, 2014.

TIMÓTEO, P. et al. A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. **Food Chemistry**, v. 175, p. 366–373, 2015.

TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, n. January 2003, 2003.

USP, U. P. C. **USP30-NF25 USP PHARMACOPEIA**. 30. ed. [s.l: s.n.].

VALE, T. G. et al. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 167, p. 127–133, 1999.

VALE, T. G. et al. Central effects of citral , myrcene and limonene , constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill .) N . E . Brown. **Phytomedicine**, p. 709–714, 2002.

VARGAS, E. C. A. et al. Uso de Plantas com Fins Terapêuticos por Usuários de uma Unidade Pré-Hospitalar Pública de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Online de Pesquisa**, v. 11, n. 5, p. 1129–1134, 2019.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, A. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa , Porto Alegre , RS , Brasil. v. 20, n. 2, p. 367–382, 2006.

VIANA, G. S. B. et al. Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. **Pharmaceutical Biology**, v. 36, n. 5, 1998.

VIRANI, P. et al. Updated Review : Validation and Method Validation Parameters. **Pharmatutor Magazine**, v. 2, n. 10, p. 27–37, 2014.

WEN, Y. et al. Pharmacokinetics, Biodistribution, Excretion and Plasma Protein Binding Studies of Acteoside in Rats. **Drug Research**, v. 66, n. 3, p. 148–153, 2015.

YAMAMOTO, P. Y. **INTERAÇÃO GENÓTIPO X AMBIENTE NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** Campinas, 2006. 71 p. Dissertação de Mestrado - Instituto Agronômico Pós Graduação.

ZÉTOLA, M. et al. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* - Verbenaceae (Brazilian false melissa). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 207–215, 2002.

ZHANG, W. et al. Pharmacokinetics of acteoside following single dose intragastric and intravenous administrations in dogs. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 8, p. 634–640, 2015.

Material Suplementar

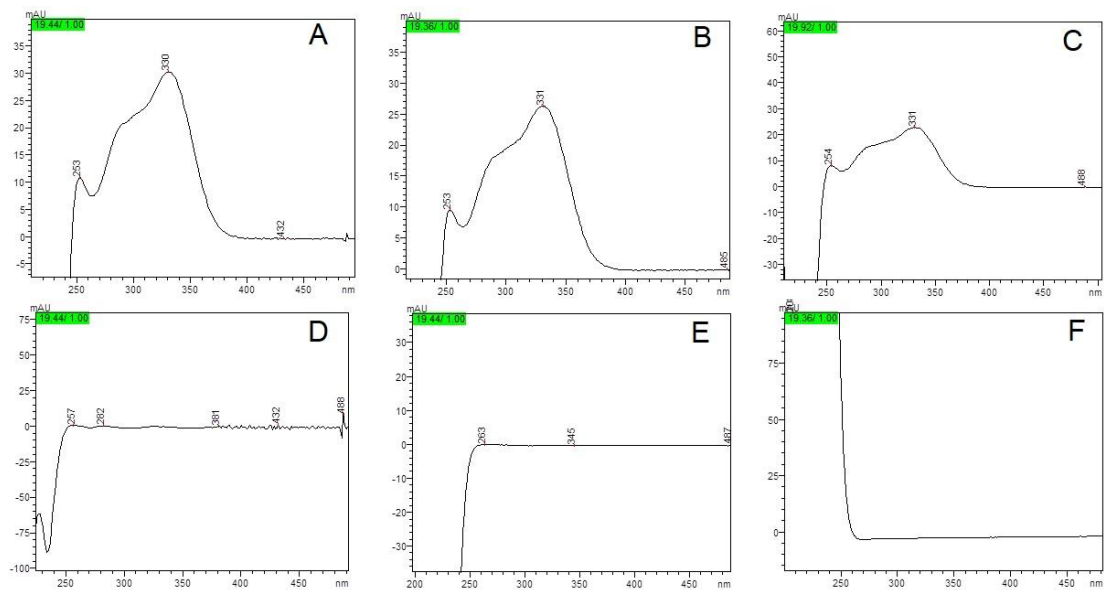


Figura 1: Espectros de Absorção no Ultravioleta das amostras submetidas ao teste de Seletividade. A = SQR Acteosídeo 14,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$; B = *Lippia alba* 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; C = Comprimido de *Lippia alba* 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; D = Branco (MeOH:H₂O); E = Matriz; F = Diluente (DSC).

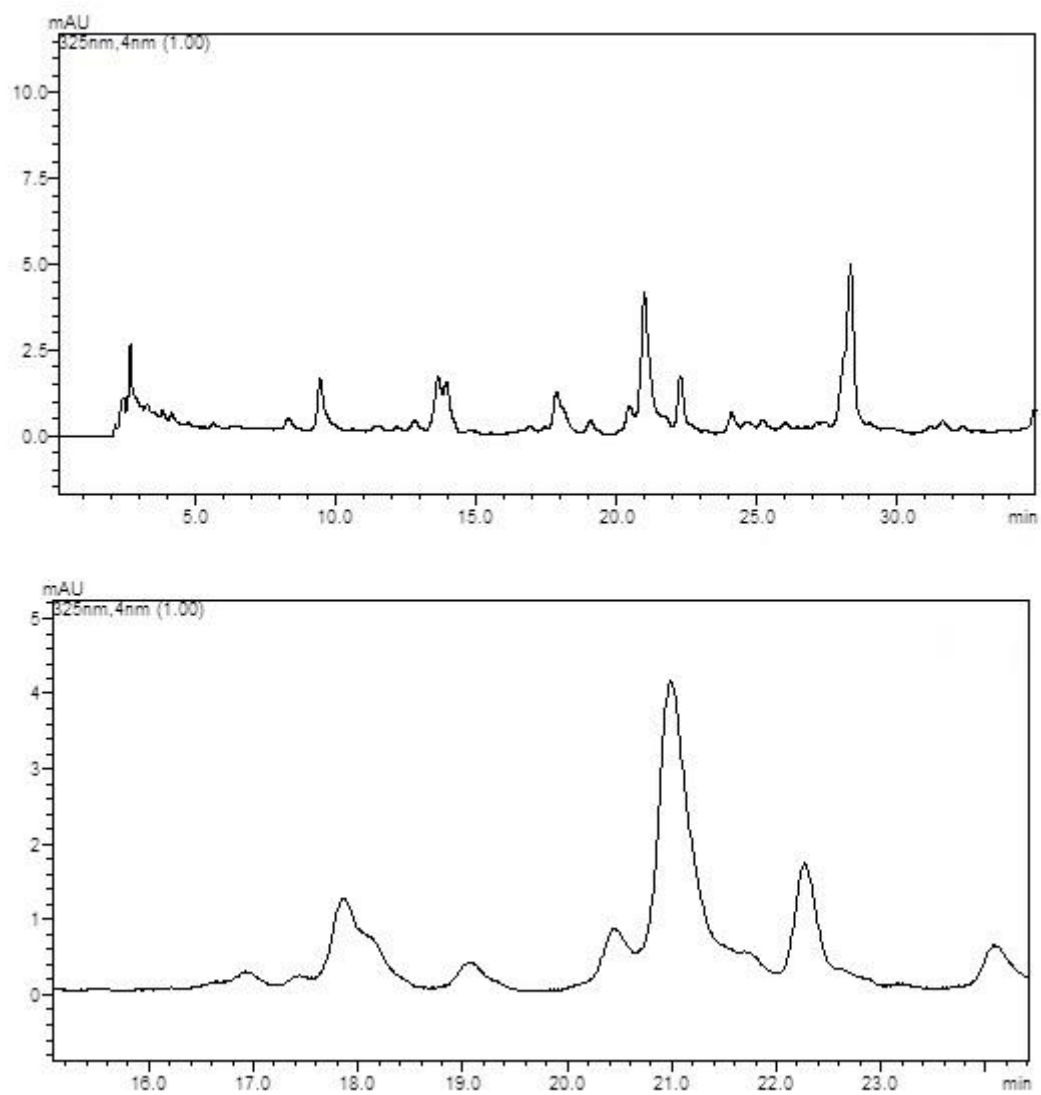


Figura 2: *Ocimum gratissimum L.* $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

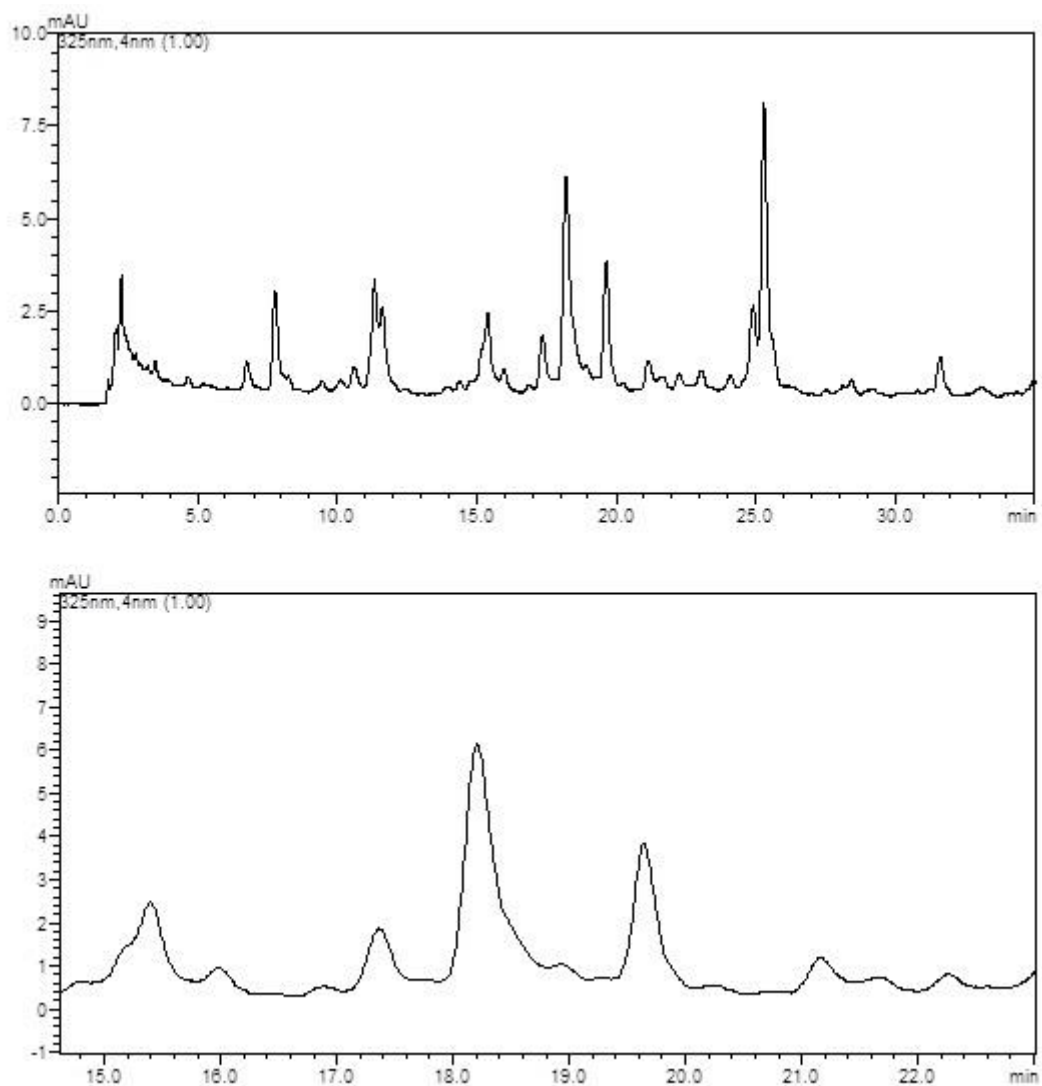


Figura 3: *Ocimum gratissimum* L. com adição de SQR Acteosídeo $2,10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Com os estudos de *docking* molecular foi possível sugerir que dentre os 15 compostos analisados, o acteosídeo possui ação ansiolítica devido a uma inibição da enzima GABA-transaminase. Porém, estudos adicionais precisam ser realizados, para comprovação dos resultados adquiridos através da predição pelo PASS, visto que não se tem reportado na literatura até o momento atividade inibitória do acteosídeo frente a enzima GABA-transaminase.
- Foi possível obter extrato seco por *spray drying* da *Lippia alba* com fluxo adequado para produção do comprimido.
- O extrato escolhido e a formulação desenvolvida apresentaram excelentes ângulo de repouso, índice de Carr e razão de Hausner, permitindo a obtenção dos comprimidos por compressão direta.
- A metodologia para quantificação do marcador molecular da planta, o acteosídeo, foi desenvolvida e validada segundo critérios estabelecidos pela ICH e ANVISA. Todos os parâmetros analisados foram aprovados segundo as análises estatísticas.
- Todos os comprimidos preparados a partir do extrato hidroalcoólico *spray drying* padronizado de *Lippia alba* foram aprovados. A dissolução demonstrou uma formulação de liberação imediata.