

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de comprimidos e isolamento de marcadores
a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera
langsdorffii* Desf.**

Mauro Nogueira da Silva

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de comprimidos e isolamento de marcadores
a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera
langsdorffii* Desf.**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para obtenção
do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos

Orientado(a): Mauro Nogueira da Silva

Orientador(a): Jairo Kenupp Bastos

Ribeirão Preto
2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Nogueira, Mauro Silva

Desenvolvimento de comprimidos e isolamento de marcadores a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.. Ribeirão Preto, 2011

166 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências

Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos

Naturais e Sintéticos.

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp

1. Comprimidos. 2. Marcadores químicos. 3. *Copaifera langsdorffii*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mauro Nogueira da Silva

Desenvolvimento de comprimidos e isolamento de marcadores a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador(a): Jairo Kenupp Bastos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

RESUMO

NOGUEIRA, M. S. **Desenvolvimento de comprimidos e isolamento de marcadores a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.** 2011. 166f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A espécie *Copaifera langsdorffii* pertence à família Leguminosae Juss., sub-família Caesalpinioideae Kunth. No Brasil, espécies de copaifera são amplamente distribuídas nos estados do Amazonas, Pará e Ceará e são mundialmente conhecidas pelo oleorresina que pode ser extraído de forma sustentável do tronco de suas e árvores. Este oleorresina e suas frações voláteis são amplamente estudados. No entanto, poucos estudos se relacionam com a composição química e biológica de outras partes da planta. A atividade antilitiásica do extrato hidroalcoólico das folhas dessa espécie, evidenciada em estudos preliminares pelo grupo de pesquisa e já com pedido de depósito de patente, abriu perspectivas para investigação fitoquímica deste extrato e produção de comprimidos fitoterápicos. Assim, objetivou-se nesse estudo conhecer o perfil químico do extrato, isolar e identificar metabólitos secundários que possam ser utilizados como marcadores da espécie e/ou como padrões cromatográficos, utilizando diferentes modalidades cromatográficas. E ainda, realizar estudos de extração, secagem e de pré-formulação para produção de comprimidos de qualidade contendo teor de extrato em dose adequada à utilização em ensaios clínicos futuros. O perfil químico do extrato e frações obtidas após partição com solventes de polaridade crescente demonstra constituição majoritária de compostos polares. A fração em AcOEt foi submetida às técnicas de cromatografia em coluna clássica e cromatografia contracorrente (HSCCC) propiciando o isolamento dos compostos **1** (quercetina-3-O- α -L-raminopiranosídeo) e **2** canferol-3-O- α -L-raminopiranosídeo), após purificação em CLAE preparativa. A fração aquosa foi submetida às técnicas de cromatografia em coluna utilizando gel de *sephadex* LH-20 e cromatografia contracorrente, propiciando o isolamento dos compostos de **3-10**, após purificação em CLAE preparativa. Os compostos **4**, **6**, **9** e **10** tiveram suas estruturas elucidadas e pertencem à classe dos ácidos galoilquínicos, identificados como ácido 6',4''-dimetóxi-3,4-di-O-galoilquínico; ácido 6'''-metóxi-3,4,5-tri-O-galoilquínico; ácido 4',4'''-dimetoxi-3,4,5-tri-O-galoilquínico; e ácido 4-metóxi-3-O-galoilquínico, respectivamente. Os estudos de extração levaram à obtenção de três extratos com maior rendimento, sendo o processo de extração simples utilizando-se etanol:água 7:3 (45 mL) com 3 g de droga vegetal, o qual foi de escolha para produção do extrato avaliado no estudo de secagem por “*spray drying*”. Os resultados do estudo de secagem não revelaram diferenças significativas entre os experimentos avaliados e as partículas dos extratos secos obtidos não apresentaram boas características de fluxo para compressão direta. A granulação por via úmida do extrato seco contendo 73% de extrato, 25% dos adjuvantes Maltodextrina:Aerosil (1:1) e 2% de polivinil pirrolidona, produziu partículas com características e propriedades de fluxo excelentes para a compressão. A compressão dos granulados sem adição de outros excipientes proporcionou comprimidos com

dureza elevada e longos tempos de desintegração. No entanto, comprimidos produzidos por mistura prévia com granulado de amido+lactose, apresentaram melhores características físicas, sendo os valores de dureza e friabilidade aceitáveis e tempos de desintegração menores e próximos aos valores recomendados.

Palavras-chave: Comprimidos, marcadores químicos, ácidos galoilquínicos, *Copaifera langsdorffii*

ABSTRACT

NOGUEIRA, M. S. **Development of tablets and isolation of secondary metabolites from hydroalcoholic extract of *Copaifera langsdorffii* Desf. leaves.** 2011. 166f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Copaifera langsdorffii belongs to Leguminosae Juss. family, sub-family Caesalpinioideae Kunth. In Brazil, *Copaifera* species are widely spread in Amazonas, Pará and Ceará states and are worldwide known by the oil-resin that can be extracted from its trunk. This oleoresin and its volatile fractions have been studied by many research groups. However, few studies are related to the chemical and biological composition of other plant parts, such as leaves. We have been investigating the antititiasic activity of the hydroalcoholic extract from *C. langsdorffii*, and it have risen the in both the phytochemical investigation of the aerial parts and the production of tablets with the obtained extract. Thus, the aim of this study was to evaluate the leaf extract chemical profile, to isolate and identify the secondary metabolites to be used as chromatographic standards, using different chromatographic methods, for the analysis of plant materials, its extracts and products, as well as, to carry out studies of extraction, drying and preformulation to produce tablets containing a suitable dose of the extract for using in future clinical trials. Chemical profile of the extract and its fractions obtained after partition with solvents with increasing polarity revealed that the extract is majorly composed by polar compounds. The ethyl acetate fraction was submitted to classical column chromatography and high speed countercurrent chromatography (HSCCC) techniques, resulting in isolation of compounds **1** (quercetin-3-O- α -L-rhaminopiranoside) and **2** (kaempferol-3-O- α -L-rhaminopiranoside, after preparative HPLC purification. The aqueous fraction was submitted to column chromatography techniques using gel filtration (sephadex LH-20) and HSCCC yielding compounds **3** to **10**, after preparative HPLC purification. Compounds **4**, **6**, **9** and **10** were identified as galloylquinic acid derivatives 6',4''-dimethoxy-3,4-di-O-galloylquinic acid; 6'''-methoxy-3,4,5-tri-O-galloilquinic acid; 4',4'''-dimethoxy-3,4,5-tri-O-galloylquinic acid; and 4-methoxy-3-O- galloylquinic acid, respectively. Studies of extraction process furnished three extracts with higher yielding, using a simple extraction process with ethanol: water 7:3 (45 mL) with 3g of plant biomass, which was chosen to obtain the extract for drying studies. Drying results showed no significant differences between the undertaken experiments, and the dried extracts particles did not have good flow properties for direct compression. Wet granulation of dried extract containing 73% of plant extract, 25% of excipients Maltodextrin: Aerosil (1:1) and 2% of polyvinyl pyrrolidone produced particles with excellent flow properties for compression. Granulate compression without adding other excipients furnished tablets with high hardness and long disintegration times. However, granulates prior mixed with amide-lactose produced tablets with better physical properties, such as hardness and friability with acceptable values and adequate disintegration times.

Keywords: Tablets, secondary metabolites, galloilquinic acids, *Copaifera langsdorffii*

1. INTRODUÇÃO

1.1 A FAMÍLIA LEGUMINOSAE

A família Leguminosae Juss., cujo nome mais antigo é Fabaceae Lindley, é a segunda maior das famílias botânicas. A classificação mais moderna da família Leguminosae divide-se em três sub-famílias: Caesalpinoideae, Mimosoideae e Papilionoideae (JUDD, *et al.*, 1999).

Seu valor econômico é representado pela produção de alimentos de consumo animal e humano, plantas medicinais, plantas ornamentais, fibras, gomas e resinas, taninos, grande número de drogas vegetais, inseticidas, entre outros (HEGNAUER & GRAYER-BARKMEIJER, 1993).

A família tem uma distribuição cosmopolita, sendo abundante nas regiões tropicais, subtropicais. É mais escassa apenas na Antártida e Nova Zelândia. Grande número das leguminosas é adaptado a habitats áridos e semi-áridos e muitas espécies são capazes de crescer em diferentes regimes de temperatura (HEGNAUER & GRAYER-BARKMEIJER, 1993).

Dados quimiotaxonômicos demonstram a presença de compostos que dão características à família como ácidos graxos de cadeia 20, 22 ou 24 carbonos nos óleos das sementes; classes de compostos que se distribuem homogeneamente pela família como saponinas triterpênicas, taninos, gomas, C15- e C20-terpenóides, alcalóides quinozilidínicos; compostos com uma distribuição mais aleatória como antraquinonas e alcalóides pirrolizidínicos; e classe de distribuição mais homogênea como a dos flavonóides. A taxionomia das leguminosas tem evoluído principalmente devido ao estudo da classe dos flavonóides, visto a importância destes metabolitos secundários e de sua diversidade metabólica nessa família. Membros da família Leguminosae contêm não apenas flavonas e flavonóis, que são flavonóides comumente encontrados em plantas de outras famílias, mas produzem especialmente chalconas, 2,3-diidroflavonóides e flavanonas, além de flavonóides que são raros em qualquer planta do reino vegetal como isoflavonóides, rotenóides, e flavanas (HEGNAUER & GRAYER-BARKMEIJER, 1993).

1.2 O GÊNERO *COPAIFERA*

O gênero *Copaifera* L. pertence à família Leguminosae Juss., sub-família Caesalpinioideae Kunth (VEIGA JR & PINTO, 2002).

Segundo a última edição do Index Kewensis (1996) o gênero *Copaifera* possui 72 espécies distribuídas em regiões tropicais da América Latina que se estende do México ao norte da Argentina e também em regiões tropicais da África Ocidental. Destas, 16 espécies são somente encontradas no Brasil.

A origem do nome copaíba pode ser atribuída ao tupi “cupa-yba”, a árvore de depósito, ou que tem jazida, em alusão clara ao óleo que guarda em seu interior. As copaibeiras são árvores de crescimento lento, alcançam de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos. O tronco é áspero, de coloração escura, medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro. As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma semente avóide envolvida por um arilo abundante e colorido. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arranjas em panículos axilares (PIO CORRÊA, 1984; VAN DEN BERG, 1982)

Popularmente conhecidas como “copaibeiras ou pau d’óleo”, as copaibas são encontradas facilmente nas regiões Amazônica e Centro-oeste do Brasil. Entre as espécies mais abundantes, destacam-se: *C. officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador), *C. guianensis* Desf. (Guianas), *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazônia), *C. confertiflora* Bth (Piauí), *C. langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguai), *C. coriacea* Mart. (Bahia), *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (ANDRADE, *et al.*, 2000).

Quimicamente, o gênero *Copaifera* destaca-se por apresentar uma enorme diversidade de metabólitos secundários. Estudos realizados com o óleo de copaibeiras revelam em grande maioria a presença de sesquiterpenos e diterpenos (BRAGA, 1998; MORIM, *et al.*, 1999; PINTO, *et al.*, 1997). Dentre os diterpenos já descritos na literatura, todos pertencem aos esqueletos caurano, labdano e clerodano. (CASCON; GILBERT, 2000).

1.3 A ESPÉCIE *Copaifera langsdorffii* Desf.

Copaifera langsdorffii Desf. (Leguminosae-Caesalpinioideae) (Fig. 1) possui os seguintes sinônimos botânicos: *Copaifera nitida* Mart. ex Hayne e *Copaifera sellowii* Hayne (TROPICOS, 2010), conhecidas popularmente como “copaíba”.

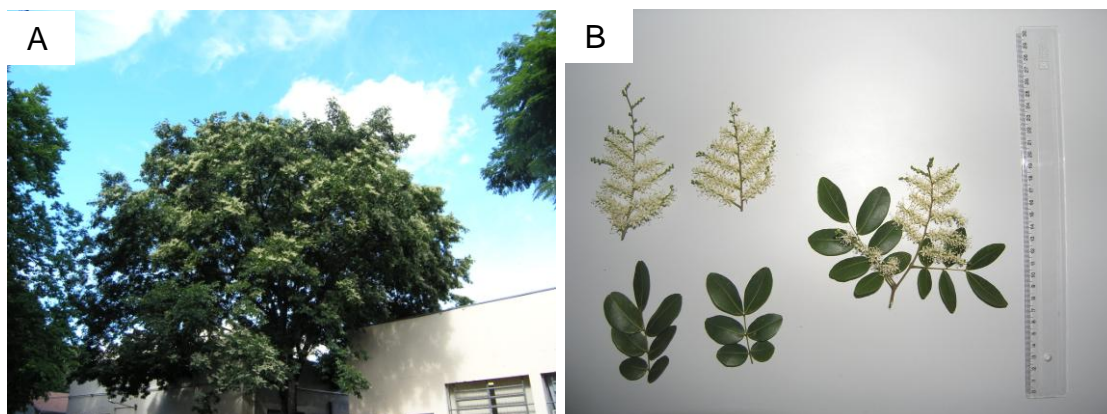


Figura 1 – A: *Copaifera langsdorffii* medindo cerca de 7 m de altura; B: Folhas e sementes de *Copaifera langsdorffii*.

As árvores de *C. langsdorffii* são grandes e crescem amplamente nas regiões norte e nordeste do Brasil, especialmente nos estados do Amazonas, Pará e Ceará (PAIVA, *et al.*, 2002). Esta espécie é polinizada no período diurno, com grande participação de *Trigona sp* e *Apis mellifera*. A biologia de suas sementes foi estudada por diversos pesquisadores que abordaram desde sua morfologia e anatomia, passando pela sua conservação e maturação (EIRA, *et al.*, 1992), até a germinação (BARBOSA, *et al.*, 1992). Sua identificação botânica é difícil, sendo realizada, na maioria das vezes, segundo as características das flores (VEIGA JR; PINTO, 2002).

Dos canais secretores localizados em todas as partes da árvore de *C. langsdorffii* pode ser extraído um óleo-resina, através de uma pequena incisão à cerca de um metro de altura de seu tronco (VEIGA JR; PINTO, 2002). Este óleo é considerado, na sua forma “*in natura*”, um valioso remédio na medicina popular, sendo utilizado como anti-inflamatório e agente anti-infeccioso no tratamento de varias condições tais como: dores de garganta, infecções urinária e pulmonar (PAIVA, *et al.*, 1998).

Estudos fitoquímicos sobre o óleo-resina desta espécie revelaram a presença de óleos essenciais contendo principalmente sesquiterpenos como β -cariofileno, óxido cariofileno, β -elemeno, curcumeno, entre outros (BRAGA, *et al.*, 1998) e uma mistura de diterpenos, sendo composta por cerca de 70 % de ácido caurenóico e seus derivados (GRAMOSA *et al.*, 1996). Recentemente, no óleo essencial das folhas de *C. langsdorffii* foram identificados, por cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massas CG/EM, 12 constituintes voláteis: α -cubebeno, α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno, α -bergamoteno, α -humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, δ -cadineno, germacreno B, globulol e α -cadinol (DE SOUSA, 2011). Muitos deles também presentes no óleo-resina e frações voláteis deste óleo. Sesquiterpeno e diterpenos foram isolados do óleo-resina (Fig. 2), dentre eles o ácido copálico, que em trabalho desenvolvido por Souza e cols. (2011) apresentou potencial antimicrobiano, demonstrando ser o mais ativo contra bactérias cariogênicas.

Segundo Paiva, *et al.*, (2004a e 2004b) estudos sobre as atividades biológicas em animais com o óleo de copaíba apresentaram atividades como efeito protetor de colite aguda e de danos do intestino.

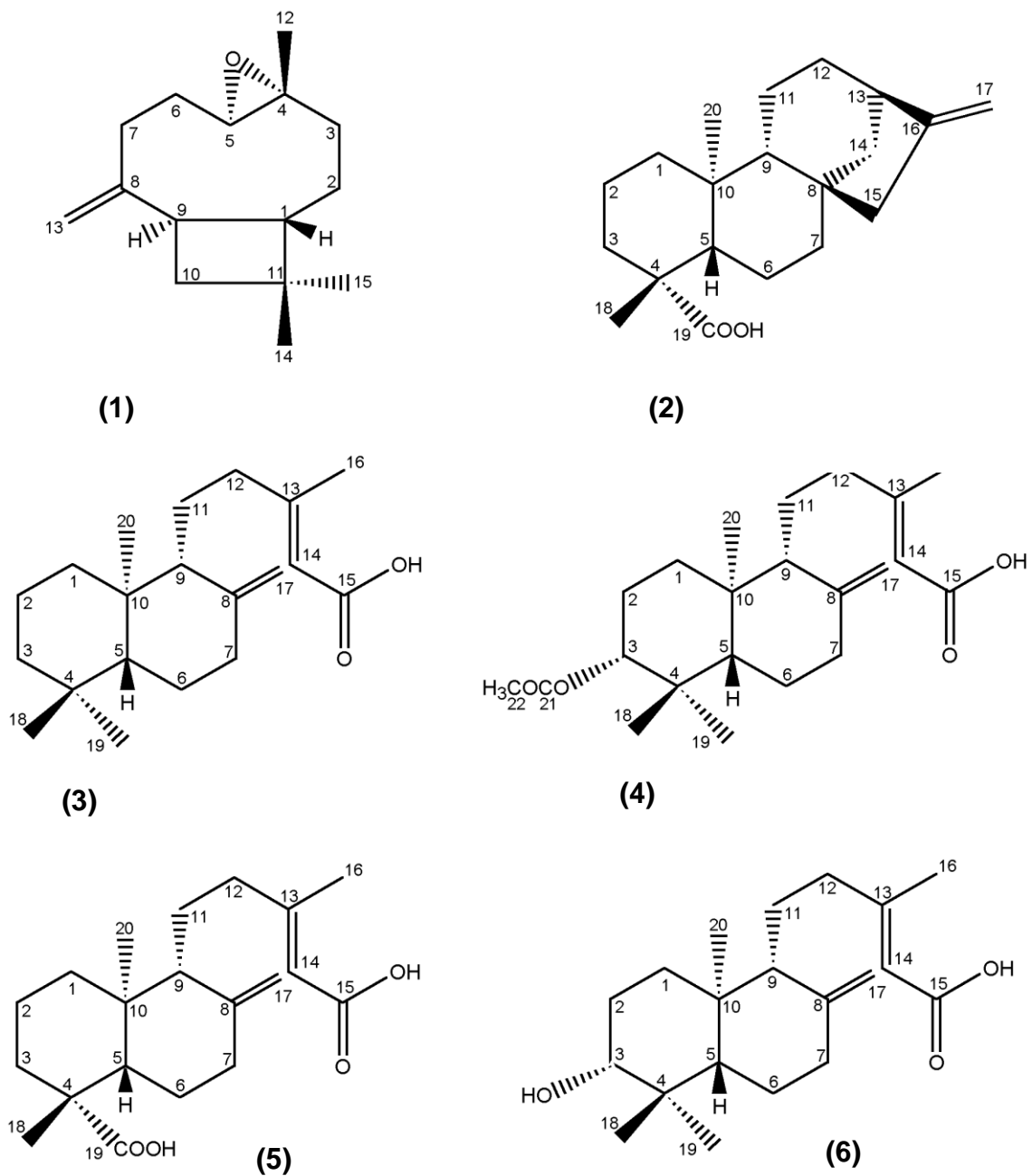
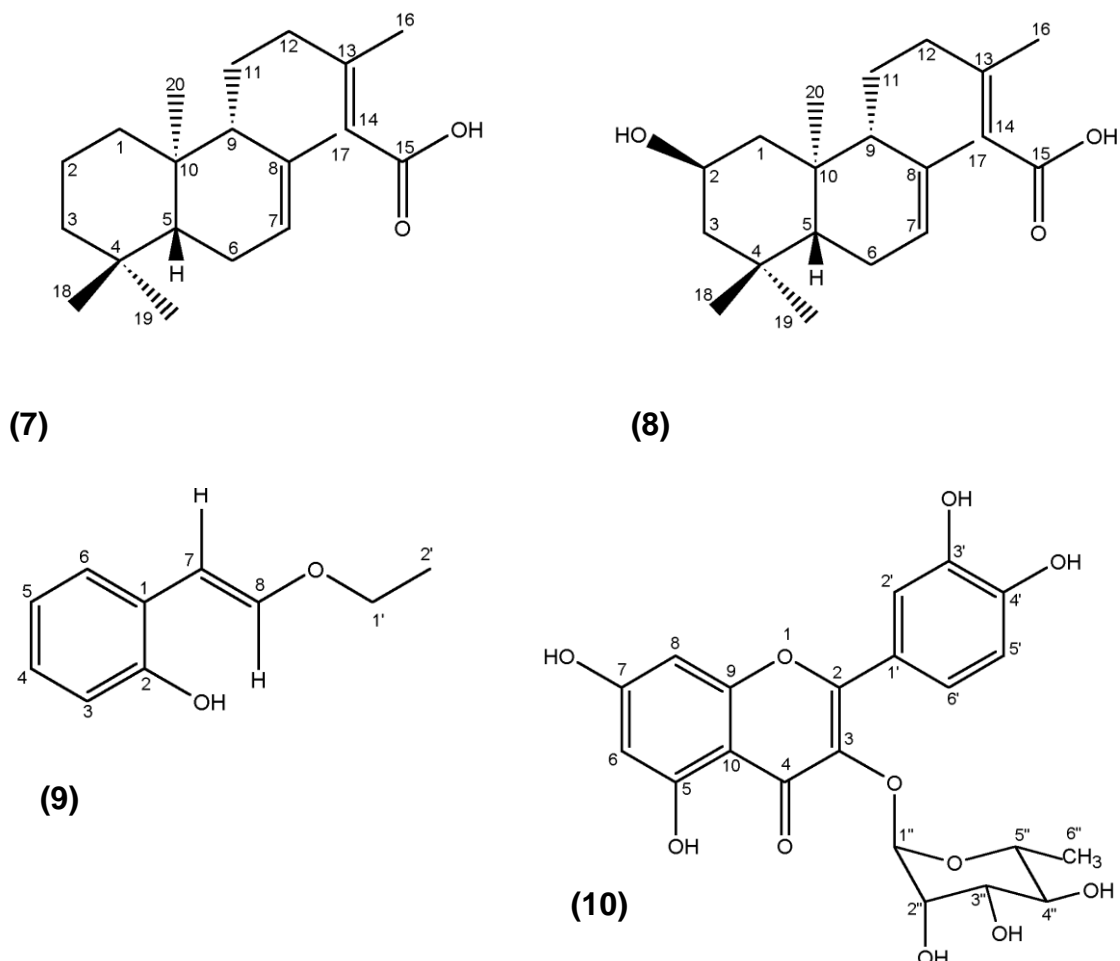


Figura 2 – Sesquiterpeno e diterpenos isolados do óleo-resina de *C. langsdorffii*: óxido de cariofileno (1), ácido caurenóico (2), ácido copálico (3),

ácido 3-acetoxi-copálico (4), ácido agático (5), ácido 3-hidroxi-copálico (6). Adaptado de De Sousa (2011).

Dos extratos dos frutos e das flores de *C. langsdorffii* foram isolados os diterpenos: ácido caurenóico, ácido *ent*-labda-7,13-dien-15-óico, ácido 2-



hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-óico, e os compostos: éter 2-hidróxifenilvinil

Figura 3 – Compostos isolados dos extratos das flores e dos frutos de *C. langsdorffii*: ácido *ent*-labda-7,13-dien-15-óico (7), ácido 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-óico (8), 2-hidróxifenilvinil etílico (9), quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosídeo (10). Adaptado de De Sousa (2011).

etílico (obtido do extrato dos frutos), e 3-O- α -ramnopiranosil-quercetina (obtido do extrato das flores) (Fig. 3).

1.4 CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE

1.4.1 Conceito, funcionamento, vantagens e desvantagens

Cromatografia contracorrente (CCC) é uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido, na qual a fase estacionária líquida é retida no aparelho sem a utilização de suporte sólido e a fase móvel passa através desta (BERTHOD, 1991). O princípio da separação da amostra envolve a partição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis, sendo a proporção relativa de soluto que passa para cada fase determinada pelo seu respectivo coeficiente de partição (K) (MARSTON & HOSTETTMANN, 2006). Segundo Winterhalter (2007) CCC é uma versão automatizada da extração líquido-líquido, comparável a repetidas partições do analito entre duas fases líquidas imiscíveis por agitação contínua em funil de separação.

O modelo moderno de cromatografia contracorrente iniciou-se com os trabalhos de Yoichiro Ito na década de 1970 (PAULI *et al.*, 2008) e a técnica se evoluiu rapidamente. Os modelos de aparelhos de CCC operam com base nos princípios: hidrostático ou hidrodinâmico. Os primeiros aparelhos desenvolvidos baseavam-se em princípios hidrostáticos, utilizando um único eixo de rotação e de forma que a coluna estivesse perpendicular à força gravitacional para retenção da fase estacionária, promovendo campo de força centrífuga constante ao longo de toda a coluna. O sistema hidrodinâmico utiliza dois eixos de rotação, sendo a coluna um longo tubo enovelado que gira em dois eixos, mimetizando o movimento planetário, promovendo campo de força centrífuga variável ao longo da coluna. E em consequência deste fenômeno, obtêm-se zonas de mistura e de separação das fases ao longo de toda a coluna, obtendo-se um número superior de partições como, por exemplo, nos aparelhos de HSCCC – “*High-speedy counter-current chromatography*” (ITO, 1991; PAULI *et al.*, 2008).

Dentre algumas vantagens que a CCC possui quando comparada aos métodos de cromatografia sólido-líquido podem ser citados (COSTA, 2009; MARSTON & HOSTETTMANN, 2006; PAULI *et al.*, 2008):

a) Versatilidade: quantidade e ampla faixa de polaridade da amostra, sistemas de solventes compostos por inúmeros solventes em inúmeras

proporções e possibilidade de intercambiar a fase móvel e estacionária (eluição em modo normal ou reverso);

b) Não adsorção da amostra, resultando em recuperação de toda a amostra injetada e principalmente com mínima possibilidade de modificação química da amostra;

c) Eficiência na separação. Ainda que o número de pratos teóricos não alcance os obtidos com CLAE, a relação quantidade de fase estacionária x fase móvel em uma coluna de CCC compensam;

d) Rapidez: separações podem ser feitas em poucas horas;

e) Economia: é necessário somente investimento inicial da compra do equipamento, sem necessidade de adquirir colunas caras. Os sistemas de solventes utilizados nas separações são solventes comuns e, em sua maioria, usam água. Além disso, os solventes são utilizados em muito menor quantidade quando comparados a técnicas clássicas de cromatografia.

f) Previsibilidade e reprodutibilidade: a retenção das substâncias é determinada pelo coeficiente de partição.

No entanto, alguns problemas são comuns com relação ao uso da CCC como a formação de emulsões no interior da coluna, especialmente na separação de misturas complexas como extratos de produtos naturais. Como outra desvantagem, pode-se citar a dificuldade na concentração das amostras eluídas em fase móvel aquosa, quando for o caso, mas o que também não difere nesse sentido da cromatografia de alta eficiência preparativa em fase reversa.

1.4.2 Escolha do sistema de solventes

O sistema de solventes constitui um sistema bifásico que será utilizado como a fase móvel e a fase estacionária na CCC. A escolha de um sistema de solventes apropriado para a amostra a ser separada é o passo mais importante na CCC e, evidentemente, o sucesso da separação depende dessa escolha. Esta etapa pode representar até 90 % do tempo gasto em um experimento realizado em CCC (PAULI *et al.*, 2008).

Dados da literatura sugerem algumas alternativas para se iniciar a escolha do sistema de solventes apropriado à amostra a ser utilizada. Dentre

elas podem ser citadas: a busca na literatura por famílias de sistemas de solventes, seguida de otimização da proporção dos solventes (OKA *et al.*, 1991; PAULI *et al.*, 2008); busca na literatura por artigos que relatem o isolamento de substâncias similares por CCC; a consulta de tabelas de sistemas de solventes apropriadas para separação de determinadas classes de compostos (ITO, 2005; SEGER *et al.*, 2006); a utilização de diagramas ternários que indicam a composição exata das fases estacionária e móvel e permitem o preparo independente de cada uma (FOCAULT, 1994); e a utilização de tabelas do 'melhor solvente', onde primeiro deve ser escolhido um solvente no qual a sua amostra é totalmente solúvel e então este será repartido entre outros dois solventes imiscíveis entre si e miscíveis no 'melhor solvente' (FOCAULT, 1994; FOCAULT & CHEVOLOT, 1998). Alternativa pouco descrita na literatura para escolha do sistema de solventes se fundamenta na solubilidade da amostra e na imiscibilidade dos solventes. Os solventes em que a amostra seja mais solúvel devem estar preferencialmente um em cada fase do sistema bifásico e os solventes que não solubilizam a amostra geralmente são adicionados ou como agentes de seletividade das fases do sistema ou como agentes que proporcionarão imiscibilidade ao sistema, caso os solventes que melhor solubilizam a amostra sejam miscíveis. Os agentes de seletividade têm suas proporções modificadas para "empurrar" ou "puxar" a amostra ou compostos de interesse de uma fase para outra dependendo do modo (normal ou reverso) de separação desejado (BROWN, 2010). Na separação de extratos de produtos naturais, esta concepção pode ser uma excelente alternativa, pois o sistema de solventes será obtido levando em conta as particularidades da amostra (solubilidade, presença de compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos, presença de agentes emulsificantes, dentre outras) e objetivando a separação dos compostos de interesse.

O sistema de solventes adequado deve satisfazer algumas condições básicas (COSTA, 2009; MARSTON & HOSTETTMANN, 2006):

- a. O sistema deve ser preferencialmente bifásico, podendo em alguns casos ser trifásico;
- b. A amostra deve ser estável e solúvel no sistema;
- c. O tempo de separação das fases após agitação (tempo de decantação) deve ser inferior a 30 s. Esse tempo geralmente tem estreita

relação com a retenção da fase estacionária, melhorando a retenção quanto menor for o tempo de decantação;

d. O coeficiente de partição (K) das substâncias deve estar na faixa de $0,5 < K < 2,0$ e o fator de separação ($\alpha = K_2/K_1$, $K_2 > K_1$) entre duas substâncias deve ser superior a 1,5 para garantir uma separação eficiente (ITO, 2005);

e. Quanto mais próximos da proporção 1:1 forem os volumes da fase superior e inferior do sistema de solventes, menor é o desperdício de solvente.

1.5 DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE COMPRIMIDOS A PARTIR DE EXTRATOS VEGETAIS

Considerando-se as diferentes formas farmacêuticas líquidas, sólidas e semi-sólidas dos fitoterápicos, destaca-se o interesse da indústria farmacêutica pelos extratos vegetais secos por apresentarem maior estabilidade, diminuindo a infestação e crescimento microbiológico, bem como as degradações físicas e químicas, além da facilidade de manuseio, transporte e armazenamento (ROCHA, *et al.*, 2010; SONAGLIO *et al.*, 2000). Dentre os principais métodos para a obtenção de extratos secos encontram-se a liofilização, a secagem em leitos fluidizados e a secagem por nebulização. Devido ao alto custo da primeira é recomendado verificar a possibilidade de uso das duas últimas. Modificando-se algumas características do processo de secagem é possível alterar e controlar as seguintes propriedades do pó produzido: aparência, tamanho das partículas, distribuição do tamanho, densidade aparente, densidade da partícula, porosidade, fluidez, estabilidade, dispersão, friabilidade, retenção de atividade, aroma e sabor (MASTERS, 1985). É possível alterar também a solubilidade de alguns fármacos pelo uso de adjuvantes (LEUNER e DRESSMAN, 2000).

No processo de secagem dos líquidos e suspensões dos extratos, o solvente do material é removido e o material seco é produzido ou como pó ou como uma massa seca friável, dependendo do método usado. Dentre todos os tipos de equipamentos para secagem, somente alguns poucos admitem a alimentação direta de líquidos e a descarga direta do pó. A escolha mais comum dentre estes é o "spray-dryer" (MASTERS, 1985) que tem como

vantagens ser altamente versátil e produtivo. Extratos vegetais secos por nebulização têm sido utilizados como produtos finais e intermediários na obtenção de granulados, cápsulas, comprimidos, pomadas entre outros. A técnica de secagem por aspersão “*Spray-Drying*” tem sido bastante empregada com o intuito de se obterem produtos intermediários com maior concentração de constituintes químicos e com melhores características tecnológicas. Os produtos apresentam vantagens relacionadas com a homogeneidade de distribuição dos constituintes da preparação e maior estabilidade física (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

Além disso, a otimização dos parâmetros de secagem como temperaturas de entrada e de saída e velocidade de fluxo de alimentação, concentração e tipo de adjuvante tecnológico, bem como os teores de sólidos do extrato fluido a nebulizar são fatores indispensáveis para obtenção de extratos secos com melhores características físico-químicas e aumento do rendimento da operação (PAULA *et al.*, 1998). E o uso de adjuvantes tecnológicos influencia de maneira decisiva no aumento do rendimento do processo de secagem (MASTERS, 1985).

As formas farmacêuticas sólidas orais são amplamente utilizadas dentro da categoria de medicamentos fitoterápicos, sendo a maior parte, administrada sob a forma de comprimidos. Estes apresentam vantagens em relação às formas farmacêuticas líquidas com relação a estabilidade química, física e microbiológica e podem ser produzidos em larga escala por processos bem estabelecidos e robustos. Além disso, são leves, compactos, apresentam maior precisão da dose e são bem aceitos pela população.

Os comprimidos podem ser produzidos por compressão direta, que envolve apenas três estágios: a pesagem dos pós que compõem a formulação, a mistura destes e a compressão (PRISTA *et al.*, 1995), ou passando por um tratamento prévio que consiste no preparo de grânulos ou granulados, que são aglomerados de pó ou partículas finas na forma de grãos ou grânulos de forma irregular e com aspecto homogêneo que apresentam dentre outras vantagens melhores características de fluxo e compactação (AULTON, 2005). E de acordo com os passos tecnológicos, os processos de granulação podem ser didaticamente divididos em granulação por via seca e granulação por via úmida (COUTO, *et al.*, 2000; LACHMAN *et al.*, 1970) As etapas envolvidas na

elaboração dos comprimidos podem ser resumidas didaticamente como descritas na Tabela 1.

O método de compressão direta apresenta algumas vantagens importantes como baixo custo de produção, processo a seco envolvendo menos etapas, menos energia e tempo além da obtenção de comprimidos com baixo tempo de desintegração (SÁ BARRETO & CUNHA-FILHO, 2009).

Tabela 1 – Etapas comumente requeridas em várias técnicas de granulação e compressão direta

Etapas do processo	Úmida	Seca	Direta
Matéria prima	X	X	X
Pesagem	X	X	X
Mistura	X	X	X
Compressão		X	
Massa úmida	X		
Triturar/Tamisar	X		
Secagem	X		
Tamisação	X	X	
Mistura	X	X	
Compressão	X	X	X

Tabela adaptada de Lachman e cols. (1970).

No entanto, estima-se que menos de 20% dos materiais farmacêuticos são capazes de serem submetidos a um processo de compressão direta na forma como são comercializados, devido a propriedades de fluxo, coesão ou lubrificação insatisfatórias (GOHEL & JOGANI, 2005). Extratos de plantas medicinais secos por “*spray drying*” de extratos de plantas medicinais são muito finos, leves e de baixa fluidez e compressibilidade, além da alta higroscopicidade. A granulação é a técnica mais frequentemente usada para melhorar as propriedades tecnológicas dos extratos vegetais secos por “*spray drying*”, no entanto, por apresentarem elevada higroscopicidade, o processo por via úmida com a adição de soluções aquosas podem formar uma massa pegajosa, o que inviabiliza a granulação (SOARES, *et al.*, 2005b; MININA, *et al.*, 1996).

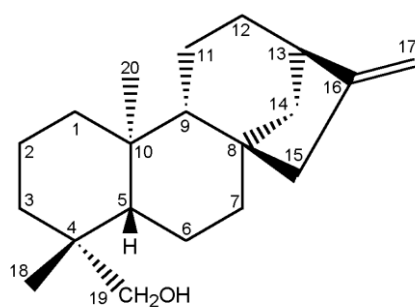
Para controlar a qualidade dos grânulos, são necessárias análises físico-químicas e/ou farmacotécnicas como tamanho, forma, umidade, características de fluxo, dentre outras (PRISTA *et al*, 2002). De forma semelhante, análises físico-químicas devem ser realizadas como forma de avaliar a qualidade dos comprimidos produzidos tais como tamanho, forma, peso médio, dureza, friabilidade, desintegração e dissolução (FARM. BRAS. 5 Ed., 2010; Lachman *et al.*, 1970).

1.6 PERSPECTIVAS A PARTIR DO EXTRATO HIDROALCÓLICO DAS FOLHAS DE *Copaifera langsdorffii* (Desf.)

Os trabalhos realizados sobre *C. langsdorffii* estão, em sua maioria, relacionados com o óleo que é exsudado do tronco destas árvores ou com a fração volátil obtida desse produto. Apesar de existirem inúmeros trabalhos publicados abordando as utilizações e aplicações do óleo-resina e de seus voláteis, estudos sobre a composição química e atividade biológica de extratos das folhas ainda são escassos. No entanto, desde 2007, estudos a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii* têm sido realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Souza (2011) isolou dois flavonóides majoritários a partir do extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii*: canferol-3-O- α -L-raminopiranosídeo e quercetina-3-O- α -L-raminopiranosídes (Fig. 4), que foram utilizados como padrões cromatográficos para o desenvolvimento e validação de método analítico para as espécies de *C. langsdorffii*. Além destes, outros quatro compostos foram obtidos a partir do extrato: ácido caurenóico (Fig. 2), óxido de cariofileno (Fig. 2), ácido 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-óico (Fig. 3), e caurenol (Fig. 4).

(11)



(10) R = OH

(12) R = H

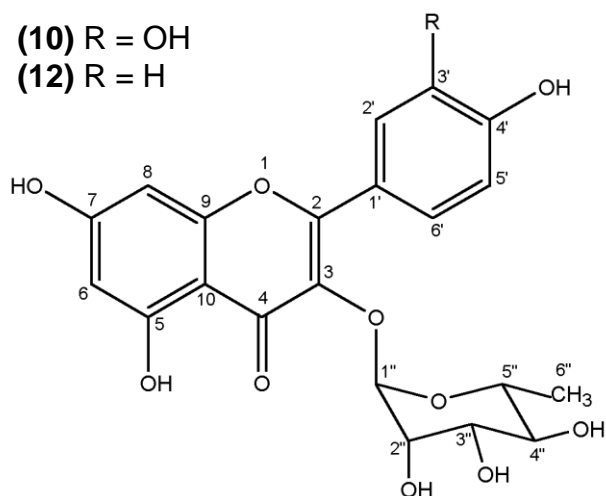


Figura 4 – Compostos isolados a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii*: caurenol (11), quercetina-3-O- α -L-raminopiranosídeo (10) e canferol-3-O- α -L-raminopiranosídeo (12).

Em estudos prévios de atividade biológica realizados por Brancalion (2010), o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii* demonstrou propriedade antilítase em ensaios “*in vivo*” com ratos. Recentemente, foi solicitado o registro de depósito de patente junto ao INPI: PI 04088br, “Processo de obtenção e utilização de extratos, frações e substâncias isoladas de espécies de copaífera no tratamento da litíase urinária em seres humanos e em animais”. Esta patente ainda precisa ser fortalecida com novas informações imprescindíveis tais como: constituintes químicos presentes no extrato ativo, metodologia analítica validada, tecnologia de obtenção da forma farmacêutica, resultados de eficácia pré-clínica para o extrato bruto, frações e substâncias isoladas, bem como os resultados dos ensaios clínicos. Com relação à eficácia,

o protocolo para realização do estudo clínico fase II foi devidamente aprovado pelo comitê de ética para pesquisa com seres humanos e os resultados preliminares obtidos indicam o potencial do extrato hidroalcoólico das folhas da espécie em questão para o tratamento da urolitíase. Todavia, esses ensaios foram realizados com amostras obtidas na universidade e, portanto, serão refeitos com base na legislação vigente, para qual há necessidade de produção dos lotes pilotos em empresa farmacêutica. Neste contexto, é que considero a importância de estudos fitoquímicos para o conhecimento do perfil metabólico desse extrato e o isolamento e identificação de seus principais metabólitos secundários com vistas à obtenção de outros padrões cromatográficos que deverão ser disponibilizados para realização dos ensaios biológicos e/ou bioquímicos pré-clínicos a serem realizados por outros pesquisadores do grupo, bem como para serem utilizados na quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Considerando a produção de um medicamento fitoterápico de qualidade, a matéria prima e o processo de extração devem ser padronizados com as condições otimizadas para a obtenção de um extrato que apresente maior rendimento. E tendo em vista as vantagens da secagem deste extrato utilizando técnicas como aspersão ou “*spray drying*” para o preparo de intermediários de diferentes formas farmacêuticas, bem como a aplicabilidade da técnica em processar diferentes tipos de matéria prima tanto sensíveis quanto resistentes ao aquecimento, é de grande importância a otimização desse processo para produção de um intermediário com características adequadas para o desenvolvimento de comprimidos de extrato de *C. langsdorffii*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a composição química das folhas de *C. langsdorffii*, visando enriquecer e contribuir para o conhecimento da química desse gênero, e realizar estudo da extração e secagem do extrato hidroalcoólico para produção de intermediários farmacêuticos na forma sólida e formulação de comprimidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o perfil químico (impressão digital) do extrato hidroalcoólico e frações de *C. langsdorffii* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo reverso.
- Submeter o extrato a diferentes técnicas cromatográficas visando o isolamento de compostos majoritários e minoritários, com base no perfil cromatográfico, e identificar suas estruturas químicas com o auxílio de técnicas espectroscópicas.
- Realizar estudo do processo de extração objetivando maior rendimento do extrato das folhas de *C. langsdorffii* para produção de intermediários farmacêuticos.
- Realizar estudo do processo de secagem do extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* em “*spray dryer*” para produção de intermediário farmacêutico na forma de pó com baixo teor de excipientes.
- Produzir comprimidos contendo alto teor de extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* avaliando sua qualidade com relação às variáveis físicas (peso médio, tamanho, friabilidade, dureza e desintegração).

3. CONCLUSÕES

- O perfil cromatográfico do extrato das folhas de *C. langsdorffii* e frações, bem como o rendimento das frações demonstraram que o extrato é majoritariamente constituído de substâncias polares;

- Os compostos **1** e **2** identificados como quercetina-3-O- α -L-raminopiranosídeo e canferol-3-O- α -L-raminopiranosídeo, respectivamente, foram isolados da fração em AcOEt em coluna clássica de sílica gel, seguido de purificação em CLAE-PREP e obtidos por separação em HSCCC com rendimento superior;

- O isolamento dos compostos **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9** e **10** foi realizado a partir da fração aquosa por cromatografia em coluna utilizando gel de sephadex LH-20 e HSCCC, seguido de purificação em CLAE. Os compostos **4**, **6**, **9** e **10** foram identificados e pertencem à classe dos ácidos galoilquínicos, correspondendo ao ácido 6',4''-dimetóxi-3,4-di-O-galoilquínico; ácido 6'''-metóxi-3,4,5-tri-O-galoilquínico; ácido 4',4'''-dimetoxi-3,4,5-tri-O-galoilquínico; e ácido 4-metóxi-3-O-galoilquínico, respectivamente. Esses dados contribuem de maneira significativa para o conhecimento do perfil químico e potencial biológico da espécie;

- O estudo da extração das folhas de *C. langsdorffii* revelou três métodos com maiores rendimentos: a) maceração exaustiva utilizando etanol:água 1:1 (15 mL – 3x) com 2g de droga vegetal; b) maceração exaustiva utilizando etanol:água 9:1 (15 mL – 3x) com 2g de droga vegetal; c) extração simples utilizando etanol:água 7:3 (45 mL) com 3g de droga vegetal, sendo este último o método de escolha para produção do extrato avaliado no estudo de secagem;

- Os experimentos do estudo da secagem do extrato das folhas de *C. langsdorffii* não demonstraram diferenças estatisticamente significativas. As partículas obtidas tiveram tamanho médio entre 104 μ m a 159 μ m e

propriedades de fluxo ruins, inviabilizando a utilização de compressão direta para produção de comprimidos;

- O experimento de secagem que continha maior teor de extrato seco (75%), temperatura inferior (60°C) e 25% de adjuvantes Maltodextrina:Aerosil (1:1) foi reproduzido em maior escala com adição prévia à secagem de 2% de polivinil pirrolidona para granulação por via úmida, obtendo-se granulados com tamanho de partículas entre 500 µm e 617 µm, com excelentes características físicas e propriedades de fluxo;

- Comprimidos de 550 mg contendo grânulos do extrato seco por “*spray drying*”(GESD), produzidos em máquina compressora apresentaram propriedades físicas inadequadas (dureza > 130N e tempos de desintegração acima de 90 min). Os comprimidos de 600 mg produzidos a partir das misturas do GESD ao GAL contendo ao final quantidades de extrato 60,2% ou 65,7%, embora sem diferenças estatisticamente significativas entre si com relação às variáveis físicas, tiveram vantagens farmacotécnicas (dureza e friabilidade aceitáveis e tempo de desintegração próximos aos valores recomendados);

- Adequações simples no processamento dos comprimidos podem ser realizadas como a redução na força de compressão, para produção de comprimidos de qualidade e com teor de extrato de *C. langsdorffii* adequado à utilização nos ensaios clínicos futuros. Destaca-se, ainda, a importância de se realizar a etapa de revestimento objetivando melhorar os aspectos organolépticos e estéticos dos comprimidos.

4. REFERÊNCIAS

AMERI, M.; MAA, Y-F. Spray drying of biopharmaceuticals: stability and process considerations. **Dryng Technology**, v 24, p. 736-738, 2003.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr., L. V. Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. 6 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1995.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 677p., 2005.

ANDERSEN, O. M., MARKHAM, K. R., Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Flórida: Taylor & Francis, 1212 p., 2006.

ANDRADE Jr, M. A.; FERRAZ, I. D. K.; VEIGA Jr, V. F. **51º Congresso Nacional de Botânica da Sociedade Botânica do Brasil**, Brasília, Brasil, 2000.

BARATTO, M. C.; TATTINI, M.; GALARDI, C.; PINELLI, P.; ROMANI, A.; VISIOLI, F.; BASOSI, R.; POGNI, R.. Antioxidant Activity of Galloyl Quinic Derivatives Isolated from *P. lentiscus* Leaves. **Free Radical Research**, v. 37(4)405–412, 2003.

BARBOSA, J. M.; AGUIAR, I. B.; SANTOS, S. R. G. **2º Congresso Nacional de Essências Nativas**, Brasília, Brasil, 1992.

BERLINCK, R. G. S. Chromatographic Approach to Polar Compounds: Isolation Of The Hydrophylic Constituents Of The Marine Sponge Crambe. **Química Nova**, Brasil, v. 17, p. 167-171, 1994.

BERTOLUCCI S. K. V.; PEREIRA A.B. D.; PINTO J. E. B P.; RIBEIRO J. A. A.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Development and Validation of an RP-HPLC Method for Quantification of Cinnamic Acid Derivatives and Kaurane-Type Diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta Medica**, v. 75, p. 280-285, 2009.

BERTHOD, A. Countercurrent Chromatography or Centrifugal Partition Chromatography. **Cheminform**, v. 26, 1991.

BOUCHET, N.; LEVESQUE, J.; BLOND, A.; BODO, B.; POUSSET, J. L. 1,3-di-O-galloylquinic acid from *Guiera senegalensis*. **Phytochemistry**, v. 42, p 189-190, 1996.

BRAGA, W. F.; REZENDE C. M.; ANTUNES, A. C.; PINTO, A. C. Terpenoids from *Copaíba cearensis* of *Copaifera* species. **Phytochemistry**, v. 49, p. 263-264, 1998.

BRANCALION, A. P. S. Investigações in vitro e in vivo das propriedades antilitiásicas dos extratos das folhas e ramos de *Copaifera langsdorffii*. 120p. 2010. Dissertação (Mestrado – Área de concentração em Produtos Naturais e Sintéticos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, p. 773-778, 2000.

CHANDIRA, M.; JAYAKAR, B. Formulation and evaluation of herbal tablets containing *Ipomoea digitata* Linn extract. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 3 (1), p. 101-110, 2010.

CLIFFORD, M. N.; STOUPI, S.; KUHNERT, N. Profiling and characterization by LC-MS of galloylquinic acids of green tea, tara tannin, and tannic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, 2797-2807, 2007

CORSE, J.; LUNDIN, R. E.; SONDERMAYER, E.; WAISS JR., A.C. Conformation analyses of D-(-)-quinic acid and some of its derivatives by nuclear magnetic resonance. **Phytochemistry**, v. 5, p. 767-776, 1996.

COSTA, F. N.; ***Sparattosperma leucanthum***: Anatomia foliar e isolamento de flavonóides por cromatografia contracorrente. 2009. 163p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração em Química de Produtos Naturais). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

COUTO, A. G.; GONZÁLEZ, O. G.; PETROVICK, P. R. Granulação. **Caderno de Farmácia**, v. 16 (1), p. 13-20, 2000.

CURY, B. S. F.; SILVA JR. N. P.; CASTRO, A. D.; Influências das propriedades de granulados de nas características físicas de comprimidos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v 29 (1), p 37-44, 2008.

DE SOUSA, J. P. B. ***Copaifera langsdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal**. 2011. 203p. Tese (Doutorado – Área de concentração em Produtos Naturais e Sintéticos). Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto.

DIAZ, L.; SOUTO, C.; CONCEIRO, A.; GOMEZ-AMOZY, L. M.; MARTINEZ-PACHECO, R. Evaluation of Eudragit E as excipient in tablets of dry plant extract. **STP Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 105-109, 1986.

DURHAM, D. G. Isolation by Ion-Exchange methods. In: ISOLATION SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Natural Products Isolation**. 2a Edição. Totowa,, New Jersey: Humana Press Inc., p. 159-184, 2006.

EIRA, M. T. S.; SALOMÃO, A. N.; CUNHA, R.; MELLO, C. M. C.; TANAKA, D. M. **2º Congresso Nacional de Essências Nativas**, Brasília, Brasil, 1992.

BRASIL. FARMACOPEIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 546p., 2010.

FOCAULT, A. P. **Centrifugal Partition Chromatography**, Chromatographic Science Series, v. 68, Marcel Dekker, New York, 1994.

FOCAULT, A. P.; CHEVOLOT, L. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. **Journal of Chromatography A**, v. 808, p. 3-22, 1998.

GOBBO-NETO, L. ; Santos, M. D.; KANASHIRO, A.; ALMEIDA, M. C.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; Lopes, J. L.; Souza, G. E.; Lopes, N. P. Evaluation of the Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Di- -glucosylflavones from (Asteraceae). **Planta Medica** (Stuttgart), v. 71, p. 3-6, 2005.

GOBBO-NETO, L. ; SANTOS, M. D. ; ALBARELLA, L ; ZOLLO, F ; PIZZA, C ; LOPES, N. P. Glycosides, caffeoylquinic acids and flavonoids from the polar extract of leaves of *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 36, p. 473-475, 2008.

GOHEL, M. C., JOGANI, P. D., A review of co-processed directly compressible excipients. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 8(1), p. 76-93, 2005.

GRAMOSA, N.V., BRIGIDO, C.L., SILVEIRA, E.R. **Contribuição ao conhecimento químico do óleo de Copaíba do Ceará**. VII Encontro de Químicos e Farmacêuticos Industriais do Norte-Nordeste, Fortaleza, Brasil, 1996.

HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEIJER, R. J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: A chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, v. 34(1), p. 3-16, 1993.

HE ZHYONG; XIA, W.; LIU, Q.; CHEN, J. Identification of a new phenolic compound from Chinese olive (*Canarium album* L) fruit. **Eur. Food. Res. Technol.**, v. 288, p. 339-343, 2009.

HOU., A. J.; PENG, L. Y.; LIU, Y. Z.; LIN, A. W., SUN, H. D. Gallotannins and related polyphenols from *Pistacia weinmannifolia*. **Planta Medica**, v. 66, p. 624-626, 2000.

INDEX KEWENSIS, suppl. XX; Clarendon Press: Oxford, 1996.

ISHIMARU, K.; NONAKA, G. I.; NISHIOKA, I. Gallic acid esters of protoquercitol, quinic acid and (-)-shikimic acid from *Quercus mongolica* and *Q. myrsinaefolia*. **Phytochemistry**, v. 26(5), p. 1501-1504, 1986.

ITO, Y. Recent advances in counter-current chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 538, p. 3-25, 1991.

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for highspeed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, p. 145-168, 2005.

JUDD, S. W.; CAMPBELL, S. C.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. S. **Plant Systematics, A Phylogenetic Approach**, Ed Sinauer, Sunderland, p. 283, 1999.

KUCINSKAITE, A.; SAWICKI, W.; BRIEDIS, V.; SZNITOWSKA. Fast disintegration tablets containing *Rhodiola rosea* L. extract. **Acta Poloneae Pharmaceutica – Drug research**, v. 64(1), p. 63-67, 2007

BROWN, L. **Procedures to operate the AECS-QuikPrep™ CCC Method Development Strategies for Polar & Mid Polar Compounds of interest, by an Quattro CCC™ Mk 5 & Mk 6**. UK, 12 p., 2010.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **The theory of Industrial pharmacy**. Nova York: Ed Lea & Febiger, 2a Ed., 811p., 1970.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal Biopharmaceutical**, v. 50, p. 47-60, 2000.

LEITÃO, G. G.; EL-ADJI, S. S.; MELO, W. A. L.; LEITÃO, S. G.; BROWN, L. Separation of Free and Glycosylated Flavonoids from *Siparuna guianensis* by gradient and isocratic CCC. **Journal of Liquid Chromatography & related Technologies**, v. 28, p. 2041-2051, 2005.

LIMA, L. R. Tecnologia de obtenção de comprimidos à base de resina/extrato de Jalapa do Brasil – *Operculina macrocarpa* L. Urban – e validação de metodologia analítica. 71p. 2006. Dissertação (Mestrado–Ciências Farmacêuticas, Universidade de Federal do Pernambuco, Recife.

MARTINELLO, T. Desenvolvimento de comprimidos de paracetamol de 500 mg fabricados por compressão direta utilizando planejamento estatístico de mistura 153p. 2005. Dissertação (Mestrado – Área de concentração em Produção e controle Farmacêuticos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARTINS, R. M. Desenvolvimento de dispersões sólidas microparticuladas contendo carbamazepina por *spray congeling*. 166p. 2010. Dissertação (Mestrado – Área de concentração em Medicamentos e Cosméticos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Rbeirão Preto, Ribeirão Preto.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**. 4th ed, Longman and Wiley & Sons, 1985.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 181-194, 2006.

MACÍAS, F. A.; SIMONET, A. M., GALINDO, J. C. G.; CATELLANO, D. Bioactive phenolics and polar compounds from *Melilotus messanensis*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 35-46, 1999.

MININA, S. A.; SHIGAROVA, L. V.; CHIZHIKOV, EFIMOVA, L. S. Optimization of the process of dry ginseng extract granulation. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 30(10), p. 633-639, 1996.

MORIN, P. H.; RICHARD, H.; CAUDE, M. **Journal of Chromatography**, 464, 125, 1989.

OKA, F.; OKA, H.; ITO, Y. Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 538, p. 99-105, 1991.

PAIVA, L. A., RAO, V. S. N., GRAMOSA, N. V., SILVEIRA, E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oil-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.62 (1), p. 73-78, 1998.

PAIVA, L. A., DE ALENCAR CUNHA, K. M., SANTOS, F. A., GRAMOSA, N. V., SILVEIRA, E.R., RAO, V.S.N. Investigation on the wound healing activity of oleoresin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**. v. 16 (8), p. 737-739, 2002.

PAIVA, L. A.; GURGEL, L. A.; De SOUSA, E. T.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleoresin against acetic acid induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93 p. 51-56, 2004a.

PAIVA, L. A.; GURGEL, L. A.; CAMPOS, A. R.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleoresin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Science**, v. 75, p.1979-1987, 2004b.

PARKER, W. B.; NISHIZAWA, M.; FISHER, M. H.; YE, N.; LEE, K. H.; CHENG, Y. C. Characterization of a novel inhibitor of human DNA polymerases: 3,4,5-tri-O-galloylquinic acid. **Biochem. Pharmacol**, v. 38, p. 3759-3765, 1989.

PAULA, I.C.; ORTEGA, G.G.; BASSANI, V.L.; PETROVICK, P.R. Development of ointment formulations prepared with *Achyrocline satureioides* spray-dried extracts. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 235-241, 1998.

PAULI, G. F.; PRO, M. S.; FRIESEN, J. B. Countercurrent Separation of Natural Products (review). **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1489-1508, 2008.

PINTO, A. C.; ANTUNES, O. A.; REZENDE, C. M.; CORREIA, C. R. D. **Phytochemistry Analytical**, v. 8 p. 14, 1997.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, vol. 2. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1984.

PLAZIER-VERCAMEN J. A.; BRUWIER C. Evaluation of excipients for direct compression of the extract of *Harpagophytum procumbens*. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 2(17), p. 525–530, 1986.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 6.ed. Lisboa:Edição da Fundação Calouste Gulbenkian, v.1, 786p., 2002.

PRISTA, L. N.; ALVES A. C.; MORGADO R. **Tecnologia Farmacêutica**, v.1. 5a ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. págs. 199-478, 1995.

PURI, R.; WONG, T. C.; PURI, R. K. 1H- and 13C-Nmr Assignments and Structural Determination of a Novel Glycoalkaloid from *Solanum platanifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 57 (5), p. 587-596, 1994.

ROCHA, A. P. T.; CABRAL, S. B.; SILVA, O. S.; ALSINA, O. L. S. Estudo da friabilidade de grânulos de quebra-pedra recobertos em leito de jorro. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 5(2), p. 88-95, 2010.

ROMANI, A.; PINELLI, GLARDI, C.; MULINACCI, N.; TATTINI, M. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical analysis*, v. 13(2), p. 79-86, 2002.

RONGSNIYAM, Y.; TRONGTOKIT, Y.; KOMALAMISRA, N.; SINCHAIPANICH, N.; APIWATHNASORN, C.; MITREJET, A. Formulation of tablets from the crude extract of *Rhinacanthus nasutus* (Thai local plant) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae: a preliminary study *Yupha Rongsriyam*. **Thailand Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v.37, p. 265-271, 2006.

SÁ BARRETO, L. C. L. & CUNHA-FILHO, M. S. S. Excipientes co-processados para compressão direta. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28 (2), p. 304-12 (2009).

SANNOMIYA, M.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; BRITO, A. R.; VILEGAS, W. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 19, p. 2244-2250, 2005

SANTOMASO, A.; LAZZARO, P.; CANU, P. Powder flowability and density ratios: the impact of granules packing. **Chem. Eng, Sci.**, v. 58, p. 2857-75.

SEGER, C. ; EBERHART, K.; STURM, S.; STRASSER, H.; STUPPNER, H. Apolar chromatography on Sephadex LH-20 combined with high-speed counter-current chromatography, high yield strategy for structurally closely related analytes – destruxin derivatives from *Metarhizium anisopliae* as a case of study. **Journl of Chromatography A**. 1117, 67-73, 2006.

SOARES, L. A. L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; PETROVICK, P. R., SCHMIDT, Efeito da força e velocidade de compressão sobre as propriedades de comprimidos contendo alta concentração de extrato seco vegetal. **Acta Farmaceutica Bonaerensis**, v. 22, p. 147-154, 2003.

SOARES, L. A. L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; PETROVICK, P. R., SCHMIDT, P. C. Dry granulation and compression of spray-dried plant extracts. **AAPS Pharmsceutical Science and Technology**, v.6, p. 359-366, 2005a.

SOARES, L. A. L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; PETROVICK, P. R., SCHMIDT, P. C. Optimization of tablets containing a high dose of spray-dried plant extract: a technical note. **AAPS Pharmsceutical Science and Technology**, v.6, p. 359-366, 2005b.

SONAGLIO, D; Ortega, G. G.; Petrovick, P. R.; Bassani, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2007.

SOUZA, A. B. ; MARTINS, C. H. ; SOUZA, M. G.; FURTADO, N. A. ; HELENO, V. C.; DE SOUSA, J. P. ; ROCHA, E. M.; BASTOS, J. K., CUNHA, W. R., VENEZIANI, R. C., AMBROSIO, S. R. Antimicrobial Activity of Terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. Against Cariogenic Bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 215-220, 2011.

STILL, W.C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 43, p. 2923-2925, 1978.

RODRIGUES, P. O., GONÇALVES, T. C.; SILVA, W. B. Influência de sistemas de solventes no processo de extração de *Calliandra officinalis* L. (Asteraceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23 (1), p. 27-31, 2004.

TOLLER, A. B.; SCHMIDT, C. A. Excipientes à base de celulose e lactose para compressão direta. **Disciplinarium Scientia**, v. 6(1), p. 61-80, 2005.

TROPICOS, 2008. Disponível em <<http://www.tropicos.org/>>. Acessos em 10 de março de 2011.

United States Pharmacopeia: USP 30, National Formulary: NF-25. Rockville United States Pharmacopeial Convention, 2007.

VADUGA, A. T.; BATTESTIN, V.; RINZER, J. R. D. Secagem de extratos de erva-mate em secador por atomização. **Cienc. Technol. Aliment.**, v. 23(20, P 184-189, 2003).

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

VAN DEN BERG, M. E. Plantas Medicinais da Amazônia. Contribuição ao seu conhecimento sistemático, **CNPq-MPEG**, Brasília, p.145, 1982.

VEIGA JUNIOR, V.F. e PINTO, A. C. O gênero *copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002

WAGNER, H. & BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: 2a Edição, p. 368, 1996.

WINTERHALTER, P. Application of high-speed counter-current chromatography to the analysis of natural pigments. *Trends in Food Science and Technology*, v. 18, p. 507-513, 2007.