UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento, padronização e avaliação biológica de extratos nebulizados de *Dalbergia ecastaphyllum*

Maira Neto Zampiér

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento, padronização e avaliação biológica de extratos nebulizados de *Dalbergia ecastaphyllum*

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

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Maira Neto Zampiér

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Pereira Oliveira

Ribeirão Preto

2012

“AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE – O AUTOR”

Zampiér, Maira Neto
Desenvolvimento, padronização e avaliação biológica de extratos nebulizados de *Dalbergia ecastaphyllum*. Ribeirão Preto, 2012.
172 p. : il. ; 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP
Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos
Orientador: Oliveira, Wanderley Pereira.

1. secagem. 2. extrato seco. 3. spray drying. 4. *Dalbergia ecastaphyllum*. 5. atividade biológica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maira Neto Zampiér

Desenvolvimento, padronização e avaliação biológica de extratos nebulizados de *Dalbergia ecastaphyllum*

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

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Pereira Oliveira

Aprovada em: ___/___/___

Banca examinadora

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Laboratório de P&D em Processos Farmacêuticos.

“Aos meus queridos pais Mauro e Dalva que sempre incentivam a busca do conhecimento, me estimulando a seguir em frente, a cada dia.”

Agradecimentos

A colaboração entre as pessoas faz uma idéia se tornar realidade.

Quero agradecer a Deus e a todos que contribuíram de forma significativa para a conclusão deste projeto de pesquisa.

Ao Professor Dr. Wanderley Pereira de Oliveira que me aceitou como aluna, auxiliou na escolha do tema deste projeto e ofereceu uma vaga em seu laboratório.

A Dra. Claudia Regina Fernandes de Souza, pela ajuda inestimável. Seus conhecimentos técnicos e organização possibilitaram o bom cumprimento das atividades.

Ao colega Marcelo Martinez pela dedicação e comprometimento com o projeto.

Aos colegas do LAPROFAR: Camila, Daniele, Diego, Fabiana, Lucimara, Maurette, Rodrigo e Tales, pela boa convivência e auxilio em todos estes anos.

Aos docentes da FCFRP/USP, sempre dispostos a contribuir com seus conhecimentos.

Ao Professor Luiz Alberto de Moraes (FFCLRP) e suas alunas Ana Paula e Fernanda, pelos valiosos ensinamentos.

A Juliana Copedde que com muito carinho e paciência me auxiliou a trabalhar com a microbiologia.

A Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) pela disponibilidade de acesso ao laboratório.

Ao Sr. Edvaldo Pacheco (apicultor, João Pessoa–PB), pelo apoio incondicional em todos os momentos que se fizeram necessários.

A empresa Ourofino Agronegócios pela compreensão e abertura para que eu iniciasse o mestrado e conduzisse todas as atividades paralelamente ao meu trabalho na empresa.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP pela oportunidade de realização deste projeto de pesquisa.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq) e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

ZAMPIER, M. N. **Desenvolvimento, padronização e avaliação biológica de extratos nebulizados de *Dalbergia ecastaphyllum***. 2012. 172 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento, padronização e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos secos nebulizados de *Dalbergia ecastaphyllum.* Para que os objetivos propostos fossem alcançados foram desenvolvidas metodologias analíticas capazes de avaliar a qualidade da matéria-prima vegetal durante os processos de transformação (extração de compostos ativos, secagem, produto final, etc).

A solução extrativa foi obtida a partir das folhas de *D. ecastaphyllum* empregando-se a extração por maceração dinâmica onde se avaliou fatores como: proporção planta:solvente, tempo e temperatura de extração através de um planejamento composto central (PCC). A solução extrativa otimizada foi avaliada quanto a presença de metabólitos secundários, atividade antioxidante/ antimicrobiana e foi submetida à secagem por nebulização onde foram investigados parâmetros de secagem e adjuvantes tecnológicos sobre o desempenho do equipamento e nas características morfológicas, físico-químicas e farmacológicas do produto. Os extratos secos foram submetidos a um estudo de estabilidade; sendo também utilizados para o desenvolvimento de formulações semi-sólidas cuja estabilidade foi avaliada em estudo acelerado.

Pretende-se que os resultados advindos desse trabalho possam servir de base para a padronização de extratos de outras plantas medicinais com interesse terapêutico, bem como contribuir para o aprimoramento dos conhecimentos envolvidos no desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos.

Palavras chave: Secagem, *spray drying*, fitoterápicos, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, estudo de estabilidade, *Dalbergia ecastaphyllum*, própolis vermelha.

ABSTRACT

ZAMPIER, M. N. **Development, standardization and biological evaluation of spray drying extracts of *Dalbergia ecastaphyllum***. 2012. 172 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

This work aimed the development, standardization and evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of spray dried extracts from *Dalbergia ecastaphyllum*. Analytical methodologies for evaluating the quality of the vegetable raw material during processing procedures (such as extraction of active compounds, drying, final product, etc.) were developed in order to achieve the proposed objectives.

The extraction solution was obtained from the leaves of *D. ecastaphyllum* by dynamic maceration. In this stage, some factors were evaluated such as: the plant: solvent ratio, extraction time and temperature using a central composite design (CCD). The optimized extraction solution was evaluated for the presence of secondary metabolites and antioxidant / antimicrobial activity. It was also subjected to spray drying. In this process, the effects of the drying parameters and processing aids on the equipment performance and the morphological, physicochemical and pharmacological properties of the product were investigated. The dry extracts were subjected to a stability study; and were used for the development of semi-solid formulations, also evaluated in an accelerated stability study.

It is intended that the results from this work can provide a basis for further standardization of extracts of other medicinal plants with therapeutic interest, as well as to contribute to the enhancement of the knowledge involved in the technological development of herbal products.

Keywords: drying, spray drying, herbal medicines, antimicrobial activity, antioxidant activity, stability study, *Dalbergia ecastaphyllum*, red propolis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	–	*Dalbergia ecastaphyllum* (L.) em seu habitat natural (João Pessoa,PB).	6
Figura 2.2	–	Flavonoides presentes na resina e casca de *D. ecastaphyllum*	7
Figura 2.3	–	Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta (Fonte: GOBBO-NETO; LOPES, 2006)	12
Figura 2.4	–	Classificação por formas farmacêuticas dos medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil (Fonte: CARVALHO *et al.,* 2008)	13
Figura 2.5	–	Processo de secagem por aspersão (Fonte: AULTON, 2005)	15
Figura 2.6	–	Esquema e foto do *spray dryer* (SD-05 LabPlant) utilizado	18
Figura 4.1	–	Esquema representativo da partição realizada com a solução extrativa otimizada de *D. ecastaphyllum*	44
Figura 4.2	–	Diagrama de cores do Sistema CIELAB	52
Figura 5.1	–	Etiqueta de identificação da exsicata depositada no Herbário JPB	61
Figura 5.2	–	Distribuição granulométrica das folhas secas e moídas de *D. ecastaphyllum*	62
Figura 5.3	–	Curva de calibração do pirogalol utilizada na quantificação dos polifenóis totais	64
Figura 5.4	–	Curva de calibração da quercetina utilizada na quantificação dos flavonoides totais	67
Figura 5.5	–	Análise da correlação entre as respostas avaliadas para a otimização do processo extrativo	71
Figura 5.6	–	Gráfico de Pareto para a variável dependente IC_{50}	73
Figura 5.7	–	Superfícies de resposta para a variável dependente IC_{50} em função do tempo de extração e da relação mp/ms (a) e em função da temperatura e relação mp/ms (b)	74
Figura 5.8	–	Gráfico de Pareto para a variável dependente FT	75
Figura 5.9	–	Gráfico de superfície resposta para a variável dependente FT em função da temperatura de extração e da relação mp/ms (a) e em função do tempo e relação mp/ms (b)	75
Figura 5.10	–	Gráfico de Pareto para a variável dependente recuperação (R)	76

Figura 5.11	–	Superfícies de resposta para a variável dependente rendimento (R) em função da relação da mp/ms e temperatura de extração (a) e em função do tempo e temperatura (b)	77
Figura 5.12	–	Gráfico de Pareto para a variável dependente teor de sólidos (S)	78
Figura 5.13	–	Superfícies de resposta para a variável dependente concentração de sólidos (S) em função do tempo de extração e da relação mp/ms (a) e da temperatura de extração em função da relação mp/ms (b)	79
Figura 5.14	–	Mecanismos de atividade antioxidante dos polifenóis (Fonte: BRAVO, 1988)	82
Figura 5.15	–	Molécula de quercetina com a marcação dos pontos de sua estrutura química que favorecem sua atividade antioxidante	83
Figura 5.16	–	Cromatogramas da solução extrativa otimizada obtidos com comprimentos de onda de 270, 310, 350 e 520 nm	85
Figura 5.17	–	Estrutura do flavonoides dividido de acordo com suas bandas de absorção no UV	86
Figura 5.18	–	Espectros dos picos monitorados em 350 nm	88
Figura 5.19	–	Aspecto visual da solução extrativa de *D. ecastaphyllum* lote 002.....	90
Figura 5.20	–	Espectro das frações monitoradas por UV-Vis durante o processo de partição do extrato de *D. ecastaphyllum*	91
Figura 5.21	–	Frações secas de *D. ecastaphyllum*.....	92
Figura 5.22	–	Curva representativa da atividade antioxidante pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico	94
Figura 5.23	–	Correlação entre as atividades antioxidantes mensuradas pelo método de seqüestro do radical DPPH e redução do complexo fosfomolibdênico	94
Figura 5.24	–	Correlação entre a % de FT, PF e TT com a atividade antioxidante representada pelo valor de IC_{50}	96
Figura 5.25	–	Cromatogramas da FOB4 (fração butanol - solução 2mg/mL) obtidos com comprimentos de onda de 270, 310 e 350nm	99
Figura 5.26	–	Cromatogramas da FOA6 (fração acetato - solução 2mg/mL) obtidos com comprimentos de onda de 270, 310 e 350nm	100
Figura 5.27	–	Cromatogramas da FA8 (fração aquosa solução 2mg/mL) obtidos com comprimentos de onda de 270, 310 e 350nm	101
Figura 5.28	–	Extratos secos de *D. ecastaphyllum* (DE) e de própolis vermelha (PV)	111
Figura 5.29	–	Fotomicrografias obtidas em MEV para os extratos secos de *D. ecastaphyllum*	116

Figura 5.30	–	Fotomicrografias obtidas em MEV para os extratos secos de *D. ecastaphyllyum* e própolis vermelha	117
Figura 5.31	–	Distribuição granulometrica em fração acumulada dos extratos secos de *D. ecastaphyllyum* e própolis vermelha	120
Figura 5.32	–	Difractogramas obtidos para o extrato liofilizado e extratos secos de *D. ecastaphyllum*.....	124
Figura 5.33	–	Difractogramas obtidos para os extratos secos de própolis vermelha	125
Figura 5.34	–	Resultado da análise de difração de raio-X realizados para a beta ciclodextrina (a) BCD nativa; (b) BCD após sua secagem por atomização (Fonte: FERNANDES, 2008); dióxido de silício coloidal (aerosil) e maltodextrina	125
Figura 5.35	–	Cromatogramas obtidos de cada extrato seco monitorados no comprimento de onda de 350 nm	127
Figura 5.36	–	Monitoramento da umidade dos extratos secos durante o estudo de estabilidade acelerado (40ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5%)	128
Figura 5.37	–	Monitoramento da umidade dos extratos secos durante o estudo de estabilidade de longa duração (30ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5%).....	129
Figura 5.38	–	Monitoramento da área relativa referente aos picos monitorados em 350 nm.....	130
Figura 5.39	–	Monitoramento da concentração de flavonoides totais durante o estudo de estabilidade (T3ML: 30ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5% e T3MA: 40ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5%)	131
Figura 5.40	–	Monitoramento da concentração de polifenóis totais durante o estudo de estabilidade (T3ML: 30ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5% e T3MA: 40ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5%)	133
Figura 5.41	–	Monitoramento da atividade antioxidante dos extratos secos durante o estudo de estabilidade (T3ML: 30ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5% e T3MA: 40ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5%)	135
Figura 5.42	–	Correlação entre a atividade antioxidante e a % de flavonoides totais do extrato glicólico da própolis vermelha durante o estudo de estabilidade	136
Figura 5.43	–	Aparência das formulações (emulsões) nos diversos tempos de armazenamento (T 0, T 15 e T 30 dias).....	141
Figura 5.44	–	Aparência das formulações (emulsões) nos diversos tempos de armazenamento (T 0, T 15 e T 30 dias).....	142
Figura 5.45	–	Formulações de emulsão e gel obtidas com os extratos seco e glicólico monitoradas durante o estudo de estabilidade (T0, T15 e T 30 dias).....	143
Figura 5.46	–	Comportamento reológico das formulações das emulsões desenvolvidas durante o estudo de estabilidade (T0 e T30 dias)	144
Figura 5.47	–	Comportamento reológico das formulações de gel desenvolvidas durante o estudo de estabilidade (T0 e T30 dias).....	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Inter-relação entre parâmetros operacionais do *spray dryer* (Fonte: CAL; SOLLOHUB, 2010) 17

Tabela 4.1 – Formulações utilizadas para a produção dos extratos secos 47

Tabela 4.2 – Termos descritivos e classificação de solubilidade (F. BRAS. V, 2010) 48

Tabela 4.3 – Formulação gel com extrato glicólico (GEL-EG)..... 55

Tabela 4.4 – Formulação gel com extrato seco DE 003 (GEL-DE003)..... 56

Tabela 4.5 – Formulação da emulsão com extrato glicólico (creme lanette-EG) 56

Tabela 4.6 – Formulação das emulsões contendo os extratos secos DE 003 e DE 004 (creme lanette - DE 003 e DE 004) 57

Tabela 5.1 – Resultados das análises fitoquímicas qualitativas para folhas de *D. ecastophyllum* 63

Tabela 5.2 – Resultados de polifenóis totais e taninos totais da droga vegetal 66

Tabela 5.3 – Planejamento composto central (PCC) 68

Tabela 5.4 – Resultado das análises realizadas com as soluções extrativas 69

Tabela 5.5 – Coeficiente de regressão para as respostas avaliadas 72

Tabela 5.6 – Comparação entre as respostas teóricas e obtidas experimentalmente 80

Tabela 5.7 – Análises realizadas com a solução extrativa otimizada com o material vegetal proveniente do lote 001..... 81

Tabela 5.8 – Atividade antioxidante da quercetina..... 83

Tabela 5.9 – Atividade antioxidante do ácido tânico e ácido gálico..... 84

Tabela 5.10 – Resultado das análises realizadas com as soluções extrativas de *D. ecastaphyllum* referentes ao lote 001 e 002..... 90

Tabela 5.11 – Análises das frações obtidas a partir da solução extrativa de *D. ecastaphyllum*..... 93

Tabela 5.12 – Concentração inibitória mínima em mg/mL da solução extrativa (EB) de *D. ecastaphyllum* e suas frações..... 97

Tabela 5.13 – Resultados das análises realizadas com a solução extrativa de *D. ecastaphyllum* e própolis vermelha 103

Tabela 5.14 – Concentração inibitória mínima em mg/mL da solução extrativa de própolis vermelha (PV) e *D. ecastaphyllum* (SE)..... 105

Tabela 5.15 – Resultados das análises realizadas com a solução extrativa e extrato glicólico de própolis vermelha 106

Tabela 5.16 – Avaliação dos extratos secos obtidos nos ensaios preliminares..... 109

Tabela 5.17 – Rendimento da secagem e propriedades físico-químicas dos extratos secos de *D. ecastaphyllum*..... 110

Tabela 5.18 – Resultados de atividade antioxidante para os extratos secos de *D. ecastaphyllum* 111

Tabela 5.19 – Análise granulométrica dos extratos secos de *D. ecastaphyllum* e própolis vermelha..... 120

Tabela 5.20 – Avaliação das características farmacotécnicas dos extratos secos..... 121

Tabela 5.21 – Índice de Carr como indicativo do fluxo de pós 121

Tabela 5.22 – Análise colorimétrica dos extratos secos em estudo de estabilidade .. 138

Tabela 5.23 – Resultados do estudo de estabilidade realizado com as formulações (emulsão) 140

Tabela 5.24 – Resultados do estudo de estabilidade realizado com as formulações (gel) 141

SUMÁRIO

RESUMO ..... **i**
LISTA DE FIGURAS..... **iii**
LISTA DE TABELAS ..... **vi**
1. INTRODUÇÃO **1**
2. REVISÃO DE LITERATURA **5**
2.1 *Dalbergia ecastaphyllum*..... 6
2.2 Metabólitos secundários..... 10
2.3 Secagem por nebulização..... 14
2.4 Padronização de extratos e legislação nacional vigente..... 19
2.5 Estudos de estabilidade 21
2.5.1 Estudo de estabilidade acelerado..... 22
2.5.2 Estudo de estabilidade de longa duração..... 23
2.6 Estudo de estabilidade para derivados de plantas medicinais..... 23
2.7 Relevância do tema 24
3. OBJETIVOS..... **26**
4. MATERIAIS E MÉTODOS..... **28**
4.1 Materiais e equipamentos 29
4.2 Métodos 30
4.2.1 Caracterização da matéria-prima vegetal 30
4.2.1.1 Preparo da matéria prima vegetal 30
4.2.1.2 Determinação do teor de extrativo (TEIXEIRA, 1996) . 30
4.2.1.3 Determinação da perda por dessecação..... 31
4.2.1.4 Análise granulométrica 31
4.2.1.5 Análise de flavonoides totais 31
4.2.1.6 Análise de polifenóis totais e taninos totais 32
4.2.1.7 Prospecção fitoquímica (COSTA, 2005)..... 33
4.2.2 Obtenção da solução extrativa – estudo de otimização da extração 33
4.2.2.1 Caracterização das soluções extrativas..... 34
- Determinação do resíduo seco (teor de sólidos)..... 34
- Determinação do pH..... 34
- Determinação da densidade relativa..... 35
- Análise de flavonoides totais..... 35

- Avaliação do potencial antioxidante das soluções extrativas 35
- Atividade seqüestradora de radicais DPPH 36
- Formação do complexo fosfomolibdênio..... 36
4.2.2.2 Caracterização da solução extrativa otimizada 37
- Análise de polifenóis totais e taninos totais 37
4.2.3 Produção do segundo lote de solução extrativa de *D. ecastaphyllum*..... 38
- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 39
- Avaliação da atividade antimicrobiana da solução extrativa otimizada..... 39
- Ensaios para bactérias..... 40
- Ensaios para leveduras 41
- Ensaios para dermatófitos 42
4.2.3.1 Partição da solução extrativa otimizada (extrato bruto)..... 43
- Análises das frações obtidas pela partição..... 45
4.2.4 Preparo da solução extrativa da própolis vermelha..... 45
4.2.4.1 Caracterização da solução extrativa da própolis vermelha 45
4.2.5 Preparo do extrato glicólico da própolis vermelha..... 45
4.2.5.1 Caracterização do extrato glicólico da própolis vermelha 46
4.2.6 Obtenção do extrato seco nebulizado..... 46
4.2.6.1 Caracterização dos extratos secos 47
- Umidade residual..... 48
- Atividade de água 48
- Solubilidade..... 48
- Determinação do teor de flavonoides totais..... 49
- Determinação do teor de polifenóis e taninos totais 49
- Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE 49
- Distribuição granulométrica..... 49
- Índices de fluidez e acomodamento dos pós 50
- Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) 51
- Difração de raios-X 51

- Análise colorimétrica 51
- Avaliação do potencial antioxidante 52
4.2.7 Estudo de estabilidade dos extratos 52
4.2.7.1 Parâmetros monitorados no estudo de estabilidade 53
- Umidade..... 53
- Análise colorimétrica..... 54
- Análise dos flavonoides totais..... 54
- Análise de polifenóis totais e taninos totais..... 54
- Avaliação do potencial antioxidante..... 54
- Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE 54
4.2.8 Preparo de formulação contendo extrato glicólico e extrato seco de *D. ecastaphyllum* 55
4.2.8.1 Estudo de estabilidade das formulações 58
- Caracterização reológica das formulações..... 58
4.3 Tratamento dos resultados 59
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 60
5.1 Caracterização da matéria-prima vegetal..... 61
5.1.1 Determinação do teor de extrativos..... 61
5.1.2 Determinação de umidade..... 62
5.1.3 Análise granulométrica..... 62
5.1.4 Prospecção fitoquímica..... 63
5.1.5 Análise de polifenóis totais e taninos totais..... 64
5.1.6 Análise de flavonoides totais..... 66
5.2 Obtenção da solução extrativa 67
5.2.1 Caracterização das soluções extrativas obtidas pelo PCC 69
5.2.2 Análise das variáveis dependentes 72
5.2.3 Obtenção das condições ótimas de extração..... 79
5.2.4 Ensaios realizados com a solução extrativa otimizada..... 80
5.3 Produção do segundo lote de solução extrativa de *D. ecastaphyllum* 89
5.3.1 Partição do extrato 91
5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana e antifúngica..... 97
5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE..... 98
5.6 Obtenção da solução extrativa da própolis vermelha 102
5.6.1 Caracterização da solução extrativa de própolis vermelha..... 102

5.6.2 Avaliação da atividade antimicrobiana e antifúngica..... 105
5.6.3 Caracterização do extrato glicólico de própolis vermelha 106
5.7 Obtenção e caracterização dos extratos secos nebulizados 106
5.7.1 Microscopia eletrônica de varredura 115
5.7.2 Avaliação das características farmacotécnicas do extrato seco..... 119
5.7.3 Solubilidade 122
5.7.4 Difração de raios-X..... 123
5.7.5 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE 126
5.8 Estudo de estabilidade dos extratos secos 128
5.8.1 Umidade 128
5.8.2 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE 129
5.8.3 Análise dos flavonoides totais..... 131
5.8.4 Análise de polifenóis totais..... 133
5.8.5 Avaliação do potencial antioxidante 134
5.8.6 Análise colorimétrica..... 136
5.9 Estudo de estabilidade das formulações..... 139
6. CONCLUSÕES..... 147
6.1 Aspectos de processamento de extratos 148
6.2 Avaliação da estabilidade dos extratos 150
6.3 Aplicação dos extratos secos em formulações semi-solidas 151
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 153
APÊNDICES 170

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os produtos de origem natural tem sido grandes instrumentos científicos para decifrar a lógica e as estruturas para a descoberta de novas drogas, as quais são utilizadas como agentes inovadores na terapêutica de doenças de alta prevalência e morbidade como infecções, neoplasias e imunodeficiências (CLARDY *et al*., 2004).

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou suas preparações. Neste contexto o Brasil é um país que apresenta cerca de 20 a 22% de todas as plantas e microrganismos existentes no planeta, contudo estima-se que não mais de 25.000 espécies de plantas tem sido objeto de investigação científica (CALIXTO, 2005).

Entre os elementos que constituem a biodiversidade, as plantas são a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos.

Uma planta é caracterizada como medicinal quando contém em um ou mais de seus órgãos substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sirvam para semi-síntese químico-farmacêutica (WHO 1978). Este fator abordado faz com que o Brasil tenha certa vantagem para o desenvolvimento de novos produtos baseados na biodiversidade e sustentabilidade.

O uso de derivados de plantas como medicamentos são estudados desde a antiguidade. Hipócrates, Dioscórides, Galeno e Avicenas escreveram obras que referenciam o uso de plantas com a finalidade de cura (PINTO *et al.,* 2002).

Com o surgimento da química medicinal e o modelo “chave fechadura” todas as atenções em pesquisa de medicamentos se voltaram para a área de síntese de novas moléculas (chaves) que pudessem atuar em um determinado alvo dentro do organismo (fechadura) podendo assim exercer o efeito terapêutico. Aparentemente parece fácil sintetizar um novo medicamento tendo em vista a molécula alvo onde o mesmo deve atuar, porém como se trata de alvos biológicos a interação entre o fármaco e o alvo deve ser perfeita e esta interação deve ocorrer preferencialmente nos alvos que se deseja exercer o tratamento terapêutico. Caso esta interação ocorra em outras moléculas do corpo que não as de interesse terapêutico, irá

ocorrer o que chamamos de efeito colateral, um anti-inflamatório que causa dor de estômago, um antiemético que causa vertigem e assim sucessivamente.

Na corrida contra o tempo as grandes multinacionais buscaram sintetizar e patentear novos fármacos, porém o cenário atual é que está cada vez mais difícil sintetizar novas drogas com a complexidade adequada para tratar as doenças que ainda não tem cura. Recentes constatações das indústrias farmacêuticas mostram que para algumas doenças complexas os produtos naturais se mostram como uma importante fonte para a produção de novas entidades químicas uma vez que apresentam estruturas privilegiadas e complexas (CALIXTO, 2005).

Neste contexto, os produtos de origem natural apresentam-se como uma alternativa para a descoberta de novas drogas. A natureza é capaz de sintetizar moléculas complexas através de reações que muitas vezes não podem ser reproduzidas em laboratórios.

De acordo com Yunes *et al*. (2001), existem diversas vantagens na utilização de fitoterápicos como a presença de efeito sinérgico no combate a determinada enfermidade, associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes, menores riscos de efeitos colaterais e menores custos de pesquisas.

Além das questões relacionadas à saúde da população os medicamentos fitoterápicos chamam a atenção quando se avalia sua projeção de mercado. O mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de U$ 22 bilhões por ano sendo que no Brasil é estimado que este mercado gire em torno de U$$ 160 milhões por ano. O crescimento nas vendas de fitoterápicos chega a ser maior que 15% ao ano enquanto que para os medicamentos sintéticos o crescimento é da ordem de 4% (CARVALHO *et al.,* 2008). Entretanto, mesmo sendo detentor da maior biodiversidade do planeta o faturamento do Brasil é inferior ao de países como EUA e Alemanha (PINTO *et al.,* 2002).

Para que se possa desenvolver um produto fitoterápico com eficácia, segurança e qualidade garantidas, e que possa ser produzido industrialmente, é necessário que a matéria-prima vegetal seja abundante e homogênea. Assim, o cultivo de plantas medicinais, de maneira sistematizada, constitui uma das etapas iniciais para a padronização dos mesmos (SIMÕES *et al*., 2004).

Paralelamente ao crescimento da demanda, produção e comercialização de medicamentos de origem vegetal foram observados o aumento de exigências quanto

ao controle de qualidade e à obtenção de produtos com eficácia terapêutica e segurança, bem como, a necessidade do estabelecimento de critérios de preservação do meio ambiente e de legislação sanitária adequada.

Desta forma, a produção de fitoterápicos deve atender as práticas modernas de fabricação e controle de qualidade, enfatizando os aspectos de padronização a fim de manter e garantir a constância da composição química e da atividade farmacológica (BONATI, 1991). Faz-se ainda necessária uma fundamentação científica, fato que diferencia um produto fitoterápico propriamente dito das plantas medicinais e das preparações utilizadas na medicina popular, sendo as principais exigências incidentes: extração das substâncias ativas, da forma mais completa possível; garantia da estabilidade das substâncias ativas durante o processo de fabricação e o período de armazenamento; e a obtenção de um produto padronizado (VOIGT; BORNSCHEIN, 1982).

Assim, do total de espécies vegetais com registro no Brasil, menos de 30% são nativas da América do Sul (CARVALHO *et al.,* 2008).

Dada à importância e relevância que o tema "produção de fitoterápicos" tem adquirido atualmente, propôs-se esse trabalho visando o desenvolvimento tecnológico e avaliação de atividade farmacológica de formas farmacêuticas obtidas a partir de plantas medicinais utilizando *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub. como planta modelo.

Dalbergia ecastaphyllum foi selecionada para o presente trabalho, pois além de ser uma planta do mangue brasileiro é ainda pouco estudada. Além disso, sabe-se que a própolis vermelha, conhecida por apresentar diversas atividades biológicas é derivada da resina de *D. ecastaphyllum (*DAUGSCH, 2007).

Assim, essa espécie vegetal é uma excelente candidata para o desenvolvimento de estudos visando o desenvolvimento de produtos fitoterápicos. Este trabalho está inserido na linha de pesquisa do Grupo de Aglomeração e Secagem de Produtos Farmacêuticos da FCFRP/USP que, com o apoio da FAPESP e CNPq, vem desenvolvendo estudos sistemáticos visando o desenvolvimento de processos de produção de extratos secos de plantas medicinais brasileiras, obtendo resultados promissores (CORDEIRO, 2000; RUNHA *et al.*, 2001; SOUZA, 2007; SOUZA *et al.*, 2008; BOTT, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010, FERNANDES, 2008).

2. Revisão da Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

Apresenta-se a seguir uma revisão sobre *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub., planta medicinal utilizada neste estudo, apresentando informações botânicas e farmacológicas da espécie e a importância dos metabólitos secundários e seu emprego na terapêutica. Abordam-se também, aspectos sobre a padronização de fitoterápicos com base na legislação vigente e embasamento tecnológico de sua produção.

2.1 *Dalbergia ecastaphyllum*

Dalbergia ecastaphyllum (L.) Taub*,* é um arbusto que ocorre ao longo do mar e praias de rio da América Latina e África (DONNELLY *et al.,* 1973; MATOS *et al.,* 1975). Popularmente é conhecida como rabo-de-bugio e pertence à família *Fabaceae* (Leguminosae). A Figura 2.1 apresenta fotos de *D. ecastaphyllum* em seu habitat natural.

Figura 2.1 – *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) em seu habitat natural (João Pessoa, PB).

Estudos fitoquímicos demonstraram que amostras de extrato da casca de *D. ecastaphyllum* da América do Sul, contém os flavonoides isoliquiritigenina, liqueritigenina, daidzeina, formononetina, dimetilduartina, dimetilhomopterocarpina,

medicarpina, 7-O-methylvestitol, vestitol, sitosterol, mucronulatol e (2R,3R)-3,7-dihydroxy-6-methoxyflavanone (DONNELLY *et al.,* 1973; MATOS *et al.,* 1975).

Trabalhos recentes indicaram que extratos da resina de *D. ecastaphylum* apresentam alta concentração relativa das isoflavonas 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpina, medicarpina (SILVA, 2008). A avaliação da resina de *D. ecastaphylum* coletada no nordeste brasileiro mostra a presença de flavonoides como rutina, liquiritigenina, daidzeina, pinobanksina, quercetina, luteolina, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina, pinocembrina e biochanina-A (DAUGSCH, 2007).

A Figura 2.2 apresenta algumas das moléculas de flavonoides encontradas na casca e resina de *D. ecastaphyllum.*

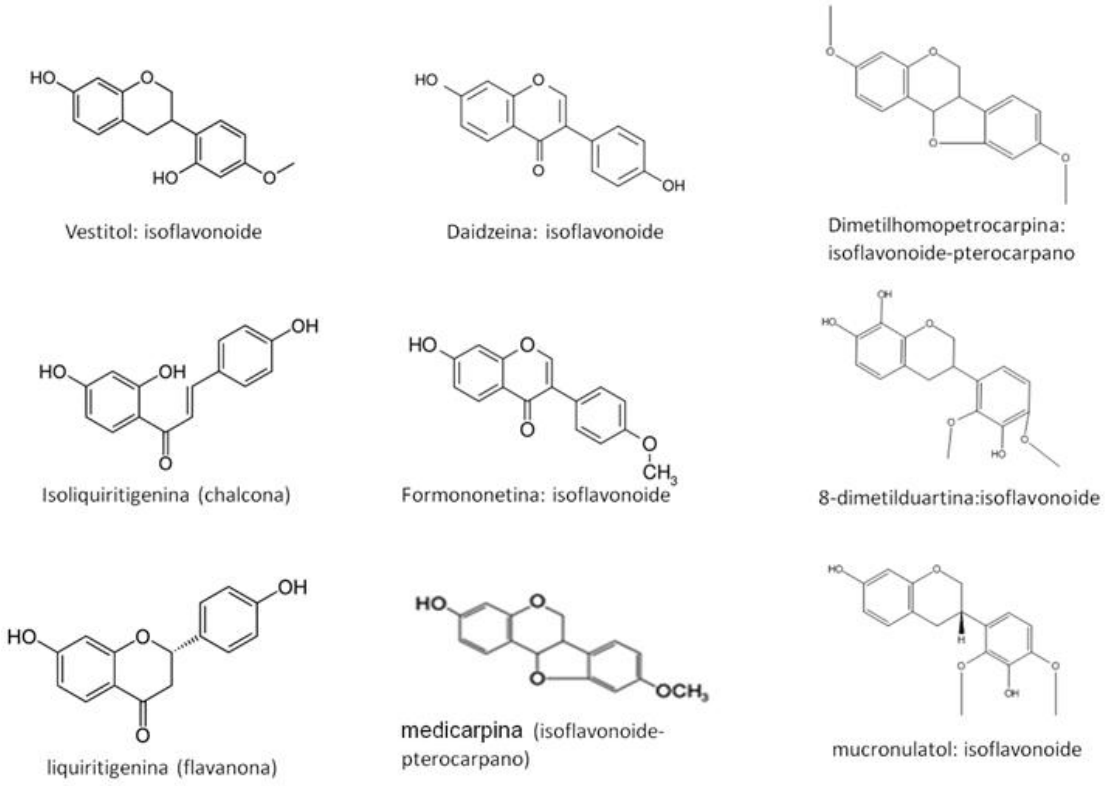


Figura 2.2 – Flavonoides presentes na resina e casca de *D. ecastaphyllum* (Fonte: http://commons.wikimedia.org Acessado em 16/01/2010; http://www.lipidmaps.org/data; http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/OverviewOfPlantDiseases.aspx, acessado em 17/01/2011).

A isoliquiritigenina pertence ao grupo das chalconas amplamente encontradas em espécies da família Leguminosae. Estudos relatam que a isoliquiritigenina inibe o crescimento de câncer prostático e de células neoplásicas no pulmão (KANAZAWA *et al.,* 2003; LI *et al*., 2004). Liquiritigenina e isoliquiriigenina inibem a enzima xantina oxidase responsável por realizar algumas reações de oxidação no organismo podendo gerar íons superóxido. A inibição da xantina oxidase foi sugerida para uso no tratamento de hepatites e tumores cerebrais, porque nestes casos de enfermidade os níveis de xantina oxidase no plasma apresentam-se aumentados (KONG *et al.,* 2000). Estudos com a isoliquiritiogenina isolada de *Dalbergia odorífera* mostraram uma importante ação anti-inflamatória (LEE *et al*., 2009).

Estudos realizados com formononetina indicam sua ação como fito-estrógeno além da atividade antioxidante (MU *et al*., 2009). A formononetina também apresenta um efeito vasorelaxante e antihipertensivo de acordo com os estudos realizados por Sun *et al.,* (2011).

Existem vários relatos na literatura mostrando que as isoflavonas apresentam efeito antimicrobiano, antifúngico, antineoplásico, ação antioxidante e redução dos sintomas da menopausa (WANG *et al*., 2000; MILITAO *et al*., 2005; 2006; RUFFER *et al*., 2006, KANO *et al*., 2006).

Outro flavonoide presente nas espécies de *Dalbergia* é a medicarpina a qual é atribuída forte atividade como fitoalexina (HARGREAVES, 1976).

Poucos estudos foram realizados com relação a atividade biológica em *D. ecastaphyllum*. Extratos de resina e casca de *D. ecastaphyllum* demonstraram atividade contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a várias drogas (CORREA *et al.,* 2008). Estudos realizado por Silva (2008) demonstraram atividade antimicrobiana do extrato da resina de *D. ecastaphyllum* contra *Streptococus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Staphylococcus aureus e Actinomyces naeslyndii.*

Até o atual momento não foram encontrados relatos de substâncias e possíveis atividades biológicas presente nas folhas de *D. ecastaphyllum.* Em contrapartida existem diversos estudos realizados que apresentam a composição e atividade biológica de extratos da folha e de outras partes de diferentes espécies de *Dalbergia,* o que pode ser utilizado como indicativo para futuros estudos envolvendo

a espécie *D. ecastaphyllum*. A seguir apresenta-se uma revisão dos principais artigos científicos encontrados que abordam estudos de isolamento e atividade biológica de substancias encontradas em diversas espécies de *Dalbergia*.

Borai; Dayal (1992) identificaram a presença da flavona glicosilada luteolina-4-rutinosídeo a partir de extrato metanólico das folhas de *Dalbergia stipulacea*. Na fração butanólica das folhas de *Dalbergia sisso* foram encontrados os isoflavonoides glicosilados como a biochanina A e a tectorigenina (FARAG *et al.,* 2001), enquanto que no extrato hexânico e etanólico das folhas de *Dalbergia spinosa* foram detectados prunetina, 7 metilhectorigenina, caviunina, dapsina e dalbergina (NARAYANAN; NAGARAJAN, 1988). A análise das frações acetato de etila e butanol das folhas de *Dalbergia nigra* mostraram a presença de um isoflavonoide glicosilado, a 5-hydroxy-6,7-dimethoxy-4'-*O*-(6-*O*-D-apio-β-D-furanosyl-β-D-glucopyranosyl)isoflavone (MATHIAS *et al.,* 1998).

Estudos realizados com as folhas de *Dalbergia paniculata* cultivada no Egito mostram o isolamento de 4 isoflavonoides: dalpateína, genisteína, biochanina-A e formononetina, sendo que o extrato hidroálcoolico das folhas apresentou uma pronunciada atividade antioxidante *in vitro* (AMIN *et al.,* 2012).

Compostos fenólicos isolados das raízes de *Dalbergia odorífera* apresentaram atividade antioxidante maior que α tocoferol e BHT (YU *et al.,* 2000; 2007). Estudos realizados com buteina, uma chalcona isolada de *Dalbergia odorífera* indicaram que este composto apresenta forte atividade na inibição da peroxidação lipídica em cérebro de ratos, além de ser tão ativa como α-tocoferol na redução do radical livre DPPH (CHENG *et al.,* 1998).

Flavonoides, isoflavonoides e isoflavonas isoladas de *Dalbergia parviflora* apresentaram atividade antifúngica, antibacteriana e antimalárica (SPONGSIANG *et al.,* 2009).

Em síntese, constata-se com base nas informações científicas anteriormente relatadas que as espécies pertencentes ao gênero *Dalbergia* apresentam grande potencial no fornecimento de moléculas bioativas, o que torna a *Dalbergia ecastaphyllum* uma excelente candidata para a pesquisa e desenvolvimento de extratos padronizados com potencial aplicação terapêutica. Também se atribui a

esta espécie significativa importância comercial, visto que a própolis vermelha tem origem no exsudado resinoso presente no caule desta espécie.

2.2 Metabólitos secundários

Mesmo apresentando uma denominação de algo que não é principal ou primordial, os metabólitos secundários são substâncias que exercem uma importante função na sobrevivência das espécies vegetais. Hoje se sabe que muitas destas substâncias estão envolvidas com a adaptação entre a planta e seu habitat apresentando atividades que podem variar desde a proteção contra radiação UV até defesa da planta contra herbívoros e microrganismos (SIMÕES *et al.,* 2004).

Dentre os metabólitos secundários existentes os polifenóis e carotenóides são os compostos mais estudados e abrangem um grupo de substâncias como os ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, taninos, licopenos entre outros. O grande interesse nestes compostos é que os mesmos podem exibir importantes atividades biológicas, como atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral, podendo ser exploradas pelas indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias (OLIVEIRA *et al.,* 2010).

Muitas das atividades biológicas encontradas nos polifenóis, como por exemplo no processo de cicatrização, inibição de enzimas importantes para fixação de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* no dente e ação antiviral ocorrem devido a sua ligação com proteínas (HASLAM, 1996).

Vanden Berghe *et al.* (1985), sugeriram que os polifenóis apresentam como mecanismo de ação antiviral a ligação com as proteínas presentes no vírus e na membrana da célula hospedeira atrapalhando desta maneira a absorção do vírus.

De maneira geral, a complexação dos polifenóis com as proteínas pode ser considerada como um mecanismo de reconhecimento molecular por contato e desta maneira pode ser maximizada no ponto isoelétrico da proteína. O contato entre proteína e polifenol pode ser prejudicado (menor atividade) se a proteína alvo for muito enovelada e compacta. O núcleo aromático dos polifenóis também pode se ligar na superfície da proteína alvo. Quanto maior o tamanho do polifenol maior será a sua eficácia para ligação com as proteínas sendo que a principal força que rege

esta ligação está relacionada às interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. Quanto menor a afinidade do polifenol por água mais facilmente ele precipitará com proteínas sendo que as pontes de hidrogênio são denominadas como efeitos secundários na complexação dos polifenóis (HASLAM, 1996).

A origem destes metabólitos secundários está na molécula de glicose, que dá origem ao ácido chiquímico que por sua vez originará o ácido gálico, precursor dos taninos hidrolisáveis. Além disso, a molécula de glicose é precursora do acetil-coa que juntamente com o ácido chiquímico vai dar origem as antraquinonas, flavonoides e taninos condensados (SIMÕES *et al.,* 2004).

Como a base destes metabólitos secundários é a glicose, uma molécula muito importante na manutenção das necessidades primárias de sobrevivência da planta, para que ocorra o dispêndio de glicose para conversão em uma molécula de "defesa" é necessário que algum estímulo do ambiente ocorra. Devido a este fator a variação na produção destes metabólitos pode ser um fator agravante durante o processo de padronização de substâncias ativas presentes nos extratos tanto em solução como secos.

Alguns fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, idade e estágio de desenvolvimento, temperatura, disponibilidade de água, incidência de radiação UV, nutrientes do solo, altitude, composição da atmosfera e danos ao tecido da planta podem influenciar na produção dos metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2006). A Figura 2.3 ilustra os fatores associados a variação de metabólitos secundários nas plantas.

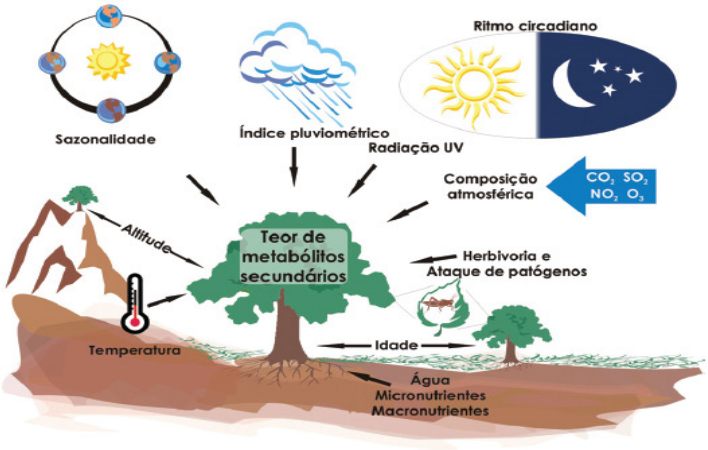


Figura 2.3 – Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta (Fonte: GOBBO-NETO; LOPES, 2006).

Assim, como as plantas medicinais são reconhecidas fontes de matéria-prima para a indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, e sabendo-se que existem inúmeros problemas relativos a sua padronização e garantia da constância dos princípios ativos, devem-se utilizar recursos tecnológicos visando o desenvolvimento de extratos vegetais padronizados e validados do ponto de vista da sua eficácia, segurança e qualidade. Neste sentido, o emprego de metodologias científicas desde o cultivo da matéria-prima vegetal até o produto final é de suma importância na obtenção de produtos padronizados, sendo que especial atenção deve ser dada a etapa de desidratação das soluções extrativas visando a obtenção de um produto seco, o que traz inúmeras vantagens tecnológicas e comerciais. Assim, os processos de secagem merecem destaque na etapa produtiva e dentre os processos mais utilizados pode-se citar a secagem por nebulização ou *spray drying*, a liofilização e a secagem em leitos fluidizados, sendo que a escolha do processo a ser empregada está baseada em suas vantagens e desvantagens e características tecnológicas pretendidas ao produto final.

A produção de extrato seco representa um campo em expansão visto que as indústrias farmacêuticas buscam a substituição de formas farmacêuticas fluidas por extratos secos de planta. Dentre as razões que estão envolvidas na preferência de utilização do extrato seco pode-se citar a alta concentração dos compostos ativos no

extrato seco quando se compara com a concentração presente no extrato fluido, melhor estabilidade e maior facilidade de padronização dos compostos bioativos no extrato, fácil transporte, redução do espaço necessário para o armazenamento e baixo risco de contaminação (SOUZA, 2003).

Desta maneira pode-se dizer que os fitoterápicos provenientes de extratos secos estão melhores adaptados a demanda da terapêutica moderna garantindo a homogeneidade das formulações farmacêuticas. Dentre as formulações onde os extratos secos podem ser utilizados destaca-se as pílulas, cápsulas, comprimidos, pomadas entre outras (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A maioria dos medicamentos fitoterápicos comercializados no Brasil estão na forma de comprimidos e cápsulas (CARVALHO *et al.*, 2008) desta maneira é evidente que a produção de extratos secos a partir de soluções extrativas vegetais é um processo muito importante para ser estudado para o desenvolvimento de um novo medicamento fitoterápico. A Figura 2.4 apresenta a classificação por formas farmacêuticas dos medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil.

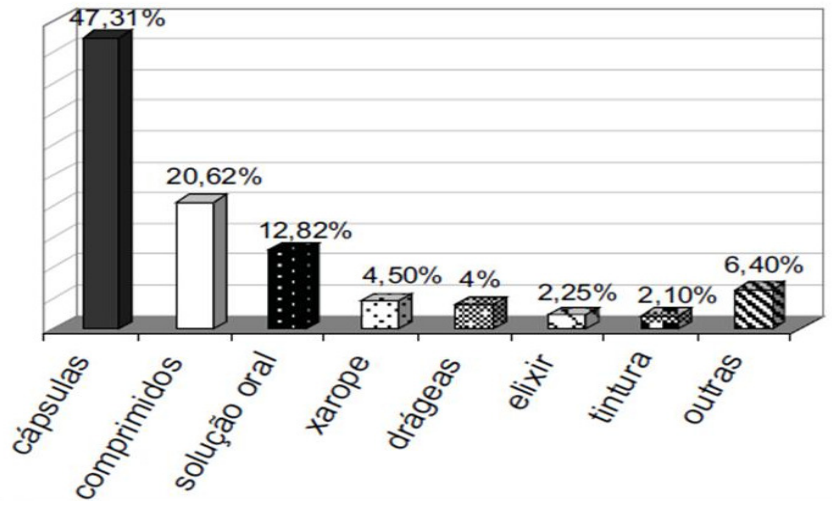


Figura 2.4 – Classificação por formas farmacêuticas dos medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil (Fonte: CARVALHO *et al.,* 2008).

2.3 Secagem por nebulização

A realização da secagem de uma suspensão ocorre a partir do espalhamento do líquido em uma ampla área superficial para que ocorra a transferência de calor e de massa, sendo que no final do processo se coleta os sólidos seco. Quando ocorre a aspersão da suspensão as pequenas gotículas formadas aumentam a área superficial favorecendo a transferência de massa e calor (AULTON, 2005).

O processo de secagem por nebulização ou *spray drying* consiste, basicamente, na atomização de uma mistura diluída sólido-fluído em uma corrente gasosa aquecida que promove a evaporação do solvente, levando a um produto seco. Esses tipos de secadores são amplamente usados na secagem de produtos presentes na forma líquida tais como soluções, suspensões, polpas e pastas líquidas em diversos setores industriais, incluindo o farmacêutico (MASTERS, 1976).

Durante o processo de secagem, a desidratação das gotículas de líquidos atomizadas acontece da superfície para o núcleo mais interno. Uma camada de solutos concentrados é formada na superfície da partícula promovendo uma diminuição na temperatura da partícula devido ao resfriamento. A remoção extremamente rápida da água aumenta a viscosidade dos sólidos remanescentes e a superfície das partículas passa para o estado vítreo antes que ocorra a colisão com outras partículas ou com as paredes no interior da câmara de secagem. A vitrificação das partículas na secagem por *spray drying* é essencial por permitir o escoamento livre das partículas no interior da câmara e para evitar que haja aderência entre as partículas e as paredes do secador. No final do processo, a temperatura da partícula e seu teor de umidade devem fornecer condições para que o pó permaneça no estado vítreo (ROOS, 2002). O processo de secagem por aspersão a partir de uma gotícula formada esta descrito na Figura 2.5.

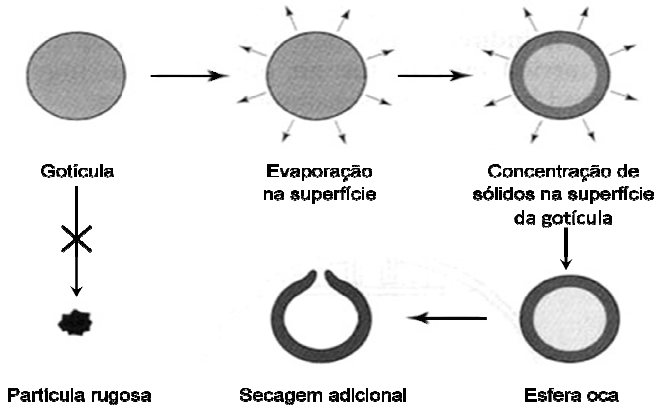


Figura 2.5 – Processo de secagem por aspersão (Fonte: AULTON, 2005).

Além das transformações físicas podem ainda ocorrer outros tipos de transformação durante o processo de secagem como transformações químicas, biológicas e enzimáticas. A ocorrência de tais transformações irá depender das características do produto a ser processado e das condições de processo aplicadas. Em muitas situações é desejável que tais transformações ocorram desde que possam promover alguma melhora em certas características do produto como o aumento da solubilidade e por conseqüência da biodisponibilidade do ativo, eliminação de patógenos devido ao aquecimento durante o processo entre outros. Contudo a secagem pode também promover alterações que não são desejáveis como, por exemplo, a perda de atividade enzimática e degradação do princípio ativo (OLIVEIRA *et al.,* 2010).

Desta maneira a determinação das condições do processo irá impactar diretamente sobre a qualidade do produto resultante. As variáveis devem ser controladas de modo a maximizar as características desejáveis no produto seco como a obtenção de rendimento e de teor de umidade adequados, estabilidade química, minimização da aderência de partículas na câmara de secagem (*sticking*) e características tecnológicas específicas. Assim, as características do produto final estão atreladas ao tipo de material de entrada e aos parâmetros de operação do equipamento (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Dentre as variáveis relacionadas ao material de entrada pode-se citar o conteúdo de sólidos, densidade, viscosidade, tensão superficial, e adjuvantes adicionados. Uma das principais funções destes adjuvantes é aumentar a temperatura de transição vítrea do material que será desidratado promovendo desta maneira uma redução na tendência de aglomeração durante o armazenamento do produto. Os adjuvantes tecnológicos amplamente utilizados no processo de secagem de extratos vegetais são amidos, amidos modificados, maltodextrina, dióxido de silício coloidal, goma arábica e ciclodextrinas. Estes componentes podem ser utilizados sozinhos ou associados em proporção adequada para o extrato a ser seco (OLIVEIRA *et al.,* 2010).

As variáveis de processo que influenciam diretamente a operação de secagem são: temperatura de entrada do ar de secagem, vazão do ar de secagem, vazão do líquido e pressão de atomização do líquido. Outros parâmetros de processo como a temperatura de saída do ar de secagem, o tamanho da gotícula, eficiência da secagem e propriedades físico-químicas do produto seco são dependentes dos parâmetros de processo ajustados pelo operador do equipamento (CAL; SOLLOHUB, 2010). A Tabela 2.1 apresenta a inter-relação dos parâmetros de secagem do *spray dryer.*

Tabela 2.1 – Inter-relação entre parâmetros operacionais do *spray dryer* (Fonte: CAL; SOLLOHUB, 2010).

Parâmetros	Vazão do ar de secagem (↑)	Umidade do ar (↑)	Temperatura de entrada (↑)	Vazão de atomização do ar (↑)	Taxa de alimentação (↑)	Presença de solvente orgânico no lugar de água	Concentração de sólidos no material de alimentação (↑)
Temperatura de saída	↑↑ menor perda de aquecimento em base da energia total	↑ maior energia contida na umidade	↑↑↑ relação simples	↓ maior quantidade de ar frio para ser aquecido	↓↓ mais solvente precisa ser evaporado	↑↑↑ menor energia requerida para evaporação	↑↑ menos água para ser evaporada
Tamanho de partícula	-	-	-	↓↓↓ aumento na quantidade de energia para atomização	↑ mais líquido para ser disperso	↓ menor tensão superficial	↑↑↑ mais sólido disponível para formação da partícula
Umidade final do produto	↓↓ menor pressão parcial do vapor de água	↑↑ aumento na pressão parcial do ar de secagem	↓↓ diminuição na umidade relativa do ar	-	↑↑ maior quantidade de água aumentando sua pressão parcial	↓↓↓ falta de água conduz a formação de produto muito seco	↓ menos água para evaporar, menor pressão de vapor
Eficiência da secagem	↑↑ melhor separação no ciclone	↓ mais umidade pode levar a aderência na câmara de secagem	(↑) eventualmente produtos secos previnem a aderência	-	↑↓ depende da aplicação	↑↑ falta de higroscopicidade resulta em secagem mais fácil	↑ partículas maiores são mais facilmente separadas no ciclone.

A Figura 2.6 apresenta um diagrama esquemático e uma foto do *spray dryer* utilizado para o desenvolvimento deste trabalho.

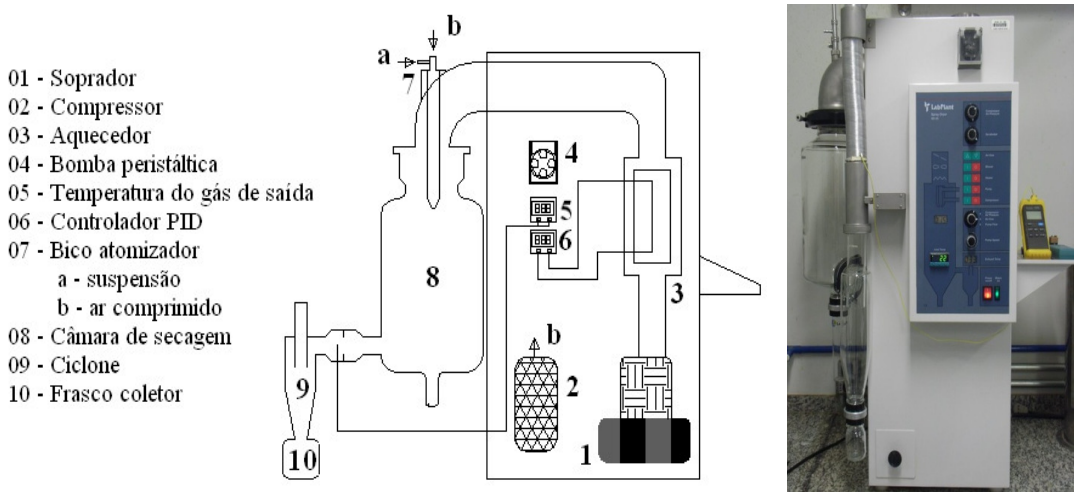


Figura 2.6 – Esquema e foto do *spray dryer* (SD-05 LabPlant) utilizado.

O processo de secagem por aspersão apresenta diversas vantagens, tais como (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; OLIVEIRA *et al.,* 2010):

- seleção do equipamento pode ser feita baseada nas características do produto final;
- controle do tamanho de partículas pelo ajuste dos parâmetros de processo;
- possibilidade de alteração das condições de secagem sem a necessidade de interromper o processo de secagem;
- rápida evaporação do solvente devido a formação de gotículas que aumentam a área superficial do material de entrada o que favorece as trocas de calor no interior da câmara de secagem;
- baixa agressividade ao produto devido ao pequeno intervalo de tempo de contato do material de entrada com a fonte de calor;
- rapidez e rendimento;

- as partículas resultantes apresentam forma esférica uniforme e uma rápida dissolução, devido à grande área específica;
- baixos custos operacionais e de processo e,
- secagem ocorre em condições assépticas evitando possíveis contaminações durante o processamento.

Existem poucas desvantagens na utilização da secagem por *spray dryer* como as grandes dimensões ocupada pelo equipamento de secagem em escala industrial e o custo relativamente alto da aquisição e instalação do equipamento. O alto valor agregado do produto final poderá justificar este ônus inicial (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

2.4 Padronização de extratos e legislação nacional vigente

No Brasil o início da padronização dos medicamentos fitoterápicos surgiu com a primeira portaria mencionando o emprego de fitoterápico como medicamento publicada em 1967. Entretanto, somente a partir da publicação da portaria SVS nº 06 em 1995 é que o fitoterápico passou, categoricamente, a ser encarado como medicamento, e como tal, deveria ser produzido segundo o rigor que todo medicamento exige. Ou seja, deveria ser um produto tecnologicamente obtido e caracterizado pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade, pelo conhecimento da eficácia e dos riscos provenientes do seu uso.

A normatização do registro dos medicamentos fitoterápicos foi disposta na resolução RDC nº 17 publicada em 2000 sendo atualizada pela resolução RDC nº 48 de 2004 que foi atualmente revogada pela RDC 14/10 publicada em 05 de abril de 2010 (BRASIL, 2000; BRASIL, 2004: BRASIL, 2010a).

> *" ...O registro de medicamentos é o instrumento através do qual o Ministério da Saúde, no uso de sua atribuição específica, determina a inscrição prévia do produto no órgão ou na entidade competente, pela avaliação do cumprimento de caráter jurídico-administrativo e técnico-científico relacionada com a eficácia, segurança e qualidade*

destes produtos, para sua introdução no mercado e sua comercialização ou consumo..." (BRASIL, 2010b).

A RDC 14/10 define um medicamento fitoterápico como um produto obtido com o uso exclusivo de matéria-prima ativa vegetal onde a eficácia e segurança são pontos primordiais que devem ser comprovados por meio de levantamento bibliográfico ou pela realização de ensaios clínicos. Além disso, é preconizado que exista uma reprodutibilidade e constância na qualidade do produto final a ser comercializado. Não se podem incluir como medicamentos fitoterápicos as substâncias ativas isoladas e/ou associações destas substâncias isoladas com extratos vegetais (BRASIL, 2010a).

Para garantir a qualidade do medicamento fitoterápico a ser comercializado a RDC 14/10 preconiza a realização de uma série de análises na droga vegetal como ensaios de autenticidade, caracterização organoléptica, identificação macroscópica e microscópica; ensaios de pureza e integridade, método de estabilização, quando empregado, secagem e conservação utilizados, com seus devidos controles, quando cabível, método para eliminação de contaminantes, quando empregado, e a pesquisa de eventuais alterações; avaliação da ausência de aflatoxinas, a ser realizado quando citado em monografia específica em Farmacopéia reconhecida ou quando existir citação em literatura científica da necessidade dessa avaliação ou de contaminação da espécie por aflatoxinas; local de coleta, perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica; análise quantitativa do(s) marcador(es) ou controle biológico (BRASIL, 2010a).

Com relação ao produto derivado vegetal, como por exemplo o extrato seco, deve constar no laudo de análise as seguintes informações: solventes, excipientes e/ou veículos utilizados na extração do derivado; relação aproximada droga vegetal:derivado vegetal; ensaios de pureza e integridade, métodos para eliminação de contaminantes, quando empregado, e a pesquisa de eventuais alterações; caracterização físico-química do derivado vegetal incluindo umidade/perda por dessecação, solubilidade e densidade aparente (para extratos secos); avaliação da ausência de aflatoxinas, a ser realizado quando citado em monografia específica em Farmacopéia reconhecida ou quando existir citação em literatura científica da

necessidade dessa avaliação ou de contaminação da espécie por aflatoxinas; perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica e análise quantitativa do(s) marcador(es) ou controle biológico (BRASIL, 2010a).

Para o produto acabado (medicamento fitoterápico) o relatório de controle de qualidade deve apresentar as seguintes informações: perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica; análise quantitativa do(s) marcador(es) específico(s) de cada espécie ou controle biológico; resultados de todos os testes realizados no controle da qualidade para um lote do medicamento de acordo com a forma farmacêutica solicitada; especificações do material de embalagem primária e controle dos excipientes utilizados na fabricação do medicamento por método estabelecido em Farmacopéia reconhecida (BRASIL, 2010a).

Existem também outras normas que completam as orientações necessárias para o registro correto de um medicamento fitoterápico como a recente IN nº 05/10, que apresenta a "Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos"; a IN 05/08, com a "Lista de fitoterápicos de registro simplificado; RE 90/04, que publicou o "Guia para realização dos testes de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos" entre outras (BRASIL, 2010b).

2.5 Estudos de estabilidade

Um estudo de estabilidade é realizado com o objetivo de assegurar que produtos farmacêuticos apresentem a mesma eficácia até que se encerre o prazo de validade estipulado. Para produtos farmacêuticos em geral é de suma importância a determinação do período de tempo no qual o produto mantém potência e qualidade suficiente para o seu uso (BOTT, 2008). A USP 29 define estabilidade como sendo o tempo no qual um produto retém, dentro dos limites especificados e durante o seu período de estocagem e uso as mesmas propriedades e características que este produto apresentava no momento de sua produção.

Cinco tipos de estabilidade podem ser listados de acordo com a USP 29:

- *Estabilidade química*: o ingrediente ativo mantém a sua potência e integridade química dentro dos limites especificados.

- *Estabilidade física*: as propriedades físicas originais, incluído aparência uniformidade, dissolução, ressuspensão devem se manter.
- *Estabilidade microbiológica*: a esterilidade ou a resistência ao crescimento de microrganismo é mantida de acordo com o requerimento específico. Os agentes antimicrobianos presentes retêm sua efetividade dentro dos limites especificados.
- *Estabilidade terapêutica*: os efeitos terapêuticos permanecem inalterados.
- *Estabilidade toxicológica*: não há nenhum aumento significativo da toxicidade.

No Brasil a ANVISA dispõe da resolução n° 01 de 29 de julho de 2005 (RE 01/05) que estabelece as diretrizes para a realização do estudo de estabilidade de produtos farmacêuticos e fitoterápicos (BRASIL, 2005).

De acordo com a RE 01/05 um estudo de estabilidade é definido como um conjunto de testes projetados para obter informações sobre estabilidade de produtos farmacêuticos visando definir seu prazo validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas.

Para a determinação do prazo de estabilidade preconiza-se a condução dos estudos de estabilidade que serão descritos a seguir:

2.5.1 Estudo de estabilidade acelerado

O estudo de estabilidade acelerada tem como propósito a aceleração de possíveis alterações físicas, químicas e microbiológica que podem ocorrer com uma determinada formulação.

Condições de “stress” que aceleram as mudanças podem ser alterações na temperatura, luz, umidade, agitação, gravidade, pH, embalagem e modo de fabricação. Temperaturas mais elevadas intensificam a perda da estabilidade sendo que o objetivo do “stress” com temperatura é a obtenção de uma estimativa estatisticamente válida do prazo de validade do produto de forma mais rápida que o armazenamento em condições de temperatura ambiente (YOUNG, 1990).

Para a realização do estudo acelerado as amostras devem ser acondicionadas em sua embalagem primária e as mesmas devem permanecer em

câmara climática com temperatura de 40ºC ± 2ºC e umidade relativa de 75% ± 5% por um período de 6 meses. As análises deverão ser realizadas no tempo inicial (T0) após 3 a 6 meses de estudo. Para que seja concedido um prazo de validade de 24 meses para o produto, o ativo não poderá apresentar queda de teor superior a 5%. Caso esta queda fique entre 5,1 e 10% o prazo de validade concedido será de 12 meses (BRASIL, 2005).

2.5.2 Estudo de estabilidade de longa duração

O estudo de estabilidade de longa duração tem como objetivo verificar a manutenção das propriedades físicas, químicas e microbiológicas do produto até o prazo de estabilidade estipulado ou até mesmo em um tempo de análise superior a validade. Para a realização deste estudo as amostras devem ser acondicionadas em sua embalagem primária e as mesmas devem permanecer em câmara climática com temperatura de 30ºC ± 2ºC e umidade relativa de 75% ± 5% por um período que no mínimo seja referente ao prazo de validade do produto. As análises deverão ser realizadas no tempo inicial (T0) e após 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses de estudo. Para o período de 24 meses a queda do marcador não poderá ser maior que 15% do teor inicial desde que seus produtos de degradação não sejam responsáveis por reações adversas e toxicidade, além disso, as demais características físico-químicas e microbiológicas devem ser preservadas (BRASIL 2005).

2.6 Estudo de estabilidade para derivados de plantas medicinais

Apesar dos métodos para ensaio de estabilidade e as rotas químicas de degradação estarem bem definidos para a maioria das substâncias químicas, existe uma carência de estudos sistemáticos sobre a estabilidade de produtos derivados de plantas medicinais (GOPPEL; FRANZ, 2004).

O controle de qualidade de produtos derivados de plantas medicinais é altamente complexo uma vez que todo o conteúdo vegetal é considerado como substâncias ativas, com exceção das plantas onde as substâncias ativas já são amplamente conhecidas e vários estudos já foram realizados para associar a

eficácia a determinada substância. Para que haja maior quantidade de informações vários métodos devem ser utilizados para que diferentes grupos de componentes possam ser avaliados. Análises semi-quantitativas são comumente utilizadas para que a estabilidade do material possa ser demonstrada. Utilizando-se marcadores que possam ser quantificados, a produção e a composição dos produtos de plantas medicinais podem ser controladas (KOLL *et al.,* 2003).

Para se obter um produto fitoterápico nos padrões de qualidade, segurança e eficácia deve-se avaliar um conjunto de fatores que vão além da estabilidade do marcador e levar em consideração os aspectos agronômicos, identificação botânica correta através do depósito da exsicata de uma amostra da planta em herbário especializado (OLIVEIRA *et al*., 2010).

Um importante pré-requisito para a qualidade de um medicamento é a garantia da estabilidade durante todo o tempo definido como prazo de validade. Para os produtos fitoterápicos os mesmos requisitos estabelecidos para drogas sintéticas devem ser seguidos no que diz respeito à qualidade, eficácia e segurança (HEIGL; FRANZ, 2003).

O ensaio de estabilidade do produto final é necessário para comprovar que a composição do produto derivado da planta medicinal permanece constante durante o prazo de validade.

Bott (2008) apresenta uma vasta revisão da literatura sobre o tema estudos de estabilidade de extratos vegetais e propõe protocolos para a avaliação da estabilidade e determinação do tempo de prateleira (*shelf life*) para três espécies medicinais amplamente utilizadas pela população (*Bauhinia forficata*, *Passiflora alata* e *Maytenus ilicifolia*).

2.7 Relevância do tema

A produção de extratos secos padronizados deve respeitar uma seqüência de procedimentos essenciais para a obtenção de um produto com as especificações desejadas, quanto aos critérios de qualidade, segurança e eficácia exigidos para produtos fitoterápicos.

O desenvolvimento de protocolos para obtenção de extratos vegetais padronizados tem inicio pela seleção do material vegetal, sua correta identificação, preparo de soluções extrativas com solventes e condições de extração otimizadas, concentração dos princípios ativos e seleção do método de secagem e adjuvantes mais apropriados para se alcançar um produto final com as especificações tecnológicas e terapêuticas desejadas. Todas as etapas envolvidas durante este procedimento devem ser cuidadosamente avaliadas através de ferramentas analíticas capazes de garantir a qualidade, segurança e eficácia destes produtos derivados de plantas.

Neste contexto, destacam-se com base em informações científicas anteriormente relatadas, as espécies pertencentes ao gênero *Dalbergia* que apresentam grande potencial no fornecimento de moléculas bioativas. Dentre as espécies pertencentes a este gênero pode-se destacar *Dalbergia ecastaphyllum* como uma excelente candidata para a pesquisa e desenvolvimento de extratos padronizados com potencial de aplicação terapêutica. Também atribui-se a esta espécie significativa importância comercial, visto que a própolis vermelha tem origem no exsudado resinoso presente no caule desta espécie.

Nas páginas seguintes, serão abordadas de maneira sistemática todas as etapas envolvidas na obtenção e padronização de extratos secos de *Dalbergia ecastaphyllum*, avaliação de suas propriedades físico-químicas e atividades biológicas (ensaios de atividade antioxidante e antimicrobiana) e desenvolvimento de formas farmacêuticas semi-solidas (emulsões e gel) contendo os extratos secos obtidos. Também serão apresentados os resultados do estudo de estabilidade acelerada para os extratos secos e formas farmacêuticas obtidas.

3. Objetivo

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento, a padronização e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos secos nebulizados de *Dalbergia ecastaphyllum*.

3.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral proposto as seguintes etapas foram realizadas:

- revisão e atualização bibliográfica;
- coleta, identificação e caracterização da matéria-prima vegetal;
- caracterização farmacognóstica do material vegetal e seus extratos;
- desenvolvimento e/ou adaptação de métodos analíticos para caracterização química da espécie medicinal, das soluções extrativas e extratos concentrados (espectrofotometria UV-VIS, cromatografia liquida de alta eficiência - CLAE);
- obtenção de solução extrativa otimizada a partir do delineamento composto central rotacional;
- ensaios de atividade antimicrobiana (utilizando-se cepas padrão de fungos e bactérias) e atividade antioxidante (*in vitro*) com a solução extrativa e extratos secos obtidos em condição otimizada;
- realização de ensaios de secagem em *spray drying* para obtenção dos extratos secos padronizados (avaliação da adição de adjuvantes de secagem);
- caracterização física e química dos produtos secos obtidos;
- avaliação do desempenho do secador (recuperação do produto);
- realização do estudo de estabilidade dos extratos secos avaliando parâmetros como umidade, concentração de ativos e atividade antioxidante;
- obtenção e caracterização de formulações semi-sólidas (emulsões e gel) contendo os extratos secos desenvolvidos.

4. Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

Apresentam-se, nesta seção, os materiais e os métodos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

4.1 Materiais e equipamentos

Materiais

Folhas frescas e folhas secas de *Dalbergia ecastaphyllum* (material testemunho depositado no Herbário da Universidade Federal da Paraiba com registro de número JPB 47286); cloreto de alumínio (LabSynth); ácido pirogálico; acetato de etila (LabSynth), butanol (LabSynth), *n*-hexano (LabSynth), metanol (LabSynth), álcool etílico absoluto (LabSynth); ácido orto-fosfórico (LabSynth); ácido ascórbico; fosfato de sódio (LabSynth); molibdato de amônio (LabSynth), ácido sulfúrico (LabSynth); DPPH (radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazila Sigma-Aldrich); acetato de sódio (LabSynth), carbonato de sódio (LabSynth), ácido fosfomolibídico (LabSynth); molibdato de sódio (Vetec), tungstato de sódio (Vetec); quercetina diidratada (Sigma-Aldrich); hidróxido de sódio (LabSynth), carbopol, glicerina (LabSynth), propilenoglicol, lanette N, palmitato de cetila, óleo mineral, DMDM hidantoína, meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) e RMPI-1640, embalagem laminada (7x7 cm). Todos os reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho possuem grau de pureza pró-análise (PA).

Equipamentos

Os equipamentos citados a seguir foram utilizados na execução e análise dos experimentos relacionados ao trabalho.

Espectrofotômetro UV-Vis HP 8453 operando o *software* HP *Chem-Station*; cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu Prominence, equipado com detector espectrofotométrico de arranjo de diodos SPD-M20A, bombas LC-6AD, injetor de amostra SIL-10AF, controlador de sistema modelo CBM 20A, software LC solution, versão 1.24 SP1; coluna cromatográfica C18 (250 mm x 4,6 mm d.i.) Shimadzu Shim-pack CLC (M); pH-metro Micronal mod. B474; picnômetro; alcoômetro; balanças analíticas e semi-analíticas (Marte e Mettler Toledo); balança

determinadora de umidade Sartorius; bombas de vácuo; estufa de secagem e esterilização com circulação forçada; centrifuga Fanem Excelsa II, Mod. 206-BL; tanque extrator; filtros; evaporador rotativo Fisatom, mod. 802; homogeneizador de alta rotação ultra-turrax IKA mod. T18 basic (6000 a 24000 rpm/min); agitador de peneiras Bertel, com jogo de tamises; medidor de atividade de água AQUALAB 4TEV – Decagon; Titulador de Karl-Fisher mod. 870KF Tritino plus Metrohm; colorímetro HunterLab ColorQuest XE; liofilizador Micromodulyo Thermo-Fisher; *spray dryer* SD-05 da Labplant; difractor de raios-X, Rigaku Rotaflex, mod. RU-200B; microscópio óptico Olympus operando o *software* Image Pro-Plus®; reômetro Brookfield Modelo LV-DV III, tipo cilindros concêntricos, operando o *software* Reocalc®; mesa agitadora orbital MA 140 CFT Marconi e agitadores mecânicos e magnéticos.

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterização da matéria-prima vegetal

4.2.1.1 Preparo da matéria-prima vegetal

A matéria-prima vegetal foi seca em estufa de circulação com temperatura de 40 °C e em seguida foi pulverizada em moinho de facas MARCONI modelo MA 680, utilizando malha 20 (833 µm). O pó obtido foi armazenado em frasco âmbar devidamente rotulado.

4.2.1.2 Determinação do teor de extrativo (TEIXEIRA, 1996)

Alíquotas de 1,0 g do material vegetal foi submetida a decocção em 100 g de etanol 70 % (v/v) durante 10 minutos. Após resfriamento, o peso inicial foi reconstituído com acréscimo de etanol 70 % e filtrado, desprezando-se os primeiros 20 mL. Do restante do filtrado foi pesado uma alíquota de 2 g, em balança de umidade, previamente tarada, e evaporado até secura. O resultado foi expresso pela média de três determinações, utilizando a Equação 01.

$$T_E = \frac{m \cdot FD \cdot 100}{p} \quad (01)$$

Onde: T_E = teor de extrativos (m/m); m = massa do resíduo seco em gramas; p = massa da amostra em gramas (g); FD = fator de diluição.

4.2.1.3 Determinação da perda por dessecação

Para a determinação da perda por dessecação utilizou-se balança de umidade. Pesou-se cerca de 1 g da amostra a ser analisada tomando-se o cuidado de distribuir o material de maneira uniforme pelo prato da balança. Definiu-se que a temperatura de secagem seria de 105 °C por tempo suficiente para que o material fosse completamente seco (massa constante). O aparelho foi então ligado e após o termino da avaliação o valor de perda pro dessecação presente na amostra apareceu no “display” do aparelho. Os resultados foram expressos pela media de três determinações (F. BRAS. V, 2010).

4.2.1.4 Análise granulométrica

Cerca de 100 g das folhas secas e moídas da planta foram submetidas a passagem através de tamises previamente pesados com abertura de malha de 0,600 à 0,075 mm, durante 15 minutos. O resultado foi determinado de acordo com a classificação adotada pela Farmacopéia Brasileira e expressos em porcentagem sobre a quantidade total de matéria-prima vegetal, pela média de quatro determinações (F. BRAS. V, 2010).

4.2.1.5 Análise de flavonoides totais

A metodologia para a dosagem de flavonoides totais por espectrofotometria de UV-Vis foi baseada no método descrito e validado por Souza (2007), que consiste na reação dos flavonoides com o cloreto de alumínio sendo o comprimento de onda deslocado para 425 nm. Em um balão volumétrico de 250 mL de fundo chato foi adicionado 2 g de droga vegetal moída e 30 mL de etanol 70%. O balão ficou em

refluxo por 15 minutos. Seu conteúdo foi filtrado em balão volumétrico de 250 mL utilizando filtro de algodão. Após a filtração foi adicionado mais 30 mL de etanol 70% (v/v) no balão de 250 mL juntamente com o algodão utilizado para a filtração (o algodão após a filtração ficou impregnado com droga vegetal). Este procedimento foi repetido por mais 3 vezes. Após o término do refluxo o balão de 250 mL foi completado para 250 mL com etanol 40% (v/v). Retirou-se 10 mL deste balão transferindo este conteúdo para um balão de 100 mL onde o volume foi completado com etanol 40% (v/v). Transferiu-se 10 mL desta solução diluída para 4 balões de 25 mL identificados como "branco" e amostras 1, 2 e 3. No balão do branco foi completado o volume para 25 mL com etanol 40% (v/v). Nos balões de amostra foi adicionado 2 mL de solução de cloreto de alumínio 0,5 % (p/v) e posteriormente o volume foi completado com etanol 40% (v/v). As amostras ficaram em repouso por 30 minutos e as leituras realizadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 425 nm.

4.2.1.6 Análise de polifenóis totais e taninos totais

A metodologia para a dosagem dos polifenóis totais foi baseada no método de Folin-Denis que consiste na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotungico pelos compostos fenólicos em meio básico produzindo uma coloração azul intensa a qual é mensurada por espectrofotometria em comprimento de onda de 760 nm (SOUZA *et al.*, 2008; BOTT; 2008). Em um balão volumétrico de 250 mL de fundo chato foi adicionado 0,75 g de droga vegetal moída e 100 mL de etanol 70% (v/v) mantendo-se a mistura em refluxo por 30 minutos e em seguida foi resfriado com água corrente. O conteúdo foi transferido para um balão de 250 mL completando-se o volume com água purificada. Em seguida filtrou-se em proveta de 250 mL desprezando os primeiros 20 mL. Foi retirado 20 mL do filtrado e adicionado a 20 mL de água para o preparo da solução mãe. Para a análise de polifenóis totais adicionou-se 5 mL da solução mãe em balão de 25 mL completando em seguida o volume do balão com água purificada. Posteriormente, 1 mL desta solução foi transferida para um tubo de ensaio onde foram adicionados na sequência, 1 mL de reagente de Folin Denis e 8 mL de solução saturada de carbonato de sódio. Após 2 minutos da adição do carbonato de sódio o conteúdo do tubo foi lido em

espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm. A dosagem foi realizada em triplicata e o branco utilizado foi água purificada. Para a análise de taninos totais foi adicionado 0,3 g de caseína em 20 mL da solução mãe. A suspensão ficou em agitação por 1 hora e após este procedimento foi filtrada. Transferiu-se 5 mL do filtrado para um balão de 25 mL sendo o volume final completado com água destilada. Em seguida 1 mL desta solução foi transferida para um tubo de ensaio onde foram adicionados na sequência, 1 mL de reagente de Folin Denis e 8 mL de solução saturada de carbonato de sódio. Após 2 minutos da adição do carbonato de sódio o conteúdo do tubo foi lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm. A dosagem foi realizada em triplicata e o branco utilizado foi água purificada. A concentração de taninos totais foi determinada pela diferença entre a concentração de polifenóis da amostra antes da precipitação com caseína e após a precipitação.

4.2.1.7 Prospecção fitoquímica (COSTA, 2005)

Os ensaios para análise fitoquímica qualitativa da droga vegetal moída foram realizados através de reações gerais para: flavonoides (cloreto de alumínio/UV, cloreto férrico, e reação de Shinoda), taninos (precipitação com acetato de chumbo, sulfato de quinino, solução de gelatina, e reação com cloreto férrico), cumarinas (NaOH/UV), saponinas (índice de espuma), alcaloides (precipitação com reagentes de Dragendorff e de Mayer) e antraquinonas (reação de Borntraeger).

4.2.2 Obtenção da solução extrativa – estudo de otimização da extração

As soluções extrativas foram preparadas a partir das folhas secas e moídas de *Dalbergia ecastaphyllum* utilizando o método de maceração dinâmica e como líquido extrator o etanol 70 % (v/v). Foram avaliados vários fatores, como por exemplo: proporção planta:solvente extrator, temperatura e tempo de extração. De forma a se obter um extrato otimizado com o menor número de experimentos foi utilizado um planejamento composto central (PCC) seguido de análise multiresposta.

4.2.2.1 Caracterização das soluções extrativas

As soluções extrativas obtidas foram filtradas em sistema de filtração a vácuo que consiste de um funil de Büchner (com papel de filtro) acoplado a um kitassato e conectado a uma bomba de vácuo. As soluções extrativas obtidas foram analisadas quanto ao teor de sólidos, pH, densidade relativa, teor de princípios ativos (flavonoides totais), e avaliação do potencial antioxidante através do método de seqüestro do radical DPPH e da formação do complexo fosfomolibdênio segundo metodologias descritas a seguir.

Determinação do resíduo seco (teor de sólidos)

O teor de sólidos totais (resíduo seco) foi determinado pelo método da balança de umidade. Pesou-se cerca de 2 g da amostra a ser analisada tomando-se o cuidado de distribuir o material de maneira uniforme pelo prato da balança. A partir deste momento definiu-se que a temperatura de secagem seria de 105 °C por tempo suficiente para que o material fosse completamente seco. O aparelho foi então ligado e após o termino da avaliação o valor de perda por dessecação presente na amostra apareceu no “display” do aparelho. Os resultados foram expressos pela media de três determinações (F. BRAS. V, 2010).

Determinação do pH

A determinação do pH das soluções extrativas foi realizada em potenciômetro calibrado com soluções tampão de fosfato e acetato, em pH 7,0 e 4,0, respectivamente. O resultado foi expresso pela média de três determinações (F. BRAS. V, 2010).

Determinação da densidade relativa

A densidade relativa das soluções extrativas foi determinada por picnometria utilizando um picnômetro de 10 mL, a 20°C, sendo os resultados expressos pela média de três determinações (F. BRAS. V, 2010).

Análise de flavonoides totais

A dosagem de flavonoides totais da solução extrativa também seguiu a metodologia para a dosagem de flavonoides totais por espectrofotometria de UV-Vis descrita e validada por Souza, 2007. Adicionou-se em balão de 100 mL a massa de extrato que corresponderia a 500 mg de sólidos. Foi adicionado a este extrato aproximadamente 80 mL de etanol 40% (v/v) sendo o conteúdo mantido em ultrassom por 5 minutos e depois completado para 100 mL. Após este procedimento o material foi filtrado (sendo os primeiros 30 mL descartados). Foi adicionado em balão de 100 mL, 10 mL do material filtrado e o volume do balão completado com etanol 40% (v/v). Tranferiu-se 10 mL desta solução diluída para 4 balões de 25 mL identificados como "branco" e amostras 1, 2 e 3. No balão do branco foi completado o volume para 25 mL com etanol 40% (v/v). Nos balões de amostra foi adicionada 2 mL de solução reagente de cloreto de alumínio (0,5% p/v) e posteriormente o volume foi completado com etanol 40% (v/v). A absorbância da solução amostra foi medida em espectrofotômetro a 425 nm após 30 minutos de reação. O teor de flavonoides totais foram expressos em relação a quercetina pela media de três determinações.

Avaliação do potencial antioxidante das soluções extrativas

Para a avaliação do potencial antioxidante das soluções extrativas obtidas pelo planejamento experimental empregou-se duas diferentes metodologias: determinação da atividade seqüestradora de radicais livres usando uma solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil ($DPPH^{\bullet}$) segundo Georgetti *et al*., (2006) e através do método de formação do complexo do fosfomolibdênio (PRIETO *et al*., 1999). Os resultados obtidos para as soluções extrativas em ambos os métodos de análise

foram comparados com substâncias padrão de reconhecido poder antioxidante (quercetina; acido gálico e acido tânico).

Atividade seqüestradora de radicais DPPH

O método para determinação da atividade antioxidante usando-se o radical DPPH (1,1-difenil-1,2-picrilhidrazina) é amplamente utilizado para seleção de extratos de plantas com potencial atividade antioxidante. Esses extratos, geralmente são ricos em substâncias seqüestradoras de radicais livres, como os flavonoides e polifenóis (LU; FOO, 2001). A redução do DPPH foi determinada pela mudança na absorvância medida em 517 nm, de acordo com a metodologia descrita por Blois (1958). A solução extrativa (10 µL), em diferentes diluições, em etanol, foi adicionada no meio reacional contendo 1 mL de tampão acetato 0,1 M, pH 5,5, 1 mL de etanol P.A., e 0,5 mL de solução etanólica de DPPH na concentração de 250 µM. A mudança da absorvância foi medida a 517 nm depois de 20 min de reação, em temperatura ambiente. Foi utilizada uma solução contendo 1 mL de tampão acetato 0,1 M, pH 5,5, 1,5 mL de etanol P.A. como branco, e uma solução contendo 1 mL de tampão acetato 0,1 M, pH 5,5, 1,0 mL de etanol P.A. e 0,5 mL de solução de DPPH a 250 µM em etanol como controle positivo. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A concentração da solução extrativa necessária para atingir 50 % de atividade sequestrante de radicais DPPH, foi considerada como sendo a IC_{50}, e seu valor foi determinado com o auxílio do *software* GraphPad Prism®.

Formação do complexo fosfomolibdênio

O método de formação do complexo fosfomolibdênio é um método espectrofotométrico de quantificação da capacidade antioxidante, baseado na redução do Mo(VI) a Mo(V) em presença de substâncias com capacidade antioxidante e a subseqüente formação de um complexo verde de fosfato/Mo(V) em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente a 695 nm (PRIETO *et al.,* 1999).

Uma alíquota de 0,3 mL da amostra das soluções extrativas foi adicionada em um tubo de ensaio com 3 mL de solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato

de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). Os tubos de ensaio foram tampados e incubados em banho-maria a 95 ºC por 90 min, juntamente com o branco. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e mediu-se a absorvância a 695 nm, usando-se como branco uma solução com 0,3 mL de água e 3 mL de solução reagente. Para a análise das soluções extrativas provenientes do planejamento experimental a atividade antioxidante foi expressa em relação a atividade do ácido ascórbico, à concentração de 200 µg/mL, equivalente a 18,2 µg/mL no meio reacional, a qual foi considerada como sendo 100 % de atividade. Todas as análises realizadas em triplicata.

Para a realização da curva foi realizada uma análise com 3 concentrações de sólidos do extrato sendo que cada concentração foi realizada em triplicata.

4.2.2.2 Caracterização da solução extrativa otimizada

A solução extrativa otimizada obtida pela análise do planejamento experimental foi caracterizada quanto ao teor de sólidos, pH, densidade relativa, teor de flavonoides totais, e avaliação do potencial antioxidante através do método de seqüestro do radical DPPH e da formação do complexo fosfomolibdênio (resultados não utilizados para otimização do processo extrativo) segundo metodologias descritas no item 4.2.2.1 (Caracterização das soluções extrativas). A solução extrativa otimizada também foi analisada quanto ao teor de polifenóis e taninos totais (análises não foram realizadas para as soluções extrativas obtidas no estudo de otimização).

Análise de polifenóis totais e taninos totais

A metodologia de análise de polifenóis totais e taninos totais utilizada foi padronizada e validada por Bott (2008).

Para a análise de polifenóis totais adicionou-se a massa de extrato correspondente a 50 mg de sólidos em balão de 50 mL, completando o volume do balão com água purificada. O balão foi então submetido a ultrassom por 10 minutos, após este tempo filtrou-se o conteúdo completo do balão obtendo-se assim a solução mãe. Transferiu-se 5 mL da solução mãe para um balão de 25 mL e o

mesmo foi completado com água purificada. Posteriormente retirou-se 2 mL desta amostra a qual foi transferida para um tubo de ensaio âmbar onde também foram adicionados na sequência 2 mL de reagente de Folin Denis e 16 mL de solução saturada de carbonato de sódio. Após 2 minutos da adição do carbonato de sódio o conteúdo do tubo foi lido em espectrômetro no comprimento de onda de 750 nm. A análise foi realizada em triplicata e o branco utilizado foi água purificada.

Para a análise de taninos totais retirou-se 20 mL da solução mãe e adicionou-se 0,3 g de caseina. A suspensão ficou em agitação por 1 h e após este tempo foi filtrada e foram adicionados 5 mL do filtrado em balão de 25 mL completado com água purificada. Posteriormente retirou-se 2 mL do desta amostra a qual foi transferida para um tubo de ensaio âmbar onde também foram adicionados na sequência 2 mL de reagente de Folin Denis e 16 mL de solução saturada de carbonato de sódio. Após 2 minutos da adição do carbonato de sódio o conteúdo do tubo foi lido em 750 nm. A dosagem foi realizada em triplicata e o branco utilizado foi água purificada. A concentração de taninos totais foi terminada pela diferença entre a concentração de polifenóis da amostra antes da precipitação com caseína e após a precipitação.

4.2.3 Produção do segundo lote de solução extrativa de *D. ecastaphyllum*

Um processo de extração em maior escala foi realizado para obter-se material suficiente para o prosseguimento do trabalho (etapa de secagem).

As condições de extração otimizadas pelo planejamento experimental foram utilizadas para a obtenção da solução extrativa otimizada. O método extrativo utilizado foi maceração dinâmica em um extrator encamisado com aquecimento e agitação. A velocidade de agitação foi mantida constante em 200 rpm. O solvente extrator empregado foi uma solução de etanol 70% (v/v) e a massa de planta/massa de solvente foi de 0,2.

Adicionou-se 8 litros de etanol 70 % (v/v) em reator de inox e ajustou-se a temperatura para 50 ºC. Quando a temperatura foi atingida a droga vegetal moída foi adicionada ao solvente sob agitação sendo que a solução extrativa foi preparada com 90 minutos. Após este procedimento a solução extrativa foi filtrada obtendo-se 5 litros de extrato. Para recuperar os 3 litros de solução extrativa que ficaram retidas

na droga vegetal foi adicionado ao resíduo molhado 3 litros de etanol 70% (v/v) sendo este material agitado manualmente apenas para se retirar o extrato retido. Em seguida a solução foi filtrada a vácuo e armazenada em geladeira.

A solução extrativa foi concentrada, com base no teor de sólidos obtido até uma concentração de sólidos de, aproximadamente 20 %. A etapa de concentração foi realizada em um evaporador rotativo Fisatom, modelo 802, com temperatura não excedendo 50 ^{o}C e vácuo de 700 mm Hg.

Para a caracterização deste segundo lote produzido foram realizadas análises de sólidos totais, pH, densidade, flavonoides totais, polifenóis totais, taninos totais, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), atividade antioxidante e atividade antimicrobiana segundo as metodologias descritas nos itens 4.2.2.1, 4.2.2.2 e 4.2.3. Este lote foi utilizado para os experimentos de partição e produção dos extratos secos.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

No presente trabalho foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu Prominence, equipado com detector espectrofotométrico de arranjo de diodos SPD-M20A, interface CBM-20A, bombas LC-6AD, injetor de amostra SIL-10AF, e *software* LC solution, versão 1.24 SP1. Usou-se uma coluna cromatográfica C18 (250 mm x 4,6 mm d.i.) Shimadzu Shim-pack CLC (M), empacotada com partículas de sílica esférica e porosa de 5 µm, com superfície quimicamente modificada. A coluna foi eluida usando gradiente linear de água/ácido fórmico, 99:1, v/v, pH 2,88 (solvente A) e metanol (solvente B), iniciando com 10% de B passando para 30% de B (0 - 3 min), permanecendo em 40% de B (3-16 min), passando para 50% de B (16-35 min), passando para100% de B (35-37 min) permanecendo em 100% de B (37-42 min), diminuindo para 10% de B (42-44 min) e mantendo-se em 10% de B (44-50 min). A vazão empregada foi de 1mL/min e o volume de amostra injetado foi de 20 µL.

Avaliação da atividade antimicrobiana da solução extrativa otimizada

A atividade antimicrobiana e os ensaios da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da solução extrativa foram determinadas através da técnica

de microdiluição em placa, seguindo normas CLSI com alterações utilizando-se de cepas padrão de fungos e bactérias (ANIBAL, 2007; SCORZONI *et al*., 2007; TELLES; MOSCA, 2000).

Os ensaios para determinação da atividade antimicrobiana foram realizados com a solução extrativa otimizada lote 002 para os seguintes microrganismos *Candida albicans, Candida krusei, (*M27-A2, The National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS, 2002a), *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* (M38-A, NCCLS 2002b), *Staphylococcus aureus e Escherichia coli* (M7-A6, NCCLS 2003). Os ensaios foram realizados no Laboratório de microbiologia da unidade de biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

Ensaios para bactérias

O meio de cultivo Muller Hintonfoi utilizado para a realização dos ensaios para bactérias. A suspensão inicial do inóculo foi preparada em solução salina 0,95% através da leitura da suspensão em espectrômetro UV-VIS em comprimento de onda de 550 nm realizando ajuste da suspensão para absorvância entre 0,1 e 0,125 nm. Em seguida a suspensão foi diluída 50 vezes em meio de cultura para a obtenção de um inóculo de concentração igual a 1-5x10^5 UFC/mL. As cepas utilizadas foram *Staphylococcus aureus (*ATCC 6538*) e Escherichia coli (*ATCC 25922*).* A solução extrativa otimizada foi seca e reconstituída com etanol absoluto para uma concentração de 2,5 mg/mL.

Alíquota de 50 µL de solução da amostra a ser analisada foi depositada no primeiro poço da placa de microdiluição. Em seguida adicionou-se 150 µL de meio de cultura no poço 1, 100 µL de meio nos poços 2-10, 200 µL de meio no poço 11 (controle negativo) e 100 µL de meio no poço 12 (controle positivo). Para a realização da microdiluição seriada transferiu-se 100 µL do poço 1 para o 2 homogeneizando em seguida, 100 µL do poço 2 para a 3 e assim sucessivamente até que 100 µL foram então descartados no poço 10 para a realização do controle do extrato. Foi inoculado 100 µL da suspensão microbiana nos poços 1 a 9 e 12. Também foi realizado um ensaio com o antibiótico gentamicina para comparação com a solução extrativa.

A microplaca foi incubada a 37 ºC durante 24 horas. A leitura foi realizada após a adição de 25 µL da solução de 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) a 5 mg/mL. Microrganismos vivos reduzem o TTC por reação enzimática originando formazan que fica no interior das células que se tornam vermelhas, desta maneira o poço que apresentar bactérias viáveis irá ser revelado com coloração avermelhada (BELOTI, 1999).

Foi considerada como Concentração Inibitória Mínima (CIM), a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 99,99% das bactérias. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata.

Ensaios para leveduras

O meio de cultivo utilizado para ensaio com leveduras foi o caldo RPMI-1640 GIBCO BRL® (Life Technologies, Grand Island, EUA), com glutamina, sem bicarbonato de sódio, suplementado de glicose e tamponado com MOPS a pH 7,0 (NCCLS, 2002a).

A suspensão inicial do inóculo foi preparada em solução salina 0,95% através da leitura da suspensão em espectrômetro UV-VIS em comprimento de onda de 530 nm realizando ajuste da suspensão para absorvância entre 0,125 e 0,150 nm. Em seguida a suspensão foi diluída 20 vezes e desta solução, realizou-se nova diluição 50 vezes em meio de cultura RPMI para a obtenção de um inóculo de concentração igual a $1\text{-}5 \times 10^4$ UFC/mL. As cepas utilizadas foram *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida krusei* (ATCC 6258).

A solução extrativa otimizada foi seca e reconstituída com etanol absoluto para uma concentração de 2,5 mg/mL.

Alíquota de 50 µL de solução da amostra a ser analisada foi depositada no primeiro poço da placa de microdiluição. Em seguida adicionou-se 150 µL de meio de cultura no poço 1, 100 µL de meio nos poços 2-10, 200 µL de meio no poço 11 (controle negativo) e 100 µL de meio no poço 12 (controle positivo). Para a realização da microdiluição seriada transferiu-se 100 µL do poço 1 para o 2 homogeneizando em seguida, 100 µL do poço 2 para a 3 e assim sucessivamente até que 100 µL foram então descartados no poço 10 para a realização do controle do extrato. Foi inoculado 100 µL da suspensão de cada microrganismo nos poços 1

a 9 e 12. Também foi realizado um ensaio com fluconazol para comparação com a solução extrativa.

As microplacas foram incubadas a 35 ºC durante 48 horas. A leitura foi realizada visualmente, comparando-se o crescimento no poço controle positivo, com os demais poços referentes as concentrações dos extratos analisados.

Foi considerada como Concentração Inibitória Mínima (CIM), a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 99,99 % das leveduras. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata.

Ensaios para dermatófitos

O meio de cultivo utilizado foi o caldo RPMI-1640 GIBCO BRL® (Life Technologies, Grand Island, EUA), com glutamina, sem bicarbonato de sódio, suplementado de glicose e tamponado com MOPS a pH 7,0 (NCCLS, 2002b).

A suspensão final do inóculo foi preparada em solução salina (0,85 %) esterilizada, utilizando-se cultura de 7 dias. Foram adicionados 2 mL de solução salina e a seguir com o auxílio de um *swab* estéril, os conídios foram removidos por meio de raspagem do micélio aderido ao meio de cultura. A mistura foi transferida para um tubo cônico esterilizado e o volume completado para 5 mL. A seguir, o inóculo foi ajustado por contagem de conídios através da leitura da suspensão em espectrômetro UV-VIS em comprimento de onda de 530 nm realizando ajuste da suspensão para absorvância entre 0,125 e 0,150 nm que equivale a 1-5 x 10^6 UFC/mL. A viabilidade e a pureza do inóculo foram controladas por cultivo de alíquotas de suspensão em placas de ágar Sabouraud, incubadas a 28 ºC durante 7 dias. As cepas utilizadas foram *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533) e *Microsporum canis* (ATCC 32903).

As soluções extrativas e montagem das placas foram preparadas conforme descrito para o ensaio para leveduras.

As microplacas foram incubadas a 28 ºC, durante 5 dias. A leitura foi realizada visualmente, comparando-se o crescimento no poço controle positivo com os demais poços referentes as concentrações dos extratos analisados.

Foi considerado CIM, a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 99,99 % dos dermatófitos. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata.

4.2.3.1 Partição da solução extrativa otimizada (extrato bruto)

A metodologia desenvolvida para realizar a partição do extrato visou a princípio obter fração rica em polifenóis, desta maneira optou-se por trabalhar com solventes de elevada polaridade como acetato de etila e butanol. De acordo com Compagnome *et al.,* (2008) flavonoides glicosilados e bioflavonoides foram isolados de *Clusia columnaris* a partir das frações acetato de etila e butanol. Em trabalho realizado com folhas de *Cissus verticillata* obteve-se como composto ativo na fração acetato de etila o resveratrol (SILVA *et al.*, 2008). Em contrapartida foi observada a extração de taninos na forma ácido gálico e galocatequina na fração acetato de etila em *Stryphnodendron* (LOPES *et al*., 2009). Análises realizadas com a fração butanólica de *Struthanthus vulgaris* detectaram a presença de flavonoides e taninos (VIEIRA *et al*., 2005). Isoflavonoides glicosilados de *Dalbergia sissoo* foram isolados a partir da fração butanólica (FARAG *et al*., 2001).

A partição da solução extrativa otimizada (extrato bruto) de *D. ecastaphyllum* foi realizada conforme descrito no esquema apresentado na Figura 4.1.

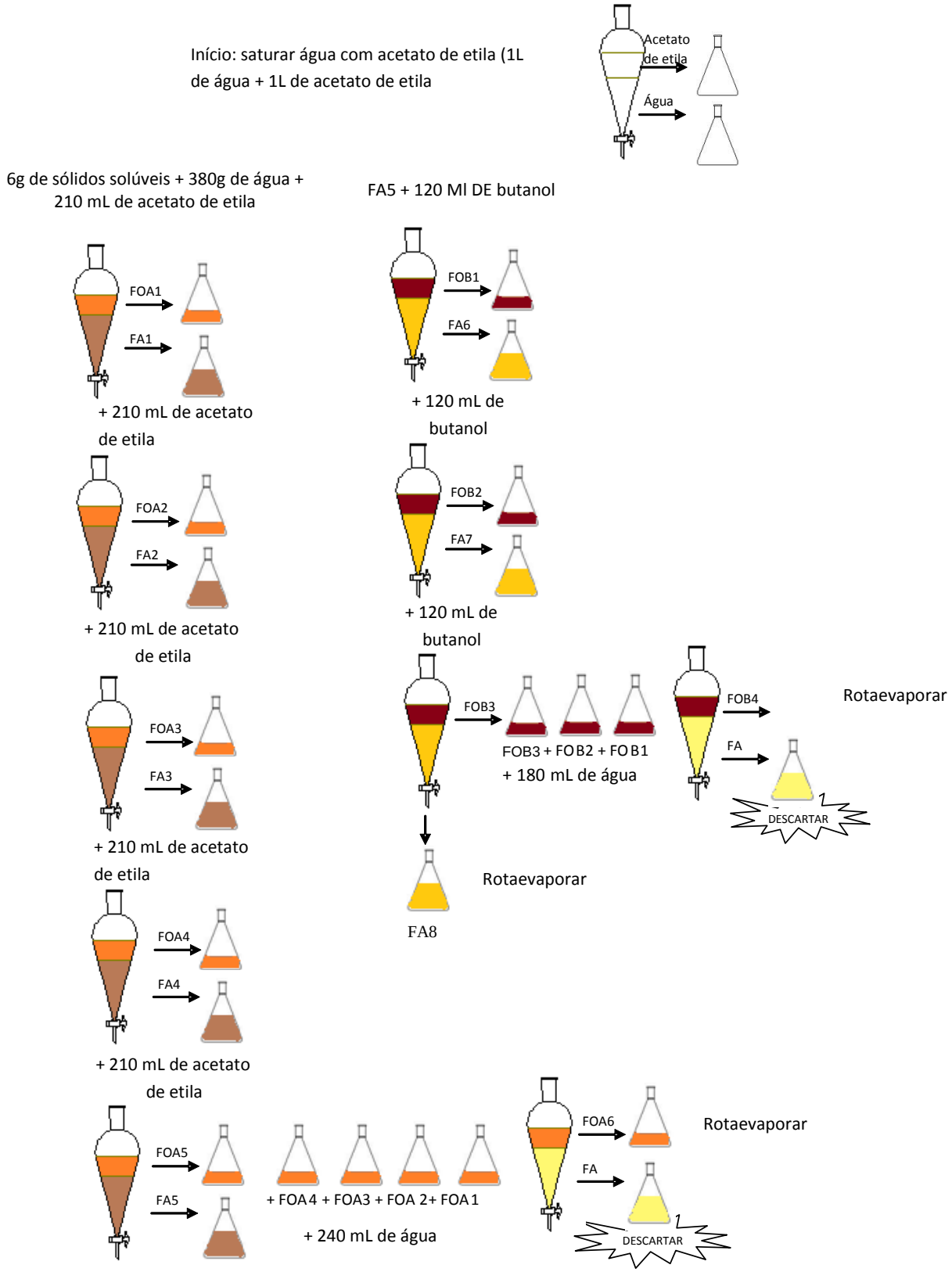


Figura 4.1 – Esquema representativo da partição realizada com a solução extrativa otimizada de *D. ecastaphyllum*.

Análises das frações obtidas pela partição

As frações obtidas pela partição da solução extrativa otimizada foram caracterizadas pelo teor de flavonoides totais, polifenóis totais, taninos totais, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e pela obtenção de *fingerprints* por cromatografia liquida de alta eficiência segundo as metodologias descritas nos itens 4.2.2.1, 4.2.2.2 e 4.2.3.

4.2.4 Preparo da solução extrativa da própolis vermelha

A própolis vermelha tem sua origem no exsudado do caule de *Dalbergia ecastaphyllum* e com base nesta informação propôs-se a obtenção de uma solução extrativa de própolis vermelha para ser utilizada como comparação dos resultados obtidos para os extratos de folhas de *D. ecastaphyllum*.

Para o preparo da solução extrativa da própolis vermelha foi adicionado 4 litros de etanol 80% (v/v) no extrator de aço inox e quando a temperatura do solvente atingiu 70°C foi adicionado 40 g da própolis vermelha previamente triturado (própolis coletado em setembro de 2009). O tempo de extração foi de 30 minutos. Após este tempo a solução extrativa obtida foi filtrada e armazenada em geladeira.

4.2.4.1 Caracterização da solução extrativa da própolis vermelha

A solução extrativa da própolis vermelha foi caracterizada quanto ao teor de sólidos, pH, densidade relativa, pelo teor de flavonoides totais, polifenóis totais, taninos totais, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana segundo as metodologias descritas nos itens 4.2.2.1, 4.2.2.2 e 4.2.3.

4.2.5 Preparo do extrato glicólico da própolis vermelha

Para o preparo do extrato glicólico da própolis vermelha a solução foi concentrada em evaporador rotativo com temperatura de 50°C e pressão reduzida de 700 mmHg até a secura. Após este procedimento o resíduo seco foi ressuspendido com propilenoglicol para que a concentração final de sólidos do extrato glicólico fosse de 10% (p/v).

4.2.5.1 Caracterização do extrato glicólico da própolis vermelha

O extrato glicólico da própolis vermelha foi caracterizado quanto ao pH, densidade relativa, teor de flavonoides totais, polifenóis totais, taninos totais, e atividade antioxidante, segundo as metodologias descritas nos itens 4.2.2.1 e 4.2.2.2.

4.2.6 Obtenção do extrato seco nebulizado

Para a avaliação dos parâmetros operacionais a serem empregados na secagem em *spray drying* foram realizados dois ensaios de secagem preliminar a partir da solução extrativa otimizada de *D. ecastaphyllum*.

Os adjuvantes de secagem escolhidos para esta avaliação foram o dióxido de silício coloidal – aerosil – (formulação DE 002) e maltodextrina – Mor Rex DE 1910 – (formulação DE 003). Foi utilizado o *spray dryer* de bancada, modelo SD 05, fabricado pela LAB-PLANT, Reino Unido. Os parâmetros operacionais foram fixados em: temperatura do ar de secagem, T_{ge} = 140 ºC, temperatura do ar de saída, T_{gs} = 100 °C, vazão do ar de secagem, W_g = 60 m^3/h, vazão de alimentação do extrato, W_{susp} = 4 g/min, pressão do ar de atomização, P_{atm} = 1,5 bar e vazão do ar de atomização, W_{atm} = 15 lpm.

Após a avaliação dos resultados desta primeira secagem foram realizados os demais ensaios de secagem para a obtenção de extratos secos a partir da solução extrativa concentrada de *D. ecastaphyllum* e da própolis vermelha mantendo-se os parâmetros operacionais (condições descritas anteriormente) e variando o tipo e a concentração dos adjuvantes de secagem utilizados de acordo com a Tabela 4.1. Os adjuvantes de secagem selecionados para este trabalho foram:

- Aerosil 200 – dióxido de silício coloidal (Degussa Brasil Ltda)
- Maltodextrina Mor Rex 1910 – amido de milho parcialmente hidrolisado (Corn Produts do Brasil)
- Beta ciclodextrina (Kleptose) – oligossacarídio cíclico derivado da hidrólise enzimática do amido comum (Roquette, França)

Tabela 4.1 – Formulações utilizadas para a produção dos extratos secos.

COD.	S (%)	MD (%)	DSC (%)	P80 (%)	BCD (%)
DE 002	75	25	-	-	-
DE003	75	-	25	-	-
DE 004	75	12,5	12,5	-	-
DE 005	75	12,5	12,5	1,0	-
DE 006	50	25	25	-	-
DE 007	20	-	-	-	80
PV 002	20	-	-	-	80
PV 003	20	40	40	0,5	-

S: sólidos provenientes do extrato; MD: maltodextrina (Mor Rex1910); DSC: dióxido de silício coloidal (aerosil); P80: polisorbato 80 (Tween 80); BCD: beta ciclodextrina

4.2.6.1 Caracterização dos extratos secos

Os extratos secos obtidos foram caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas: umidade residual, atividade de água, solubilidade, teor de flavonoides totais, polifenóis totais e taninos totais, perfil cromatográfico por CLAE, distribuição granulométrica, índices de fluidez e acomodamento dos pós (densidade bruta, densidade de compactação, índice de Carr e fator de Hausner), morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV), cristalinidade dos extratos secos por difração de raios-x e análise colorimétrica. Os extratos secos também foram avaliados quanto a sua atividade biológica através da determinação do potencial antioxidante pelo método da atividade seqüestradora de radicais livres ($DPPH^{\bullet}$). As metodologias empregadas para estas determinações encontram-se descritas a seguir.

Umidade residual

A análise de umidade foi realizada pelo método de titulação por Karl Fischer em equipamento Karl-Fischer, modelo 870 KF Tritino-plus (Metrohm), utilizando-se amostra de aproximadamente 100 mg de extrato seco para cada determinação. As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em media e desvio padrão.

Atividade de água

A atividade de água foi obtida pelo aparelho AQUALAB 4TEV – Decagon, pela técnica do ponto de orvalho, a 25 ºC. As análises foram realizadas em triplicata e expressa pela média e desvio padrão.

Solubilidade

Para a avaliação da solubilidade do extrato seco adicionou-se uma parte do mesmo em partes de água purificada correspondentes a descrição da Farmacopéia Brasileira (2010), de acordo com a Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Termos descritivos e classificação de solubilidade (F. BRAS. V, 2010).

SOLVENTE	DESCRITIVO
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10 000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10 000 partes

Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado segundo o método de dosagem descrito em 4.2.2.1, mantendo a mesma concentração de sólidos utilizada na análise da solução extrativa.

Determinação do teor de polifenóis e taninos totais

O teor de polifenóis e taninos totais foi determinado segundo o método de dosagem descrito em 4.2.2.2, mantendo a mesma concentração de sólidos utilizada na análise da solução extrativa.

Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

Amostras de extrato seco de *D. ecastaphyllum* foram diluídas em metanol/água ultra-pura MilliQ na proporção 40/60 (v/v) para concentração de 2 mg/mL (base seca) mantidas sob agitação em agitador multi-provas por 60 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante filtrado por seringas com unidades filtrantes de politetrafluoroetileno de 0,45 μm e acondicionadas em frascos de vidro para CLAE.

Todas as análises foram realizadas seguindo o método descrito em no item 4.2.3.

Distribuição granulométrica

A distribuição granulométrica do produto seco foi determinada dispersando-se uma amostra do pó em uma lâmina de vidro e obtendo-se imagens com o auxilio de um microscópio óptico (Olympus® – modelo BX60MIV). As fotos obtidas foram analisadas por um sistema de análise de imagens, *Image Pro-Plus 7.0*® (CORDEIRO; OLIVEIRA, 2005).

Índices de fluidez e acomodamento dos pós

Os extratos secos foram analisados quanto aos índices de compactação (densidade aparente e de compactação, fator de Hausner e índice de Carr) que são características de extrema importância para o processamento tecnológico de materiais presentes na forma de pós. Os métodos utilizados estão descritos a seguir.

Densidade bruta e de compactação: 10 gramas dos extratos secos foram pesados, separadamente, e transferidos para proveta de 50 mL para medida do volume ocupado pelo pó e determinação de sua densidade bruta. A densidade de compactação foi determinada em triplicata. O pó contido na proveta foi submetido a 1250 quedas (PRISTA *et al.,* 1995).

Determinação do Fator de Hausner: *o* fator de Hausner (FH) foi determinado através do quociente entre as densidades de compactação e bruta dos extratos secos, conforme Equação 02 (PRISTA, 1995), onde, ρc = densidade de compactação (g/ml), e ρb = densidade bruta (g/ml).

$$FH = \frac{\rho c}{\rho b} \qquad (02)$$

Determinação do índice de Carr: o índice de Carr (IC) foi determinado segundo Equação 03 (PRISTA et al., 1995), onde, ρc = densidade de compactação (g/ml), e ρb = densidade bruta (g/ml).

$$IC = \frac{\rho c - \rho b}{\rho c} x100 \qquad (03)$$

Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Análises da forma e das características superficiais das amostras de extrato seco foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura empregando-se microscópio eletrônico de varredura (Zeiss mod. EVO50), com atmosfera de vácuo de 10^{-5} torr. Inicialmente as amostras foram metalizadas através do recobrimento com ouro. As amostras foram colocadas sobre um porta-amostras de alumínio, presas por fita dupla face a base de carbono, da marca Nisshin. Em seguida, as amostras foram introduzidas no Spouter coater Bal-Tech, modelo SCD 050 para recobrimento com ouro (120 segundos, vácuo 2.10^{-2} mbar, corrente 40 mA). Todas as imagens foram geradas no modo topográfico a 20kV (detector de elétrons secundário).

Difração de raios-X

Amostras de extrato seco foram colocadas em um suporte para amostras pulverulentas e a superfície fechada por uma lâmina de vidro. As medidas foram obtidas por um difractor de raios-X marca RIGAKU ROTAFLEX, modelo RU-200B, com câmara de difração multi-propósito em radiação de CuKα com comprimento de onda de 1,542 Å em voltagem de 50 kV de potência e corrente de 100 mA. As amostras foram examinadas em ângulos de 10 a 40° em 2θ, com incremento de 0,02° (1,2°/min) (BOTT, 2008).

Análise colorimétrica

Para a realização da análise colorimétrica as amostras diluídas em etanol 30% (v/v) foram submetidas a leitura em colorímetro Colorquest XE (HunterLab, Reston Virginia, EUA) em modo transmitância (TTRAN), com um ângulo de 10° e iluminante D65, obtendo-se desta maneira os valores de L* (luminosidade), a* (índice de saturação vermelho) e b* (índice de saturação amarelo). A Figura 4.2 apresenta um digrama de cores do sistema CIELAB.

Os valores de L*, a* e b* matematicamente combinados foram utilizados para calcular o ângulo hue e Chroma segundo as equações a seguir (ARIAS *et al.,* 2000):

hue = tan-1 (b*/a*), quando a* > 0 e b* ≥ 0

hue = 180 + tan-1 (b*/a*), quando a* < 0

Chroma = (a*2 + b*2)1/2

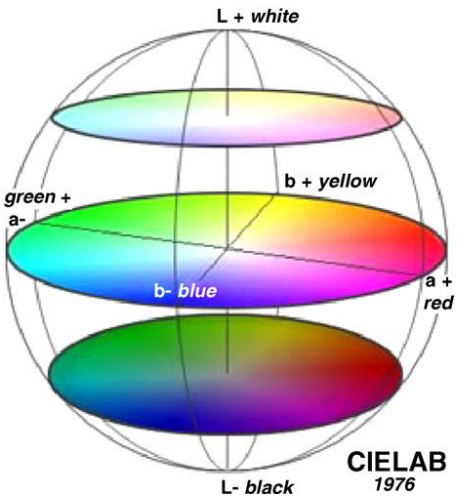


Figura 4.2 – Diagrama de cores do Sistema CIELAB.

Avaliação do potencial antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos foram realizadas pela determinação da atividade seqüestradora de radicais livres usando uma solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil ($DPPH^{\bullet}$) (GEORGETTI *et al*., 2006). Para as análises foram preparadas soluções com os extratos secos nas concentrações de 17 mg/mL de sólidos diluídas em etanol/água (70% v/v) sendo que a descrição do método encontra-se no item 4.2.2.1.

4.2.7 Estudo de estabilidade dos extratos

Visando atender alguns pontos descritos na RDC 14/10 que versa sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, realizou-se um estudo de estabilidade dos extratos secos obtidos a partir da solução extrativa de *D. ecastaphyllum*. Também foi

realizado um estudo de estabilidade comparativo entre o extrato glicólico e extrato seco obtido a partir da solução extrativa da própolis vermelha.

Para a realização deste estudo os extratos secos foram acondicionados em embalagem primária laminada de 7x7 cm e o extrato glicólico foi acondicionado em frasco de vidro âmbar de 10 mL.

Todas as amostras foram submetidas as condições de estabilidade preconizadas pela RE n° 1, de 29 de julho de 2005 (BRASIL, 2005): 40ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5% (estudo acelerado), e 30ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5% (estudo de longa duração).

As análises foram realizadas no tempo 0 e 3 meses (estudo de longa duração e acelerado).

4.2.7.1 Parâmetros monitorados no estudo de estabilidade

A cada tempo de amostragem para os extratos secos foram retiradas as embalagens (sachês laminados) e as amostras foram analisadas quanto ao teor de umidade, análise de cor, teor de flavonoides, polifenóis e taninos totais, obtenção de *fingerprints* por cromatografia liquida de alta eficiência e potencial antioxidante pelo método de seqüestro do radical DPPH. Para as amostras de extrato glicólico foram retiradas as embalagens (frascos âmbar) e as amostras foram analisadas quanto a análise de cor, teor de flavonoides, polifenóis e taninos totais, e potencial antioxidante pelo método de seqüestro do radical DPPH. Os métodos empregados estão descritos a seguir.

Umidade

Para o monitoramento da umidade dos extratos secos, as embalagens contendo o extrato seco foram pesadas após a selagem antes de serem acondicionadas nas câmaras e após serem retiradas das mesmas no tempo determinado de análise. A diferença entre o peso da embalagem após acondicionamento nas câmaras e o peso da embalagem antes do acondicionamento foi utilizada para a determinação da % de umidade residual do produto.

Análise colorimétrica

Para a realização da análise colorimétrica as amostras diluídas em etanol 30% (v/v) foram submetidas a leitura em colorímetro Colorquest XE (HunterLab, Reston Virginia, EUA) em modo transmitância (TTRAN), com um ângulo de 10° e iluminante D65, obtendo-se desta maneira os valores de L* (luminosidade), a* (índice de saturação vermelho) e b* (índice de saturação amarelo).

Análise dos flavonoides totais

A dosagem dos flavonoides totais foi realizada de acordo com a método descrita no item 4.2.2.1.

Análise de polifenóis totais e taninos totais

A dosagem dos polifenóis e taninos totais foi realizada de acordo com método descrita no item 4.2.2.2

Avaliação do potencial antioxidante

Para o monitoramento da atividade antioxidante durante o estudo de estabilidade foi realizada a análise de DPPH sendo que a descrição do método encontra-se no item 4.2.2.1.

Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

O método analítico por CLAE utilizado para o monitoramento dos extratos secos durante o estudo de estabilidade encontra-se descrito no item 4.2.6.1.

4.2.8 Preparo de formulação contendo extrato glicólico e extrato seco de *D. ecastaphyllum*

Para avaliar a aplicação de alguns extratos secos produzidos foram desenvolvidas formulações de emulsão e gel. Com o objetivo de comparar a performance do extrato seco nas formulações, também foram obtidas formulações com o extrato glicólico obtido a partir do extrato bruto no lote 002/10.

O extrato glicólico foi preparado em uma concentração de 10% (p/v) de sólidos a partir da concentração do extrato bruto até a secura seguida de ressuspensão do mesmo com propilenoglicol.

As formulações foram preparadas de modo que fosse obtido 2% de sólidos em cada formulação e para isso foi adicionado a formulação 2,67% dos extratos secos DE 003 e DE 004 (ambos com 75% de sólidos) e 20% do extrato glicólico.

As Tabelas 4.3 a 4.6 apresentam as composições de cada formulação desenvolvida seguida de seu modo de preparo.

Tabela 4.3 – Formulação gel com extrato glicólico (GEL-EG).

INSUMOS	% P/P
Carbopol 940	0,80
Hidróxido de sódio	0,25
extrato glicólico	20,0
DMDM hidantoína	0,10
EDTA	0,10
Água	78,75

Modo de preparo: Adicionou-se 96,8% do total de água da formulação e sob agitação foi adicionado o EDTA sendo a solução homogeneizada até completa dissolução do EDTA. Em seguida adicionou-se lentamente no vortex da solução o total de carbopol 940 permanecendo a agitação até que os grumos do carbopol 940 estivessem desaparecido. Após este procedimento foi adicionado 2,5% de uma solução de hidróxido de sódio 10% para a neutralização do carbopol 940. Foi adicionado na seqüência a DMDM hidantoína e o extrato glicólico seguido de agitação até completa homogeneização dos insumos.

Tabela 4.4 – Formulação gel com extrato seco DE 003 (GEL-DE003).

INSUMOS	% P/P
Carbopol 940	0,80
Hidróxido de sódio	0,25
extrato seco DE 003	2,67
etanol 40% v/v	7,30
Propilenoglicol	5,0
DMDM hidantoína	0,10
EDTA	0,10
Água	83,78

Modo de preparo: Adicionou-se 96,8% do total de água da formulação e sob agitação foi adicionado o EDTA sendo a solução homogeneizada até completa dissolução do EDTA. Em seguida adicionou-se lentamente no vortex da solução o total de carbopol 940 permanecendo a agitação até que os grumos do carbopol 940 estivessem desaparecido. Após este procedimento foi adicionado 2,5% de uma solução de hidróxido de sódio 10% para a neutralização do carbopol 940. Foi adicionado na seqüência a DMDM hidantoína, propilenoglicol e extrato seco previamente solubilizado em etanol 40% v/v seguido de agitação até completa homogeneização dos insumos.

Tabela 4.5 – Formulação da emulsão com extrato glicólico (creme lanette-EG).

INSUMOS	% P/P
Lanette N	8,0
Palmitato de cetila	2,0
Óleo mineral	10,0
extrato glicólico	20,0
Glicerina	5,0
DMDM hidantoína	0,10
EDTA	0,10
Água	54,8

Modo de preparo: FASE A: Foi adicionado em béquer de vidro o total de óleo mineral, lanette N e o palmitato de cetila. Os insumos foram aquecidos em banho maria até 70° C e permaneceram no banho até completa fusão dos componentes sólidos. FASE B: Foi adicionado em béquer o total de água da formulação e sob agitação adicionou-se EDTA e glicerina. A solução foi aquecida em banho maria até 70° C.

Quando as duas fases atingiram 70 °C verteu-se lentamente sob agitação a FASE A sobre a FASE B. Após 10 minutos de agitação o béquer foi retirado do banho para resfriamento. Quando a temperatura atingiu 25 °C foi adicionado DMDM hidantoína e o extrato glicólico seguido de agitação até completa homogeneização dos insumos.

Tabela 4.6 – Formulação das emulsões contendo os extratos secos DE 003 3 DE 004 (creme lanette - DE 003 e DE 004).

INSUMOS	% P/P
Lanette N	8,0
Palmitato de cetila	2,0
Óleo mineral	10,0
extrato seco*	2,67
etanol 40% v/v	7,30
Glicerina	5,0
DMDM hidantoína	0,10
EDTA	0,10
Água	64,83

*DE 003 ou DE 004

Modo de preparo: FASE A: Foi adicionado em béquer de vidro o total de óleo mineral, lenette N e o palmitato de cetila. Os insumos foram aquecidos em banho maria até 70° C e permaneceram no banho até completa fusão dos componentes sólidos. FASE B: Foi adicionado em béquer o total de água da formulação e sob agitação adiciounou-se EDTA e glicerina. A solução foi aquecida em banho maria até 70° C.

Quando as duas fases atingiram 70 °C verteu-se lentamente sob agitação a FASE A sobre a FASE B. Após 10 minutos de agitação o béquer foi retirado do banho para resfriamento. Quando a temperatura atingiu 25 °C foi adicionado DMDM hidantoína, glicerina e extrato seco previamente solubilizado em etanol 40% v/v seguido de agitação até completa homogeneização dos insumos.

4.2.8.1 Estudo de estabilidade das formulações

Com o objetivo de se avaliar a estabilidade física das formulações desenvolvidas foram realizadosalguns ensaios de estabilidade acelerada preconizadas no guia de estabilidade de produtos cosméticos (BRASIL, 2004b).

Inicialmente as formulações foram centrifugadas a 3000 rpm por 30 minutos para a verificação de separação de fases. Caso as formulações se mantivessem estáveis neste ensaio preliminar seriam acondicionadas em bisnagas de alumínio para a realização da estabilidade térmica com ciclos de 24 horas a 40° ± 2°C, e 24 horas a 4° ± 0,5° C - durante um período de 4 semanas.

As análises realizadas no tempo inicial foram: aspecto visual, cor, pH e reologia. Após duas semanas de estudo foram realizadas as análises de aspecto visual, cor e pH e para a conclusão do estudo após as 4 semanas de ensaio, foram realizadas as mesmas análises descritas no tempo inicial.

Caracterização reológica das formulações

Os ensaios de caracterização reológica das formulações (gel e emulsão) foram realizados em um Reômetro Brookfield Modelo LV-DV III, cilindros concêntricos operando o *software* Reocalc®. Para a realização das leituras da formulações de emulsão selecionou-se um programa com incremento/redução de velocidade de 5 rpm, faixa de leitura de 0 a 50 (aumentando e reduzindo a rotação) e para as formulações de gel o incremento/redução de velocidade de 3 rpm, faixa de leitura de 0 a 30, utilizando *spindle* SC4-18.

4.3 Tratamento dos resultados

Para o tratamento e análise dos resultados experimentais obtidos foram empregadas técnicas de planejamento experimental e métodos estatísticos, tais como planejamento fatorial, análise de variância e regressão não linear (BOX; DRAPER, 1987; MONTGOMERY, 1976). O tratamento estatístico dos resultados foi realizado com o auxílio dos programas Statistica® versão 10.0 (StatSoft Inc.) e Prism® versão 5.0 (GraphPad).

5. Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da matéria-prima vegetal

A identificação e confirmação de identidade botânica são aspectos primordiais para o estudo de determinada espécie vegetal. A Figura 5.1 mostra a exsicata de *D. ecastaphyllum* utilizada no presente trabalho, depositada no Herbário da Universidade Federal da Paraíba.

HERBÁRIO JPB
Universidade Federal da Paraíba
João Pessoa - Paraíba - Brasil
JPB nº 47286
Brasil, Paraíba, Cabedelo, Praia de Intermares, Reserva de mangue entre o Bessa e Intermares (lado do Intermares).
Leguminosae-Pap.
Dalbergia ecastaphyllum (L.) Taub.
Dissertação de Mestardo - DESENVOLVIMENTO, PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE EXTRATOS NEBULIZADOS DE DALBERGIA ECASTAPHYLLUM,
Orientador: Wanderley Pereira de Oliveira.
Maira Neto Zampier
Edivaldo Ferreira Pacheco Filho 1 18 VIII 2011
Det: Lima, I.B. 1 XII 2012

Figura 5.1 – Etiqueta de identificação da exsicata depositada no Herbário da UFPa.

Após a coleta, realizou-se a secagem das folhas de *D. ecastaphyllum*, à temperatura de 40° C. Esta temperatura foi a que apresentou melhor desempenho na secagem de folhas de *Maytenus ilicifolia*, acarretando reduzida perda da atividade antioxidante do material vegetal (NEGRI, *et al.,* 2009).

5.1.1 Determinação do teor de extrativos

O teor de extrativos obtido foi de 44 % ± 4,24 %. O alto valor observado reflete a alta concentração de sólidos solúveis presentes na matéria-prima vegetal extraídos pelo sistema solvente utilizado.

5.1.2 Determinação de umidade

O teor de umidade da matéria-prima vegetal é um parâmetro importante para avaliar a efetividade da secagem das folhas. O excesso de umidade pode ocasionar a degradação de princípios ativos assim como contaminação microbiana. A perda por dessecação utilizando o método gravimétrico (estufa) foi de 6,67 ± 0,26 % e o valor obtido pela balança de umidade foi de 9,94 ± 0,07 %. Os valores obtidos estão de acordo com o valor preconizado pela Farmacopéia Brasileira onde a umidade deve ser menor que 10%.

5.1.3 Análise granulométrica

A Figura 5.2 apresenta a distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal. O diâmetro médio da matéria-prima vegetal foi de 281,10 µm, com desvio padrão da distribuição de 43,9 %. De acordo com a classificação da Farmacopéia Brasileira a matéria-prima vegetal encontra-se classificada entre pó moderadamente grosso e semi-fino.

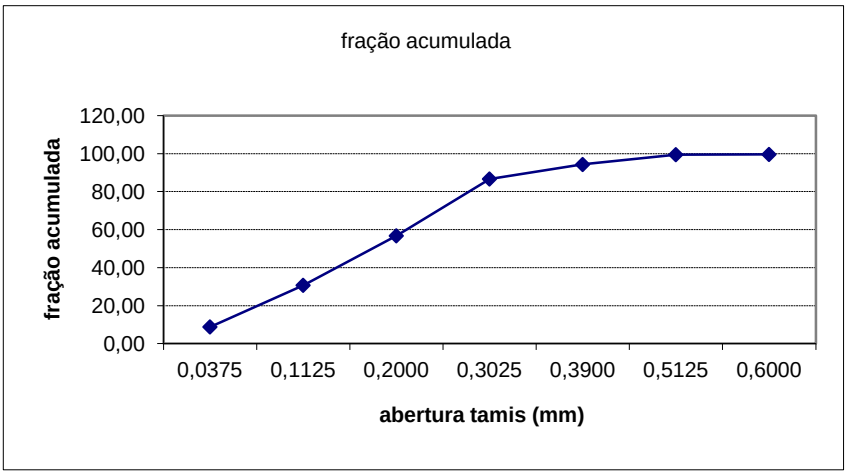


Figura 5.2 – Distribuição granulométrica das folhas secas e moídas de *D. ecastaphyllum.*

5.1.4 Prospecção fitoquímica

Devido a inexistência de estudos fitoquímicos utilizando as folhas de *D. ecastaphyllum* foram realizadas algumas análises qualitativas para a determinação das classes de metabólitos secundários presentes nas folhas desta espécie. A Tabela 5.1 resume os resultados obtidos nos ensaios fitoquímicos.

Tabela 5.1 – Resultados das análises fitoquímicas qualitativas para folhas de *D. ecastophyllum*.

CLASSE	REAÇÃO	RESULTADO	
flavonoides	Shinoda	Coloração vermelha (flavonóis)	+++
	Cloreto de alumínio	Mancha fluorescente no UV (flavonas e flavonóis)	+++
	Cloreto férrico	Coloração verde escura (flavonas e flavonóis)	+++
taninos	Solução gelatina 2,5%	Precipitação	+++
	Acetato de chumbo	Precipitação	+++
	Sulfato de quinino	Precipitação	+++
	Cloreto férrico	Coloração verde escura	+++
alcaloides	Mayer	Solução límpida	-
	Dragendorff	Solução límpida	-
cumarina	NaOH/Uv	Ausência de mancha fluorescente	-
antraquinona	reação de Borntraeger	Formação de solução alcalina vermelha	++
saponinas	Índice de espuma	< 1cm	-

- : não reativo ; + : pouco reativo; ++ : reativo; +++ : muito reativo

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.1 todas as reações para flavonoides e taninos foram positivas, o que está de acordo com a composição fitoquímica de outras espécies de *Dalbergia* sp (ASIF, 2009). Com relação a presença de antraquinonas, também não foram encontrados relatos da presença deste metabólito em outras espécies de *Dalbergia.*

5.1.5 Análise de polifenóis totais e taninos totais

Devido a indicação da presença de taninos na prospecção fitoquímica qualitativa realizada com as folhas de *D. ecastophyllum* foi realizada a análise de polifenóis totais e taninos totais na droga vegetal.

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais foi construída uma curva de calibração com o pirogalol (Figura 5.3).

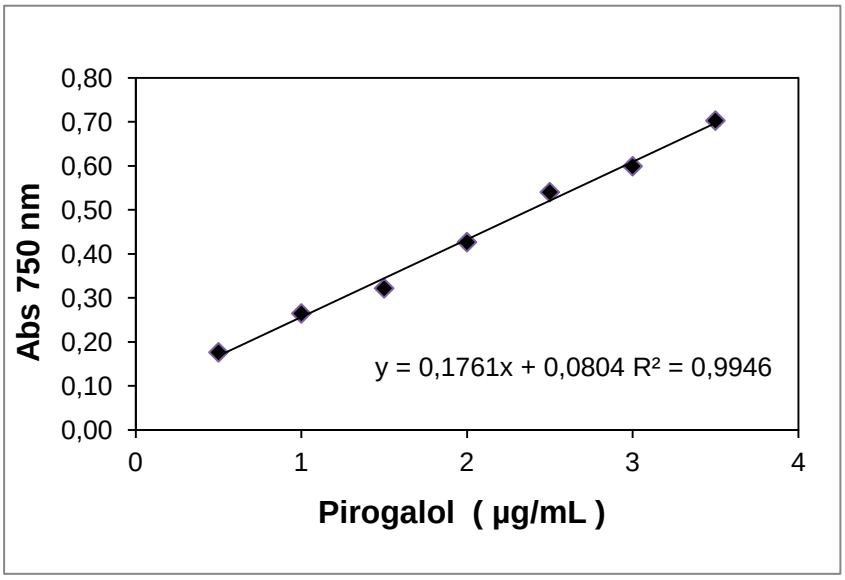


Figura 5.3 – Curva de calibração do pirogalol utilizada na quantificação dos polifenóis totais.

A análise de polifenóis foi baseada na reação de redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngico pelos compostos fenólicos presentes na amostra. A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada (ANGELO; JORGE, 2007). O produto desta reação entre a hidroxila do composto fenólico e do reagente forma um complexo de coloração azul podendo ser mensurado por espectrofotometria no comprimento de onda de 750 nm.

O método escolhido para a realização da análise qualitativa de taninos totais baseia na análise de polifenóis seguida de precipitação da amostra com caseína, quantificando-se novamente os polifenóis totais no filtrado após precipitação. Desta forma, a análise de taninos totais é feita pela diferença entre a porcentagem de

polifenóis na amostra inicial e a porcentagem de polifenóis na amostra após precipitação com a caseína.

O mecanismo de interação entre proteínas e polifenóis pode ser explicado como um fenômeno de reconhecimento molecular, onde a complexação entre estas moléculas é otimizada no ponto isoelétrico da proteína sendo estas interações dependentes do tempo e na maioria das vezes reversíveis. Proteínas que apresentam estrutura secundária e terciária compactas têm baixa afinidade por polifenóis. Em compensação proteínas ricas em prolina tem estrutura terciária mais aberta apresentando alta afinidade por polifenóis (HASLAM, 1996). A caseína utilizada no presente trabalho é uma proteína que contém um nível relativamente alto de prolina.

A principal interação que ocorre entre proteína e caseína é do tipo hidrofóbico que é reforçada pela ligação de hidrogênio que ocorre entre o grupo carbonil do peptídeo e o hidrogênio do polifenol (HASLAM, 1996). Como a ligação de hidrogênio é secundária quanto menor for a afinidade do polifenol pela água mais facilmente este ira precipitar na presença de proteínas. Esta informação foi confirmada, pois quando foi utilizado apenas etanol 70% v/v como solvente para análise de taninos totais o polifenol ficava muito solúvel no meio e não precipitava na presença de caseína dando um falso resultado de que a amostra não apresentava taninos totais. Quando o solvente utilizado após a extração passou a ser água a fraca interação dos polifenóis presentes na amostra propiciou uma maior interação destes polifenóis com a caseína ocorrendo uma maior precipitação dos mesmos, acarretando um teor de taninos totais maior do que o valor obtido quando se utilizou etanol 70% (v/v).

A Tabela 5.2 apresenta os resultados da análise de polifenóis e taninos totais da droga vegetal.

Tabela 5.2 – Resultados de polifenóis totais e taninos totais da droga vegetal.

ANÁLISES	RESULTADOS	
	LOTE 001	LOTE 002
Polifenóis totais	10,45 ± 0,21 % (104,5 mg/g)	11,4 ± 0,12 % (114,0 mg/g)
Taninos totais	9,27 ± 0,07 % (92,7 mg/g)	9,86 ± 0,11 % (98,6 mg/g)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.2 pode-se observar que não ocorreu alteração significativa na concentração de polifenóis e taninos totais da droga vegetal obtida a partir das folhas secas e moídas de *D. ecastaphyllum* dos lotes 001 e 002. O lote 001 foi coletado em setembro de 2009 enquanto que o lote 002 foi coletado em setembro de 2010.

5.1.6 Análise de flavonoides totais

Com o objetivo de monitorar de maneira mais específica o tipo de polifenol presente na matéria-prima vegetal foi realizada a dosagem de flavonoides totais utilizando-se o método descrito e validado por Souza (2007). Trata-se de um método simples e prático baseado na reação dos flavonoides com cloreto de alumínio, que promove um deslocamento batocrômico da absorção dos compostos que passa a ser em 425 nm. A quantidade de flavonas e flavonols pode ser determinada sem interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente de ácidos fenólicos, mesmo que eles formem complexos com $AlCl_3$ devido a absorbância de luz de comprimento de onda muito inferior de 434 nm (MARCUCCI *et al.*, 1998).

O valor obtido para a dosagem de flavonoides totais da matéria-prima vegetal foi de 1,34 % (p/p) ± 0,05 % (13,4 mg/g de folha). A Figura 5.4 mostra a curva de calibração da quercetina.

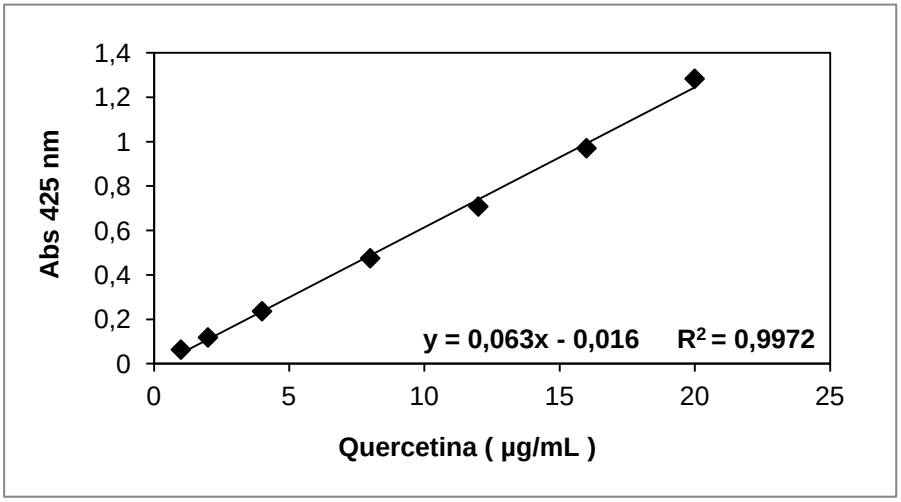


Figura 5.4 – Curva de calibração da quercetina utilizada na quantificação dos flavonoides totais.

5.2 Obtenção da solução extrativa

As variáveis do planejamento composto central foram selecionadas com o intuito de se obter um extrato rico em compostos bioativos. Desta forma buscou-se fixar o solvente extrator com polaridade intermediária (etanol 70 %, v/v) variando apenas parâmetros do processo de extração que pudessem ter efeito significativo na extração destes ativos como a proporção planta:solvente extrator, temperatura e tempo de extração.

O solvente etanol 70 % (v/v) é muito utilizado para a extração de compostos fenólicos e flavonoides. A extração de compostos fenólicos e flavonoides de plantas medicinais da Algeria foi realizado utilizando-se como solvente o etanol 70 % (DJERIDANE, *et al*., 2006). Os compostos fenólicos de *Bauhinia forficata* Link, *Passiflora alata, Maytenus ilicifolia* e *Petiveria alliacea* também foram extraídos com etanol 70 % (OLIVEIRA *et al.,* 2006, GUEDES *et al.,* 2009).

O emprego de etanol na solução extrativa, associado com a temperatura utilizada durante o processo de extração pode prevenir a oxidação enzimática que ocorrem com os polifenóis durante o processo extrativo (HARBORNE, 1984).

O estudo da influencia das variáveis de extração foi realizado com o auxílio de um planejamento experimental tendo como variáveis independentes, a proporção

planta:solvente extrator, a temperatura e o tempo de extração. Após a determinação e codificação dos valores mínimos, centrais e máximos para as variáveis o programa Statistica 10® foi utilizado para a determinação dos experimentos de extração de acordo com o planejamento composto central (PCC). A Tabela 5.3 mostra os níveis das variáveis determinadas de acordo com PCC.

Tabela 5.3 – Planejamento composto central (PCC).

CÓDIGO	VARIÁVEIS CODIFICADAS			VARIÁVEIS DECODIFICADAS		
	mp/ms (m/v)	T (°C)	Tempo (min)	mp/ms (m/v)	T (°C)	Tempo (min)
1	-1	-1	-1	0,0804	38,1	32,5
2	1	-1	-1	0,1696	38,1	32,5
3	-1	1	-1	0,0804	61,9	32,5
4	1	1	-1	0,1696	61,9	32,5
5	-1	-1	1	0,0804	38,1	97,5
6	1	-1	1	0,1696	38,1	97,5
7	-1	1	1	0,0804	61,9	97,5
8	1	1	1	0,1696	61,9	97,5
9	-1,682	0	0	0,0500	50,0	10,0
10	1,682	0	0	0,2000	50,0	120,0
11	0	-1,682	0	0,1250	30,0	65,0
12	0	1,682	0	0,1250	70,0	65,0
13	0	0	-1,682	0,1250	50,0	10,0
14	0	0	1,682	0,1250	50,0	120,0
15 (A)	0	0	0	0,1250	50,0	65,0
15 (B)	0	0	0	0,1250	50,0	65,0
15 (C)	0	0	0	0,1250	50,0	65,0

T: temperatura; mp/ms: razão entre a massa de planta e massa de solvente

Após o termino da extração as soluções extrativas obtidas foram filtradas a vácuo e armazenadas em frascos âmbar em geladeira para posteriores análises.

5.2.1 Caracterização das soluções extrativas obtidas pelo PCC

Para a determinação das condições ótimas de extração foram avaliadas como respostas: o teor de sólidos, rendimento da extração (baseado na extração de flavonoides), % de flavonoides totais e atividade antioxidante pelo método DPPH (IC_{50}). A atividade antioxidante pelo método de complexação do fosfomolibdênio não foi utilizada como resposta para a determinação das condições ótimas de extração. A Tabela 5.4 resume os resultados obtidos para as análises realizadas com as soluções extrativas obtidas pelo PCC.

Tabela 5.4 – Resultado das análises realizadas com as soluções extrativas.

Código	S (%)	FT_{ext} (%)	R (%)	$IC_{50\ ext}$ (µg/mL)	AAF (%)
1	3,64 ± 0,04	0,101*	93,75	77,2	95 ± 0,02
2	7,37 ± 0,02	0,205*	90,2	48,0	89 ± 0,03
3	3,61 ± 0,06	0,107*	99,32	87,3	92 ± 0,02
4	7,28 ± 0,05	0,216*	95,04	60,4	93 ± 0,02
5	3,57 ± 0,03	0,101*	93,75	82,0	88 ± 0,01
6	7,48 ± 0,07	0,207*	91,08	45,9	92 ± 0,01
7	3,48 ± 0,01	0,106*	98,39	89,7	90 ± 0,01
8	7,23 ± 0,02	0,218*	95,92	55,5	93 ± 0,01
9	2,24 ± 0,04	0,064*	95,52	118,4	91 ± 0,01
10	8,90 ± 0,05	0,252*	94,03	42,5	93 ± 0,01
11	5,77 ± 0,06	0,147*	87,76	63,2	91 ± 0,01
12	5,65 ± 0,03	0,162*	96,72	55,2	89 ± 0,02
13	5,60 ± 0,09	0,155*	92,54	68,3	93 ± 0,01
14	6,10 ± 0,05	0,167*	99,7	62,7	94 ± 0,01
15 A	5,97 ± 0,05	0,163*	97,31	55,0	93 ± 0,03
15 B	5,78 ± 0,09	0,159*	94,93	55,3	92 ± 0,01
15 C	5,85 ± 0,04	0,161*	96,12	55,1	88 ± 0,08

* Desvio padrão inferior a 0,01; S: % de sólidos; R: rendimento (em função da quercetina); FT_{ext}: % de flavonoides totais no extrato; $IC_{50\ ext}$ (µg/mL) concentração do extrato que representa 50% da atividade máxima antioxidante pelo método DPPH; AAF (%): atividade antioxidante pelo método de formação do complexo fosfomolibdenio.

A Tabela 5.4 mostra que a atividade antioxidante do extrato pelo método de formação do complexo fosfomolibdênio ficou próxima de 100 %. O controle positivo (100 % de atividade) utilizado foi uma solução de 200 µg/mL de ácido ascórbico e o extrato utilizado foi preparado na na concentração de 275 µg/mL. O resultado encontrado mostra que os sólidos presentes no extrato apresentam propriedade antioxidante semelhante a do ácido ascórbico.

A Figura 5.5 apresenta a análise da correlação entre as respostas avaliadas para a otimização do processo extrativo. De acordo com a Figura 5.5 existe uma forte correlação entre o teor de sólidos e a % de flavonoides do extrato. O parâmetro IC_{50} corresponde à concentração de extrato necessária para se obter 50 % da atividade antioxidante máxima do mesmo. Assim, quanto menor o valor de IC_{50} maior será o poder antioxidante do extrato em análise. Quando se avalia a % de flavonoides totais com relação ao IC_{50} fica nítida a tendência de que quanto maior a porcentagem de flavonoides totais menor será o valor do IC_{50}, correspondendo à uma maior atividade antioxidante do extrato.

A correlação encontrada entre a atividade antioxidante e o conteúdo de flavonoides totais no extrato foi positiva com R^2 de 0,776. A partir da análise da correlação entre a concentração de flavonoides totais e a atividade antioxidante de extratos obtidos a partir de plantas medicinais da Algeria obteve-se um R^2 de 0,7802, muito semelhante ao valor encontrado no presente trabalho (DJERIDANE *et al.,* 2006). Assim, pode-se sugerir que os flavonoides presentes no extrato contribuem significativamente com a atividade antioxidante do mesmo. Porém, como esta correlação não é totalmente linear sugere-se que existam outras substâncias que apresentem ação antioxidante além dos flavonoides.

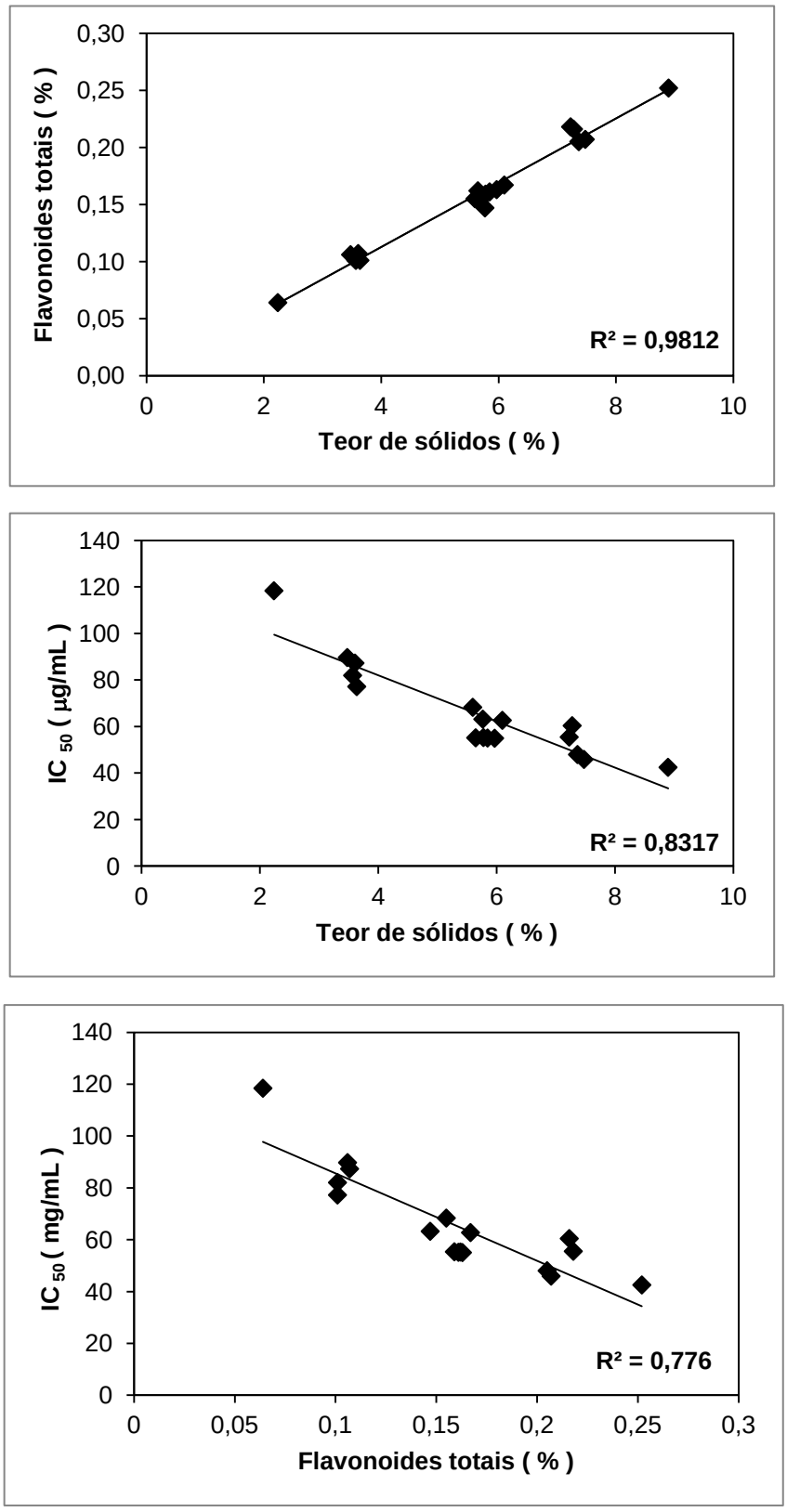


Figura 5.5 – Análise da correlação entre as respostas avaliadas para a otimização do processo extrativo.

5.2.2 Análise das variáveis dependentes

A análise das variáveis dependentes foi realizada utilizando os respectivos coeficientes de regressão determinados pelo programa Statistica 10®. A Tabela 5.5 apresenta os resultados destes coeficientes que podem também ser interpretados como efeito das variáveis independentes (mp/ms, temperatura, tempo) sobre as variáveis dependentes (IC_{50}, FT, R e S).

Tabela 5.5 – Coeficiente de regressão para as respostas avaliadas.

VARIÁVEIS E SUAS INTERAÇÕES	S (%)	R (%)	FT (%)	IC_{50} (μg/mL)
Média	5,882328	-2,31891	0,161001	55,1937
(1) mp/ms (L)	3,845796 *	-0,81444	0,109422*	-37,2045*
mp/ms (Q)	-0,317668 *	5,14916	-0,002129	17,4855*
(2) Temperatura (L)	-0,096921	-2,54685*	0,008527*	3,8582
Temperatura (Q)	-0,218673	1,75693	-0,004603*	2,4595
(3) Tempo (L)	0,102644	0,21087	0,003395	-1,3500
Tempo (Q)	-0,119678	-0,03000	-0,000007	6,9143
1L by 2L	-0,055000	0,82000	0,002750	1,0500
1L by 3L	0,065000	-0,33000	0,001250	-3,5500
2L by 3L	-0,055000	-2,31891	-0,000250	-1,3000
R^2	0,99351	0,84943	0,99865	0,94337

* efeito significante à 95%

S: % de sólidos; R: rendimento (em função da quercetina); FT: % de flavonoides totais no extrato; IC_{50} (μg/mL) concentração do extrato que representa 50% da atividade máxima antioxidante pelo método DPPH.

De acordo com os resultados apresentados a variável dependente que apresentou efeito significativo no valor de IC_{50} foi o efeito linear entre massa de planta e massa de solvente (mp/ms). Esta variável apresentou efeito negativo significante à um nível de significância de 95%, ou seja, quanto maior a quantidade de planta utilizada menor o valor de IC_{50} e maior a atividade antioxidante (Figura 5.6

– Gráfico de Pareto). Entretanto o efeito quadrático desta variável apresentou-se positivo indicando a existência de um ponto mínimo para o IC_{50}.

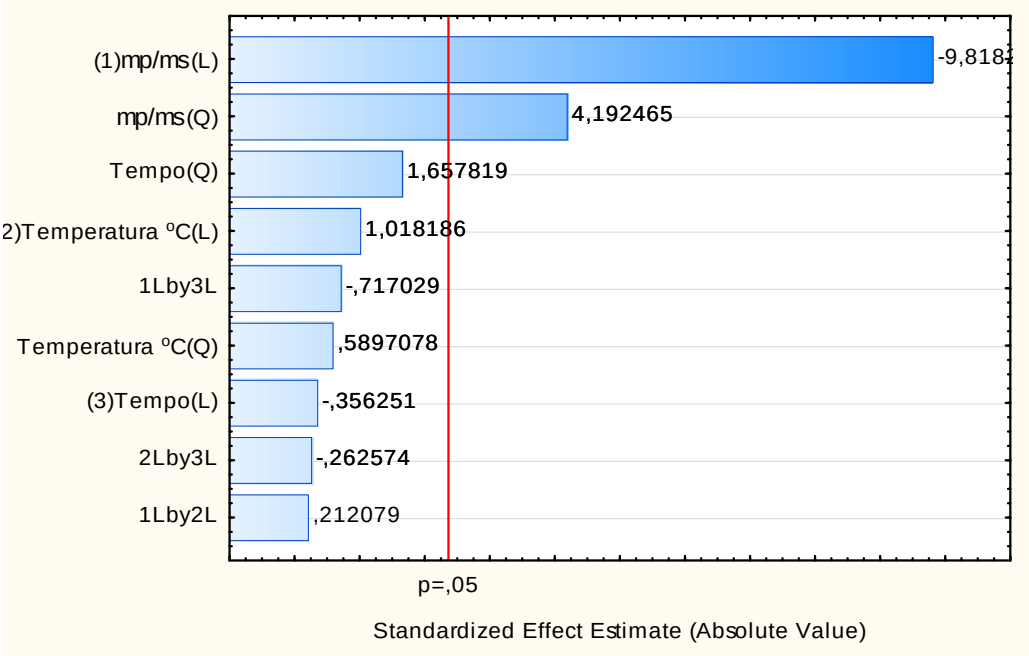
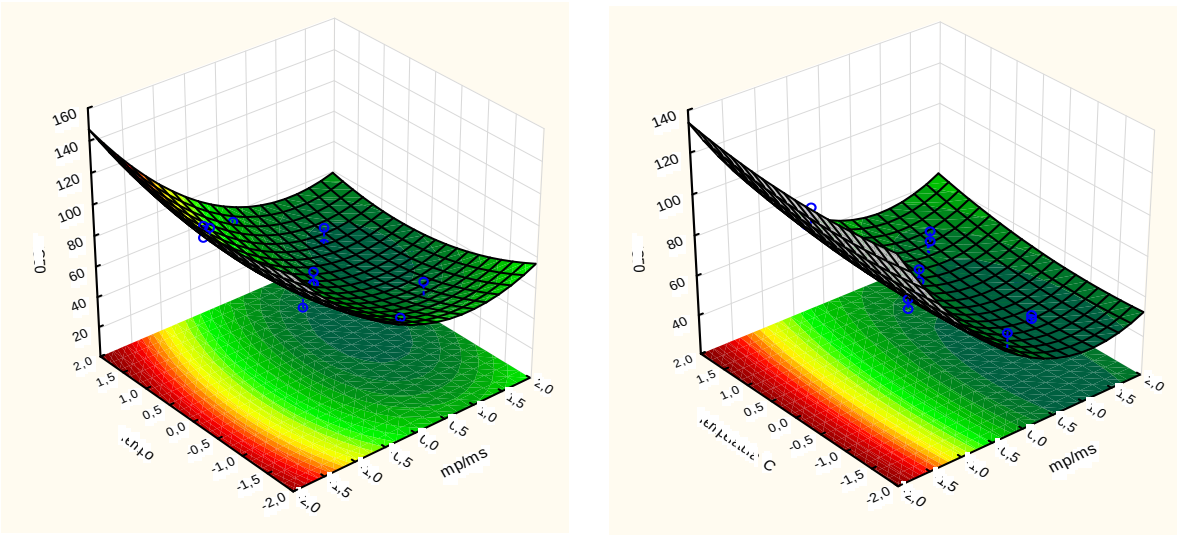


Figura 5.6 – Gráfico de Pareto para a variável dependente IC_{50}.

As demais variáveis dependentes e respectivas interações entre elas não se mostraram significativas dentro do intervalo de confiança estudado. O alto valor de R^2 indica que os resultados obtidos foram ajustados adequadamente pelo modelo estatístico proposto. A Figura 5.7 apresentam as superfícies de resposta de IC_{50} em função de mp/ms e tempo de extração (Figura 5.7a) e de mp/ms com a temperatura de extração (Figura 5.7b).



(a) **(b)**

Figura 5.7 – Superfícies de resposta para a variável dependente IC_{50} em função do tempo de extração e da relação mp/ms (a) e em função da temperatura e relação mp/ms (b).

Para a variável dependente % de flavonoides totais presentes nas soluções extrativas (FT) a relação entre massa de planta e massa de solvente (mp/ms) linear se mostrou como a variável independente de maior impacto, apresentando um forte efeito positivo e sendo significante no intervalo de confiança de 95% (Figura 5.8). A temperatura também apresentou efeito positivo e significante sobre a concentração de flavonoides no extrato. As superfícies de resposta relacionando FT com mp/ms e tempo de extração (Figura 5.9a) e com mp/ms e temperatura de extração (Figura 5.9b), confirmam a dependência linear de FT com mp/ms. As demais variáveis dependentes e respectivas interações entre elas não se mostraram significativas dentro do intervalo de confiança estudado. O alto valor de R^2 indica que os resultados obtidos estão ajustados ao modelo estatístico utilizado.

.

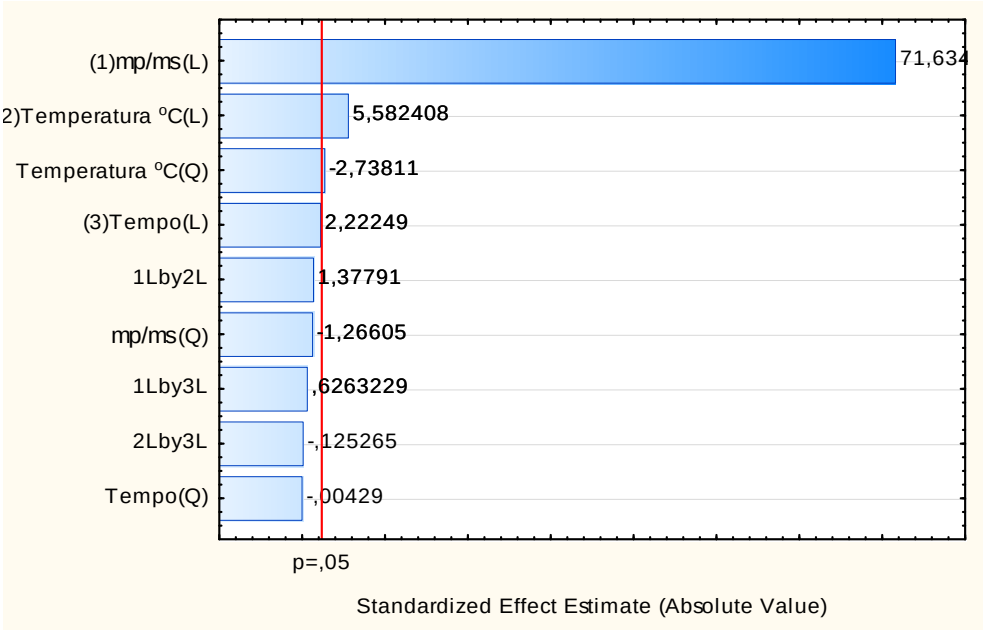
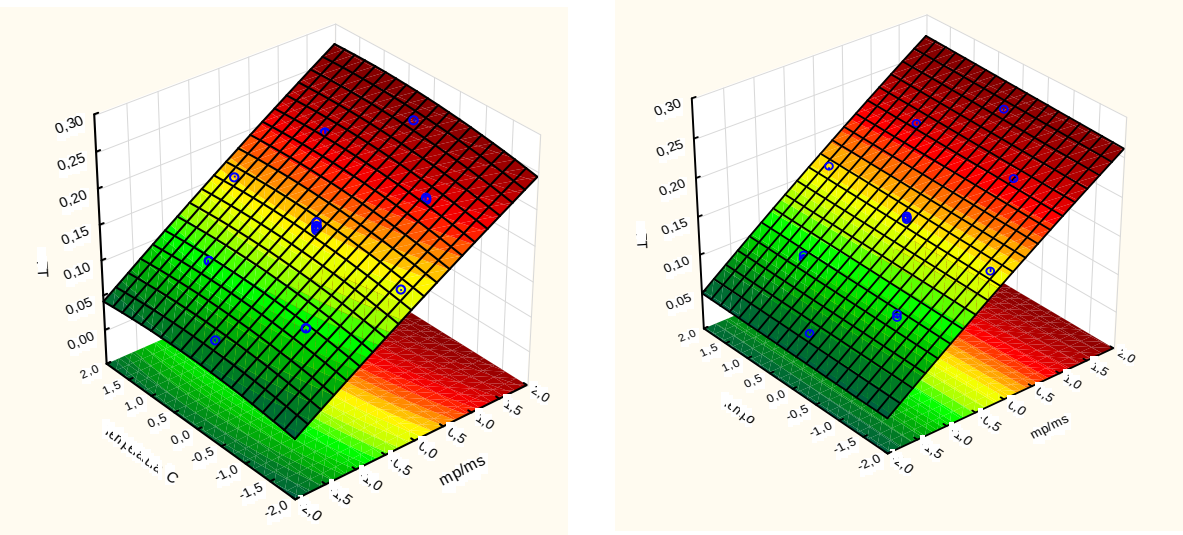


Figura 5.8 – Gráfico de Pareto para a variável dependente FT.



(a) **(b)**

Figura 5.9 – Superfícies de resposta para a variável dependente FT em função da temperatura de extração e da relação mp/ms (a) e em função do tempo de extração e da relação mp/ms (b).

O rendimento da extração foi calculado em função da concentração de flavonoides que teoricamente deveria estar presente na massa de folha extraída. De acordo com o item 5.1.6 a quantidade de flavonoides presentes em 100 g de massa de folha foi de 1,34 g. Portanto, o rendimento foi calculado levando-se em consideração a massa de folha utilizada e a quantidade teórica de flavonoides que deveriam estar presente nesta massa de acordo com a Equação:

$$R = \frac{FT \cdot 100}{(mp/ms) \,.\, 1{,}34} \qquad (04)$$

Onde, R: rendimento da extração (%) e FT: % de flavonoides totais da solução extrativa.

Para esta variável dependente a temperatura linear foi a única variável independente a mostrar efeito positivo e significativo a um nível de 95%. Este resultado se confirma pela análise dos gráficos de Pareto (Figura 5.10).

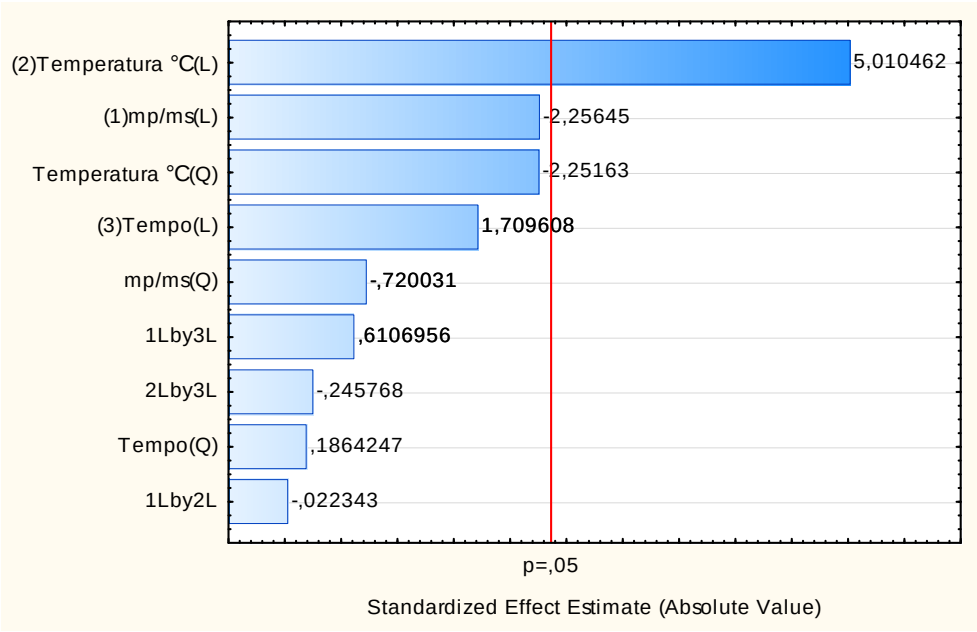
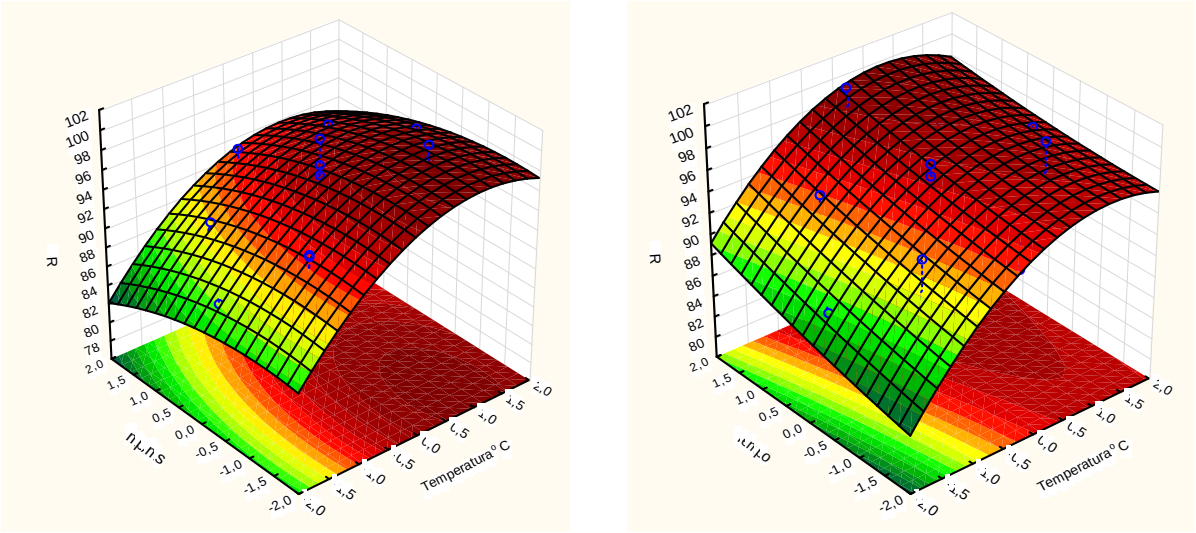


Figura 5.10 – Gráfico de Pareto para a variável dependente rendimento (R).

Como o rendimento está associado à concentrações de flavonoides totais na solução extrativa as superfícies apresentam tendências semelhantes às obtidas para a concentração de flavonoides totais em função do tempo e temperatura de extração.

As superfícies de resposta apresentadas na Figura 5.11 mostram o rendimento do extrato em função de mp/ms e da temperatura (Figura 5.11a) e de tempo e temperatura de extração (Figura 5.11b).

A utilização de temperatura durante a extração pode ser considerada com um artifício para melhorar a solubilidade dos compostos que se deseja extrair no solvente. Porém o aumento de temperatura pode ocasionar uma desnaturação de certos compostos fenólicos (SPIGNO *et al*., 2007). O alto valor de R^2 indica que os resultados obtidos são adequadamente descritos pelo modelo estatístico ajustado.



(a) **(b)**

Figura 5.11 – Superfícies de resposta para a variável dependente rendimento (R) em função da relação mp/ms e temperatura de extração (a) e em função do tempo e temperatura de extração (b).

Para a porcentagem de sólidos presentes na solução extrativa, a única variável que apresentou um efeito positivo e significante a um nível de significância de 95% foi a relação entre massa de planta e massa de solvente (mp/ms). A Figura 5.12 apresenta o gráfico de Pareto para a variável independente (S) em função das

variáveis estudadas. As demais variáveis não foram significantes para a % de sólidos no extrato dentro do intervalo de confiança estudado. O alto valor de R^2 indica que os resultados obtidos foram ajustados pelo modelo estatístico proposto.

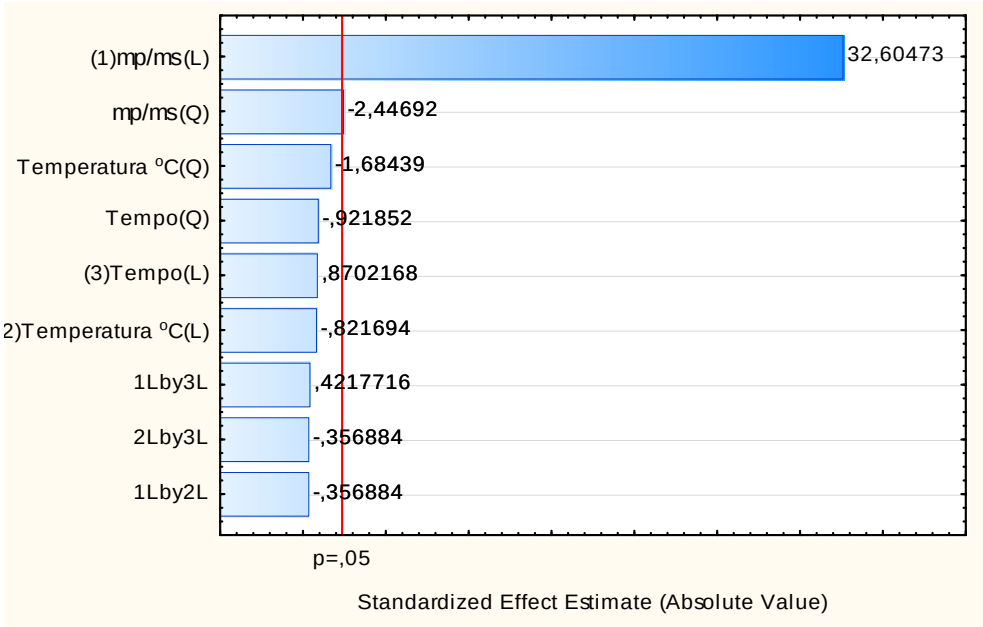
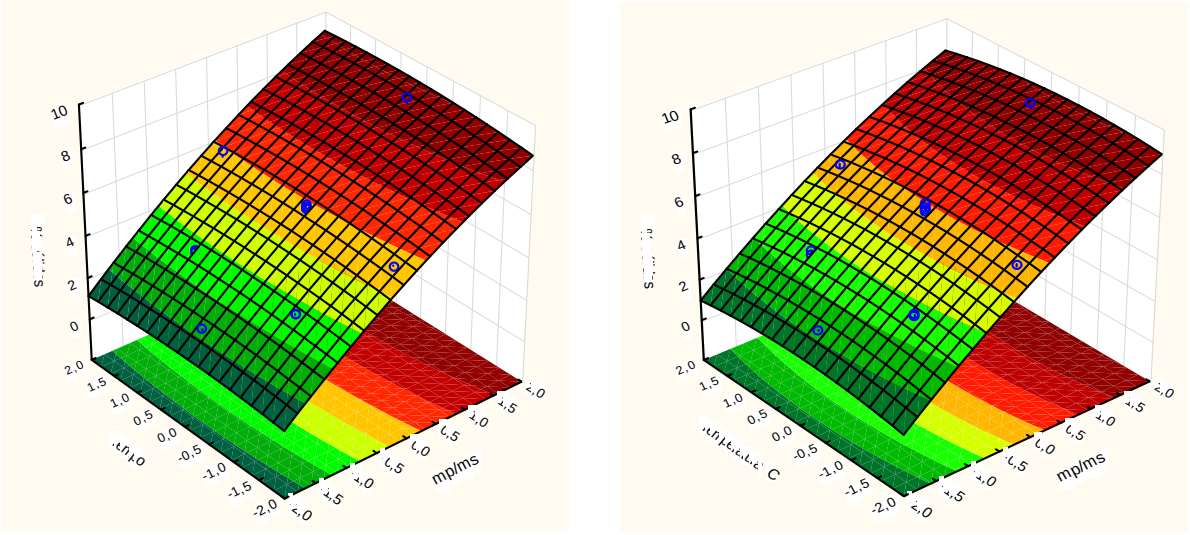


Figura 5.12 – Gráfico de Pareto para a variável dependente teor de sólidos (S).

A Figura 5.13 apresenta as superfícies de resposta para a variável dependente concentração de sólidos (S) em função do tempo de extração e da relação mp/ms (Figura 5.13a) e da temperatura de extração e da relação mp/ms (Figura 5.13b).

Pode-se observar que os gráficos de superfície reposta para teor de flavonoides totais (FT), recuperação da extração (R) e teor de sólidos (S) foram semelhantes o que se justifica pela existência de correlação entre a porcentagem de sólidos e flavonoides totais observados na Figura 5.5, sendo o valor de R^2 foi de 0,9812.



(a) **(b)**

Figura 5.13 – Superfícies de resposta para a variável dependente teor de sólidos (S) em função do tempo de extração e da relação mp/ms (a) e da temperatura de extração e relação mp/ms (b).

5.2.3 Obtenção da condição ótima de extração

A determinação da condição ótima de extração foi realizada com o auxílio do programa Statistica 10®, empregando-se a função desejabilidade. As faixas de valores das variáveis analisadas foram: teor de sólidos: 7,0 – 9,0 %; teor de flavonoides totais na solução extrativa: 0,1 – 0,2 %; rendimento de extração: 90 – 100 %, e IC_{50}: 42,5 – 65,0 µg/mL. A aplicação da função desejabilidade aos resultados experimentais permitiu a obtenção da seguinte condição ótima de extração:

- Temperatura de extração: 50 °C
- Tempo de extração: 92,3 minutos
- Relação massa de planta/massa de solvente: 0,2

Souza *et al.* (2007), empregando a análise estatística multiresposta para a otimização das condições de extração de flavonoides de *Bauhinia forficata* obteve a seguinte condição ótima de extração: temperatura de extração: 50 °C; tempo de extração: 92,3 min, e proporção planta solvente: 0,2. A temperatura ótima obtida para a extração de compostos fenólicos de *Bidens pilosa* L. foi de 66,2 °C, temperatura em que a atividade antioxidante também foi maximizada (CORTES-ROJAS *et al*., 2011).

5.2.4 Ensaios realizados com a solução extrativa otimizada

Para confirmar os valores de resposta calculados para o extrato otimizado foi realizada uma extração utilizando a condição otimizada de extração determinada (lote 001). A solução extrativa obtida foi analisada sendo que os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Comparação entre as respostas preditas e obtidas experimentalmente.

ANÁLISES	RESULTADOS	
	PREDITO	OBTIDO
Concentração de sólidos (%)	9,00	9,58
Rendimento de extração (%)	94,70	100,0
Teor de flavonoides no extrato (%)	0,23	0,27
IC_{50} (µg/mL)*	48,00	45,10

* Base úmida

A comparação entre os valores de respostas preditos e obtidos experimentalmente nas condições ótimas mostra uma boa concordância.

Para complementar as análises realizadas com o extrato otimizado, determinaram-se as concentrações de polifenóis totais e taninos totais além da atividade antioxidante do extrato pelo método de formação do complexo fosfomolibdenio. A Tabela 5.7 resume todas as análises realizadas com a solução extrativa otimizada.

Tabela 5.7 – Análises realizadas com a solução extrativa otimizada com o material vegetal proveniente do lote 001.

ANÁLISES	SE lote 001
pH (-)	6,02 ± 0,02
S (%)	9,7 ± 0,05
FT (%)	2,77 ± 0,01
PT (%)	27,02 ± 0,82
TT (%)	15,59 ± 0,05
IC_{50} (µg/mL)	4,37
AAF (µg/mL)	33,59

S: % de sólidos; FT: % de flavonoides totais no extrato; PT: % de polifenóis totais no extrato; TT: % de taninos totais no extrato; IC_{50} (µg/mL) concentração de sólidos do extrato que representa 50% da atividade máxima antioxidante pelo método DPPH; AAF (µg/mL): concentração necessária para 100% de atividade pelo método de formação do complexo fosfomolibdenio

A atividade antioxidante dos polifenóis está associada à propriedade de quelar alguns metais que como, por exemplo, o ferro e cobre. Estes metais, quando presentes em proporções excessivas no organismo podem iniciar a produção de radical hidroxila. Além disso, os polifenóis podem doar rapidamente um átomo de hidrogênio para os radicais.

Os polifenóis na forma de radicais são relativamente estáveis e ainda podem reagir com outros radicais formando uma nova molécula (SHAHIDI, 1992; BRAVO, 1998).

No presente trabalho os dois métodos empregados para a avaliação da atividade antioxidante estão baseadas no princípio da doação de átomos de hidrogênio por parte dos polifenóis.

A análise da atividade antioxidante pelo método descrito por Prieto *et al.,* (1999) se baseia na redução do molibdênio VI para o molibdênio V. Este por sua vez forma uma complexo verde com o fosfato cuja intensidade da coloração pode ser mensurada por espectrofotômetro em 695 nm. Quanto maior for a doação de hidrogênio por parte do polifenol (molécula mais antioxidante) mais molibdênio VI

será convertido em molibdênio V que por sua vez se complexará com o fosfato presente no meio reacional promovendo a formação de complexo de coloração verde.

O método de estabilização do DPPH• também se baseia na doação de hidrogênio (BONDET *et al*., 1997). A solução de DPPH• apresenta coloração roxa e conforme este radical vai sendo neutralizado passa a assumir uma coloração amarela sendo que esta alteração de cor pode ser mensurada por espectrofotômetro com comprimento de onda de 517 nm. Alguns autores acreditam que a reação de estabilização do DPPH• ocorre após a rápida transferência de elétrons dos radicais fenóxido e que a doação de hidrogênio entra de maneira secundária (FOTI *et al.,* 2004). A Figura 5.14 apresenta os possíveis mecanismos de atividade antioxidante dos polifenóis.

ROO• + PPH = ROOH + PP•	RO• + PPH = ROH + PP•
ROO• + PP• = ROOPP	RO• + PP• = ROPP

Figura 5.14 – Mecanismos de atividade antioxidante dos polifenóis (Fonte: BRAVO, 1988).

A eficiência dos polifenóis como antioxidante irá depender da sua estrutura química, o fenol é um composto inativo, porém os *orto* e *para* difenóis apresentam esta capacidade. Os flavonoides são antioxidantes potentes, pois apresentam uma série de elementos estruturais que podem estar envolvido com a atividade antioxidante mencionada acima (BRAVO, 1988):

- grupos hidroxila no anel B
- dupla ligação na posição 2-3 conjugada com a carbonila em 4
- grupos hidroxila na posição 3 e 5

A molécula de quercetina é considerada um bom modelo para atividade antioxidante, pois apresenta estes mecanismos conforme indicado em vermelho na Figura 5.15.

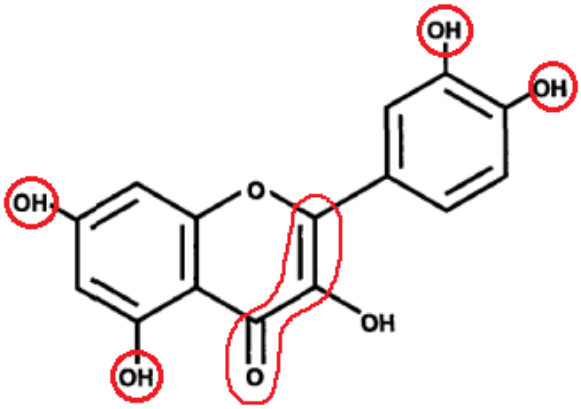


Figura 5.15 – Molécula de quercetina com a marcação dos pontos de sua estrutura química que favorecem sua atividade antioxidante.

O valor da atividade antioxidante para a quercetina pelos métodos de seqüestro do DPPH• e reação de formação do complexo fosfomolibdenio estão apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Atividade antioxidante da quercetina.

MÉTODO DE ANÁLISE	RESULTADO
IC_{50} (µg/mL)	0,96
AAF(µg/mL)	10,82

A atividade antioxidante superior do padrão quercetina com relação a atividade dos sólidos presentes no extrato é esperada considerando-se que a quercetina é uma substância purificada enquanto que os sólidos do extrato apresentam em sua composição diversas substâncias. Além disso, os flavonoides presentes na *D. ecastaphyllum* podem estar na forma glicosilada o que diminui a atividade antioxidante do flavonoide quando comparada a atividade antioxidante da respectiva aglicona (RATTY 1987; BRAVO, 1988).

A alta concentração de polifenóis e de taninos pode estar contribuindo com a alta atividade antioxidante do extrato. De acordo com Hatano *et al.* (1989), a atividade antioxidante de taninos e respectivos polifenóis relacionados podem atingir valores muito baixos de IC_{50} variando entre 0,66 – 8,3 µM existindo forte correlação

entre o peso molecular do tanino e a atividade antioxidante. Quanto maior o peso molecular maior a atividade antioxidante. A Tabela 5.9 apresenta os valores de IC_{50} determinados para o ácido gálico e ácido tânico.

Tabela 5.9 – Atividade antioxidante do ácido tânico e ácido gálico.

SUBSTÂNCIA REFERÊNCIA	IC_{50} (µg/mL)
Ácido gálico	1,00
Ácido tânico	2,38

Análise cromatográfica

A escolha da fase móvel utilizada no método de cromatografia liquida de alta eficiência desenvolvido (água acidificada e metanol) é caracterizada por apresentar resultados satisfatórios para a separação de polifenóis por CLAE (HARBORNE, 1998). Além disso, a análise por gradiente de mistura entre água acidificada e metanol como fase móvel mostrou-se eficiente na separação de flavonoides presentes na resina de *Dalbergia ecastaphyllum* (SILVA *et al.*, 2008; DAUGSCH *et al.*, 2006). Para a análise da resina a concentração inicial de metanol empregada variou entre 30 e 40%. Porém não foi possível utilizar esta condição no presente trabalho visto que os picos não se separavam ao iniciar a corrida com concentrações superiores a 10%. Tal fato pode ser devido às diferentes características dos flavonoides presentes na resina, que podem apresentar um caráter mais apolar em relação aos flavonoides presentes na folha.

A solução extrativa otimizada foi analisada por CLAE-DAD utilizando os seguintes comprimentos de onda para monitoramento da análise 270, 310, 350 e 520 nm.

A Figura 5.16 apresenta os cromatogramas da solução extrativa otimizada obtidos com comprimentos de onda de 270, 310, 350 e 520 nm. Estes comprimentos de onda também foram utilizado no trabalho de Lin (2008) para o monitoramento de compostos fenólicos presente em amostras de alimento.

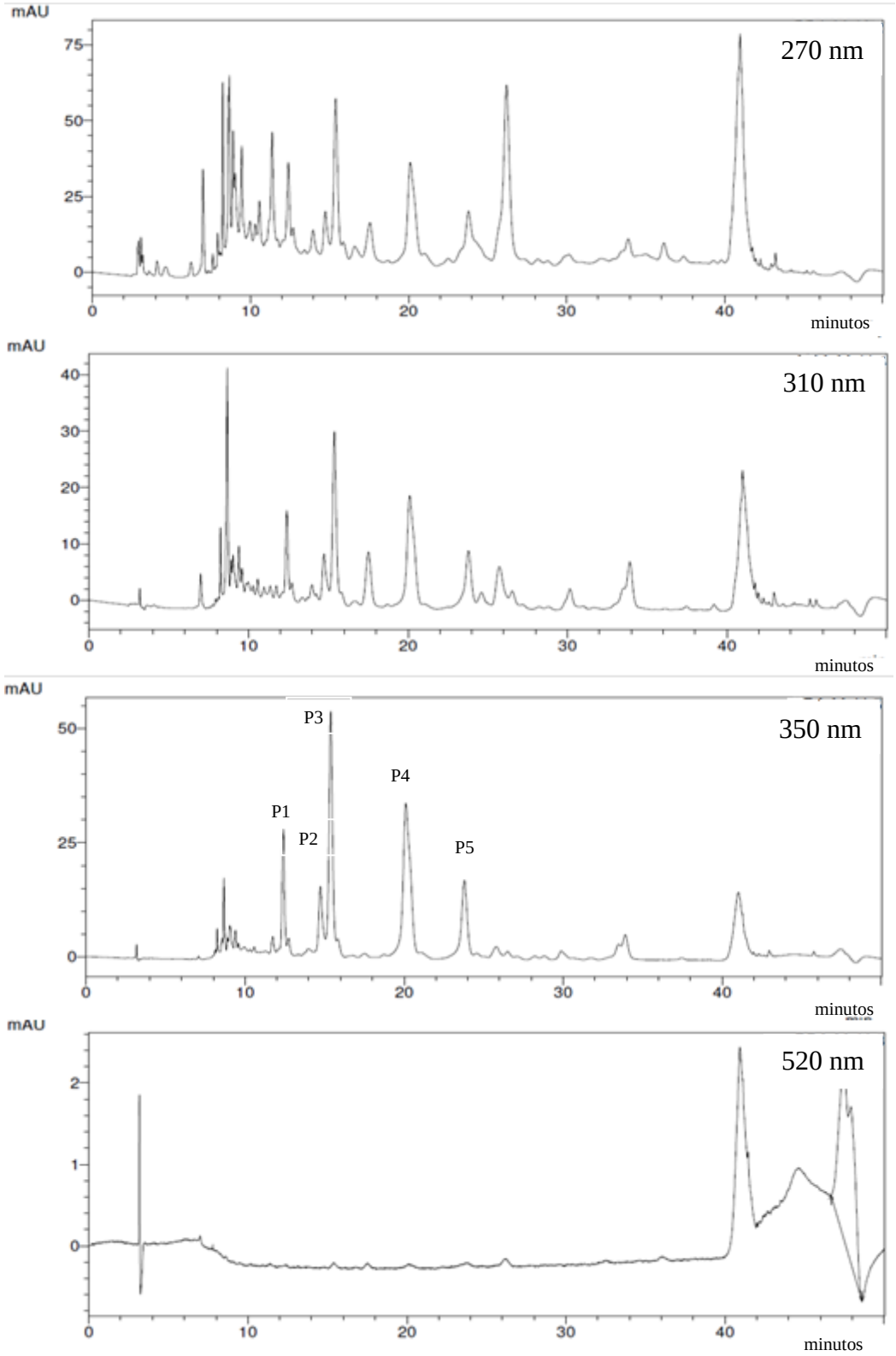


Figura 5.16 – Cromatogramas da solução extrativa otimizada obtidos com comprimentos de onda de 270, 310, 350 e 520 nm.

Com relação aos comprimentos de onda selecionados para monitoramento das análises é importante ressaltar que os flavonoides apresentam absorção em algumas regiões específicas do espectro UV. De maneira geral pode-se dividir a absorção máxima dos flavonoides em 2 faixas (Figura 5.17):

- 240 – 285 nm: absorção referente a banda 2 da molécula
- 300-400 nm: absorção referente a banda 1 da molécula (HARBORNE, 1975)

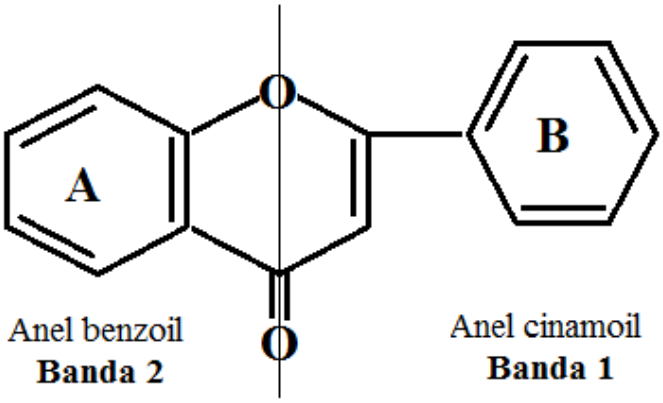


Figura 5.17 – Estrutura do flavonoides dividido de acordo com suas bandas de absorção no UV.

De acordo a classe de flavonoides e o tipo de substituinte presente na molécula as absorções máximas da banda 1 e banda 2 podem se diferenciar. As flavonas e flavonóis apresentam absorção máxima para a banda 2 entre 250 – 270 nm enquanto que para a banda 1 a absorção máxima para as flavonas é de 304 – 350 nm e para o flavonóis entre 352 – 385 nm. As isoflavonas e flavanonas apresentam baixa intensidade de absorção da banda 1 (300 – 340 para as isoflavonas e 300 – 370 para flavanona). Com relação a banda 2 as isoflavonas absorvem com maior intensidade entre 245 – 270 nm e as flavanonas entre 270 e 295 nm. No caso das chalconas a absorção da banda 1 é dominante e ocorre entre 340 e 390 nm sendo que a absorção menos intensa da banda 2 ocorre entre 220 – 270 nm (HARBORNE, 1975).

Marken (2000), preconiza que a detecção típica dos flavonoides pode ocorrer em 270 nm e entre 330 – 365 nm para flavonas e flavonóis, entre 236 – 260 para isoflavonas, entre 340 – 360 nm para chalconas, em 280 nm para dihidrochalconas, em 502 e 520 para antocianidinas e em 210 ou 280 para catequinas. Com relação aos comprimentos de onda monitorados durante a análise, os mesmos foram escolhidos, pois representam a faixa propícia para a detecção de compostos fenólicos.

Com relação aos taninos é preconizado pela Food and Agriculture Organization (http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-454.pdf) que a análise por CLAE do ácido tânico para a detecção dos taninos condensados seja detectada no comprimento de onda de 350 nm.

Os cromatogramas apresentados na Figura 5.16 mostram que foi possível detectar substâncias que absorveram em todos os comprimentos de onda avaliados exceto em 520 nm sugerindo a ausência de antiocianidinas. O resultado encontrado também está de acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.1 onde foram observadas reações positivas para flavonóis, flavonas e taninos condensados.

A Figura 5.18 mostra os espectros dos picos monitorados em 350 nm (P1, P2, P3, P4, P5). O pico que sai no tempo de retenção superior a 40 minutos não foi monitorado, pois sua eluição ocorreu no momento da limpeza da coluna e pode ter ocorrido a sobreposição de várias moléculas.

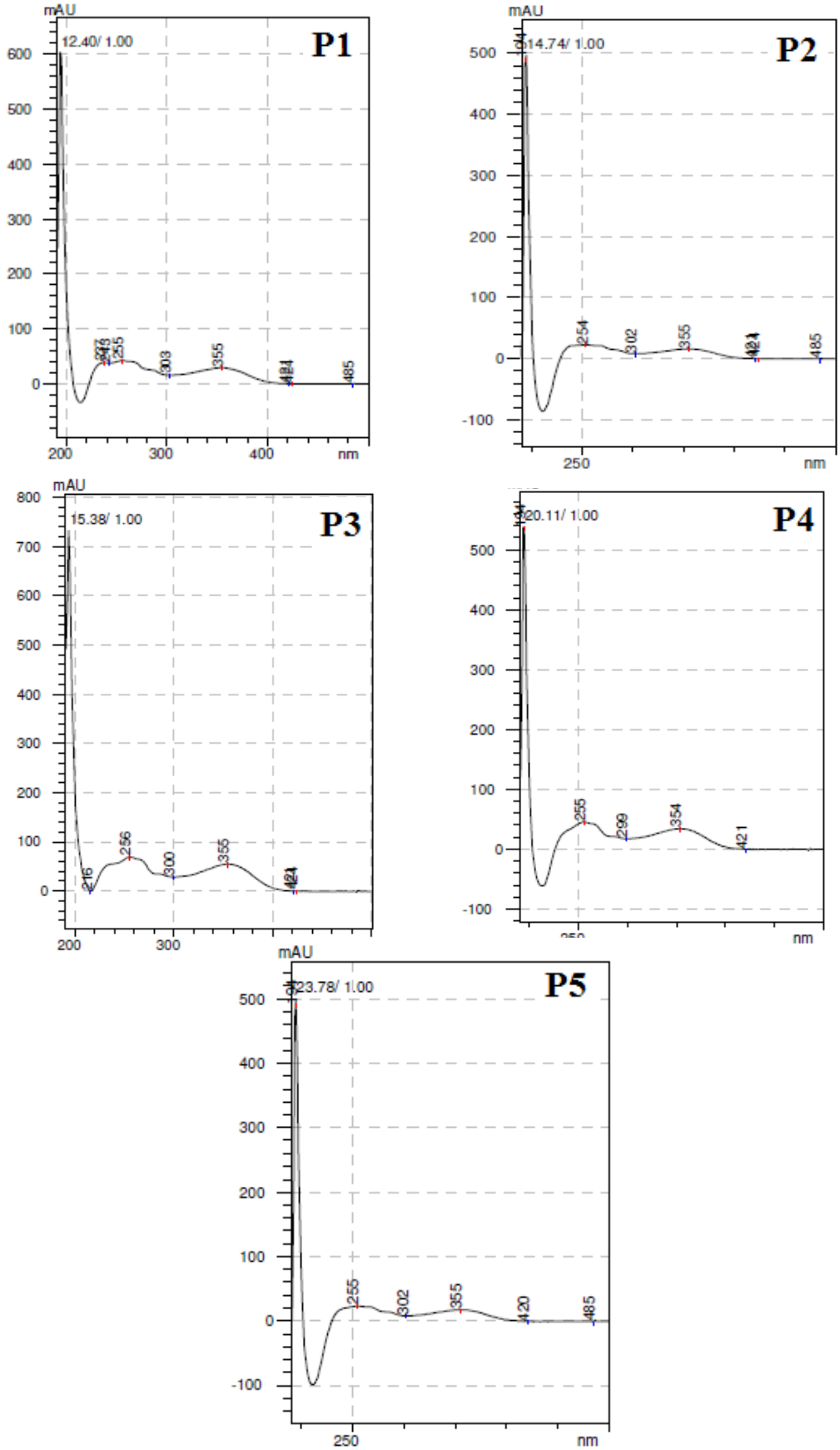


Figura 5.18 - Espectros dos picos detectados em 350 nm.

Alguns estudos realizados com a casca e resina de *Dalbergia ecastaphyllum* indicam que nesta espécie existe a ocorrência de flavonoides e isoflavonoides pertencente a diversas classes como chalconas (isoliquiritigenina), flavonas (liquiritigenina e luteolina); flavanona ((2R,3R)-3,7-diidroxi-6-metoxiflavanona) isoflavanonas (daidzeina; formononetina, biochanina A), isoflavanas (7-O-metilvestitol, vestitol, 8 demetilduartina e mucronulatol) pterocarpanos (dimethilhomopterocarpina e medicarpina) (DONNELLY *et al.,* 1973; MATOS *et al.,* 1975; DAUGCH 2006).

Estudos realizados com o extrato hidroalcóolico das folhas de *Dalbergia paniculata* cultivada no Egito mostraram a presença dos isoflavonoides como a formononetina, genisteína e dalpateína. As substâncias foram analisadas em CLAE, com coluna C18 fase reversa utilizando-se como fase móvel água acidificada e metanol em gradiente isocrático 60:40 (AMIM *et al*., 2012).

Para a realização do estudo de estabilidade do produto monitorou-se os *fingerprints* dos extratos secos pela avaliação dos picos indicados na Figura 5.16 como P1, P2, P3, P4 e P5 com comprimento de onda de 350 nm. Este monitoramento de picos não identificados também foi utilizada no trabalho de Silva (2007).

5.3 Produção do segundo lote de solução extrativa de *D. ecastaphyllum*

Para a realização dos estudos de secagem e de estabilidade e para avaliar se os parâmetros estabelecidos para o processo de extração durante o planejamento são prontamente escalonados, preparou-se uma maior quantidade de solução extrativa (8 L). A Figura 5.19 apresenta uma fotografia do aspecto visual da solução extrativa obtida. A solução extrativa foi caracterizada através da determinação do teor de flavonoides, polifenóis e taninos totais, (FT, PT e TT), atividade antioxidante pelo método DPPH e formaçãodo complexo fosfomolibdenio. A Tabela 5.10 apresenta os resultados obtidos.

Figura 5.19 – Aspecto visual da solução extrativa de *D. ecastaphyllum* lote 002.

Tabela 5.10 – Resultado das análises realizadas com as soluções extrativas de *D. ecastaphyllum* referentes ao lote 001 e 002.

ANÁLISES	RESULTADOS	
	SE lote 001 (pequena escala)	**SE lote 002 (escalonamento)**
pH (-)	6,02 ± 0,08	5,85 ± 0,05
S (%)	9,70 ± 0,12	9,14± 0,09
FT(%)	2,77± 0,01	2,38 ± 0,02
PT (%)	27,02 ± 0,82	25,67± 0,23
TT (%)	15,59 ± 0,05	19,03± 0,01
IC_{50} (µg/mL)	4,37	4,34
AAF (µg/mL)	33,59	36,20

S: concentração de sólidos; FT: flavonoides totais; PT: polifenóis totais; TT: taninos totais; IC_{50} ext (µg/mL) concentração do extrato que representa 50% da atividade máxima antioxidante pelo método DPPH; AAF: concentração necessária para 100% de atividade pelo método de formação do complexo fosfomolibdenio.

De acordo com os resultados apresentados pode-se concluir a padronização da extração foi obtida com êxito visto que os parâmetros avaliados não sofreram alterações significativas entre os lotes 001 (quantidade produzida 0,1 L) e 002 (quantidade produzida 8,0 L).

Tal fato também pode ser resultado de uma coleta das folhas realizadas em meses correspondentes do ano de 2009 e 2010, reduzindo o impacto da sazonalidade.

5.3.1 Partição do extrato

O extrato etanólico foi primeiramente adicionado na fase aquosa e em seguida a mistura água/extrato foi particionada com acetato de etila. Para monitorar a qualidade da extração avaliou-se a cor da fase acetato após o processo de extração. Além disso, foi monitorada a varredura em espectro UV-Vis para cada fração obtida após a extração a fim de se verificar qualitativamente a alteração no perfil do espectro conforme indicado na Figura 5.20, que apresenta os espectros de UV obtidos para as fases butanol e acetato de etila após a realização da partição segundo a metodologia descrita na Figura 4.1.

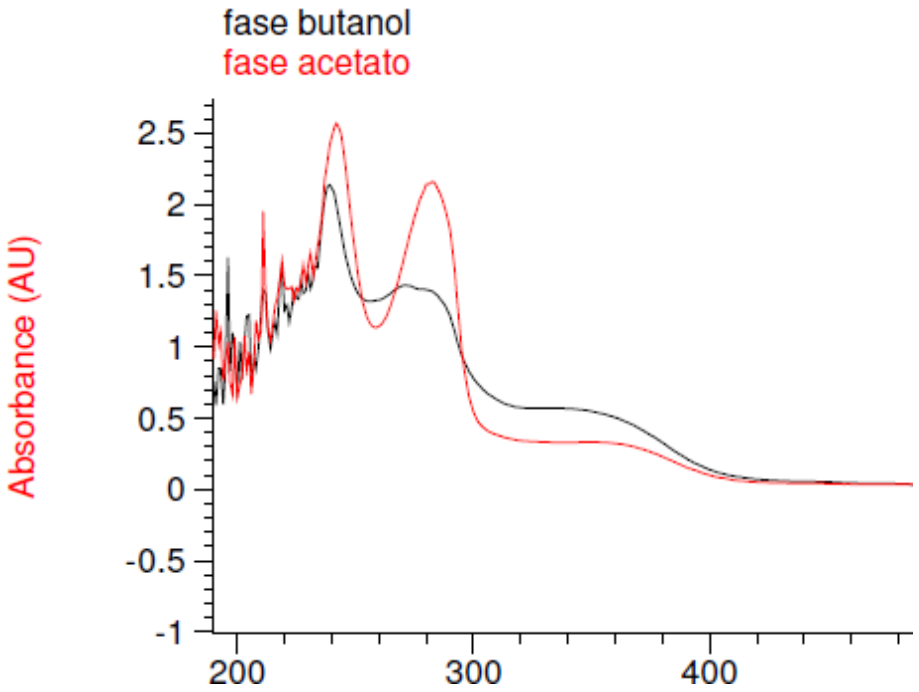


Figura 5.20 – Espectro das frações monitoradas por UV-Vis durante o processo de partição do extrato de *D. ecastaphyllum*.

Durante a partição com acetato de etila observou-se que a fase aquosa apresentava coloração marrom leitosa enquanto que a fração acetato de etila apresentava cor alaranjada.

Após proceder a extração por 5 vezes com volumes fixos de acetato de etila a fase aquosa foi em seguida particionada com butanol. No momento da adição do butanol no funil de separação observou-se que a fase aquosa começou a ficar mais límpida e de coloração amarelada enquanto que a fase butanólica apresentava coloração marrom escura. Com apenas 3 partições com butanol observou-se que a cor da fase butanol já se apresentava mais clara e a fase aquosa mais límpida. Também foi realizado o monitoramento da partição com butanol no espectro UV-Vis (Figura 5.20).

Após a realização da partição as frações acetato (FOA6), butanol (FOA4) e aquosa (FA8) foram evaporadas em evaporador rotativo até praticamente a secura e em seguida foram transferidas para frascos de vidro previamente pesados e permaneceram em estufa a 40°C para que o processo de secagem fosse concluído.

A Figura 5.21 mostra as frações após o processo de secagem. Pode-se observar que cada uma das frações possuem características diferentes. A FOA6 apresenta-se na forma de pó fino com coloração avermelhada, a FOB4 está na forma de um pó mais grosso com coloração castanho escura, enquanto que a FA8 tem um aspecto de semi-sólido com coloração castanho transparente.

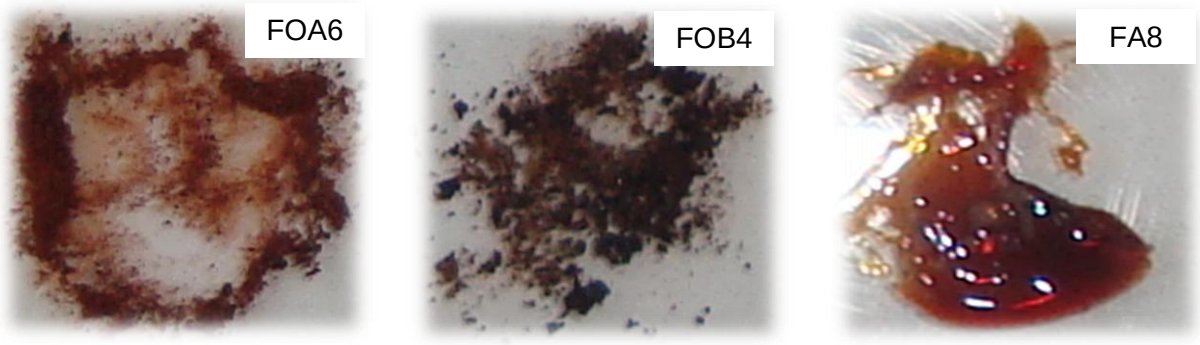


Figura 5.21 – Frações secas de *D. ecastaphyllum.*

As frações foram caracterizadas através da determinação do teor de flavonoides, polifenóis e taninos totais (FT, PT e TT) e atividade antioxidante pelo

método DPPH e pelo método de formação do complexo fosfomolibdenio. A Tabela 5.11 apresenta os resultados obtidos destas caracterizações.

Tabela 5.11 – Análises realizadas para as frações obtidas a partir da solução extrativa de *D. ecastaphyllum*.

Material avaliado	AAF (µg/m/L)	IC_{50} (µg/m/L)	% p/p em função de sólidos das frações		
			FT	PT	TT
SE lote 002	36,20	4,34	2,38 ± 0,02	25,67 ± 0,23	19,03 ± 0,01
FA8	234,37	24,10	0,65 ± 0,01	5,00 ± 0,05	1,46 ± 0,08
FOA6	28,32	2,17	1,73 ± 0,01	31,05 ± 0,47	18,95 ± 0,06
FOB4	43,19	5,54	3,51 ± 0,01	14,31 ± 0,17	11,08 ± 0,07
Perdas partição	NA	NA	0,47	5,64	6,36

SE: solução extrativa; AAF: concentração necessária para 100% de atividade pelo método de formação do complexo fosfomolibdenio; FT: flavonoides totais; PT: polifenóis totais; TT: taninos totais.

A análise da atividade antioxidante pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico foi realizada na forma de reação em 3 pontos com concentrações diferentes de sólidos, tanto para o extrato bruto quanto para as frações. Desta forma foi obtido o valor exato da concentração de sólidos em µg/m/L capaz de promover 100% de inibição (absorção no UV igual a 1,0). A Figura 5.22 evidencia que a atividade antioxidante está muito relacionada com a concentração de sólidos na amostra visto que o valor de R^2 para todas as amostras foi superior a 0,99.

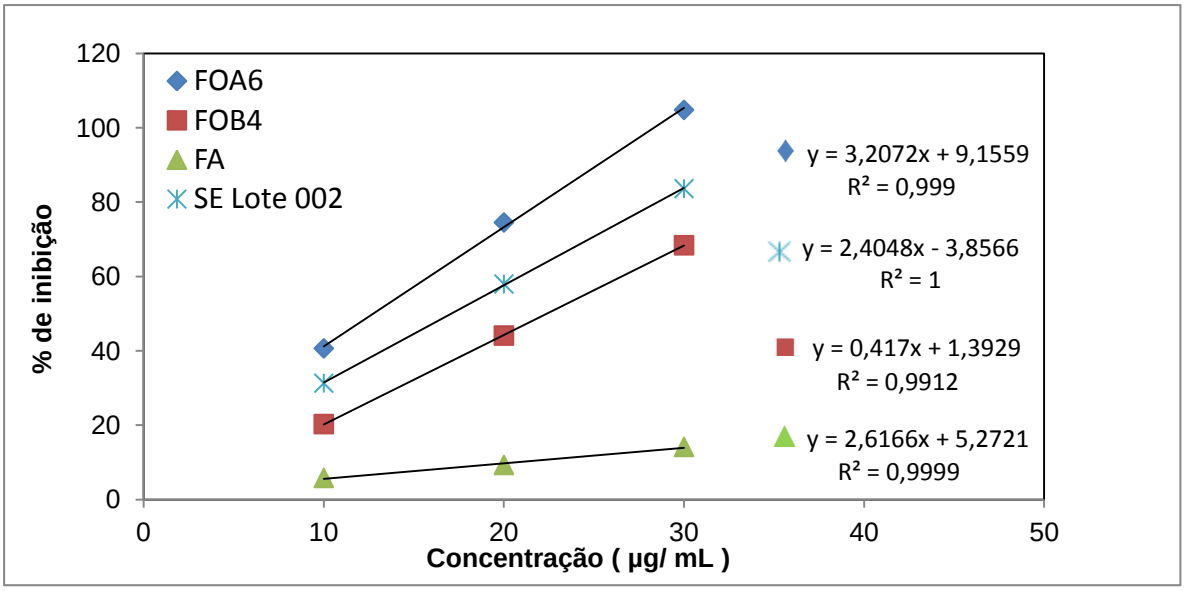


Figura 5.22 – Atividade antioxidante pelo método de formação do complexo fosfomolibdenio em função da concentração de sólidos da amostra.

Ao se avaliar a Figura 5.23 pode ser observada uma forte correlação entre os resultados de atividade antioxidante obtida pelos dois métodos (R^2 0,9946), indicando a existência de similaridades entre os mecanismos da atividade antioxidante avaliada pelos dois métodos.

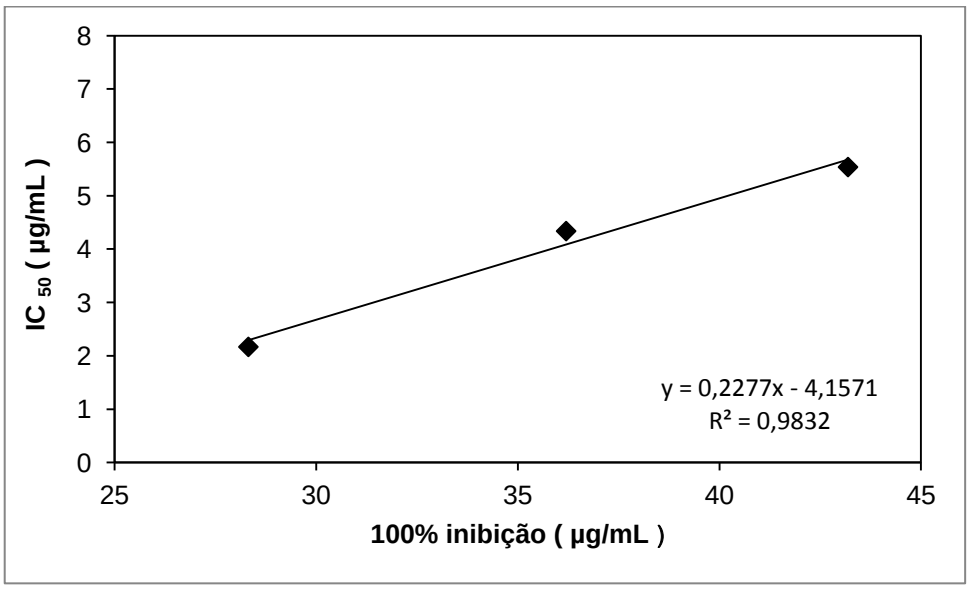


Figura 5.23 – Correlação entre as atividades antioxidantes mensuradas pelo método de seqüestro do radical DPPH e formação do complexo fosfomolibdênio.

Com o objetivo de avaliar qual das classes de compostos poderia apresentar maior influencia na atividade antioxidante, realizou-se uma comparação da atividade antioxidante (valores de IC_{50}) e a concentração de flavonoides totais, polifenóis totais e taninos totais. Como a fração aquosa esta com uma concentração muito reduzida dos compostos avaliados em relação ao extrato bruto e as outras frações esta foi removida da análise.

De acordo com a Figura 5.24 quanto maior a concentração de flavonoides totais, maior o valor de IC_{50} e menor a atividade antioxidante (R^2 de 0,9016). Por outro lado o aumento na concentração de polifenóis totais tendem a causar elevação na atividade antioxidante refletindo em menor IC_{50} (R^2 de 0,8705). O mesmo comportamento foi observado para AAF em função da concentração de polifenóis (dados apresentados na Tabela 5.11). Não foi observada uma boa correlação entre a concentração de taninos totais e a atividade antioxidante.

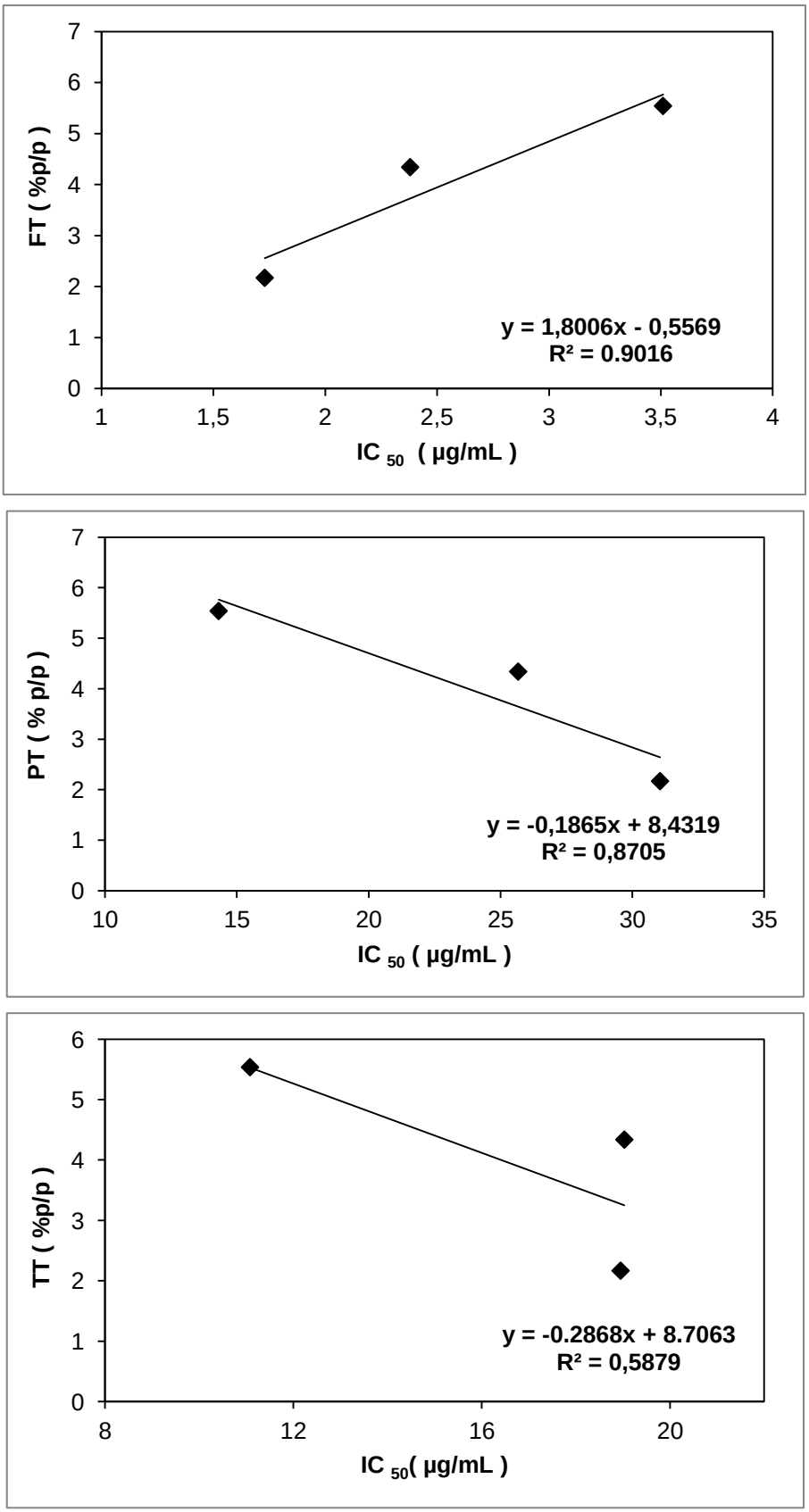


Figura 5.24 – Correlação entre a % de FT, PF e TT com a atividade antioxidante representada pelo valor de IC_{50}.

5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana e antifúngica

Pode-se considerar que um extrato apresenta boa atividade antimicrobiana quando a concentração inibitória mínima (CIM) do mesmo for inferior a 0,1 mg/mL. A atividade do extrato é considerada como moderada quando a CIM estiver entre 0,1 e 0,5 mg/mL e fraca se estiver entre 0,5 e 1,0 mg/mL. Para CIM acima de 1,0 mg/mL considera-se o extrato como inativo. Esta classificação proposta por Holetz (2002) pode ser utilizada como referência, pois valores muitos altos na CIM podem inviabilizar a produção de um medicamento fitoterápico a partir do extrato em estudo. A Tabela 5.12 resume os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana da solução extrativa e respectivas frações.

Tabela 5.12 – Concentração inibitória mínima em mg/mL da solução extrativa (EB) de *D. ecastaphyllum* e suas frações frente aos microrganismos avaliados.

AMOSTRA	*E. coli*	*S. aureus*	*C. krusei*	*C. albicans*	*T. menthagrophytes*	*M. canis*
SE lote 002	> 1,250	> 1,250	0,312	> 1,250	0,078	0,039
FOB4	> 1,250	> 1,250	0,016	> 1,250	0,078	0,039
FOA6	> 1,250	> 1,250	0,016	1,250	0,039	0,019
FA8	> 1,250	> 1,250	> 1,25	> 1,250	1,250	1,250
AB	* 0,005	* 0,005	** 0,320	** 0,320	** 0,320	**0,320

SE lote 002: solução extrativa lote 002; FOB4: fração butanol; FOA6: fração acetato; FA8: fração aquosa; AB antibacteriano referência * gentamicina, ** fluconazol

De acordo com os resultados apresentados observa-se uma maior atividade antimicrobiana frente aos dermatófitos tanto para a solução extrativa quanto para as frações FOB4 e FOA6, sendo que esta atividade apresentou-se superior ao antifúngico fluconazol utilizando como referência. A fração aquosa (FA8) mostrou-se pouco ativa frente aos microrganismos testados. Também pode se observar uma baixa atividade antibacteriana para todas as amostras testadas. Com relação as leveduras o extrato e as frações apresentaram maior atividade para *Candida krusei*. Os flavonoides possuem uma variedade de efeitos biológicos em várias partes das células. São conhecidos por serem sintetizados por plantas em resposta a infecções microbianas, justificando assim sua ação frente a vários microrganismos. Esta

atividade se dá provavelmente por complexação com a parede bacteriana. Os flavonoides mais lipofílicos podem ainda lisar a parede dos microrganismos (COWAN, 1999).

Os efeitos inibitórios dos taninos sobre bactérias e fungos derivam de 3 hipóteses: inibição das enzimas de bactérias e fungos e/ou complexação com os substratos dessas enzimas; ação sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo; complexação com íons metálicos diminuindo a disponibilidade desses para o metabolismo dos microrganismos (SIMÕES *et al.,* 2004).

Em decorrência da presença destes dois metabólitos secundários pode-se sugerir que a atividade antimicrobiana da espécie *D. ecastaphyllum* possa estar relacionada a estas classes de compostos.

5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

As Figuras 5.25, 5.26 e 5.27 apresentam respectivamenteos cromatogramas das frações butanol (FOA4), acetato (FOA6), e aquosa (FA8) avaliadas nos comprimentos de onda de 270, 310 e 350 nm.

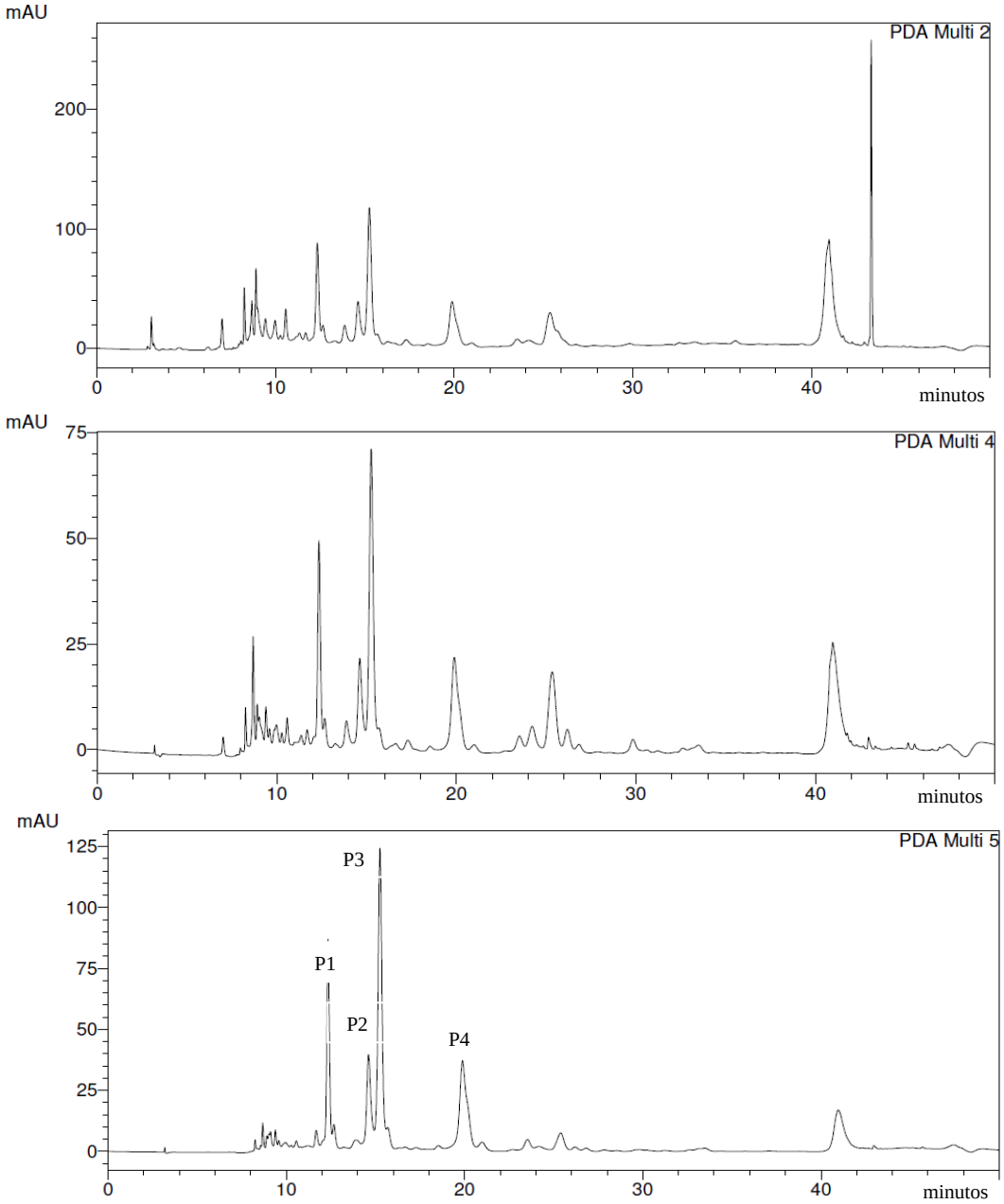


Figura 5.25 – Cromatogramas da FOB4 (fração butanol - solução 2mg/mL) obtidos com comprimentos de onda de 270, 310 e 350nm.

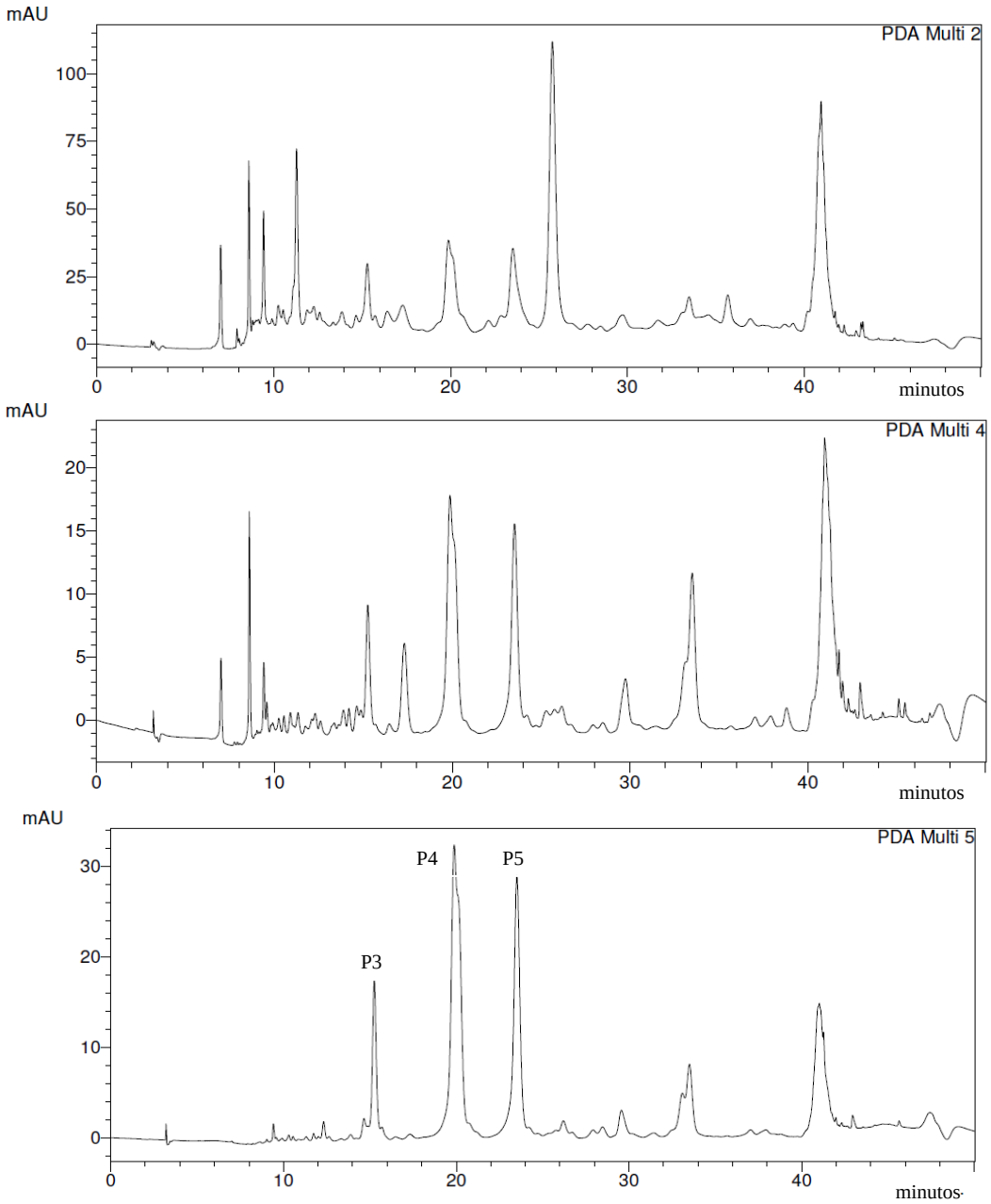


Figura 5.26 – Cromatogramas da FOA6 (fração acetato - solução 2mg/mL) obtidos com comprimentos de onda de 270, 310 e 350 nm.

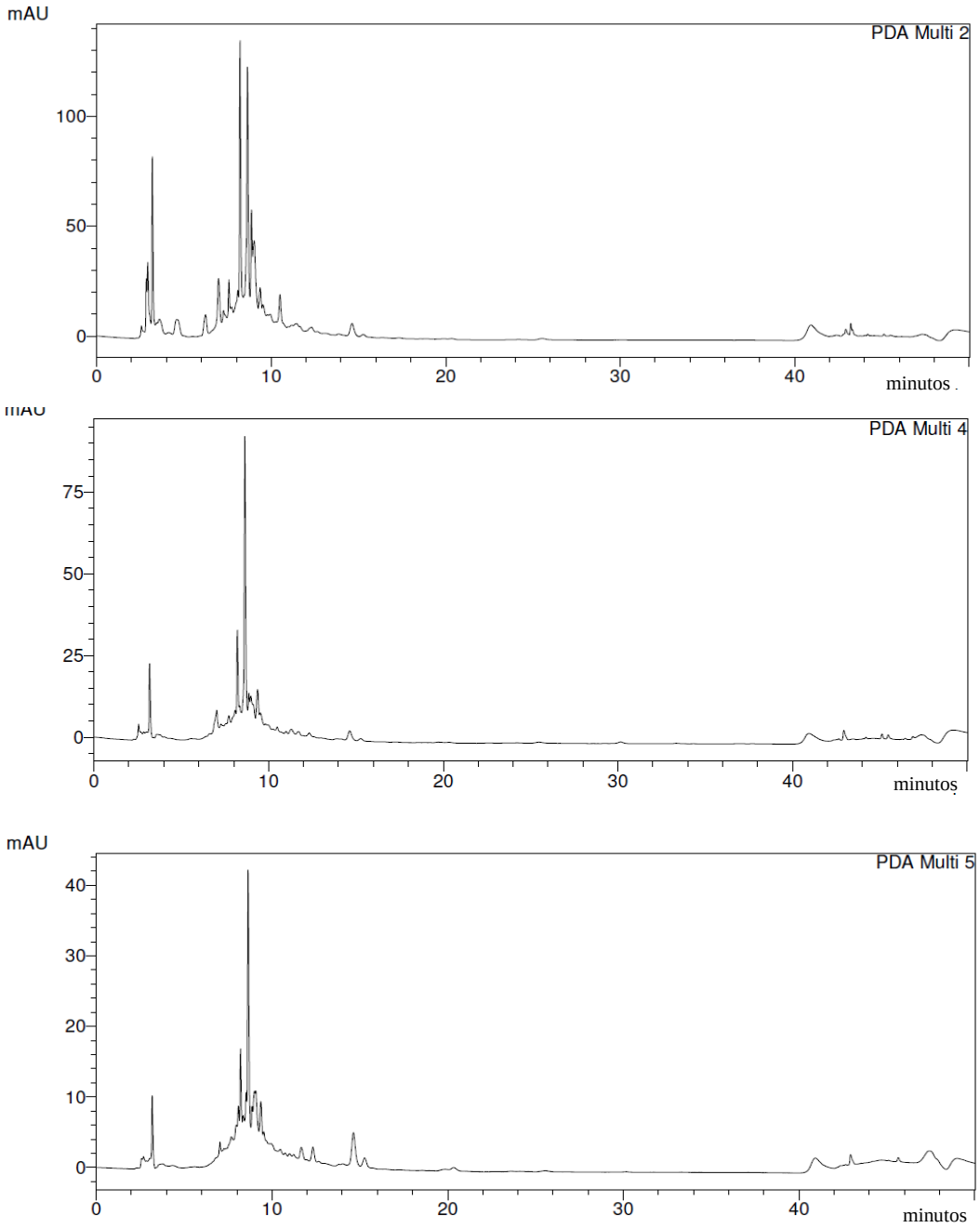


Figura 5.27 – Cromatogramas da FA8 (fração aquosa solução 2mg/mL) obtidos com comprimentos de onda de 270, 310 e 350 nm.

Avaliando as Figuras 5.25, 5.26 e 5.27 pode-se observar uma maior concentração dos picos P1, P2 e P3 na FOB4. Como esta fração apresentou uma maior concentração de flavonoides totais este picos podem ser correspondentes a flavonoides glicosilados que apresentam uma menor afinidade pela fase estacionária mais apolar e eluem com a fase móvel mais rapidamente aparecendo no início do cromatograma. O pico P4 apareceu na FOB4 e na FOA6 podendo ser caracterizado por uma substância que apresenta afinidade semelhante ao acetato de etila e ao butanol. O Pico P5 apareceu apenas na FOA6. Também pode ser observada a presença de um pico que absorve em 270 nm e elui após o P5 com maior concentração na FOA6.

As substâncias mais polares com tempo de eluição inferiores a 10 minutos aparecem majoritariamente na FA8. Nesta fração não foram observados a presença de P1, P2, P3, P4 e P5.

5.6 Obtenção da solução extrativa da própolis vermelha

A solução extrativa da própolis vermelha foi preparada na concentração de 1% de sólidos para que todo o material presente na resina solúvel no solvente pudesse ser extraído. O solvente escolhido para a extração foi o etanol 80% (v/v) visto que o mesmo se mostrou eficiente na extração de flavonoides presentes na própolis vermelha. A temperatura e o tempo de extração foram determinados a partir de trabalhos previamente realizados com a própolis vermelha (DAUGSCH, 2007; SILVA, 2008).

5.6.1 Caracterização da solução extrativa da própolis vermelha

As concentrações de sólidos encontradas na solução extrativa da própolis vermelha foi 0,8% (p/p) indicando que 80% dos sólidos presentes na própolis foram extraídos durante o processo de extração. A Tabela 5.13 resume os resultados obtidos para as análises realizadas com a solução extrativa da própolis vermelha em comparação com os resultados obtidos para a solução extrativa de *D. ecastaphyllum* lote 002.

Tabela 5.13 – Resultados das análises realizadas com a solução extrativa de *D. ecastaphyllum* e própolis vermelha.

MATERIAL AVALIADO	pH (-)	AAF (μg/m/L)	IC_{50} (μg/m/L)	FT (% p/p)	PT (% p/p)	TT (% p/p)
Extrato bruto própolis	5,7	55,14	8,72	2,76 ± 0,001 22,08 mg/g*	18,76 ± 0,60 150 mg/g*	10,81 ± 0,24 86,48 mg/g*
SE lote 002	5,9	36,20	4,34	2,38 ± 0,018 10,8 mg/g**	25,67 ± 0,23 116,8 mg/g**	19,03 ± 0,01 86,58 mg/g**

* mg/g de própolis ** mg/g de folha

SE: solução extrativa, AAF: concentração necessária para 100% de atividade pelo método de formação do complexo fosfomolibdênio; IC_{50} (μg/mL) concentração do extrato que representa 50% da atividade máxima antioxidante pelo método DPPH; FT: flavonoides totais; PT: polifenóis totais; TT: taninos totais.

A análise dos flavonoides totais presentes na própolis vermelha foram realizadas através do método de complexação dos flavonoides com o cloreto de alumínio. Chang *et al.,* (2002) determinou que este método é o mais seletivo para a análise de flavonoides da própolis visto que o alumínio forma complexo mais específico com flavona e flavonol. Com relação aos flavonoides totais foram observadas concentrações de 25 mg/g e 43 mg/g de equivalente em quercetina no extrato da própolis vermelha da região de Alagoas. No presente trabalho a concentração de flavonoides totais em equivalente de quercetina foi de 22,8 mg/g de própolis (2,76% em função dos sólidos extraídos). A concentração de polifenóis totais encontrada em equivalente de ácido gálico foi de 150 mg/g de própolis (18,76% em função dos sólidos extraídos), enquanto que a própolis vermelha da região de Maceió apresentou teor entre 99,7 e 232 mg/g (DAUGSCH, 2007; SILVA, 2008).

Daugsch (2007), através de análise cromatográfica por CLAE em coluna C18, utilizando-se como fase móvel água acidificada e metanol, encontrou na própolis vermelha do estado de Alagoas os flavonoides rutina, liquiritigenina, daidzeina, pinobanksina, quercetina, luteolina, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina, pinocembrina, pinobanksin-3-acetato e biochanina-A.

A própolis vermelha do nordeste do Brasil (grupo 13) possui similaridade com a própolis de Cuba, em relação aos flavonoides presentes. Os compostos químicos encontrados na própolis de Cuba foram: ácido gálico, isoliquiritigenina, (-)

liquiritigenina, formononetina, biochanina A, (3S)-vestitol, (3S) - 7- *O*-metilvestitol, (3S) - 7,4´- diidroxi - 2- metoxiisoflavana, 6aS, 11aS) - medicarpina, (6 aS, 11 aS)- homopterocarpina, (6aR,11aR) - vesticarpana, (6aR, 11aR) - 3,8 – diidroxi – 9 - metoxipterocarpana, (6aR, 11aR) – 3 - hidroxi-8,9 - dimetoxipterocarpana, (6aR,11aR)- 3,4-diidroxi-9-metoxipterocarpana (PICCINELLI *et al.*, 2005).

No presente trabalho o resultado da dosagem de taninos totais foi de 86,48 mg/g de própolis o que corresponde a 10,81% em função dos sólidos do extrato. Poucos trabalhos foram encontrados relacionando a presença de taninos em amostra de própolis. Entretanto Fatoni (2008) também detectou presença de taninos em análise realizada com própolis de *Trigona ssp.*

Comparando os resultado das análises realizadas com o extrato de própolis e o extrato de *D. ecastaphyllum* pode-se observar que a concentração de flavonoides totais e polifenóis totais em mg/g foi maior para a própolis vermelha, enquanto que a concentração de taninos totais foi praticamente a mesma para as duas amostras avaliadas.

A atividade antioxidante da própolis vermelha foi avaliada por duas metodologias: no método de seqüestro do radical DPPH a % de inibição foi de 81% (solução 18,66 µg/mL de sólidos no meio reacional) com IC_{50} de 8,72 µg/mL, enquanto que no método de formação do complexo fosfomolibdênio a inibição de 100% ocorreu com 36,20 µg/mL de sólidos. Alencar *et al*. (2007), avaliaram a atividade antioxidante do extrato etanólico de própolis vermelha pelo método do DPPH e obtiveram uma inibição de 57% utilizando uma solução com 90 µg /mL, portanto inferior aos resultados obtidos neste estudo.

Pode-se observar que a concentração de flavonoides totais por g de própolis é o dobro da concentração de flavonoides totais presentes na folha sendo que a concentração de polifenóis totais na própolis vermelha foi um pouco superior à concentração de polifenóis totais por g de folha de *D. ecastaphyllum*. Entretanto, ao se comparar a atividade antioxidante do extrato da própolis vermelha e do extrato das folhas de *D. ecastaphyllum* em µg/mL de sólidos observa-se pelos dois métodos avaliados que a atividade apresentada pelos extratos das folhas foi superior à atividade do extrato da própolis vermelha. Tal fato evidencia que a composição dos polifenóis presentes nas folhas de *D. ecastaphyllum* e na própolis vermelha apresentam diferenças, como esperado (SILVA, 2008; DAUGSCH, 2007).

5.6.2 Avaliação da atividade antimicrobiana e antifúngica

Após a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana da solução extrativa de própolis vermelha, verificou-se que a atividade da solução extrativa da própolis vermelha frente as cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi mais elevada que a atividade da solução extrativa de *D. ecastaphyllum*. Com relação à atividade frente às leveduras observa-se que a própolis vermelha apresentou melhor desempenho apenas contra *Candida albicans* enquanto que para *Candida krusei* as atividades foram similares. Frente ao fungo dermatófito *Trichophyton rubrum* a atividade da solução extrativa foi ligeiramente superior enquanto que para o *Microsporum canis* a solução extrativa de *D. ecastaphyllum* apresentou maior atividade. A Tabela 5.14 resume os valores encontrados para a atividade antimicrobiana das respectivas soluções extrativas.

Tabela 5.14 – Concentração inibitória mínima em mg/mL da solução extrativa de própolis vermelha (PV) e *D. ecastaphyllum* (SE).

Amostra	*E. coli*	*S. aureus*	*C. krusei*	*C. albicans*	*T. rubrun*	*M. canis*
PV	0,078	0,156	0,312	0,625	0,018	0,625
SE	>1,25	> 1,25	0,312	> 1,25	0,078	0,039
AB	*	*	** 0,320	** 0,320	** 0,320	**0,320

PV: solução extrativa de própolis vermelha; SE lote 002: solução extrativa de *D. ecastaphyllum* lote 002; AB antibacteriano referência * gentamicina, ** fluconazol

Os resultados da concentração inibitória mínima da própolis vermelha variaram de acordo com o microrganismo testado, para *Streptococcus mutans* a MIC foi de 10 µg/mL, *Pseudomonas aeruginosa* de 31 µg/mL, *Staphylococcus aureus* de 125 µg/mL, *Clostridium perfringens* de 7 µg/mL, *Salmonella typhimurium* de 200 µg/mL, e *Escherichia coli* isolada de suíno de 1000 µg/mL.

Em alguns casos, a própolis apresentou melhor inibição do que os antibióticos analisados, dentre os quais pode-se citar a lincomicina, tilosina e virginamicina utilizando-se o microrganismo *S. thyphimurium (*DAUGSCH, 2007).

A atividade da própolis vermelha também foi avaliada em diferentes épocas do ano frente a alguns microrganismos. Para o *Streptococcus mutans* a MIC variou

entre 62,5 a 250 µg/mL, para *Streptococcus sobrinus* entre 15,6 a 62,5 µg/mL, e para o *Staphylococcus aureus* entre 31,2 a 250 µg/mL (SILVA, 2008).

5.6.3 Caracterização do extrato glicólico da própolis vermelha

Foram realizadas algumas caracterizações físico-químicas com o extrato glicólico da própolis vermelho para avaliar se o processo de produção deste extrato poderia promover uma degradação dos ativos e perda de atividade antioxidante. Os resultados das análises realizadas se encontram na Tabela 5.15.

Tabela 5.15 – Resultados das análises realizadas com a solução extrativa e extrato glicólico de própolis vermelha.

Material avaliado	pH (-)	IC_{50} (µg/m/L)	S (%)	FT (%)	PT (%)	TT (%)
Extrato bruto própolis	5,7	8,72	0,8 ±0,1	2,76 ± 0,01 22,08 mg/g	18,76 ± 0,60 150 mg/g	10,81 ± 0,24 86,48 mg/g
Extrato glicólico	5,8	7,09	8,0 ±0,2	2,48±0,007	13,96 ± 0,36	10,65 ± 0,14

S: concentração de sólidos; FT: flavonoides totais; PT: polifenóis totais; TT: taninos totais.

De acordo com os resultados apresentados pode-se observar que a maior variação ocorreu na concentração de polifenóis totais sendo observada uma pequena redução nos teores no extrato glicólico.

5.7 Obtenção e caracterização dos extratos secos nebulizados

A secagem de extratos é uma operação muito empregada na padronização de produtos naturais nas formas farmacêuticas que apresentam maior número de registros junto a ANVISA, que são as formas farmacêuticas sólidas como cápsulas e comprimidos. Além desta necessidade de padronização de extratos, a secagem promove a retirada de solvente, concentrando os princípios ativos em um ambiente onde as moléculas terão menor reatividade entre si, gerando um produto mais estável e com a menor possibilidade de contaminação microbiana.

O *spray dryer* vem sendo utilizado como uma alternativa eficiente na secagem de extratos vegetais visto que apresenta uma série de variáveis independentes que podem ser alteradas durante o processo como a temperatura de entrada do ar de secagem, vazão de alimentação, pressão da atomização e vazão do ar de secagem (OLIVEIRA *et al*., 2010).

O conjunto de parâmetros especificados para operação do *spray dryer* associados às características do material de alimentação (extrato, adjuvantes) irão determinar as propriedades do extrato seco.

A temperatura de entrada do gás de secagem irá reduzir a tensão superficial favorecendo a formação das gotículas (SOARES, 2002; OLIVEIRA; PETROVICK; 2010), porém deve ser ajustada de forma a não causar degradação dos princípios ativos.

A vazão de alimentação do extrato irá determinar a condição de evaporação do líquido presente no material de alimentação. Uma vazão muito elevada pode causar a diminuição da temperatura de saída propiciando um aumento na umidade no interior do secador levando a um maior contato do material úmido com a parede da câmara de secagem (MASTERS, 1985) acarretando em perda de material diminuindo o rendimento do processo. Existe uma relação muito próxima entre os parâmetros vazão, temperatura de entrada e temperatura de saída do ar de secagem. Um aumento de vazão de material na câmara de secagem irá requerer uma maior energia térmica para promover a evaporação do líquido que pode não ocorrer de forma tão eficiente acarretando a diminuição na temperatura de saída refletindo na formação de um pó com maior umidade.

Os parâmetros de secagem escolhidos para o presente trabalho foram: temperatura do ar de entrada (T_{ge}) de 140 °C, temperatura do ar de saída (T_{gs}) de 100 °C, vazão de alimentação de extrato (W_{susp}) de 4 g/min, vazão do ar de secagem (W_g) de 60 m^3/h e pressão (P_{atm}) e vazão (W_{atm}) do ar de atomização de 1 bar e 15 L/min, respectivamente. A concentração de sólidos finais padronizada para todas as formulações de secagem foi de 20% (p/p).

A escolha do adjuvante utilizado na secagem deve ser feita pensando nas características desejadas para o produto final, estabilidade do extrato seco sem deixar de levar em consideração fatores como o custo e a disponibilidade no mercado dos respectivos adjuvantes escolhidos.

No presente trabalho optou-se por trabalhar com os adjuvantes dióxido de silício coloidal (Aerosil 200), maltodextrina (Mor Rex 1910), β-ciclodextrina (Kleptose) e polisorbato 80 (Tween 80).

O dióxido de silício coloidal apresenta uma elevada superfície específica e alto poder adsorvente e tem sido utilizado para a secagem de extratos vegetais apresentado ótimos resultados na obtenção de produtos secos (OLIVEIRA; PETROVICK; 2010; OLIVEIRA *et al*., 2006; SOUZA *et al*., 2008; SOUZA *et al.,* 2009).

A maltodextrina é um polímero de sacarídeo obtido pela hidrólise enzimática ou ácida do amido sendo que o produto final é geralmente classificado de acordo com o equivalente de dextrose (DE). A temperatura de transição vítrea da maltodextrina aumenta com a diminuição da DE. Desta forma utiliza-se geralmente maltodextrinas com baixo DE para aumentar a temperatura de transição vítrea de materiais de difícil secagem (ricos em açúcar, por exemplo). A maltodextrina ainda apresenta vantagens como o baixo custo, maior solubilidade e por este motivo acarreta em uma menor viscosidade da solução de secagem (KENYON, 1995; OLIVEIRA *et al*., 2010).

A utilização de tensoativos no material a ser seco irá promover uma diminuição na tensão superficial durante o processo de secagem favorecendo a formação das gotículas (SOARES, 2002; OLIVEIRA; PETROVICK; 2010). Além disso, a presença de tensoativos no extrato seco poderá promover uma melhora na solubilidade do mesmo, podendo influir na atividade biológica dos mesmos. Extratos nebulizados de *Achyrocline satureioides* apresentaram melhor atividade anti-inflamatória na presença de polisorbato 80 e dióxido de silício coloidal (de SOUZA *et al.,* 2007).

A ciclodextrina é obtida a partir da degradação enzimática do amido através da enzima ciclodextrina glicosil transferase. De acordo com a organização dos grupamentos hidroxila da molécula possibilita a formação de uma superfície interna hidrofóbica e externa hidrofílica o que permite a formação de um complexo de inclusão, que pode alterar as características da molécula encapsulada como alteração de solubilidade, melhora na estabilidade entre outros (SZEJTLI, 1998; OLIVEIRA *et al.,* 2010).

Diversos trabalhos foram realizados utilizando os adjuvantes dióxido de silício coloidal e maltodextrina para a obtenção de extratos secos a partir de extratos ricos em polifenóis e flavonoides. Na maioria dos trabalhos o dióxido de silício coloidal foi utilizado em proporções que variam entre 20% e 80% em função dos sólidos do extrato (CUNHA *et al.,* 2010; SOUZA *et al*., 2009; GEORGETI *et al.,* 2008; SOUZA *et al*., 2008; SILVA, 2007; De SOUZA *et al*., 2007; OLIVEIRA *et al*., 2006; SENNA *et al.,* 1997).

Para a realização de ensaio preliminar de secagem visando a avaliação da influência do adjuvante de secagem, os parâmetros operacionais do secador *spray dryer* foram mantidos constantes alterando-se a formulação de secagem, a qual foi composta por solução extrativa + dióxido de silício coloidal e solução extrativa + maltodextrina DE 10. O objetivo deste ensaio foi verificar a influência do adjuvante na proteção dos ativos durante o processo de secagem. Foi utilizada a dosagem de flavonoides totais para o monitoramento da degradação de ativos. A Tabela 5.16 apresenta de maneira resumida os resultados obtidos.

Tabela 5.16 – Avaliação dos extratos secos obtidos nos ensaios preliminares.

FORMULAÇÃO	S (%)	DSC (%)	MD (%)	FT (%)
DE 002	75	25	-	2,34
DE 003	75	-	25	2,49
Extrato bruto	100	-	-	2,38

S: sólidos provenientes do extrato; DSC: dióxido de silício coloidal; MD: maltodextrina; FT: teor de flavonoides totais

Os resultados apresentados indicaram que os parâmetros de secagem escolhidos e os adjuvantes utilizados se mostraram eficientes na manutenção da concentração dos flavonoides totais. Desta forma optou-se por manter as condições de secagem previamente estabelecidas para a secagem do extrato concentrado a fim de se realizar um estudo de estabilidade dos mesmos.

Para um melhor estudo dos adjuvantes optou-se por trabalhar com dióxido de silício e maltodextrina isoladamente e em mistura com concentrações diferentes. Silva (2007) utilizou para a secagem de extrato aquoso de *Illex paraguariensis* 30%

dos adjuvante maltodextrina e dióxido de silício isolados e misturados com 70% de sólidos provenientes do extrato, proporção muito semelhante a escolhida no presente trabalho para a obtenção dos extratos secos DE 002, DE 003, DE 004 e DE 005 (25% de adjuvante e 75% de sólidos do extrato).

O polisorbato 80 foi adicionado em uma das formulações para avaliar o impacto da adição de um tensoativo durante o processo de secagem assim como avaliação da solubilidade do extrato seco (DE 005). Pensando na melhora da solubilidade do extrato seco foi ainda realizada uma secagem utilizando como adjuvante a β-ciclodextrina (DE 007).

Os extratos secos obtidos foram caracterizados pela determinação dos teores de flavonoides, polifenóis e taninos totais, umidade residual, e atividade antioxidante. O desempenho da secagem foi avaliado através da determinação do rendimento do processo. Os resultados das análises realizadas com os extratos secos estão descritos nas Tabelas 5.17 e 5.18. A Figura 5.28 mostra a aparência visual dos extratos secos obtidos após a secagem por *spray drying*.

Tabela 5.17– Rendimento da secagem e propriedades físico-químicas dos extratos secos de *D. ecastaphyllum.*

EXT	FT (%)	PT (%)	TT (%)	Ur (%)	RP (%)	AA (-)
EC DE	2,39 ± 0,02	23,08 ± 0,47	18,67 ± 0,08	NA	NA	NA
DE 002	2,44 ± 0,01	19,03 ± 0,20	15,92 ± 0,05	3,86 ± 0,04	69,53	0,145 ± 0,01
DE 003	2,47 ± 0,02	20,40 ± 0,13	17,17 ± 0,03	4,08 ± 0,30	62,75	0,122 ± 0,01
DE 004	2,35 ± 0,01	17,95 ± 0,02	14,82 ± 0,06	5,44 ± 0,29	65,78	0,118 ± 0,01
DE 005	2,42 ± 0,03	17,99 ± 0,03	14,62 ± 0,09	5,97 ± 0,04	47,97	0,174 ± 0,01
DE 006	2,45 ± 0,01	17,51± 0,02	14,62 ± 0,05	3,33 ± 0,56	67,40	0,170 ± 0,02
DE 007	2,47 ± 0,01	20,80 ± 0,14	16,57 ± 0,04	7,64 ± 0,06	61,98	0,135 ± 0,01
SE PV	2,76 ± 0,05	18,76 ± 0,60	10,81 ± 0,24	NA	NA	NA
PV 002	2,84 ± 0,01	18,32 ± 0,43	6,71 ± 0,25	6,04 ± 0,01	10,93	0,158 ± 0,01
PV 003	1,80 ± 0,01	12,82 ± 1,05	9,50 ± 0,15	3,45 ± 0,27	48,98	0,171 ± 0,03

EXT: extrato concentrado/seco; FT: % flavonoides totais; PT: % de polifenóis totais; TT: % de taninos totais; AA: atividade de água; Ur: umidade residual; RP: rendimento do processo; NA: não se aplica

Tabela 5.18 – Resultados de atividade antioxidante para os extratos secos de *D. ecastaphyllum.*

EXT	IC_{50} (µg/mL)	INIB MAX (%)
EC DE	3,58	84,44
DE 002	3,31	86,80
DE 003	3,19	87,81
DE 004	3,27	87,23
DE 005	3,50	87,30
DE 006	3,31	87,33
DE 007	3,21	87,71
SE PV	8,72	81,00
PV 002	10,80	82,19
PV 003	15,31	77,66

EXT: extrato seco; INB MAX: valor de inibição máxima da atividade antioxidante (DPPH); AA: atividade de água;

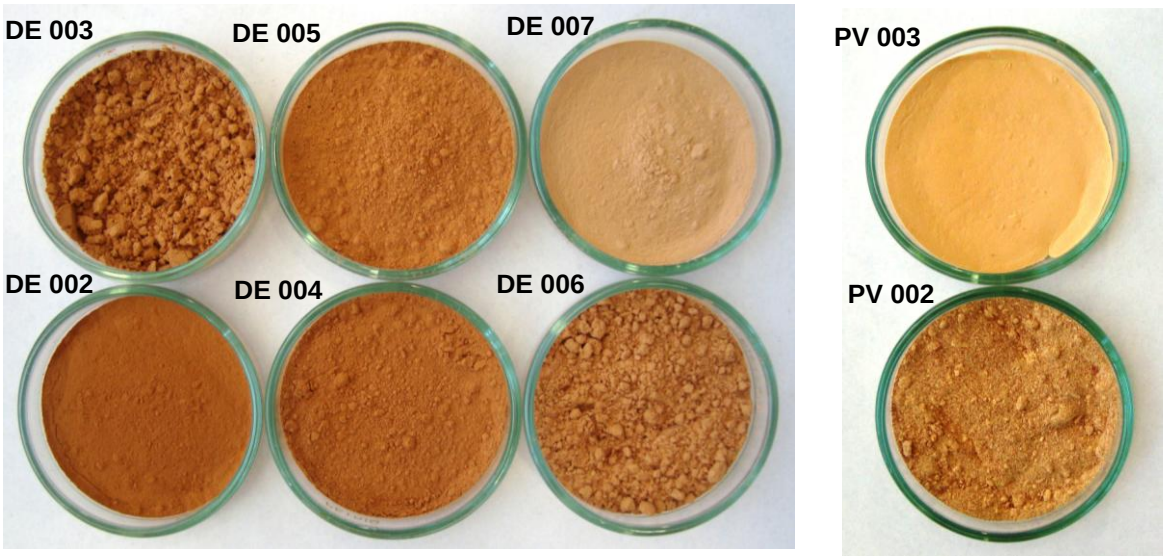


Figura 5.28 – Extratos secos de *D. ecastaphyllum* (DE) e de própolis vermelha (PV).

De acordo com os resultados apresentados a concentração de flavonoides totais assim como atividade antioxidante dos extratos secos de *D. ecastaphyllum* apresentaram valores muito próximos aos obtidos a partir do extrato bruto. Tal fato reforça a correlação entre a atividade antioxidante e a concentração de flavonoides. Além disso, evidencia que a maioria dos flavonoides presentes na folha de *D. ecastaphyllum* possam apresentar certa estabilidade térmica.

Foi observada uma queda nas concentrações de polifenóis e taninos presentes no extrato seco de *D. ecastaphyllum*, sendo que a queda foi menor nas formulações DE 003 e DE 007.

Também não foi observada redução nos teores dos flavonoides quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina presente no extrato de *Achyrocline satureioides* (Lam.) após secagem em *spray drying* do extrato concentrado com temperatura de entrada de 140 e 150 °C e saída de 95 a 96°C, vazão de 4 mL/min e pressão de atomização de 2 bar (SENNA *et al*., 1997).

Os polifenóis presentes no extrato de *Illex paraguariensis* (ácido clorogênico, rutina, ácido neoclorogênico e ácido criptoclorogenico) não se degradaram após secagem do extrato concentrado por *spray dryer* utilizando-se como adjuvante dióxido de silício e maltodextrina. Em contrapartida, a utilização da temperatura de entrada entre 157 – 160 °C com vazão de 3 mL/min e pressão de atomização de 2 bar promoveu uma diminuição nos teores dos flavonoides quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina no extrato seco por *spray dryer* quando se comparou o teor dos mesmos flavonóides no extrato liofilizado. Entretanto, mesmo com a queda no teor de flavonóides, observou-se a atividade anti-inflamatória nos extratos secos (de SOUZA *et al.,* 2007).

A temperatura de entrada de 150 °C também se mostrou prejudicial na secagem dos extratos de *Passiflora alata, Bauhinia forficata, Maytenus ilicifolia e Rosmarinus officinalis* visto que a concentração de polifenóis totais e flavonoides totais sofreu redução em relação a concentração original no extrato (OLIVEIRA *et al*., 2006; SOUZA *et al*., 2008).

A secagem do extrato concentrado de *Bauhinia forficata* utilizando-se como parâmetros o vazão de 4 mL/min, temperatura de entrada de 150 °C e pressão de atomização de 5 bar provocaram uma redução na concentração de flavonoides

totais no extrato seco, porém tal motivo não prejudicou a atividade hipoglicemiante do extrato quando o mesmo foi testado em ratos (CUNHA *et al.,* 2010).

Foram observadas quedas significativas no conteúdo de polifenóis totais e flavonoides durante a secagem por *spray dryer* do extrato de *Rosmarinus officinalis* onde foram utilizadas temperaturas de 80 e 150 °C (SOUZA *et al*., 2008).

Georgetti *et al.* (2008), também observou uma queda nos teores de flavonoides e polifenóis totais, e diminuição da atividade antioxidante após a secagem de extrato de soja em *spray drying*. A redução nos teores foi menor quando se utilizou como adjuvante o dióxido de silício coloidal. Os parâmetros escolhidos para a secagem foram temperatura de entrada de 150 °C, vazão de alimentação de 4 g/min, vazão do ar de secagem de 0,0227 kg/s, vazão do ar de atomização de 15 L/min e pressão de atomização de 1 bar.

O rendimento dos extratos secos de *D. ecastaphyllum* foram relativamente elevados considerando-se que a secagem foi realizada em escala laboratorial. Todos os rendimentos ficaram acima de 60% exceto o rendimento do extrato seco DE 005 que foi de 47,97%. Este baixo valor de rendimento ocorreu devido a maior aderência deste extrato nas paredes do *spray dryer* durante o processo de secagem o que sugere que a adição de polisorbato 80 pode ter atrapalhado a formação do pó o que refletiu diretamente no processo de secagem.

O processo de secagem do extrato aquoso de *Illex paraguariensis* em escala semi-industrial apresentou um rendimento entre 40% e 60% inferior ao apresentado no presente trabalho (SILVA, 2007). A secagem dos extratos de *Passiflora alata, Bauhinia forficata* e *Maytenus ilicifolia* utilizando como adjuvante o dióxido de silício coloidal apresentaram rendimentos de 68%, 65% e 62,9%, respectivamente (BOTT, 2008), semelhantes aos obtidos no presente trabalho.

Antes da secagem do extrato etanólico de própolis realizou-se a concentração do mesmo através de rotaevaporação com o intuito de se retirar totalmente o conteúdo de álcool do extrato. Durante o processo de concentração foi observado uma separação de fases no extrato da própolis vermelha, ocorrendo a formação de uma camada de material com característica resinosa no fundo do balão e o líquido sobrenadante que apresentou uma coloração vermelha e ligeiramente turva.

Devido e estas características do extrato concentrado optou-se por utilizar como adjuvante a β-ciclodextrina devido as suas propriedades de encapsular

moléculas hidrofóbicas melhorando a sua solubilização. Durante a secagem com β-ciclodextrina observou-se uma alta aderência do material seco no ciclone do equipamento o que refletiu em um baixo rendimento do processo (35,4%). Devido a este motivo o extrato seco PV 002 foi obtido em quantidade insuficiente para a realização do estudo de estabilidade. Apesar do baixo rendimento, o extrato seco PV 002 manteve praticamente a mesma concentração de flavonoides e polifenóis totais sendo observada uma queda na concentração de taninos totais com relação ao extrato bruto.

Ao se utilizar uma combinação dos adjuvantes maltodextrina, dióxido de silício e polisorbato 80 para a secagem do extrato concentrado (PV 003) pode-se observar uma queda no teor de flavonoides, polifenóis e taninos totais quando comparado ao teor do extrato bruto. Além disso, a atividade antioxidante do extrato seco PV 003 foi menor. Em contrapartida foi observado um maior rendimento no processo de secagem (48,98%) e uma menor umidade deste extrato seco observando-se a formação de um pó solto.

Bruschi *et al.* (2003) realizou a secagem de extrato de própolis utilizando com adjuvante a gelatina com e sem a adição do manitol em temperaturas de 140 e 160ºC. O extrato seco com melhores características foi obtido com temperatura de 160ºC utilizando-se como adjuvante a gelatina na proporção de 6/1 e manitol na concentração de 20% em relação aos sólidos observando-se assim, manutenção dos marcadores químicos e atividade antibacteriana do extrato seco.

A concentração de água em um extrato seco pode ser avaliada de diversas maneiras. No presente trabalho a concentração de água total (umidade residual) foi avaliada por titulação empregando equipamento de Karl Fischer enquanto que a concentração de água livre foi medida através da atividade de água do extrato. A água livre pode variar de 0 a 1 sendo que quanto maior for este valor maior será a concentração de água disponível para reações químicas, físicas e crescimento microbiano.

A atividade de água de todos os extratos secos ficou abaixo de 0,2. Este excelente resultado encontrado inviabiliza o crescimento de fungos e bactérias visto que um valor de atividade de água inferior a 0,5 pode evitar o crescimento microbiano (OLIVEIRA *et al.,* 2010).

A umidade de todos os extratos secos ficou abaixo de 10%. Os extratos com maiores valores de umidade foram os preparados através da utilização de β-ciclodextrina (DE 007 e PV 002). A β-ciclodextrina pode também ter propiciado uma retenção de água durante a secagem aumentando a umidade do produto.

5.7.1 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia da partícula é diretamente afetada pelas condições do experimento e parâmetros determinados para secagem por *spray drying*. A concentração de sólidos e a característica dos adjuvantes utilizados também irão afetar a morfologia da partícula (PARAMITA *et al*., 2010), sendo a microscopia eletrônica de varredura (MEV) uma importante ferramenta para a avaliação da morfologia e superfície das mesmas.

As Figuras 5.29 e 5.30 apresentam fotomicrografias obtidas por MEV dos extratos secos de *D. ecastaphyllum* e própolis vermelha, onde pode-se observar a morfologia e tamanho das partículas.

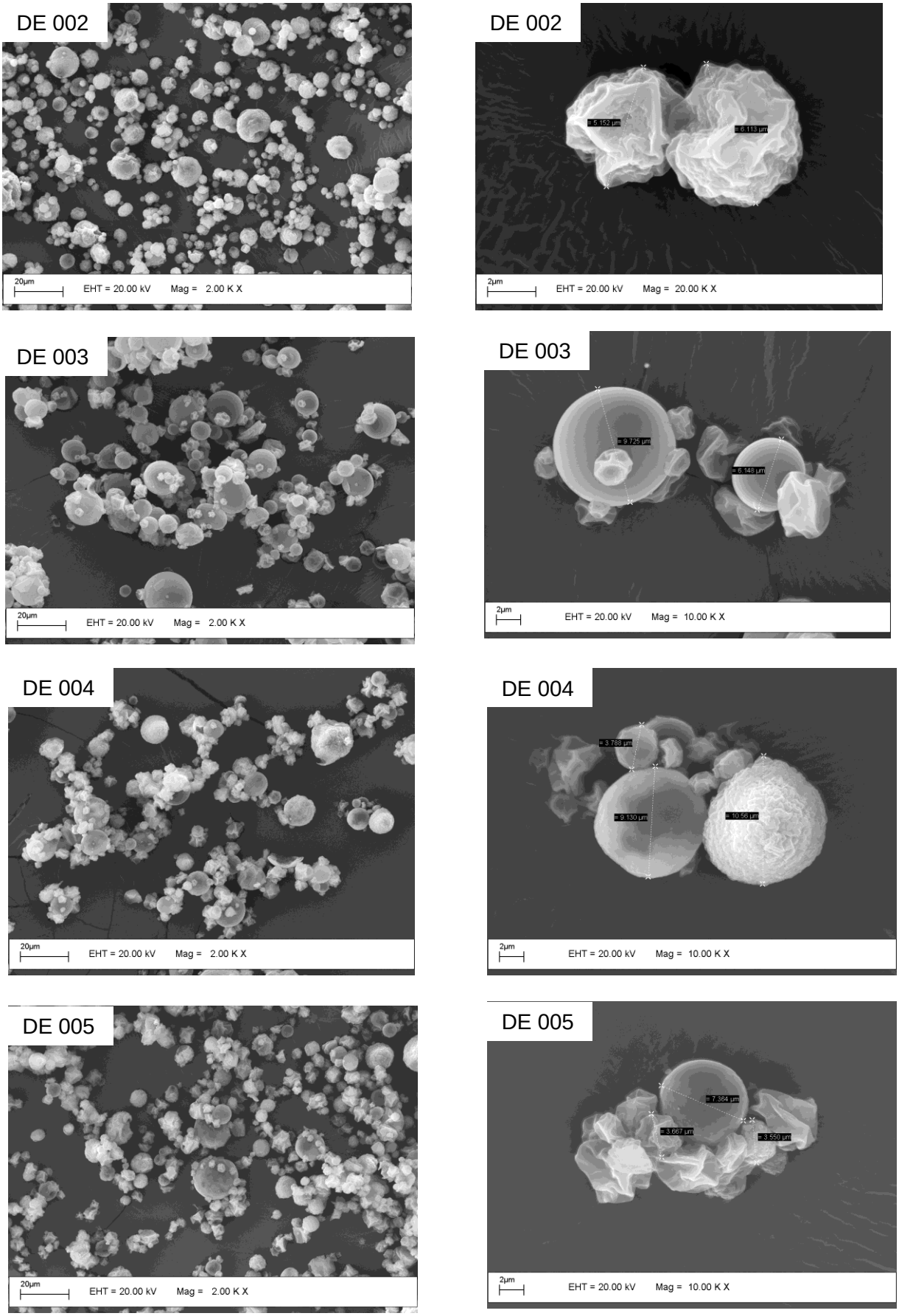


Figura 5.29 – Fotomicrografias obtidas em MEV para os extratos secos de *D. ecastaphyllum*.

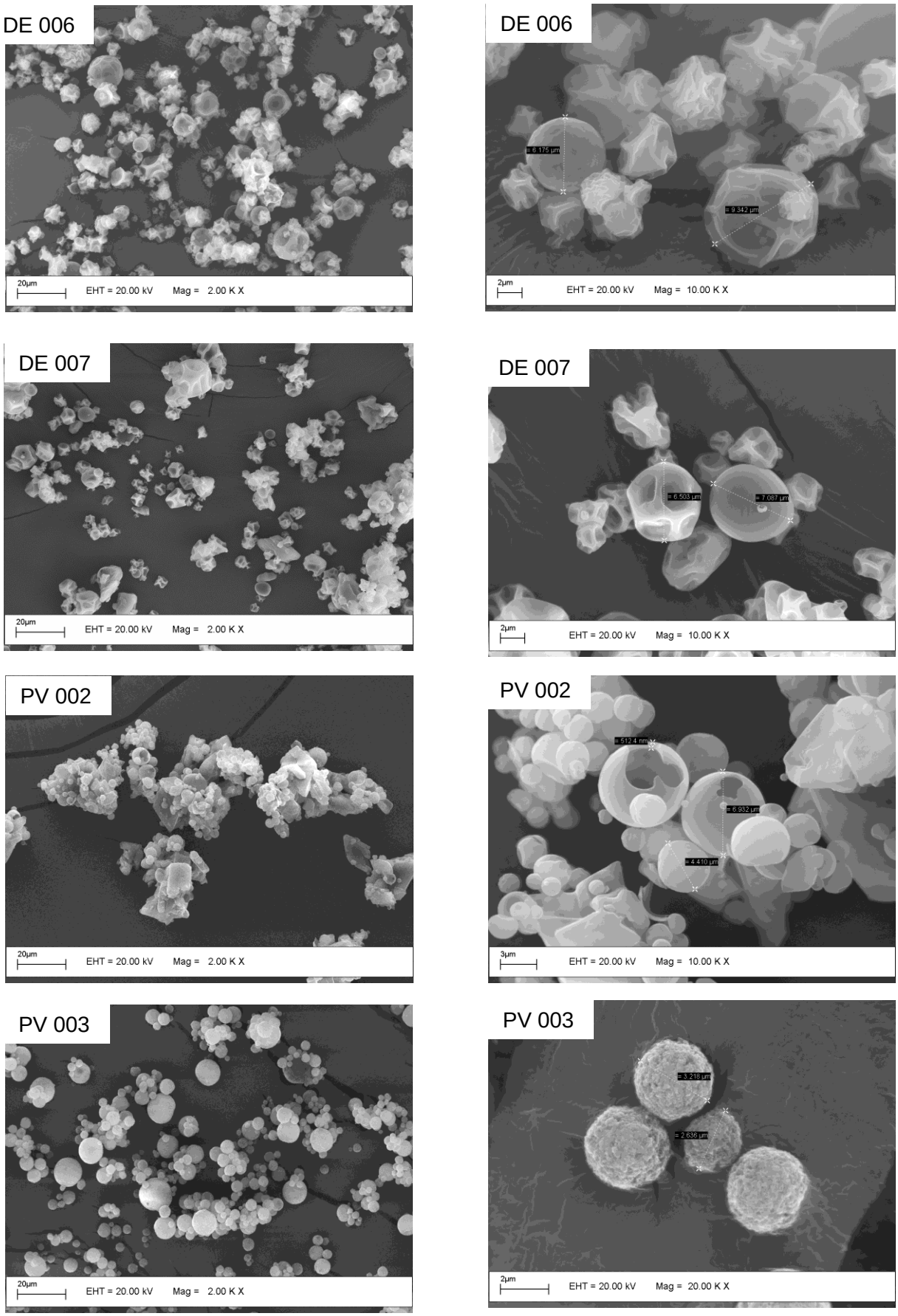


Figura 5.30 – Fotomicrografias obtidas em MEV para os extratos secos de *D. ecastaphyllyum* e própolis vermelha.

Os extratos secos com dióxido de silício (DE 002) ou com maltodextrina (DE 003) apresentaram formação de partículas esféricas, porém com características diferentes entre si. As partículas do extrato DE 002 apresentaram superfície mais rugosa enquanto que nas partículas do extrato DE 003 a superfície apresentou-se com aspecto liso. Microesferas obtidas a partir da secagem do extrato de *Bauhinia forficata* Link com 20% de dióxido de silício (em função dos sólidos) originou a partículas de formato arredondado com superfície irregular, semelhante à morfologia encontrada no presente trabalho para o extrato seco onde se utilizou apenas dióxido de silício como adjuvante (CUNHA *et al.,* 2010).

Os extratos secos com mistura de dióxido de silício e maltodextrina (DE 004, 005 e 006) apresentaram na forma de uma mistura de partículas com características arredondadas lisas e rugosas sendo que a adição do polisorbato 80 em DE 005 não promoveu nenhuma alteração morfológica na partícula quando se compara com a partícula obtida a partir de DE 004.

A formação de partículas arredondadas foi observada em trabalhos que utilizaram dióxido de silício coloidal como adjuvantes (SENNA *et al*., 1997; OLIVEIRA *et al.,* 2006). A utilização de dióxido de silício, maltodextrina e amido para a secagem de extrato de soja promoveu a formação de partículas irregulares com tendência de aglomeração (GEORGETTI *et al.,* 2008).

A análise das imagens do extrato seco com β-ciclodextrina (DE 007) com aumento de 2.000 vezes mostra a presença de alguns cristais misturados a partículas de tamanho arredondadas. Com o aumento de 10.000 vezes observa-se que a superfície das partículas arrendondadas apresenta-se lisa ou irregular. A presença de cristais também foi detectada no extrato seco de própolis vermelha contendo β-ciclodextrina (PV 002), porém todas as partículas arredondadas apresentaram superfície lisa. Este comportamento pode ser explicado pela diferença de composição da própolis vermelha e do extrato das folhas de *D. ecastaphyllum* visto que os extratos secos DE 007 e PV 002 apresentavam em sua composição 20% de sólidos sendo que deste conteúdo 80% correspondia ao adjuvante β-ciclodextrina e 20% era proveniente dos sólidos do extrato. A presença de cristais observada nos extratos secos com β-ciclodextrina pode ser proveniente da formação de um complexo entre os sólidos dos extratos com a β-ciclodextrina.

Estudos realizados com a β-ciclodextrina mostraram que a partícula desta dextrina apresenta-se na forma de cristais quando analisada antes da secagem (FERNANDES, 2008). Ao avaliar os resultados obtidos no presente trabalho pode-se observar a presença de alguns cristais na fotomicrografia apresentada na Figura 5.30 porém, a maioria das partículas apresentam formato arredondado com superfície lisa o que pode ser melhor observado nas fotomicrografias de DE 007 e PV 002 com aumento de 10.000 vezes. A mudança na morfologia da β-ciclodextrina pode sugerir que tenha ocorrido a formação de complexo de inclusão com componentes do extrato. Entretanto mais estudos são necessários para a confirmação desta informação.

As imagens do extrato de própolis seco com uma mistura dos adjuvantes dióxido de silício coloidal e maltodextrina (PV 003) com aumento de 2.000 vezes mostram a formação de partículas com superfície arredondadas e mais homogêneas quando se compara com as imagens obtidas para o extrato DE 006 por exemplo. O aumento destas partículas em 20.000 vezes mostra que a superfície das partículas é rugosa.

Pode-se observar que uma das partículas de PV 002 apresenta-se com a superfície fraturada o que tornou possível realizar a medição da espessura da parede que foi de 512,4 nm.

5.7.2 Avaliação das características farmacotécnicas do extrato seco

O resultado de granulometria das partículas apresentado na Tabela 5.19 está de acordo com os tamanhos de partículas observados nas imagens obtidas pelo MEV que variaram de 3 a 10 µm. A Figura 5.31 apresenta a distribuição granulométrica dos extratos secos expressa em porcentagem acumulada.

As partículas obtidas pela secagem de própolis com gelatina e manitol apresentaram diâmetro médio de 2,7 µm (BRUSCHI *et al.,* 2003), ligeiramente inferiores aos encontrados nas partículas do extrato seco PV 002 e PV 003 obtidas neste trabalho. Em contrapartida a secagem dos extratos de *Passiflora alata, Maytenus ilicifolia* e *Bauhinia forficata* formaram partículas com tamanho entre 13,8 e 16,5 µm, valores muito superiores ao obtidos para os extratos secos de *D. ecastaphyllum* (OLIVEIRA *et al*., 2006).

Tabela 5.19 – Análise granulométrica dos extratos secos de *D. ecastaphyllum* e própolis vermelha.

	DE 002	DE 003	DE 004	DE 005	DE 006	DE 007	PV 002	PV 003
Média (µm)	8,15	7,44	8,90	7,46	6,75	6,63	13,74	10,24
Desvio *	4,88	5,00	5,58	5,72	4,10	4,13	7,20	6,64

* Desvio relativo a faixa de distribuição

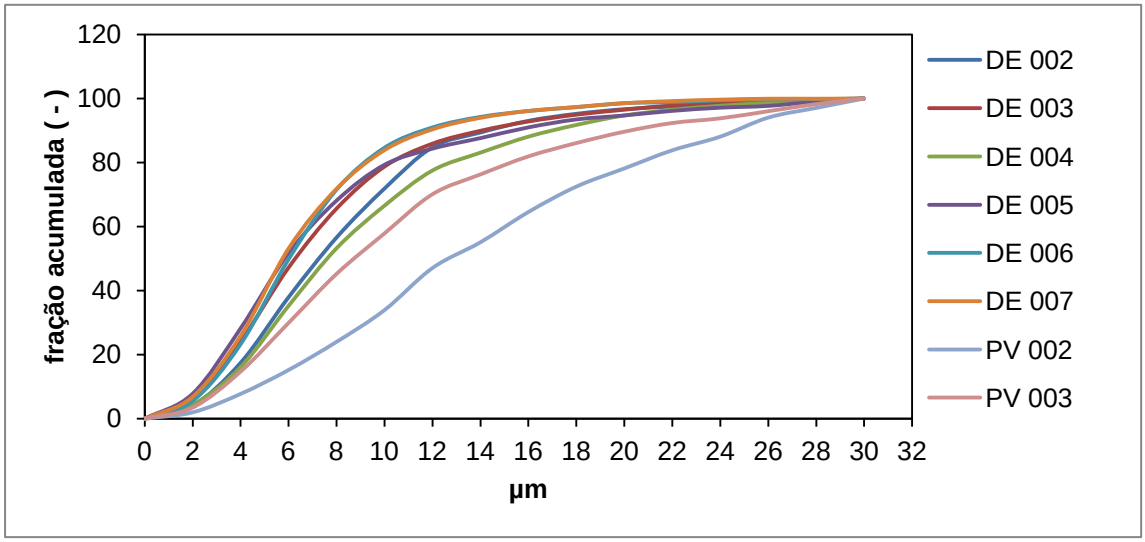


Figura 5.31 – Distribuição granulometrica em fração acumulada dos extratos secos de *D. ecastaphyllyum* e própolis vermelha.

A avaliação das características farmacotécnicas dos extratos secos foi realizada pela determinação da densidade real (ρb) e densidade de compactação (ρc). A partir destas duas medidas foi determinado o Fator de Hausner (FH) e o índice de Carr (IC) cujos valores estão descritos na Tabela 5.20.

Tabela 5.20 – Avaliação das características farmacotécnicas dos extratos secos.

	DE 002	DE 003	DE 004	DE 005	DE 006	DE 007	PV 002	PV 003
ρb (g/mL)	0,33	0,14	0,21	0,21	0,20	0,22	0,23	0,20
ρc (g/mL)	0,52	0,22	0,35	0,35	0,33	0,37	0,49	0,36
FH (-)	1,58	1,57	1,67	1,67	1,65	1,68	2,13	1,80
IC (-)	36,54	36,36	40,00	40,00	39,39	40,54	53,06	44,44

O fator de Hausner e o índice de Carr são parâmetros que relacionam as densidades bruta e compactada dos materiais particulados e podem inferir características de fluidez dos mesmos.

Um pó com boa fluidez apresenta valor do FH < 1,25, enquanto que para valores de FH > 1,25 a fluidez pode ser considerada ruim (AULTON, 2005). A Tabela 5.21 apresenta os valores de IC e a fluidez correspondente (AULTON, 2005):

Tabela 5.21 – Índice de Carr como indicativo da fluidez de pós.

ÍNDICE DE CARR	TIPO DE FLUXO
5 -15	Excelente
12 - 16	Bom
18 - 21	Favorável a tolerante
22 - 35	Fraco
33 - 38	Muito fraco
> 40	Extremamente fraco

De acordo com os parâmetros avaliados nenhum dos extratos secos obtidos apresentou boa fluidez sendo que o extrato seco DE 002 foi o que apresentou melhores resultados enquanto que o extrato seco PV 002 apresentou piores índices de fluidez.

De acordo com Aulton (2005), o índice de Carr é uma determinação pontual que muitas vezes não reflete o comportamento real de fluidez do pó visto que

algumas matérias-primas podem apresentar um alto valor para o índice e ao mesmo tempo uma boa consolidação na matriz durante o processo de compressão.

Estudos realizados com o extrato seco de *Bauhinia forficata* obtido com o adjuvante dióxido de silício coloidal mostram valores de ρb, ρc, FH e IC muito semelhantes aos valores obtidos para o extrato seco DE 003 cujo adjuvante também foi o dióxido de silício coloidal (SOUZA, 2003).

Os extratos secos de *Illex paraguariensis* produzido em escala semi-industrial utilizando como adjuvante a maltodextrina e dióxido de silício apresentaram valores de FH e IC entre 1,39 a 1,51 e 28,57 a 33,51 respectivamente. Estes resultados podem ter ocorrido pela secagem realizada em escala semi-industrial e composição do extrato. Além disso, a granulometria do produto seco apresentou diâmetro de aproximadamente 22 µm, sendo o dobro do diâmetro encontrado nos extratos secos produzidos neste trabalho (SILVA, 2007).

5.7.3 Solubilidade

O ensaio de solubilidade seguiu os parâmetros preconizados pela Farmacopéia Brasileira onde foram misturados os extratos secos com partes de água até a obtenção de uma solução. Os extratos DE 002, 003, 004 e 005 apresentaram-se praticamente insolúveis, pois mesmo utilizando mais de 10.000 partes de água por parte de extrato não foi possível observar a solubilização dos mesmos. Pode-se ainda destacar que ocorreu formação de grumos que não se desfizeram com o tempo.

Para o extrato seco DE 006 foi observado uma melhor solubilidade. Quando se utilizou 1.000 partes de água praticamente todo o pó estava dissolvido ocorrendo apenas um leve precipitado branco no fundo do béquer que deve ser proveniente do dióxido de silício que é insolúvel e estava presente no extrato. Mesmo com a presença deste leve precipitado branco o extrato seco DE 006 pode ser considerado como “muito pouco solúvel” visto que não havia grumos do extrato na solução. O extrato DE 007 ficou bem solúvel quando adicionado concentração de água entre 100 e 1000 partes podendo ser considerado como “pouco solúvel”. É importante ressaltar que este resultado pode ser uma confirmação da formação do complexo de

inclusão do extrato com a β-ciclodextrina visto que antes da secagem o extrato não apresentava esta solubilidade em água.

Com relação aos extratos de própolis tanto os extratos secos PV 002 como o PV 003 se mostraram praticamente insolúveis em água visto que com a concentração de 1 parte de extrato seco para 10.000 partes de água foram observados grumos de extrato seco no fundo do béquer.

É importante lembrar que o ensaio de solubilidade foi realizado em temperatura ambiente, apenas com uma leve agitação após a adição do extrato seco na água.

5.7.4 Difração de raios-x

De maneira geral as substâncias sólidas podem estar na forma cristalina ou amorfa. No estado cristalino os átomos e moléculas estão em uma malha muito bem organizada enquanto que no estado amorfo esta malha se apresenta de maneira desordenada. Sabe-se que nem todos os pós se encontram nestes estados extremos de organização existindo assim um estado intermediário onde se mede o grau de cristalinidade dos mesmos, sendo que a técnica de difração de raio-x é amplamente utilizada nesta determinação (SURYANARAYANAN, 1995). A Figura 5.32 apresenta os difractogramas obtidos para o extrato liofilizado e extratos secos de *D. ecastaphyllum*. A Figura 5.33 apresenta os difractogramas obtidos para os extratos secos da própolis vermelha.

Também foram realizadas as análises de difração de raios-x para os adjuvantes puros. Os difractogramas obtidos para os adjuvantes puros estão apresentados na Figura 5.34.

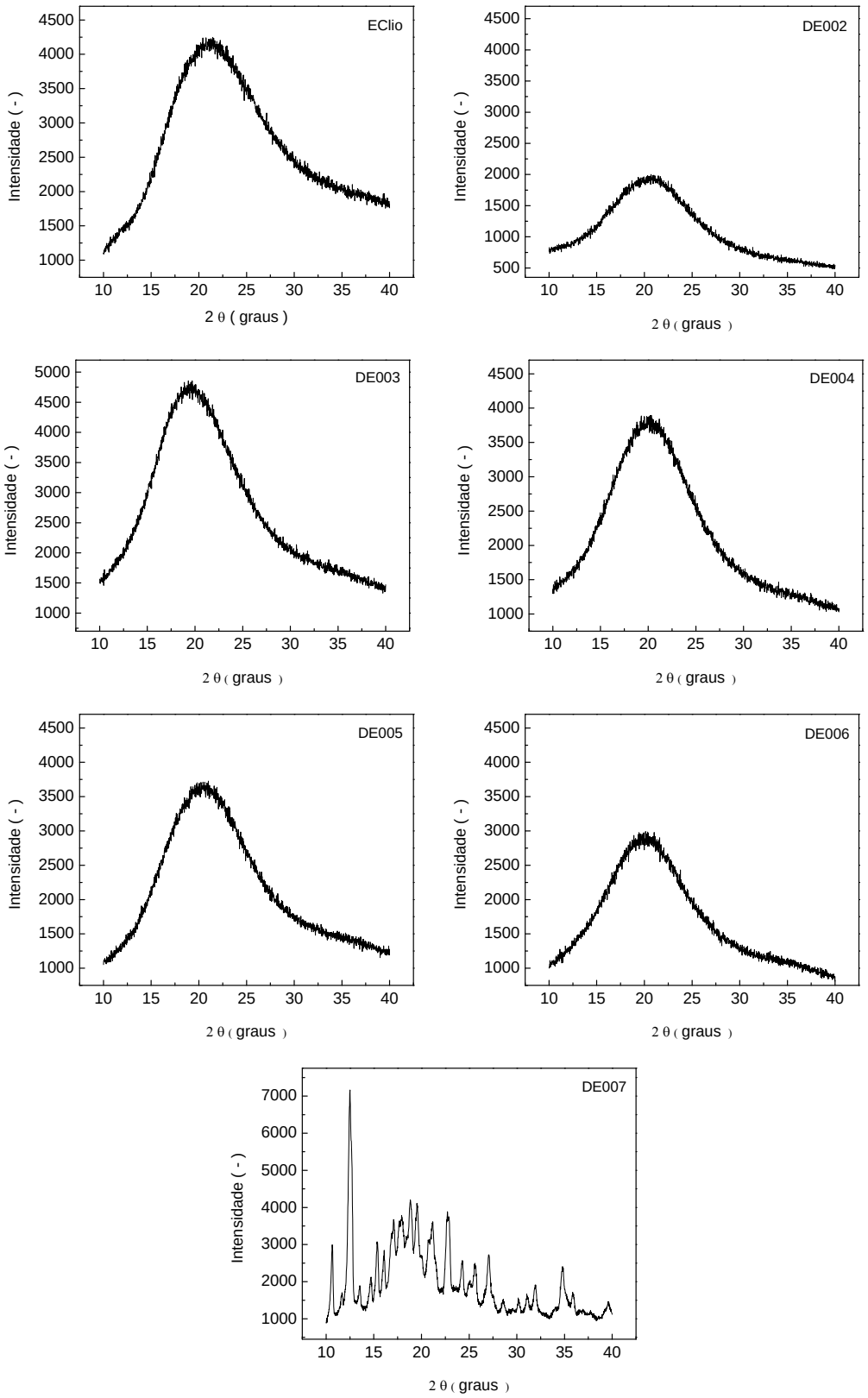


Figura 5.32 – Difractogramas obtidos para o extrato liofilizado e extratos secos de *D. ecastaphyllum*.

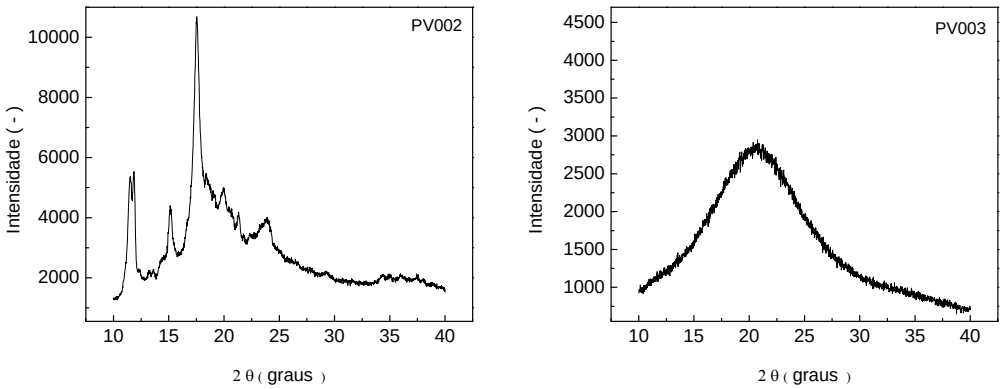


Figura 5.33 – Difractogramas obtidos para os extratos secos da própolis vermelha.

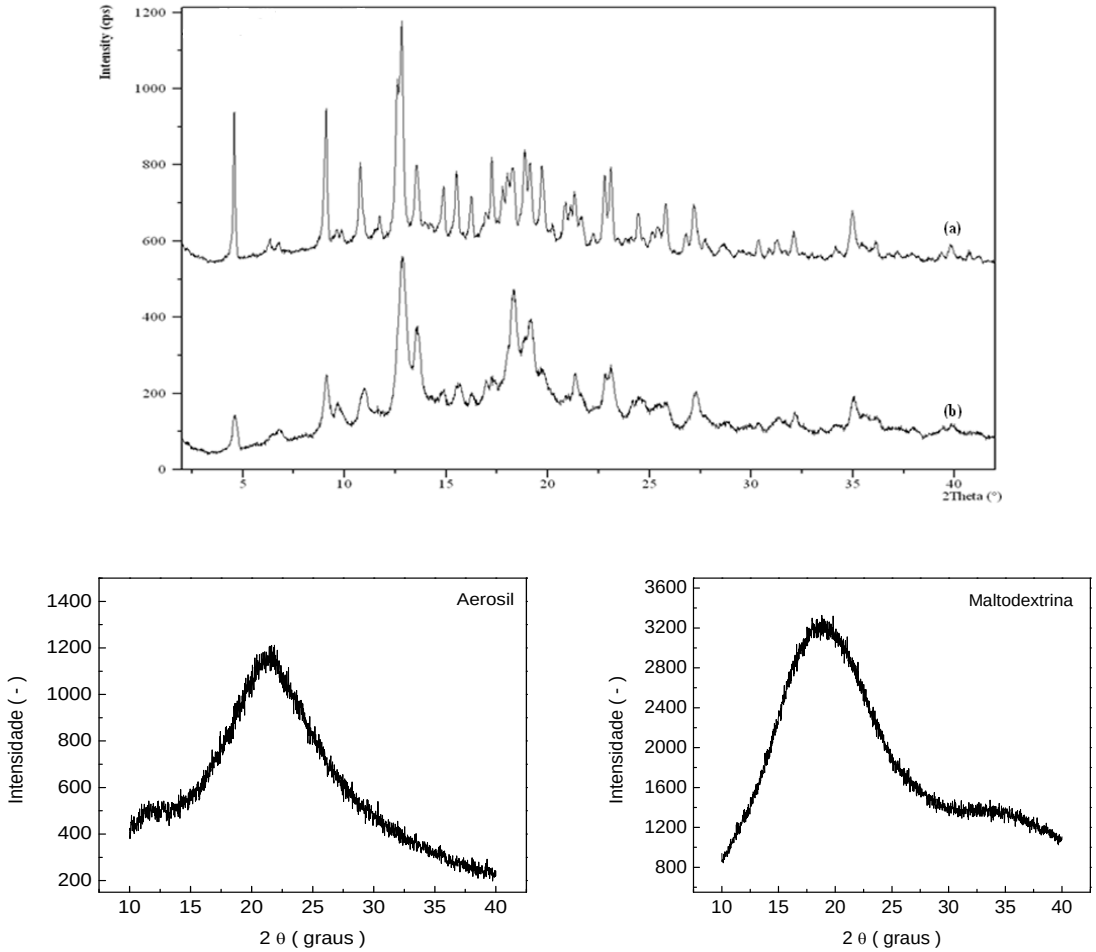


Figura 5.34 – Resultado da análise de difração de raio-x realizados para a beta ciclodextrina (a) BCD nativa; (b) BCD após sua secagem por atomização (Fonte: FERNANDES, 2008); dióxido de silício coloidal (aerosil) e maltodextrina.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5.32 pode-se observar que todos os extratos secos produzidos com os adjuvantes maltodextrina, dióxido de silício e a mistura dos mesmos entre si e com polisorbato 80 formaram estruturas de pó amorfo devido a presença de picos largos não definidos com ruídos abundantes (SOUZA, 2007).

A formação de pó amorfo com picos muito semelhantes aos observados na Figura 5.34 também foram observados nos extratos secos por *spray dryer* de *Bauhinia forficata, Maytenus ilicifolia* e *Passiflora alata*, onde se utilizou como adjuvante o dióxido de silício coloidal (BOTT, 2008).

Com relação aos extratos secos com β-ciclodextrina pode-se observar a formação de um pó cristalino tanto para o extrato seco DE 007, quanto para o extrato PV 002. Avaliando o padrão de difração de raio-x da β-ciclodextrina apresentada na Figura 5.34 pode-se notar uma diferença no padrão de cristalinidade com relação a presença de picos e intensidade dos mesmos ao se comparar com a difração de raio-x da amostra DE 007. Esta diferença foi ainda maior quando se compara a difração de raio-x do extrato seco PV 002 (Figura 5.33). Estes resultados, somados aos resultados de MEV e solubilidade dos extratos secos produzidos com β-ciclodextrina evidenciam uma possível complexação entre este adjuvante e os componentes presentes nos extratos.

5.7.5 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

Para avaliar se ocorreu algum tipo de alteração na composição da solução extrativa de *D. ecastaphyllum* após a sua secagem foram realizadas análises de cada extrato seco produzido. Para a realização desta análise os extratos foram pesados em uma proporção igual de modo a manter o mesmo teor de sólidos e em seguida foram extraídos com uma solução de metanol 40% (v/v). Após a centrifugação o sobrenadante foi então injetado em HPLC para a realização da avaliação do perfil cromatográfico de acordo com os parâmetros descritos no item 4.2.3.

A Figura 5.35 mostra os cromatogramas obtidos de cada extrato seco monitorados no comprimento de onda de 350 nm.

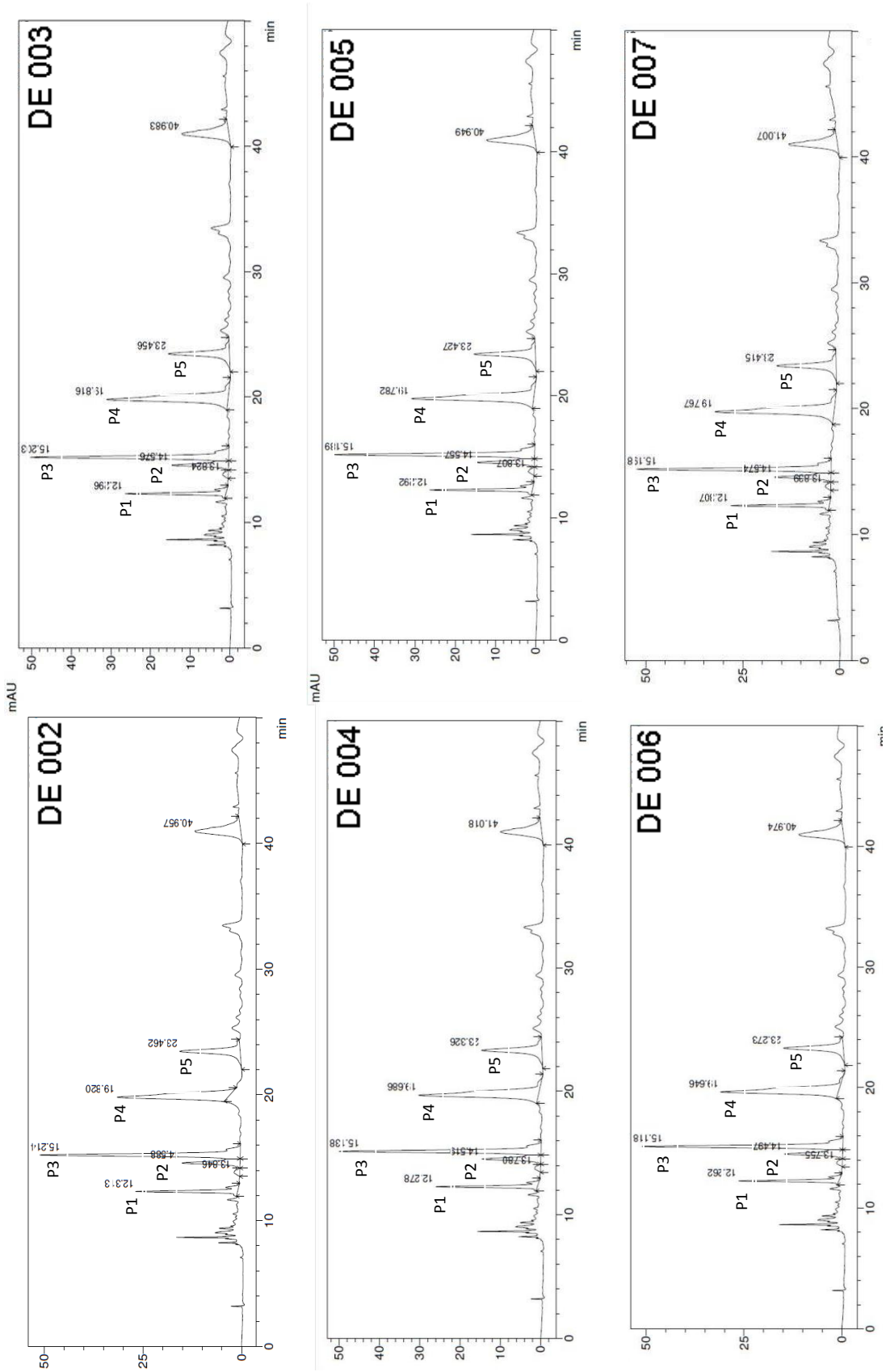


Figura 5.35 - Cromatogramas obtidos de cada extrato seco monitorados no comprimento de onda de 350 nm.

Pode-se observar que os picos P1, P2, P3, P4 e P5 apresentados nos cromatogramas obtidos estão muito semelhantes entre si e ao cromatograma apresentado na Figura 5.16 (350 nm) com relação ao tempo de retenção e intensidade dos picos. Este fato ajuda a confirmar a boa estabilidade térmica das substâncias ativas monitoradas.

5.8 Estudo de estabilidade dos extratos secos

5.8.1 Umidade

A umidade residual dos extratos secos é um parâmetro de extrema importância para a estabilidade do mesmo desta maneira este parâmetro foi monitorado durante todo o estudo de estabilidade acelerada e de longa duração.

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.36 (estabilidade acelerada) e Figura 5.37 (estabilidade de longa duração).

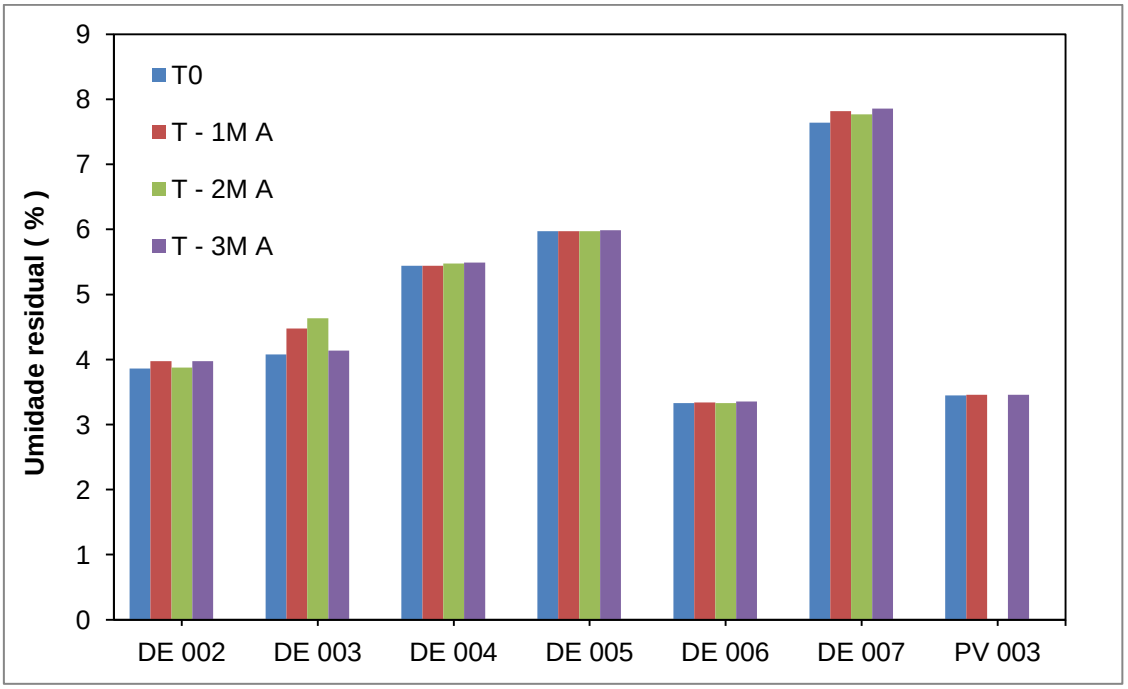


Figura 5.36 – Monitoramento da umidade dos extratos secos durante o estudo de estabilidade acelerado (40ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5%).

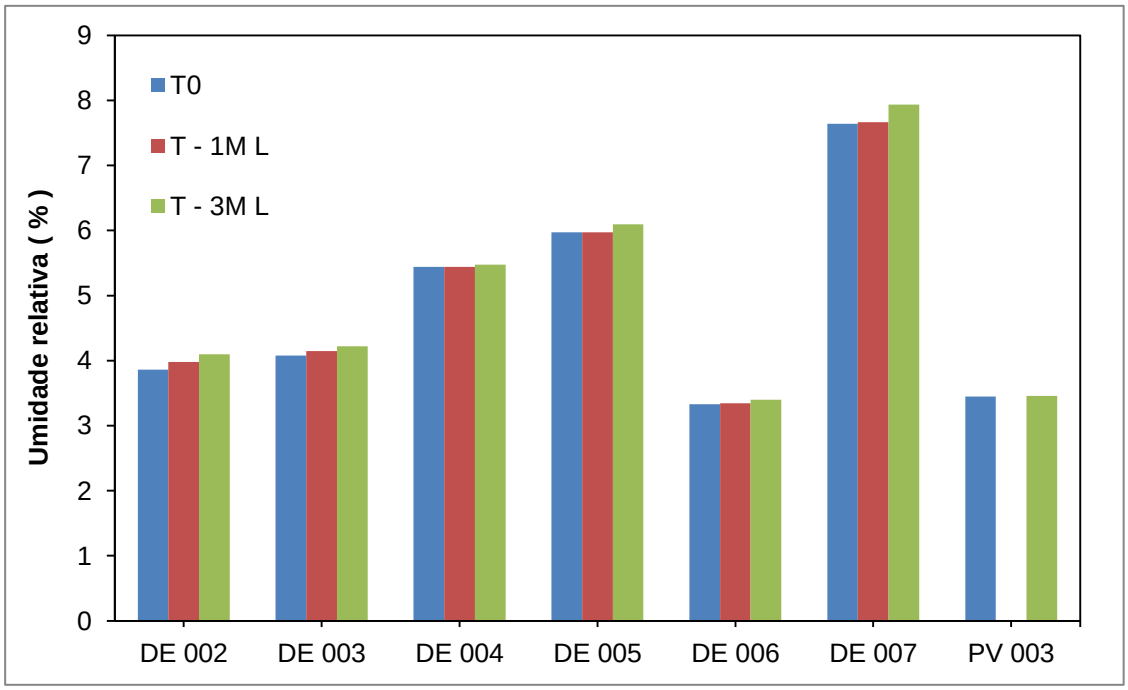


Figura 5.37 – Monitoramento da umidade dos extratos secos durante o estudo de estabilidade de longa duração (30ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5%).

Após a avaliação dos resultados pode-se concluir que a embalagem utilizada no presente trabalho apresentou baixo grau de permeabilidade de água visto que a umidade dos extratos secos ao longo do estudo não sofreu alteração significativa.

5.8.2 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

Para monitorar possíveis alterações no *fingerprint* do extrato seco após a armazenagem dos mesmos nas condições de estabilidade estipuladas foram realizadas análise dos extratos secos que permaneceram por 3 meses nas condições de 40°C ± 2°C e 75% ± 5% UR a 30°C ± 2°C e 75% ± 5% UR.

Após a realização destas análises foram comparadas as áreas relativas destes picos com a áreas dos picos obtidos no tempo inicial do estudo sendo que estes resultados estão expressos na Figura 5.38.

Avaliou-se também a % de queda na área relativa dos picos monitorados durante o estudo de estabilidade. Os cromatogramas referentes ao estudo de estabilidade estão apresentados no apêndice A.

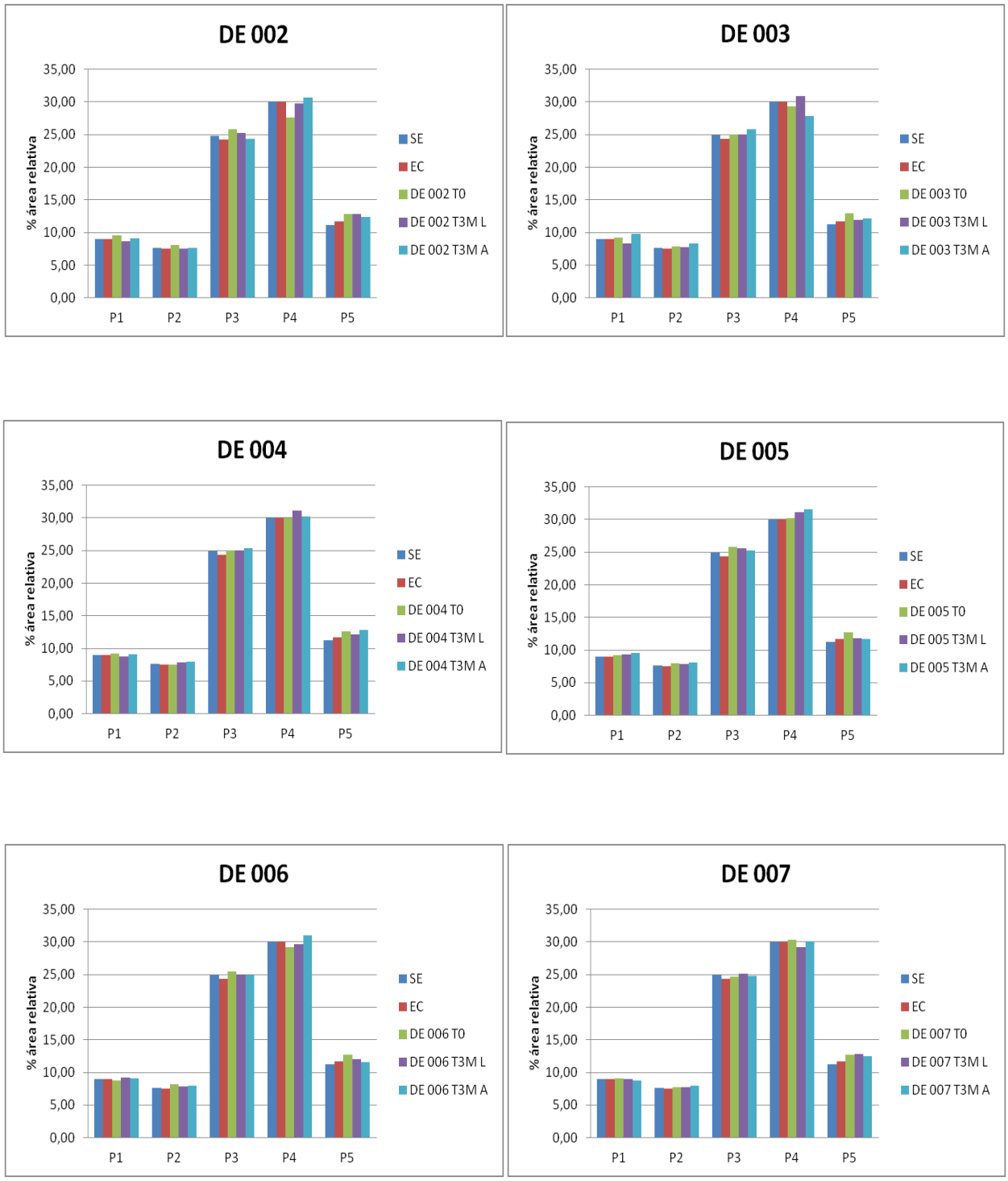
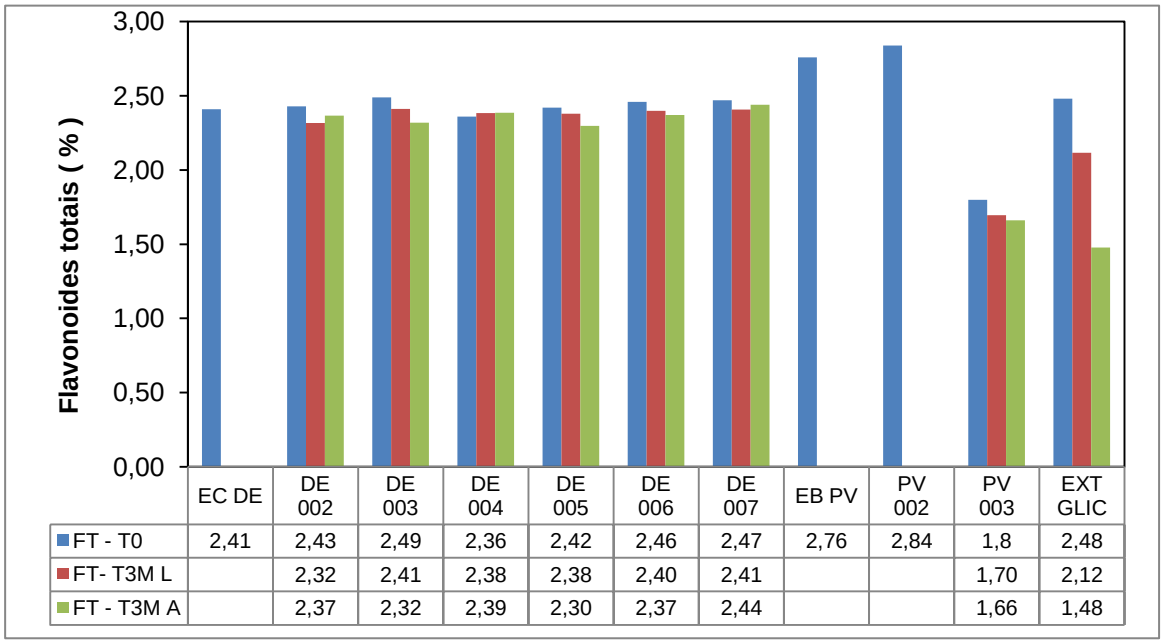


Figura 5.38 – Monitoramento da área relativa referente aos picos monitorados em 350 nm.

5.8.3 Análise dos flavonoides totais

A análise da concentração de flavonoides totais seguiu o método descrito no item 4.2.2 tomando-se o cuidado de padronizar a extração dos ativos presentes no extrato seco para minimizar as variações no estudo inerentes ao modo de preparo da solução para dosagem. Os tempos de análise tanto para a condição de estabilidade acelerada quanto para a estabilidade de longa duração seguiram conforme preconizado pela RDC 14/10 (BRASIL, 2010a).

A Figura 5.39 mostra a concentração de flavonoides totais nos extratos secos de *D. ecastaphyllum* e da própolis vermelha assim como no extrato glicólico de própolis vermelha quantificados ao longo do estudo de estabilidade.



	EC DE	DE 002	DE 003	DE 004	DE 005	DE 006	DE 007	EB PV	PV 002	PV 003	EXT GLIC
FT - T0	2,41	2,43	2,49	2,36	2,42	2,46	2,47	2,76	2,84	1,8	2,48
FT- T3M L		2,32	2,41	2,38	2,38	2,40	2,41			1,70	2,12
FT - T3M A		2,37	2,32	2,39	2,30	2,37	2,44			1,66	1,48

Figura 5.39 – Monitoramento da concentração de flavonoides totais durante o estudo de estabilidade (T3ML: 30ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5%; T3MA: 40ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5%).

A concentração de flavonoides totais variou durante o estudo de estabilidade dos extratos secos de *D. ecastaphyllum*. Avaliando-se a estabilidade acelerada o extrato seco DE 004 mostrou-se mais estável não sendo observada queda de teor enquanto que o extrato DE 003 foi o que apresentou maior queda no teor de

flavonoides totais (6,83%). Porém esta queda ainda está inferior aos 15% aceitáveis para fitoterápicos. Os demais extratos (DE 002, 003, 005, 006 e 007) apresentaram queda no teor de flavonoides totais inferior a 5%.

Com relação à própolis vermelha pode-se observar que houve uma grande perda no teor de flavonoides totais durante a secagem do extrato PV 002 (65,2%). Quando se compara a concentração de flavonoides totais do extrato seco no tempo inicial e após 3 meses de estudo observa-se uma queda no teor de flavonoides totais de 11,7% e 5,55% para o extrato na condição acelerada e longa duração respectivamente. Esta queda foi ainda maior para o extrato glicólico (40,32 e 14,52%) nas condições acelerada e longa duração respectivamente. Tal resultado é um pouco preocupante visto que a maioria dos produtos comercializados de própolis vermelha se encontram na forma de extrato glicólico, porém evidenciam que o desenvolvimento de um extrato seco contendo própolis vermelha pode ser uma alternativa para a comercialização de um produto estável.

Avaliando-se o teor de flavonoides totais presentes no extrato seco PV 002 pode-se observar um aumento na concentração deste ativo quando se compara com o teor de flavonoides totais do extrato bruto. Este fato pode ser proveniente de uma melhor solubilidade dos flavonoides após complexação com a β-ciclodextrina no extrato seco. Ainda pode-se observar que a β-ciclodextrina atuou protegendo os flavonoides da degradação térmica. Mesmo apresentando resultados promissores com relação a dosagem de flavonoides totais a secagem do extrato PV 002 deve ser retrabalhada para a obtenção melhores rendimentos para o processo.

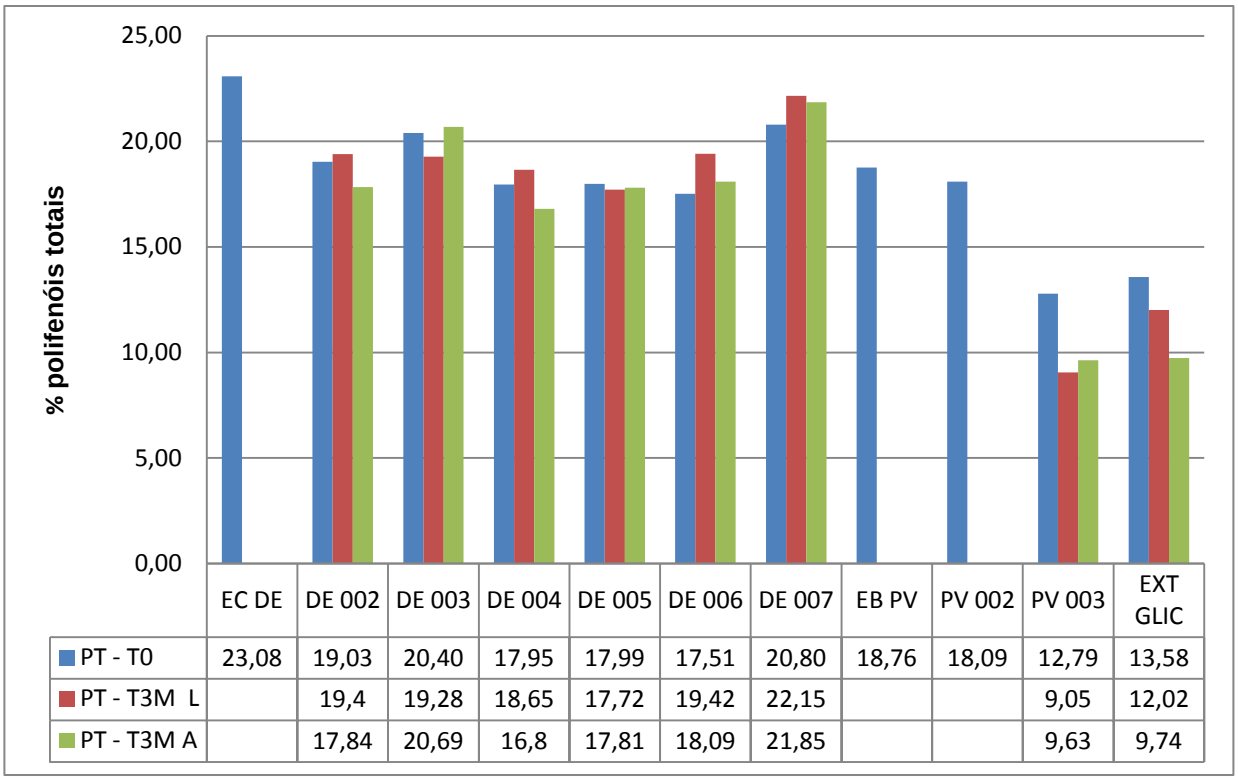
Os extratos secos de *D. ecastaphyllum* mostraram uma melhor estabilidade térmica que o extrato seco da própolis vermelha, o que sugere que a composição de flavonoides presentes na própolis vermelha pode ser diferente da composição de flavonoides presentes nas folhas de *D. ecastaphyllum,* sendo que os flavonoides da própolis vermelha apresentam uma maior sensibilidade à temperatura.

Holzschuh (2008) realizou estudo de estabilidade com extrato seco de *Achyrocline satureioides* contendo dióxido de silício coloidal e polisorbato 80 como adjuvantes. Os resultados deste trabalho mostram que os flavonoides quercetina, 3-O-metilquercetina e luteolina apresentaram variações de teor dentro dos limites especificados pela ANVISA quando submetidos as condições de 40°C ± 2°C e 75% ±5% UR por 6 meses e a 30°C ± 2°C e 75% ±5% UR por 12 meses.

Por outro lado não foi observada degradação dos flavonoides totais presentes no extrato seco de *Passiflora alata* armazenado na condição de 40°C ± 2°C e 75% ± 5% UR por 180 dias. A degradação ocorreu apenas durante o processo de secagem (BOTT, 2008).

5.8.4 Análise de polifenóis totais

Para a complementação do estudo foi realizada uma dosagem de polifenóis totais nos extrato secos ao longo do estudo de estabilidade e os resultados destas análises estão representados na Figura 5.40.



	EC DE	DE 002	DE 003	DE 004	DE 005	DE 006	DE 007	EB PV	PV 002	PV 003	EXT GLIC
PT - T0	23,08	19,03	20,40	17,95	17,99	17,51	20,80	18,76	18,09	12,79	13,58
PT - T3M L		19,4	19,28	18,65	17,72	19,42	22,15			9,05	12,02
PT - T3M A		17,84	20,69	16,8	17,81	18,09	21,85			9,63	9,74

Figura 5.40 - Monitoramento da concentração de polifenóis totais durante o estudo de estabilidade (T3ML: 30ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5%; T3MA: 40ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5%).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5.40 pode se observar que a % de queda de polifenóis após a secagem do extrato concentrado de *D. ecastaphyllum* variou entre 9,87% (DE 007) e 24,13% (DE 006). O estudo de estabilidade indica que os extratos secos DE 002 e DE 004 apresentaram a maior

% de queda de polifenóis durante a estabilidade acelerada (6,4 e 6,25% respectivamente) sendo que os demais extratos apresentaram menor variação de teor.

Desta maneira pode-se sugerir que alguns polifenóis presentes no extrato de *D. ecastaphyllum* apresentam certa instabilidade frente a temperatura visto que o teor de polifenóis reduziu após a secagem. Em contrapartida as temperaturas utilizadas na condução do estudo de estabilidade não provocaram redução no teor de polifenóis além dos limites estabelecido pela ANVISA.

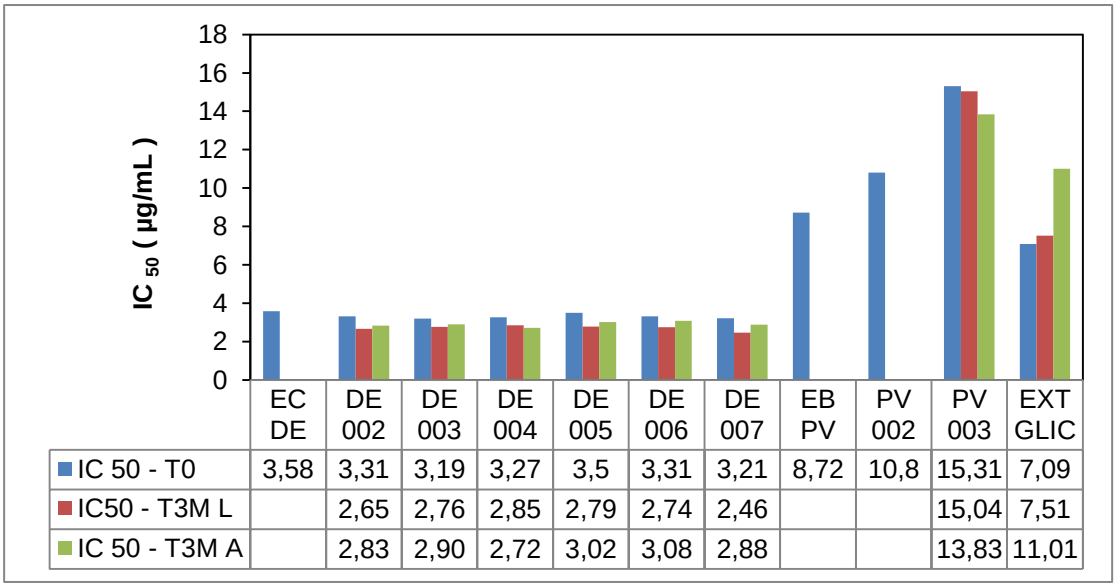
Com relação ao extrato de própolis pode-se observar um comportamento semelhante ao apresentado no estudo de estabilidade dos flavonoides totais. O extrato seco PV 002 mostrou-se estável após o procedimento de secagem enquanto que para o extrato seco PV 003 a queda na concentração de polifenóis totais foi de 31,82%. No caso do extrato glicólico a queda foi de 27,61% na concentração de polifenóis.

Os resultados do estudo de estabilidade do extrato seco PV 003 indica uma diminuição no teor de polifenóis superior a 15% variando entre 24 e 29% de queda, semelhante a observada para o extrato glicólico.

Devido a análise de taninos totais ser uma medida que depende do grau de inteiração da caseína com o polifenol esta medida não foi utilizada no monitoramento do estudo de estabilidade.

5.8. 5 Avaliação do potencial antioxidante

O monitoramento da atividade antioxidante dos extratos secos foi realizado durante o estudo de estabilidade com o intuito de se avaliar o impacto da variação na concentração das substâncias ativas sobre a atividade antioxidante. O método de seqüestro do radical DPPH foi utilizado para esta avaliação. A Figura 5.41 apresenta os resultados obtidos.



	EC DE	DE 002	DE 003	DE 004	DE 005	DE 006	DE 007	EB PV	PV 002	PV 003	EXT GLIC
IC 50 - T0	3,58	3,31	3,19	3,27	3,5	3,31	3,21	8,72	10,8	15,31	7,09
IC50 - T3M L		2,65	2,76	2,85	2,79	2,74	2,46			15,04	7,51
IC 50 - T3M A		2,83	2,90	2,72	3,02	3,08	2,88			13,83	11,01

Figura 5.41 – Monitoramento da atividade antioxidante dos extratos secos durante o estudo de estabilidade (T3ML: 30ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5%; T3MA: 40ºC ± 2ºC e 75% UR ± 5%).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5.41 pode-se observar que ocorreu um aumento na atividade antioxidante dos extratos secos de *D. ecastaphyllum* visto que os valores de IC_{50} ficaram menores após 3 meses de armazenagem, tanto para o estudo acelerado quanto para o de longa duração. Uma das hipóteses possíveis para o comportamento observado pode ser devido a atividade antioxidante de possíveis produtos de degradação formados. Quando se avalia a atividade antioxidante dos extratos de própolis vermelha pode-se observar um redução na atividade antioxidante após o processo de secagem e concentração, evidenciado pelo aumento no valor de IC_{50} dos extratos seco e glicólico. A maior perda de atividade antioxidante ocorreu no extrato glicólico da própolis vermelha sendo observado um aumento nos valores de IC_{50} ao longo do estudo. Esta perda de atividade pode estar relacionada com a degradação dos flavonoides totais visto que a correlação entre estes dois parâmetros é alta com valor de R^2 de 0,9311 conforme observado na Figura 5.42.

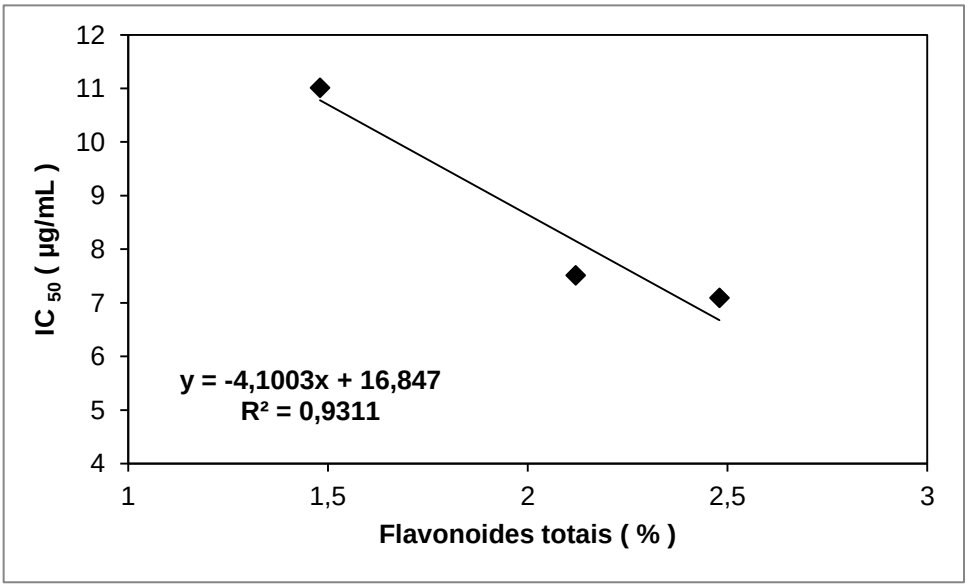


Figura 5.42 – Correlação entre a atividade antioxidante e a % de flavonoides totais do extrato glicólico de própolis vermelho durante o estudo de estabilidade.

5.8.6 Análise colorimétrica

O armazenamento de extratos secos em condições de temperatura e umidade durante o estudo de estabilidade pode promover uma alteração na composição química dos mesmos. Se o componente ou marcador que sofrer degradação alterar a cor do extrato esta alteração poderá ser detectada através de uma análise colorimétrica.

No presente trabalho utilizou o sistema CIE *L*a*b** (também conhecido como CIELAB), que se baseiam na teoria das cores opostas com três dimensões: verde / vermelho, azul / amarelo e preto / branco. Diversos trabalhos na área alimentícia utilizam o sistema CIELAB para avaliação da maturação de tomate, e estabilidade de extratos secos obtidos a partir de extratos de fruta (ARIAS *et al.*, 2000; QUEK *et al.,* 2006; OBÓN *et al*., 2009).

Através da utilização de colorímetro-espectrofotômetro em uma escala de cor apropriada é possível obter dados quantificáveis e precisos sobre a cor dos extratos secos (TASCA, 2007).

O sistema desenvolvido pela *Commission Internationale de l'Eclairage* (CIE), conhecido como CIELAB determina parâmetros de cor e iluminação que se

localizam dentro de uma área de cor definida por três eixos perpendiculares: a luminosidade (*L**), *a** índice de saturação vermelho e *b** índice de saturação amarelo) e tonalidade (*hue*).

A luminosidade (*L**) pode ser definida como atributo de uma cor, onde o zero representa a cor preta e o 100 a cor branca, indicando maior ou menor grau de luz refletida. Com relação aos índices de saturação valores positivos *a** representam a cor vermelha e os valores negativos, a cor verde. Para *b** valores positivos representam a cor amarela e negativo a cor azul (TASCA, 2007). O valor de *hue* irá determinar a percepção de cor visível, quando este valor for 0° a cor observada é a vermelha, quando for 90°, tem-se a cor amarela, 180 ° a cor verde e 270 ° a cor azul (OBÓN *et al.,* 2009). O valor de *croma* indica a intensidade da cor ou saturação uma vez que este valor correlaciona os valores de *a** e *b*.*

QUEK *et al.* (2006) observou a existência de correlação entre a queda no teor de licopeno e caroteno do extrato seco de melão e valores de *hue* apresentando R^2 próximos a 0,94.

Não foi observada variação significativa para os valores de *L** comparando os valores de T0 e T 3M, isso significa que os extratos secos não escureceram durante o período de avaliação. De maneira geral foi observado um aumento nos valores de *a** e *b** durante o período de estabilidade o que acarretou numa maior intensidade da coloração laranja o que foi confirmado com o aumento no valor de *croma*.

Todos os valores de *hue* dos extratos avaliados ficaram entre 0° e 90° caracterizando uma cor alaranjada que de fato foi observada nas soluções preparadas para a análise e também nos extrato seco. Com relação ao estudo de estabilidade os valores de *hue* encontrados para o extrato seco de *D. ecastaphyllum* após 3 meses não se alteram significativamente com relação ao valor de T0. Com relação aos extratos seco e glicólico de própolis vermelha observa-se que o valor de *hue* diminuiu, sendo que esta queda foi mais pronunciada para o extrato glicólico. Tal fato pode estar relacionado a degradação dos flavonoides conforme indicado na Figura 5.39.

A Tabela 5.22 apresenta os resultados da análise colorimétrica para os extratos secos submetidos ao estudo de estabilidade.

Tabela 5.22 – Análise colorimétrica dos extratos secos em estudo de estabilidade.

Cod.	*L **			*a **			*b **			*Hue*			*Croma*		
	T0	**T3M L**	**T3M A**	**T0**	**T3M L**	**T3M A**	**T0**	**T3M L**	**T3M A**	**T0**	**T3M L**	**T3M A**	**T0**	**T3M L**	**T3M A**
DE 002	90,67	90,67	90,61	2,89	2,74	2,75	14,13	17,19	16,59	78,50	81,00	80,63	14,42	17,41	16,82
DE 003	87,60	89,78	90,06	3,28	2,82	2,79	16,97	17,85	16,94	79,11	81,08	80,69	17,28	18,07	17,17
DE 004	90,15	90,40	90,19	3,00	2,81	2,98	14,67	16,39	16,48	78,50	80,31	79,79	14,97	16,62	16,75
DE 005	91,48	90,44	90,32	2,16	2,63	2,94	12,41	15,73	16,57	80,17	80,56	79,99	12,60	15,94	16,82
DE 006	90,17	90,19	89,89	2,61	2,71	2,79	14,05	16,11	15,97	79,54	80,49	80,13	14,29	16,34	16,21
DE 007	89,86	90,75	90,73	2,98	3,16	3,08	15,20	16,04	16,11	78,96	78,91	79,23	15,48	16,34	16,40
PV 003	92,98	92,09	92,50	-0,57	1,51	0,70	14,16	17,47	17,57	92,24	85,10	87,76	14,17	17,54	17,58
EXT GL	81,28	89,80	90,00	3,96	3,50	3,81	27,50	22,73	20,12	81,84	81,30	79,32	27,78	23,00	20,48

T0: tempo zero, amostra referencia analisada após a secagem; T3M L: tempo 3 meses estudo de estabilidade longa duração; T3M A: tempo 3 meses estudo de estabilidade acelerada.

5.9 Estudo de estabilidade das formulações

Devido a alta ação antifúngica encontrada no extrato de *D. ecastaphyllum* foram desenvolvidas algumas formulações com o extrato desta planta (seco e glicólico). A concentração de sólidos utilizada (2%) foi escolhida em função da concentração de ativos antimicóticos presente nas formulações encontradas no mercado.

Para o desenvolvimento destas formulações optou-se por trabalhar com dois tipos de formulação: emulsão e gel.

Uma emulsão pode ser definida pela mistura entre dois líquidos imiscíveis onde um deles está finamente dividido em forma de gotículas (fase interna), no outro (fase contínua), sendo estabilizado pela presença de um tensoativo (AULTON, 2005). É por natureza um sistema termodinamicamente instável onde as gotículas da fase dispersa, imiscível na fase contínua, tendem a se agrupar podendo provocar uma separação das fases, fenômeno irreversível e conhecido por coalescência.

Em contrapartida o gel é constituído de um sistema disperso formado por uma fase sólida e outra líquida, onde a fase sólida forma um esqueleto tridimensional também chamado de matriz. Como as fases estão totalmente interpenetradas não se observa distinção entre elas (VOIGT; BORNSCHEIN, 1982).

Para as formulações de emulsão optou-se por trabalhar com a base auto-emulsionante Lanette N. Esta base é aniônica e composta por álcool cetoestearílico e cetearil sulfato de sódio, além de ser um excelente tensoativo atua como um espessante devido a presença do álcool graxo de cadeia longa.

Com relação a formulação de gel optou-se por trabalhar com o Carbopol 980 que é um homopolímero formado por ligações cruzadas de ácido acrílico. Este polímero confere baixa viscosidade em solução quando apenas hidratado. Após a neutralização dos grupos carboxílicos presentes neste polímero o mesmo irá mudar a sua forma de dispersão em água conferindo uma maior viscosidade ao veículo.

Para a neutralização, é necessária uma massa 3,2 vezes menor de hidróxido de sódio com relação à massa de carbopol (LEITE, 2009). Curran *et al.* (2002) utilizou 2 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 23% (p/v) para que o pH de uma dispersão de carbopol 940 com 1,48% passasse para o pH de 6,5 confirmando a relação entre carbopol e hidróxido de sódio de 3,2.

Após o preparo das formulações as mesmas foram adicionadas em tubos falcon e submetidas a centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos para a avaliação de uma possível separação de fases. Não foi observada separação de fases após o processo de centrifugação.

Para a realização deste estudo as formulações foram armazenadas em tubo falcon para avaliação de pH e também foram armazenadas em bisnaga de alumínio para a avaliação de aparência e realização dos estudos de reologia.

As condições de armazenagem foram escolhidas conforme preconizado no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004) sendo utilizado o sistema de ciclos de 24 horas a 40 ± 2°C, e 24 horas a 4 ± 2° C durante um período de 4 semanas. A Tabela 5.23 e Figura 5.43 mostram os resultados do ensaio de estabilidade das formulações (emulsão).

Tabela 5.23 – Resultados do estudo de estabilidade realizado com as formulações (emulsão).

FORMULAÇÃO	TEMPO ARMAZENAGEM	APARÊNCIA	COR	pH
DE 003	**T 0 dia**	Emulsão	Marrom claro	4,53
	T 15 dias	Emulsão	Marrom claro	4,71
	T 30 dias	Emulsão	Marrom claro	4,52
DE 004	**T 0 dia**	Emulsão	Marrom claro	4,50
	T 15 dias	Emulsão	Marrom claro	4,71
	T 30 dias	Emulsão	Marrom claro	4,49
EXT GL	**T 0 dia**	Emulsão	Marrom	4,75
	T 15 dias	Emulsão	Marrom	4,87
	T 30 dias	Emulsão	Marrom escuro	4,66

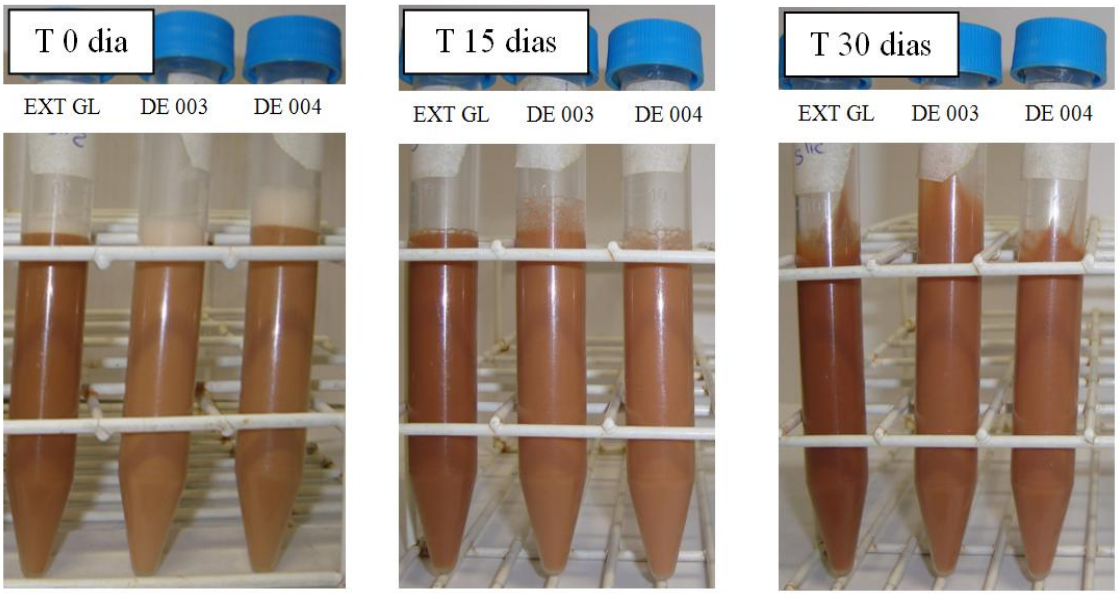


Figura 5.43 – Aparência das formulações (emulsões) nos diversos tempos de armazenamento (T 0, T 15 e T 30 dias).

A Tabela 5.24 e Figura 5.44 mostram os resultados do ensaio de estabilidade para as formulações (gel).

Tabela 5.24 – Resultados do estudo de estabilidade realizado com as formulações (gel).

ENSAIOS	DE 003			EXT GL		
	T0	**T15 dias**	**T30 dias**	**T0**	**T15 dias**	**T30 dias**
Aparência	Gel	Gel	Gel	Gel	Gel	Gel
Cor	Castanho avermelhado					
pH	7,00	7,25	6,97	7,04	6,85	6,66

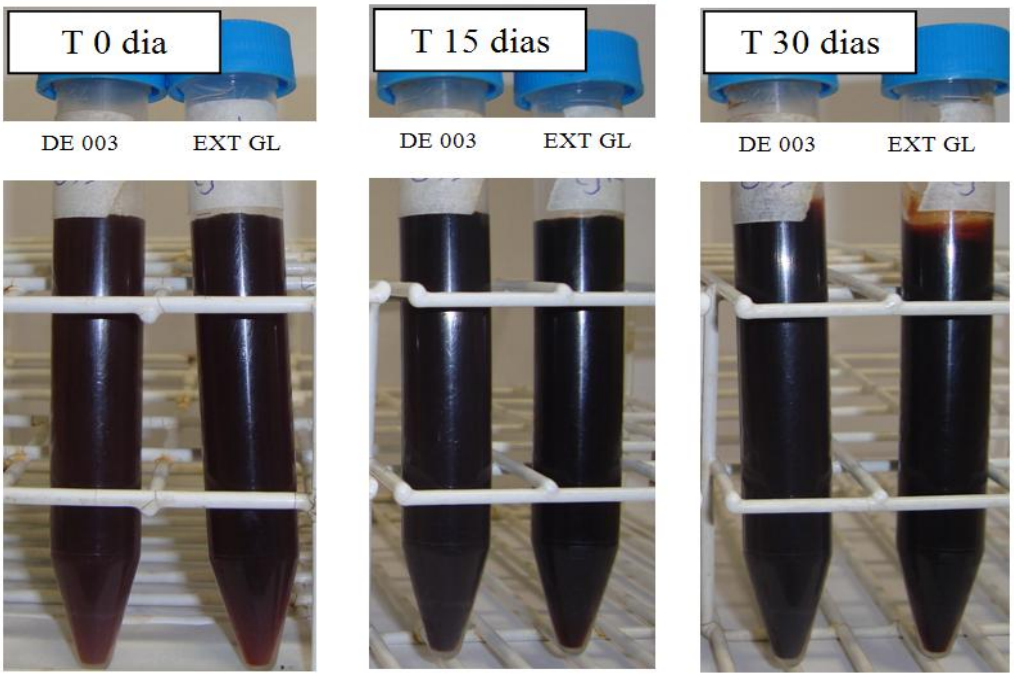


Figura 5.44 – Aparência das formulações (gel) nos diversos tempos de armazenamento (T 0, T 15 e T 30 dias).

A avaliação dos resultados mostra que as formulações de emulsão desenvolvidas se apresentaram estáveis dentro do período de avaliação. Nota-se que a formulação de emulsão desenvolvida com o extrato glicólico apresentou certo escurecimento após 1 mês que pode ter sido ocasionado devido a degradação de algum composto presente no extrato. Para todas as formulações de emulsão não foi observada alteração significativa na aparência e pH. A Figura 5.45 apresenta fotos mostrando o aspecto visual das formulações em relação ao tempo de armazenamento (T0 dia, T15 dias, e T 30 dias).

Com relação as fórmulas de gel pode-se observar que o pH da formulação desenvolvida com o extrato glicólico apresentou uma tendência de queda o que é um fator indesejável visto que a estabilidade do gel produzido com polímeros derivado do ácido acrílico é dependente da neutralização das cargas do mesmo e uma variação de pH poderá promover uma alteração neste processo de neutralização.

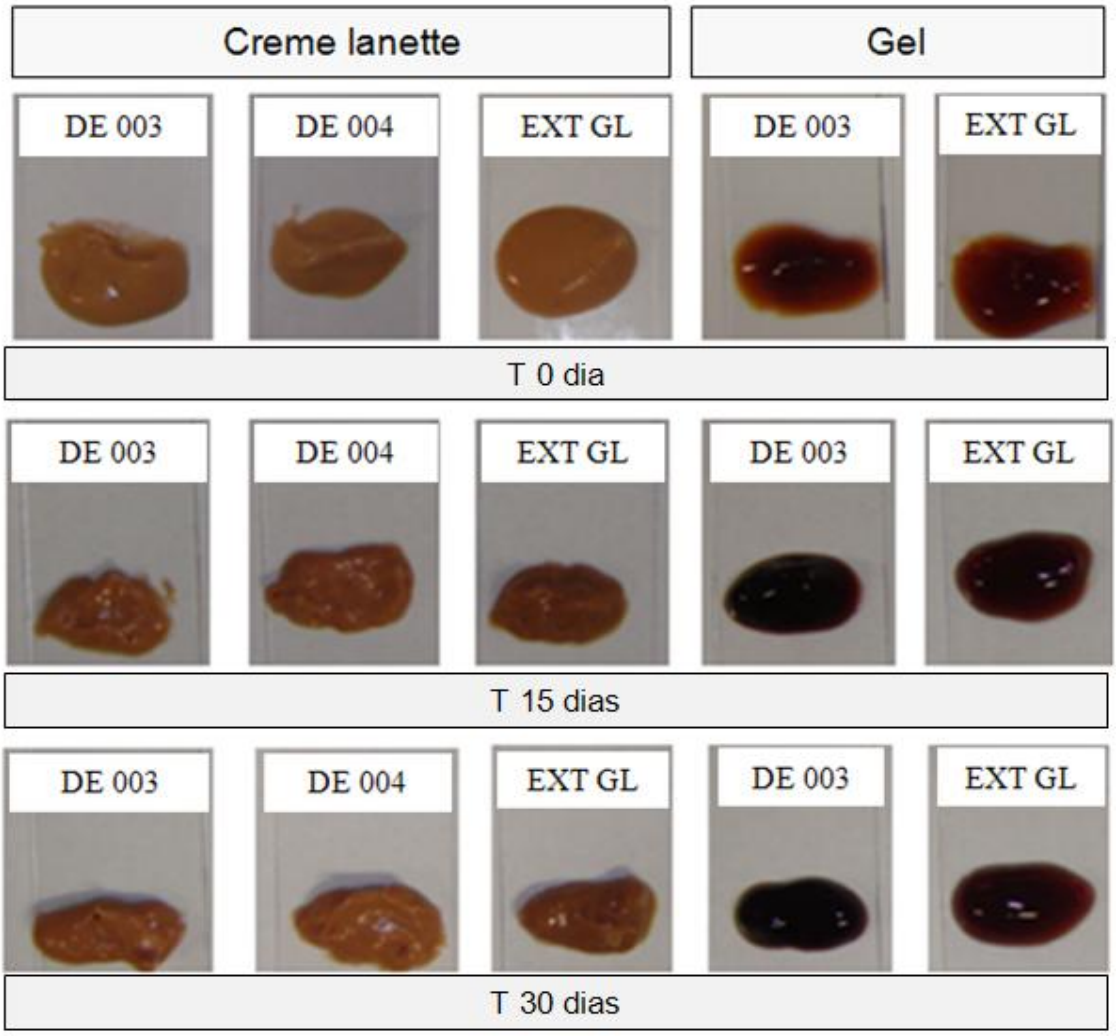


Figura 5.45 – Formulações de emulsão e gel obtidas com os extratos seco e glicólico monitoradas durante o estudo de estabilidade (T0 , T15 e T 30 dias).

Para uma melhor avaliação e caracterização das formulações também foi realizado um estudo do comportamento reológico das formulações. Os resultados da caracterização reológica para as formulações das emulsões contendo extratos secos e glicólico de *D. ecastaphyllum* encontram-se apresentados na Figura 5.46, onde são mostrados os resultados para o T0 dias e T30 dias de armazenamento.

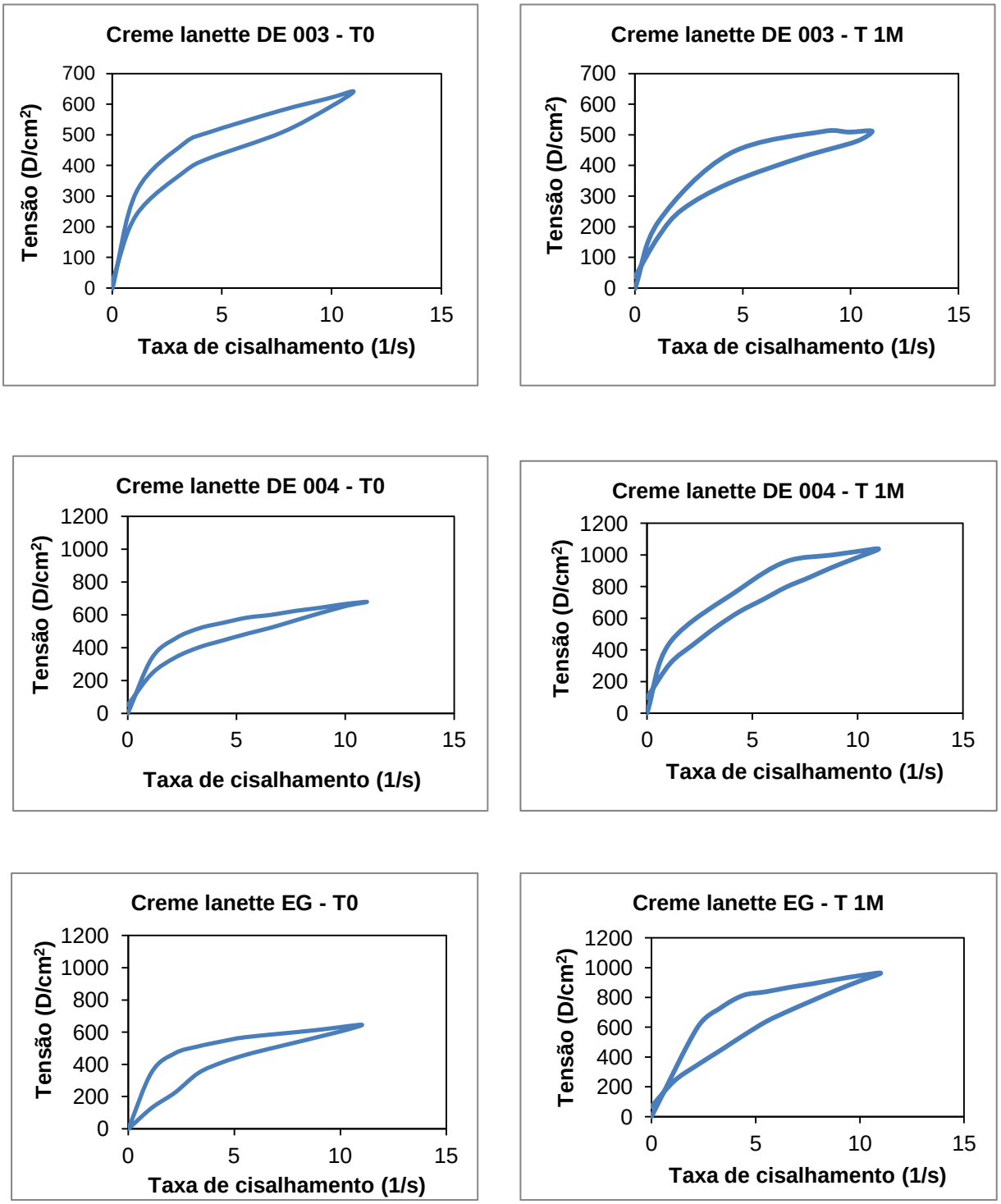


Figura 5.46 – Comportamento reológico das formulações das emulsões desenvolvidas durante o estudo de estabilidade (T0 e T30 dias).

Os resultados da caracterização reológica para as formulações de gel contendo extratos secos e glicólico de *D. ecastaphyllum* encontram-se apresentados na Figura 5.47, onde são mostrados os resultados para o T0 dias e T30 dias de armazenamento.

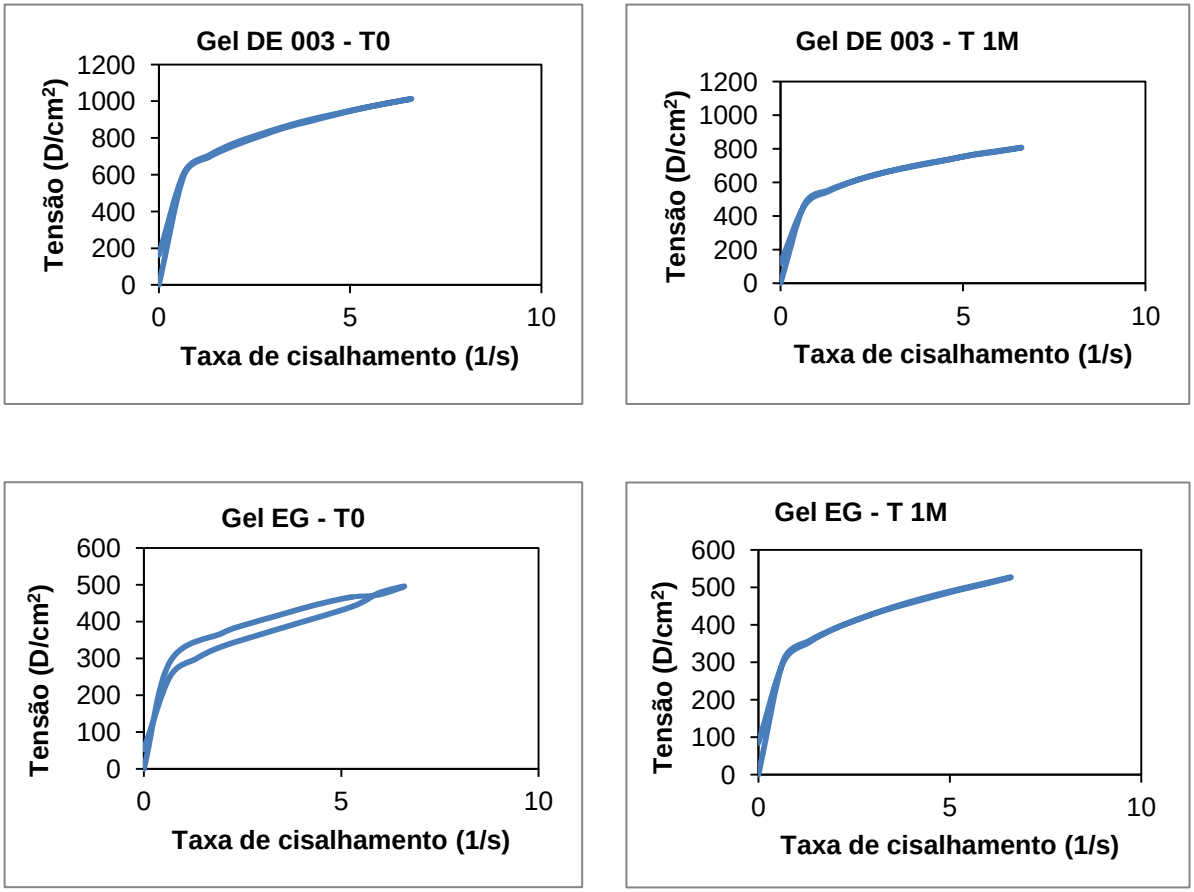


Figura 5.47 – Comportamento reológico das formulações de gel desenvolvidas durante o estudo de estabilidade (T0 e T30 dias).

De acordo com Zanin *et al.* (2001) a emulsão utilizando como tensoativo o *blend* cujo nome comercial é lanette apresentou comportamento pseudoplástico após 3 meses de armazenamento em estufa de 40°C. A utilização de 3% de lanette N em formulação de protetor solar promoveu a formação de emulsão com caráter pseudoplástico e tixotrópico (BORGUETHI; KNORST, 2006). De acordo com a avaliação da Figura 5.46 todas as emulsões desenvolvidas apresentaram caráter

pseudoplástico, ou seja, sofrem alteração na tensão com o aumento da taxa de cisalhamento e quando esta taxa começa a retornar para o valor inicial a tensão obtida é menor do que a tensão correspondente à mesma taxa de cisalhamento. Como esta variação de tensão é dependente do tempo de cisalhamento, as emulsões possuem caráter tixotrópico. O caráter pseudoplástico e tixotrópico são desejados nas emulsões de aplicação tópica visto que no momento da extrusão do produto a viscosidade da composição sofrerá uma redução e o produto sairá facilmente do frasco não retornando imediatamente ao seu estado de organização inicial permitindo que a formulação possa ser melhor aplicada.

Para as formulações de gel manipuladas com o extrato seco DE 003 foi observado um caráter pseudoplástico tanto no tempo inicial quanto no final. Já a formulação desenvolvida com o extrato glicólico apresentou-se pseudoplástica e tixotrópica no tempo inicial e após um mês o caráter tixotrópico foi reduzido. Este fenômeno pode ter acontecido, pois o tempo de homogeneização do extrato glicólico provavelmente não foi suficiente para que as cadeias do polímero carbopol pudessem se reorganizar.

Com relação ao gel de carbopol 940 foi observado comportamento pseudoplástico nas formulações contendo 0,5% de carbopol 940 e diferentes concentrações de lidocaína (KAIRUZ *et al.,* 2002).

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento deste trabalho levou à obtenção de informações relevantes sobre diversos aspectos envolvidos na produção de extratos secos de *Dalbergia ecastaphyllum*, utilizando-se o processo *spray drying* na etapa de secagem. A análise dos resultados experimentais permitiu a obtenção de conclusões abordando os aspectos de processo, avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana, ensaios de estabilidade e aplicação dos extratos secos obtidos em formulações (emulsão e gel). A seguir apresentam-se as conclusões obtidas nas condições experimentais utilizadas.

6.1 Aspectos de processamento de extratos

A avaliação qualitativa da droga vegetal indicou a presença dos metabólitos secundários: taninos, flavonoides e antraquinonas. Foi encontrada alta concentração de polifenois (9,27 e 9,86%, p/p) e flavonoides (1,34%, p/p).

O planejamento composto central (PCC) seguido de análise multiresposta são ferramentas importantes na determinação das condições ótimas de extração de compostos bioativos na droga vegetal. As respostas analisadas para o extrato otimizado, determinadas com o auxílio do programa Statistica 10® e as obtidas experimentalmente foram similares o que comprovou a eficiência do PCC para a otimização das condições de extração. A condição ótima para a produção da solução extrativa ocorreu com os seguintes valores das variáveis independentes:

- Temperatura de extração: 50 °C
- Tempo de extração: 92,3 minutos
- Relação massa de planta/massa de solvente: 0,2

As metodologias para dosagem de flavonoides, polifenóis e taninos totais utilizadas no presente trabalho, apresentaram resultados reprodutíveis.

Os métodos escolhidos para avaliação da atividade antioxidante se mostraram eficazes, sendo que o extrato apresentou elevada atividade antioxidante.

A partir do método cromatográfico desenvolvido foi possível obter um "*finger print*" do extrato otimizado.

De acordo com a classificação de Holetz *et al.* (2002) a atividade antibacteriana da solução extrativa otimizada foi baixa, pois todos os valores de CIM encontrados foram superiores a 1 mg/mL. Com relação à atividade antifúngica observou-se uma boa atividade contra fungos dermatófitos visto que os MIC foram inferiores a 0,1 mg/mL. A solução extrativa da própolis vermelha apresentou maior atividade antimicrobiana para as bactérias e para o dermatófito *Trichophyton rubrum.*

A partição da solução extrativa permitiu a separação de uma fração que apresentou maior concentração de polifenóis totais e maior atividade antioxidante que a solução extrativa (FOA6) enquanto que a outra fração (FOB4) apresentou maior concentração de flavonoides totais. Com relação a atividade antimicrobiana as duas frações apresentaram praticamente o mesmo comportamento da solução extrativa. A fração aquosa (FA8) apresentou baixa concentração de metabólitos secundários além de atividade antioxidante e antimicrobiana bem inferior às obtidas para as demais frações.

As secagens dos extratos concentrados de *D. ecastaphyllum* ocorreram de maneira adequada visto que o rendimento do processo foi superior a 60% para a maioria dos extratos secos. Valores inferiores 60% somente foram observados no extrato seco onde se utilizou polisorbato 80 (DE 005). Os teores de flavonoides totais e atividades antioxidante encontrados nos extratos secos de *D. ecastaphyllum* foram muito semelhantes ao da solução extrativa otimizada, indicando que a condição de secagem e os adjuvantes utilizados se mostraram adequados. Com relação ao teor de polifenóis totais pode ser observada uma ligeira queda após a secagem.

Com relação aos extratos secos da própolis vermelha observou-se um rendimento de processo inferior a 50% sendo que para o extrato seco PV 002 este rendimento foi de 10,93%. Mesmo apresentando baixo rendimento apenas o extrato PV 002 (contendo β-ciclodextrina) se mostrou estável com relação ao teor de flavonoides, polifenóis e atividade antioxidante. O extrato seco PV 003 apresentou melhor performance de secagem com rendimento de processo de 48,98%, porém apresentou queda na atividade antioxidante e concentração de metabólitos secundários.

A formação do complexo de inclusão entre o adjuvante β-ciclodextrina e os compostos presentes nos extratos de *D. ecastaphyllum* e da própolis vermelha pode ter ocorrido, considerando-se a variação do estado cristalino deste adjuvante após a secagem e melhoria de solubilidade observada no extrato DE 007. Além disso, foram observadas formação de estruturas arrendondadas na avaliação por MEV dos extratos secos com β-ciclodextrina (DE 007 e PV 002). Estas estruturas são diferentes da estrutura mais geométrica da β-ciclodextrina seca sem a presença do extrato.

De acordo com os parâmetros farmacotécnicos avaliados nenhum dos extratos secos obtidos apresentou boas propriedades de fluidez o que pode estar relacionado à baixa granulometria do material seco obtido.

6.2 Avaliação da estabilidade dos extratos

Os extratos secos de *D. ecastaphyllum* submetidos a armazenagem em 30ºC ± 2ºC / 75% UR ± 5% e 40ºC ± 2ºC / 75% UR ± 5% por 3 meses mantiveram suas propriedades antioxidantes. Com relação ao teor dos metabólitos secundários (flavonoides totais e polifenóis totais) pode-se observar uma ligeira variação dentro dos limites especificados pela ANVISA. A análise de *fingerprint* realizada ao longo do estudo mostra a manutenção dos picos avaliados em cada um dos extratos secos (P1, P2, P3, P4 e P5) o que sugere a estabilidade dos metabólitos secundários presentes do extrato seco.

Em contrapartida, os metabólitos secundários flavonoides totais e polifenóis presentes no extrato glicólico da própolis vermelha não se apresentaram estáveis nas condições e tempo de estabilidade avaliadas apresentando queda no teor de flavonoides totais após 3 meses de estudo de 40,32 e 14,52% nas condições acelerada e longa duração, respectivamente. Além disso, a atividade antioxidante destes extratos também diminuiu ao longo do estudo sendo que a perda de atividade antioxidante e a diminuição da concentração de flavonoides totais podem estar correlacionadas (R^2 de 0,9311). O extrato seco da própolis vermelha apresentou-se mais estável visto que a queda no teor de flavonoides totais foi de 11,7% e de 5,55% para o extrato na condição acelerada e longa duração, respectivamente. A diminuição da atividade antioxidante também foi menor para o extrato seco.

A umidade dos extratos secos não se alterou significativamente ao longo do estudo de estabilidade o que caracteriza uma adequada seleção da embalagem utilizada.

A análise colorimétrica pode ser uma importante ferramenta para a avaliação da estabilidade de extratos que apresentam em sua composição substâncias com cor definida. A partir da análise colorimétrica realizada ao longo do estudo de estabilidade dos extratos de *D. ecastaphyllum* pode-se observar pequena variação nos parâmetros avaliados (L, a*, b*) sendo que para os extratos seco e glicólico da própolis vermelha esta variação foi maior e pode estar relacionada a degradação de metabólitos secundários.

6.3 Aplicação dos extratos secos em formulações semi-sólidas

As formulações desenvolvidas com o extrato seco DE 003 se apresentaram estáveis nas condições e períodos de estabilidade acelerados, uma vez que não ocorreu alteração visual das formulações e o pH não se alterou ao longo do estudo. Como o extrato glicólico é geralmente mais utilizado em formulações semi-sólidas foi realizado um estudo de estabilidade das formulações (emulsão e gel) obtidas com extrato glicólico de *D. ecastaphyllum*. Observou-se certa alteração de cor na emulsão ao longo do estudo e o pH da formulação gel sofreu uma queda de 5,4%.

As formulações de emulsão apresentaram caráter pseudoplástico e tixotrópico que se manteve após 1 mês de estudo acelerado. A formulação de gel com extrato seco DE 003 apresentou caráter pseudoplástico que se manteve ao longo do estudo enquanto que o gel feito com extrato glicólico de *D. ecastaphyllum* iniciou o estudo de estabilidade com caráter pseudoplástico/tixotrópico e no final passou a ser pseudoplástico sem a presença de tixotropia.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIN, E.; ABOUZID, S.; SEIDA, A. Phytochemical and biological studies on isoflavonoids from *Dalbergia paniculata* cultivated in Egypt. **Pharmacologia**, v. 3, p. 84-94, 2012.

ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO M.L.; CABRAL I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 278-83, 2007.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66 (1), p. 232-240, 2007.

ANIBAL, P.C. **Potencial de ação antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas na inibição de *Candida spp*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus***. Dissertação, Universidade Estadual Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2007, 71p.

ASIF, M.; KUMAR, A. Anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Dalbergia sissoo (ROXB.)* bark. Department of Pharmacy, G.R.D (P.G) I.M.T **Rajpur, Dehradun**, v. 7 (1), p. 39-50, 2009.

ARIAS, R.; LEE, T.-C.; LOGENDRA, L.; JANES, H. Correlation of lycopene measured by HPLC with the L*, a*, b* color readings of a hydroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.1697-1702, 2000.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª edição, Editora Artmed, 2005.

BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; FREITAS, J.C., NERO, L.A.; SOUZA, J.A., SANTANA, E.H.W.; FRANCO, B.D.G.M.; Frequancy of 2,3,5- triphenyltetrazolium

chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk, **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 137-140, 1999.

BONATI, A. How and why should we standardize phytopharmaceutical drugs for clinical validation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.32, p.195-197, 1991.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Food Sci. Technol.-Leb**. v. 30, p. 609-615, 1997.

BOTT, R.F. **Influência do processo de obtenção, condições de armazenagem e propriedades físico-químicas sobre a estabilidade de extratos secos padronizados de plantas medicinais**, (Tese), FCFRP/USP, 2008, 185p.

BORGHETTI, G.S.; KNORST, M.T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42 (4), p. 531-537, 2006.

BRAVO L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317–333, 1998.

BOX, G.E.P.; DRAPER, N.R. **Empirical model-buiding and response surfaces** (John Wiley, NY - USA), 1987.

BRASIL, Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. **Regulamenta o registro de produtos fitoterápicos no Brasil**, Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, 18 de março de 2004a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Gerência Geral de. Cosméticos. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília, 2004b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RE nº 1, de 29 de julho de 2005. **Guia para realização de estudos de estabilidade**. Brasília, 2005.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 14, de 31 de março de 2010. **Regulamenta o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil**, Diário Oficial da União (DOU nº 63); Poder Executivo, Brasília, 05 de abril de 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consolidado de Normas da COFID**. Versão II**.** Brasília. DF, Poder Executivo de 31 de maio de 2010b.

BRUSCHI M.L.; CARDOSO M.L.C.; LUCCHESI M.B.; GREMIÃO M.P.D. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 264, p. 45-55, 2003.

CAL, K..; SOLLOHUB K. Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 99, p. 575-586, 2010.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view**, Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p.131-134, 2005.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18 (2), p. 314-319, 2008.

CHANG, C.C.; YANG, M.H.; WEN, H.M.; CHERN, J.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 178-172, 2002.

CHENG, J.Z.; ,KUO, C.S.; CHAN, C.S.; KO, N.F.; TENG, C.M. Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1392, p. 291-299, 1998.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.

COMPAGNOME, R.S.; SUAREZ, A.C.; LEITAO, S.G.; MONACHE, F.D. Flavonoids, benzophenones and a new euphane derivative from *Clusia columnaris* Engl. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18 (1), p. 6-10, 2008.

CORDEIRO, D.S.; OLIVEIRA, W.P. Technical aspects of the production of dried extract of *Maytenus ilicifolia* leaves by jet spouted bed drying**. International Journal of Pharmaceutics**, v. 299 (1-2), p. 115-126, 2005.

CORREA, A.F. ; SEGOVIA, J.F.O.; GONÇALVES, M.C.A.; OLIVEIRA, V.L,; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J.C.T.; KANZAKI L.I.B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria, **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 12, p. 369-380, 2008.

CORTES-ROJAS, D.F.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P.; Optimisation of the extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from aerial parts of Bidens pilosa L. using response surface methodology, **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, p. 2420-2427, 2011.

COSTA, F.B. **Práticas de laboratório da disciplina de farmacognosia**. FCFRP/USP, 60p, 2005.

COWAN M M. Plant produnts as antimicrobial agents, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.

CUNHA, A.M.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A.G.; BURGER, C.; BIAVATTI, M.W. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Phytomedicine**, v. 17, p. 37-41, 2010.

CURRAN S.J.; HAYES R.E.; AFACAN A.; WILLIAMS, M.C.; TANGUY, P.A. Properties of carbopol solutions as models for yield-stress fluids. **Food Engineering and Physical Properties**, v. 67 (1), p. 176-180, 2002.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PACHECO, E.; LIMA, I.B.; ABREU, J.A.; PARK, Y.K. Própolis vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**, v. 89, p. 2-15, 2006.

DAUGSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste brasileiro e suas características químicas e biológicas**. Universidade Estadual de Campinas, (Tese), Faculdade de Engenharia de alimentos, 2007, 133p.

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 97, p. 654-660, 2006.

DE SOUZA, K.C.B.; BASSANI, V.L.; SCHAPOVAL, E.E.S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. **Phytomedicine**, v. 14, p. 102-108, 2007.

DONNELLY, D. M. X.; KEENAN, P.J.; PRENDERGAST, J.P. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 1157-1161, 1973.

FARAG, S.F.; AHMED, A.S.; TERASHIMA, K.; TAKAYA, Y.; NIWA, M. Isoflavonoid glycosides from *Dalbergia sissoo*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1263-1268, 2001.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, Brasília, quinta edição, volume I, 2010.

FERNANDES, L.P. **Desenvolvimento tecnológico de produtos particulados obtidos a partir de Lippia *sidoides* pela técnica de *spray drying* e avaliação das propriedades antifúngicas**. (Tese), PPG-CF da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, 2008, 138p.

FATONI, A.; ARTIKA, I.; HASAN, A.E.Z.; ; KUSWANDI, K.; Antibacterial activity of propolis produced by *Trigona* spp. against *Campylobacter* spp. **Hayati Journal of Biosciences**, p.161-164, 2008.

FOTI, M.C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. **Jounal Org. Chem**., v. 69, p. 2309-2314, 2004.

GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VICENTINI, F.T.M.D.; VERRI, W.A.; FONSECA, M.J.V. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different in vitro methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. **European Journal Pharmaceutical and Biopharmaceutical**, v. 64 (1), p. 99-106, 2006.

GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; SOUZA, C. R.F.; OLIVEIRA, W.P.; FONSECA, M.J.V. Spray-drying of the soybean extract: effects on chemical properties and antioxidant activity. **Food Science Technology**, v. 48, p. 1521 – 1527, 2008.

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

GOPPEL, M., FRANZ, G. Stability control of Senna leaves and Senna extracts. **Planta Medica**, v. 70, p. 432-436, 2004.

GUEDES, R.C.M.; NOGUEIRA, N.G.P.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Petiveria alliacea* L. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 28, p. 520-524, 2009.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. The Flavonoids**.** Chapman & Hall, London, 1975

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 3ª ed. New York: Chapmann and Hall, p. 41-47, 1984.

HARBORNE, J.B. Phenolic compounds. In ***Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*** (J.B. Harborne, ed.) Chapman and Hall, London, United Kingdom. 1998.

HARGREAVES, J.A; MANSFIELD, J.W.; COXON, D.T. Identification of medicarpin as a phytoalexin in the broad bean plant (*Vicia faba* L.). **Phytochemistry**, v., 33, p. 731-732, 1993.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HATANO, T.; EDAMATSU, R.; HIRAMATSU, M.; MORI, A.; FUJITA, Y.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T.Y. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on 1,1-Diphenyl-2picrylhydrazyl radical. **Chemical & phramaceutical Bulletin**, v. 37 (8), p. 2016-1021, 1989.

HEIGL, D.; FRANZ, G. Stability testing on typical flavonoid containing herbal drugs. **Pharmazie**, v. 58, p. 881-885, 2003.

HOLETZ, B.F.; PESSINI, L.G.; SANCHEZ, D.G.C.; NAKAMURA, V.C.; FILHO, D.P. B. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases, **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97 (7), p. 1027-1031, 2002.

HOLZSCHUH, M.H. **Estudo da estabilidade de produtos secos obtidos a partir de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Asteraceae**. Porto Alegre: Programa de

Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, 2008. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas).

JIMENEZ-KAIRUZ, A.; L ALLEMANDI, D.; MANZO, R. N H. Mechanism of lidocaine release from carbomer lidocaine hydrogels. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91 (1), p. 267–272, 2002.

KANAZAWA, M.; SATOMI, Y.; MIZUTANI, Y.; UKIMURA, O; KAWAUCHI, A.; SAKAI, T.; BABA, M.; OKUYAMA, T. Isoliquiritigenin inhibits the growth of prostate cancer. **European Urology**, v. 43, p. 580-586, 2003.

KANO M.; TAKAYANAGI T.; HARADA K.; SAWADA S.; ISHIKAWA F. Bioavailability of isoflavones after ingestion of soy beverages in healthy adults. **Journal of Nutrition**. v. 136; p. 2291-2296, 2006.

KENYON, M.M. Modified starch, maltodextrin and corn syrup solids as wall materials for food encapsulation. In: S. J. Risch, G. A. Reineccius (Eds.), **Encapsulation and controlled released of food ingredients** (pp. 42-50). Society American Chemical; Washigton, DC, USA, 1995.

KOLL, K.; REICH, E.; BLATTER, A.; VEIT, M. Validation of standardized high performance thin-layer chromatographic methods for quality control and stability testing of herbal. **Journal of AOAC international**, v. 86 (5), p. 900-915, 2003.

KONG, L. D.; ZHANG, Y.; PAN, X.; TAN, R. X.; CHENG, C. H. K. Inhibition of xanthine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated from *Sinofranchetia chinensis*. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 57, p. 500-505, 2000.

LEE, A.H.; KIM, J.Y.; SEO, G.S.; SOHN, D.H. isoliquiritigenin, form *Dalbergia odorifera*, on regulartes anti-inflamatory heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages, **Inflamm. Res.,** v. 58, p. 257-262, 2009.

LEITE, L.O.B. **Determinação física e numérica de corridas de lama resultantes de ruptura de barreira retendo material viscoelástico**. (Dissertação), PPGE-FE/UNESP, 2009, 185p.

LI, T.; SATOMI ,Y.; KATOH, D.; SHIMADA, J.; BABA C̲M.; OKUYAMA T.; NISHINO, H; KITAMURA, N. Induction of cell cycle arrest and $p21^{CIP1/WAF1}$ expression in human lung cancer cells by isoliquiritigenin. **Cancer Letters**, v. 207,. p. 27-35, 2004

LIN, L.Z.; HARNLY, J.M. LC-MS profiling and quantification food phenolic components using a standard analytical approach for all plants. **Food Science and Technology: New Research**, 2008.

LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; TOLEDO, C.E.M.; ISLER, A.C.; MELLO, J.C.P. Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência, **Brasilian Jouranl of Pharmaceutical Science**, v. 45 (1), p. 135-143, 2009.

MATHIAS, L.; VIEIRA I.J.C; BRAZ-FILHO, R.; RODRIGUES-FILHO, E. A new isoflavone glycoside from *Dalbergia nigra*. **Journal of Natural Products,** v. 61, p. 1158-1161, 1998.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v. 46, p. 3-8, 1998.

MATOS, F.J.A.; GOTTLIEB, O.R.; ANDRADE, C.H.S. Flavonoids from *D. ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 825-826, 1975.

MASTERS, K. **Handbook of spray drying**. 2 ed. New York:Jonh Wiley, 1976.
MASTERS, K. **Handbook of spray drying**. 4. ed. Londres, 1985.

MILITAO, G.C.G; JIMENEZ, P.C; WILKE, D.V; PESSOA, C.; FALCAO, M.J.C.; LIMA, M.A.S. Antimitotic properties of pterocarpans isolated from *Platymiscium floribundum* on sea urchin eggs. **Planta Medica**, v. 71, p. 683-685, 2005.

MARKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review, **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 48, 2000.

MONTGOMERY, D., **Design and analysis of industrial experiments**, John Wiley, New York, USA, 1976.

MU, H.; BAI, Y. H.; WANG, S.T.; ZHU, M.Z.; ZHANG, Y.W.; Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pretense* (red clover). **International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**. v. 16, p. 314-319, 2009.

NARAYANAN, V.; NAGARAJAN, N. S.; Two isoflavone galactosides form *Dalbergia spinosa*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 2364-2365, 1988.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Publication of M27-A2: **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard**. Second edition. **NCCLS**, Wayne, v. 22 (15), p.1-30, 2002a.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Publication of M38-A: **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**; approved standard. **NCCLS**, Wayne, v.22 (16), p.1-29, 2002b.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Publication of M7-A6: **Reference Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; approved standard. **NCCLS**, Wayne, v.23 (16), p.1-53, 2003.

NEGRI, M.L.S.; POSSAMAI, J.C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19 (2B), p. 553-556, 2009.

OBÓN, J.M.; CASTELLAR, M.R.; ALACID, M.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A. Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. **Journal of Food Engineering,** v. 90, p. 471-479, 2009.

OLIVEIRA, W.P.; BOTT, R.F.; SOUZA, C.R.F. Manufacture of standardized dried extracts from medicinal brazilian plants. **Drying Technology**, v. 24 (4), p. 523-533, 2006.

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

OLIVEIRA, W.P., FREITAS, L.A.P., FREIRE, J.T. **Secagem de produtos farmacêuticos.** In: ***Fenômenos de Transporte em Sistemas Particulados: Fundamentos e Aplicações***, Jose Teixeira Freire; Ana Maria da Silveira (Org.), Ed. São Carlos-SP: SUPREMA, ISBN: 978-85-98156-45-3, p. 307-343, 2009.

OLIVEIRA, W.P.; SOUZA, C.R.F.; KUROZAWA, L.E.; PARK, K.J. **Spray drying of food and herbal products**. In: **Spray drying technology**. Volume 1, Ed. WOO, M.W.; MUJUNDAR, A.S. and DAUD, W.R.W., Chapter 5, ISBN: 978-981-08-6270-1, Published em Singapura, pp. 113-156, 2010.

ORAI, P.; DAYAL, R. A flavone glicoside from *Dalbergia stipulacea* leaves. **Phytochemistry,** v. 33, p. 731-732, 1993.

PARAMITA, V.; IIDA, K.; YOSHII, H.; FURUTA, T. Effect of additives on the morphology of spray-dried powder. **Drying Technology**, v. 28 (3), p. 323-329, 2010.

PICCINELLI, A.L.; CAMPO FERNANDEZ, M.; CUESTA-RUBIO, O.; HERNANDEZ, I.M.; DE SIMONE, F.; RASTRELLI, L. Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 53, p. 9010-9016, 2005.

PINTO, A.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P; EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais: atualidades, desafios e perpectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry***,* v. 269, p. 337-341, 1999.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. v II, 4ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.

QUEK, S.Y.; CHOK, N.K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 386–392, 2007.

RATTY, A.K.; DAS, N.P. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v. 39, p. 69-79, 1987.

ROOS, Y. H. Importance os glass transition and water activity to *spray-drying* and stability of dairy powders. **Lait**, v. 82, p. 475-484, 2002.

RUFFER CE, KULLING SE. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 54, p. 2926-2931, 2006.

RUNHA, F.P.; CORDEIRO, D.S., PEREIRA, C.A.M., VILEGAS, J., OLIVEIRA, W.P., Production of dry extracts of medicinal Brazilian plants by spouted bed process: development of the process and evaluation of thermal degradation during drying operation. **Trans. Ichem.***,* v.79, p. 160-168, 2001.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; GIANINNI, M.J.S.M. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida sp* and *Cryptococcus sp*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38 (3), p. 391-397, 2007.

SENNA, L.E.; PETROVICK, P.R.; GONZALEZ ORTEGA, G.; BASSANIW, V.L. Preparation and characterization of spray-dried powders from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 123-127, 1997.

SHAHIDI F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA P.D. Phenolic antioxidants. Critical Reviews in Food Science and nutrition, v. 32, p. 67-103, 1992.

SILVA, B.B. **Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica**. (Tese), PPGO-FOP/UNICAMP, 2008.

SILVA, L.; ONIKI, G.H.; AGRIPINO, D.G.; MORENO, P.R.H.; YOUNG, M.C.M.; MAYWORM, M.A.S.; LADEIRA, A.M. Biciclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17 (3), p. 361-367, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS; Ed. da UFSC, 2004.

SOARES, L.A.L. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek – Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final.** (Tese), Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2002, 285p.

SOUZA, C.R.F. **Estudos comparativos da produção do extrato seco de *Bauhinia fortificada* Link, pelo processo *spray-dryer* leito de jorro**. (Dissertação), FCFRP-USP, 2003, 179p.

SOUZA, C.R.F. **Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras: estudo da viabilidade técnica e econômica do processo em leito de jorro**. (Tese), FCFRP/USP, 2007, 219p.

SOUZA, C.R.F.; SHIAVETTO, I.A.; THOMAZINI, F.C.F.; OLIVEIRA, W.P. Processing of *Rosmarinus officinalis,* Linne extract on spray and spouted bed dryers. **Brazilian Journal of Chemical Engineering,** v. 25 (1), p. 1-8, 2008.

SOUZA, C.R.F.; DONIDA, M.W.; ROCHA, S.C.S.; OLIVEIRA, W.P. The role of colloidal silicon dioxide on the enhancement of the drying of herbal preparations in suspended state. **Chemical Engineering Communications**, v. 196 (3), p. 391-405, 2009.

SIPGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D.M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics, **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 200–208, 2007.

SPONGSIANG, U.; WANICH, S.; PITCHUANCHOM, NETSOPA S.; UANPORN, K.; YEMJAI, C. Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 427-431, 2009.

SUN, T.; LIU, R.; CAO, Y. Vasorelaxant and antihypertensive effects of formononetin through endothelium-dependent and -independent mechanisms. **Nature,** v. 262, p. 318-319, 2011.

SURYANARAYANAN, R. **X-ray diffractometry**. In: BRITTAIN, H.G. Physical characterization of pharmaceutical solids. Marcel Dekker, New York, USA, cap. 7. 1995.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemistry Review**, v. 98, p. 1743-1753, 1998.

TASCA, A.P.W. **Efeito do processamento industrial para obtenção de goiabada sobre os compostos antioxidantes e cor**. (Dissertação), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, 2007, 121p.

TEIXEIRA, H.F. **Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre as características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae – marcela**. (Dissertação), PPGCF/UFRGS, 1996.

TELLES, M.A.S.; MOSCA, A. Avaliação de técnicas de microdiluição em placa para determinação da concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 59 (1/2), p. 16-19, 2000.

YOUNG, W.R. Accelerated temperature pharmaceutical product stability determinations. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 16 (4), p. 551-569, 1990.

YU, C.; WANG, W.; CHENG, D. Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. **Food Chemistry**, v. 71. p. 45-49, 2000.

YU, C.; WANG, W.; YANG, M. Antioxidant activities of compounds isolated from *Dalbergia odorifera* T. Chen and their inhibition effects on the decrease of glutathione level of rat lens induced by UV irradiation. **Food Chemistry**, v. 104, p. 715-720, 2007.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J.; VAN HOOF, L. In: **Advances in Medicinal Plant Research**; Vlietinck, A.J., Dommisse, R. A., Eds.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschafte mbh: Stuttgart,1985; pp 47-54.

VIEIRA, O.M.C.; SANTOS, M.H.; SILVA, G.A.; SIQUEIRA, A.M. Atividade antimicrobiana de *Struthanthus vulgaris* (erva-de-passarinho). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15 (2), p. 149-154, 2005.

VOIGT, I.R.; BORNSCHEIN, M. **Tratado de tecnologia farmacêutica**. Zaragoza: Acribia,1982.

ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D.; CHIMELLI, M.; DALMAZ, A.C. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Revista Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 2 (2), p. 47-58, 2001.

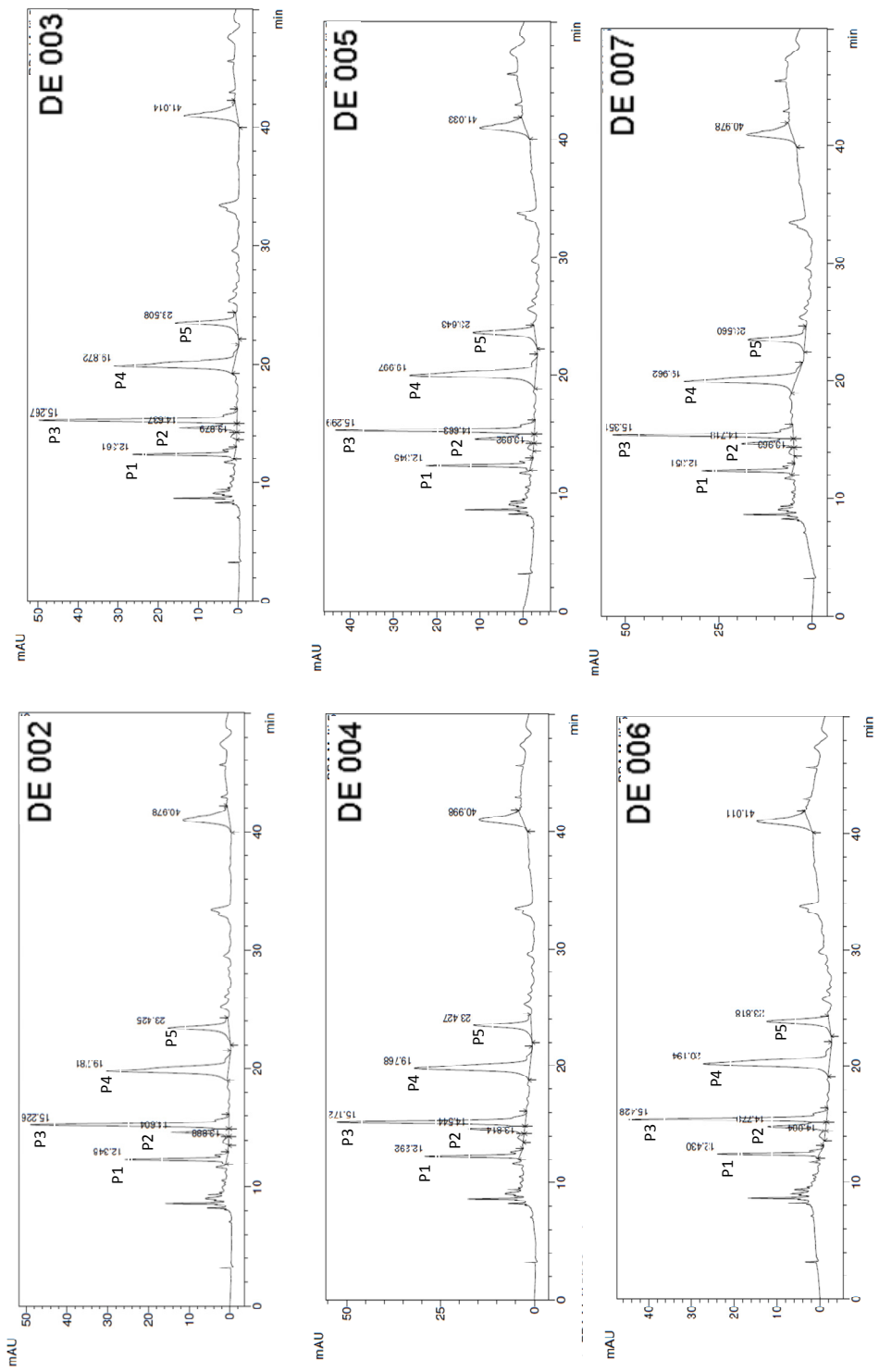
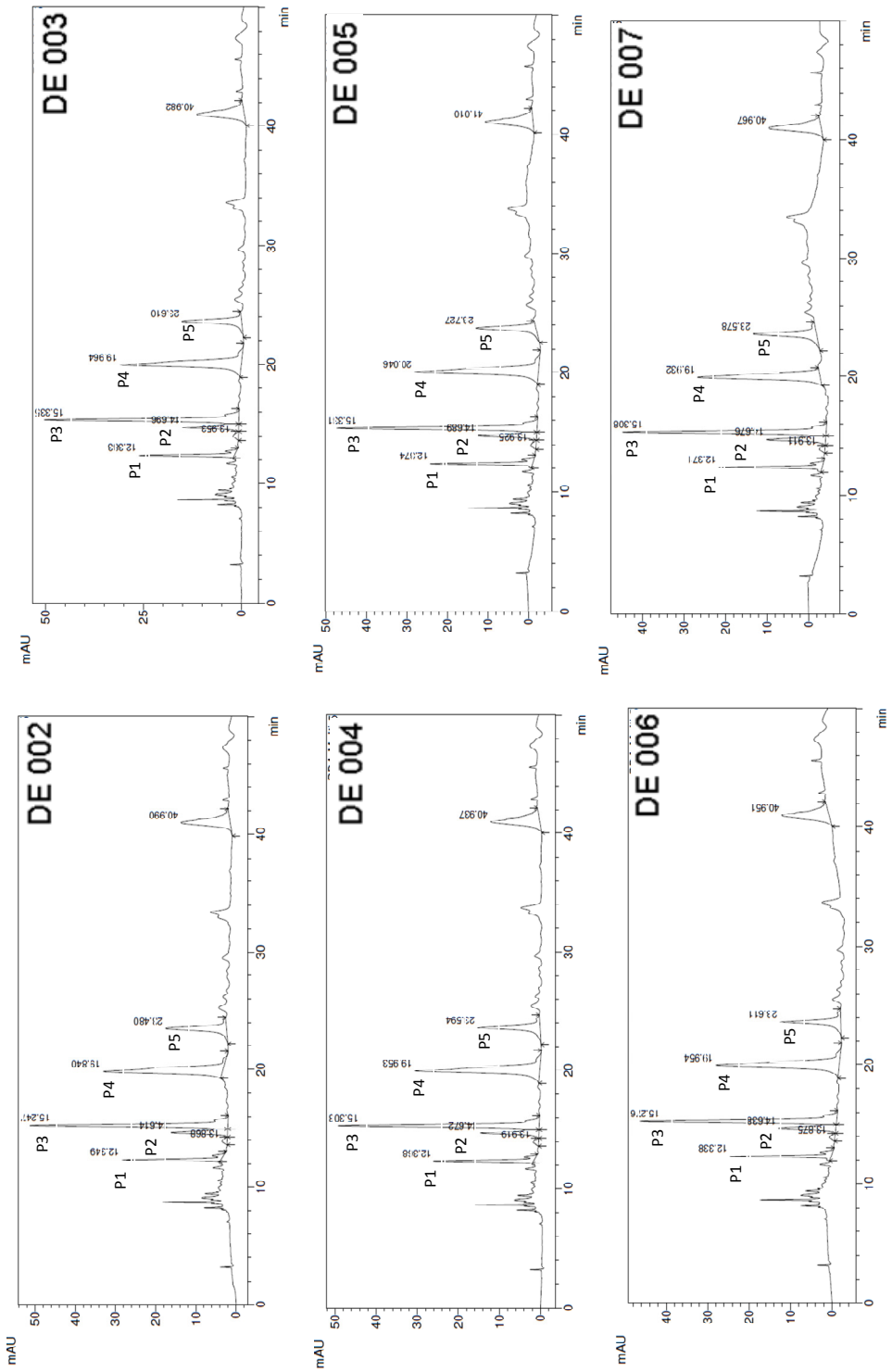
YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24 p. 147-152, 2001.

WANG W.; WENG X.C.; CHENG D.L.; Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. ***Food Chemistry*, v.71**, p. 45-49, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Doc ent de base pour la selection et la caracterisation des plantes medicinales. DPM/WP/78.4 et DPM/79.1 Geneve, 9-13 octobre,1978.

Apêndice

Cromatogramas obtidos para os extratos secos submetidos ao estudo de estabilidade acelerado referentes ao tempo de 3 meses (T3M A).



Cromatogramas obtidos para os extratos secos submetidos ao estudo de longa duração referentes ao tempo de 3 meses (T3M L).