UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Obtenção de produtos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.:
otimização da extração e secagem em *spray dryer* utilizando planejamentos
experimentais**

Ana Rita de Mello Costa Machado

Ribeirão Preto

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Obtenção de produtos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.:
otimização da extração e secagem em *spray dryer* utilizando planejamentos
experimentais**

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: Ana Rita de Mello Costa Machado

Orientador: Prof. Dr. Luís Alexandre Pedro de Freitas

Ribeirão Preto

2011

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa-Machado, Ana Rita de Mello

Obtenção de produtos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.: otimização da extração e secagem em *spray dryer* utilizando planejamentos experimentais. Ribeirão Preto, 2011.

130 f.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Freitas, Luis Alexandre Pedro de

1. Maceração dinâmica, 2. Desejabilidade, 3. Cromatografia líquida, 4. Quercetrina, 5. Afzelina

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Ana Rita de Mello Costa Machado

Título: Obtenção de produtos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.: otimização da extração e secagem em *spray dryer* utilizando planejamentos experimentais.

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.

Orientador: Prof. Dr. Luís Alexandre Pedro de Freitas

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Primeiramente, dedico este trabalho a Deus por me colocar a vista os simples e maravilhosos milagres da vida e, com isso, me fazer acreditar que tudo é possível.

Dedico este trabalho aos meus pais, Célia Ferreira de Mello Costa e José Eugênio Costa, pelo amor, paciência e respeito. Amo-os e sempre, sempre os amarei!

A meu irmão, Alexandre, pela graça de existir e me querer tão bem.

Dedico a alegria da conclusão deste trabalho a meu bem, Guilherme Machado, pela compreensão e paciência quando não pude lhe fazer companhia para poder fazer experimentos e escrever a dissertação, por me ouvir e compartilhar minhas dificuldades, pelo apoio às minhas decisões, por alegrar a minha vida com a dele.

Agradecimentos

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Luís Alexandre Pedro de Freitas, pela orientação me possibilitando clareza nos momentos de dúvida juntamente com a concessão de autonomia para direcionar meu trabalho. Agradeço também pela confiança, receptividade e acolhimento ao longo destes 28 meses.

Agradeço aos Senhores Antônio Carlos Meda e Manoel Eduardo Tavares Ferreira, diretores da Apis Flora, pela oportunidade concedida e possibilidade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, pela confiança e por me permitir participar de uma das suas brilhantes pesquisas.

À Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira e sua equipe, pelo auxílio na identificação e localização da árvore da espécie estudada.

À Andresa Ap. Berretta e Silva, pela valiosa contribuição e pelas oportunidades profissionais, além de modelo de entusiasmo e motivação.

À Paula Carolina Pires Bueno, minha colega e amiga, pela orientação valiosa, pelos ensinamentos científicos, profissionais e pessoais, pela amizade e felicidade de sua companhia.

Ao Bruno mineiro, pela companhia, ajuda e suor (rsrs) para coletar as folhas da árvore, além de sua amizade.

À Mirela Vaz, pelo auxílio ao desenvolvimento do método cromatográfico e pela amizade, claro!

Ao amigo, Henrique Moretto, por me ensinar as malícias da vida e pela capa maravilhosa desta dissertação.

Aos queridos colegas da Apis Flora, por fazerem do local de trabalho um segundo lar e pela ajuda a este trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela atenção.

Aos meus colegas do LADIFARP, pela ajuda, carinho e receptividade.

Agradeço ao apoio financeiro concedido pela Apis Flora, FINEP e FAPESP.

A todos que me auxiliaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Costa-Machado, A. R. M. **Obtenção de produtos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.: otimização da extração e secagem por *spray dryer* utilizando planejamentos experimentais.** 2011. 130f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A planta brasileira *Copaifera sp.* é uma árvore cujo óleo é tradicionalmente utilizado pela população principalmente como antiinflamatório, analgésico e relaxante muscular justificando o grande interesse científico em seu estudo. Entretanto, estudos tecnológicos, fitoquímicos e biológicos sobre suas folhas são escassos. Assim, este trabalho propôs estudar e otimizar o processo extrativo a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf., além de determinar as melhores condições de secagem em *spray dryer*, já que formas farmacêuticas sólidas são mais interessantes do ponto de vista mercadológico e farmacotécnico e ambas as etapas são fundamentais para o desenvolvimento de um futuro medicamento fitoterápico. As condições ótimas de extração e secagem em *spray dryer* foram obtidas através de diversos planejamentos experimentais como o planejamento Box-Behnken, a inclinação ascendente e a função desejabilidade. Para obtenção do extrato líquido através do processo de maceração dinâmica, objetivou-se maximizar as seguintes respostas: teor de sólidos solúveis e flavonóides totais e dos marcadores químicos, quercetrina e afzelina. As condições ótimas de extração encontradas foram: massa de planta de 41 g, proporção etanol/ água de 79°GL, tempo de extração de 1 h, temperatura de extração de 25°C e velocidade de agitação de 600 rpm. No estudo do processo de secagem em *spray dryer*, foi realizado inicialmente um teste preliminar onde oito diferentes excipientes disponíveis foram estudados quanto às características físico-químicas entre elas fluidez, compactação e degradação dos marcadores químicos. As condições do equipamento foram: bico atomizador duplo fluido pneumático com orifício de abertura de 1,2 mm que operou com vazão de ar de 40 L/min e pressão de 5,0 bar; vazão do gás de secagem de 0,6 m³/min; temperatura de saída (Ts) de 80°C e fluxo da amostra (Ws) de 5,0 g/min. A proporção sólidos do extrato líquido de *C. langsdorffii*: excipiente foi de 3:1. Entre os excipientes estudados, o manitol foi o que forneceu o extrato seco de *C. langsdorffii* com melhores características físicas e físico-químicas e, por isso foi utilizado no estudo seguinte, o planejamento Box-Behnken cujas variáveis estudadas foram concentração da amostra (Cs), fluxo da amostra (Ws) e temperatura de saída (Ts). Foram avaliadas nove respostas das quais: densidade compactada, ângulo de repouso, índice de Carr, umidade absorvida, rendimento, eficiência de secagem, degradação de flavonóides totais, quercetrina e afzelina. Para obter a condição de secagem em que as nove respostas apresentassem valores satisfatórios, utilizou-se a função desejabilidade. Assim, as condições de secagem para se obter o extrato seco de *C. langsdorffii* com boas características foram: concentração da amostra de 20,7% m/m, fluxo da amostra de 5 g/min e temperatura de saída de 80°C. Como resultado final deste trabalho, obteve-se um extrato líquido de *C. langsdorffii* otimizado com teores máximos de sólidos solúveis e dos marcadores químicos e um extrato seco com propriedades físicas, físico-químicas e farmacotécnicas adequadas para a obtenção de formas farmacêuticas sólidas.

Palavras-chave: maceração dinâmica, desejabilidade, cromatografia líquida, quercetrina, afzelina

ABSTRACT

Costa-Machado, A. R. M. **Obtainment of products from *Copaifera langsdorffii* Desf. leaves: extraction and spray drying optimization by experimental designs.** 2011. 130f. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

The Brazilian plant *Copaifera sp.* is a tree the oil of which is widely used in popular medicine as an anti-inflammatory, analgesic and muscle relaxant, consequently it is the subject of huge scientific interest. However, technological, phytochemical and biological studies regarding its leaves are rare. Thus, this work aimed to study and optimize the extraction process from *Copaifera langsdorffii* Desf. leaves, as well as to determine the best conditions for the spray drying process, since pharmaceutical solid forms are more marketable and of pharmacotechnical interests, with both steps being fundamental to the development of a future phytomedicine. The best extraction and spray drying conditions were guided by several experimental designs such as the Box-Behnken, the steepest ascent and the desirability function. From liquid extract achievement through dynamic maceration, the purpose was to maximize the following responses: soluble solids and total flavonoids contents and the chemical markers, quercetrin and afzelin contents. The best extraction conditions found were: plant mass of 41 g, ethanol/water proportion of 79°GL, extraction time of 1 h, extraction temperature of 25°C and stirring speed of 600 rpm. In the spray drying study, a preliminary test was accomplished, where eight different excipients were studied with regard to the physicochemical features such as flowability, compaction and chemical marker degradation. The equipment conditions were: a two-fluid pneumatic spray nozzle with an inlet orifice diameter of 1.2 mm that operated on 40 L/min air rate and 5 bar pressure; 0.6 m³/min drying air rate; 80°C outlet temperature (Ts) and 5.0 g/min sample feed rate (Ws). The proportion of *C. langsdorffii* liquid extract solids content: excipient was 3:1. Among the excipients studied, mannitol provided the best physicochemical feature for *C. langsdorffii* dried extract, therefore it was used in the following test, the Box-Behnken design, where the studied variables were sample concentration (Cs), sample feed rate (Ws) and outlet temperature (Ts). Nine responses were evaluated: tapped density, angle of repose, Carr index, humidity absorption, yield, drying efficiency, total flavonoids and quercetrin and afzelin degradation. To obtain the drying conditions where the nine responses presented satisfactory values, the desirability function was used. Thus, the drying conditions to obtain a dried extract with good physicochemical features were: sample concentration of 20.7% w/w, sample feed rate of 5.0 g/min and outlet temperature of 80°C. As a final result of this work, an optimized *C. langsdorffii* liquid extract presenting maximum soluble solids and chemical markers contents and a dried extract presenting the appropriate physical, physicochemical and pharmacotechnical properties to produce pharmaceutical solid forms were obtained.

Key-words: dynamic maceration, desirability, liquid chromatography, quercetrin, afzelin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Planejamento fatorial completo 2^2 com o total de ensaios e os fatores X_1 e X_2 codificados em níveis +1 e -1.....	16
Tabela 1.2 – Planejamento fatorial fracionário 2^{3-1}	18
Tabela 1.3 – Relação entre os fatores X_1 e X_2 no método de inclinação.....	20
Tabela 3.1 – Denominação codificada e não codificada dos fatores estudados no planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} e seus níveis alto +1 e baixo -1.....	30
Tabela 3.2 – Planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} com fatores codificados. X_1 = massa planta (Mp), X_2 = proporção etanol/ água (EA), X_3 = tempo de agitação (v), X_4 =temperatura de extração (T) e X_5 = velocidade de agitação (v).....	30
Tabela 3.3 – Fatores estudados no planejamento Box-Behnken e seus níveis +1, 0 e -1.	31
Tabela 3.4 – Planejamento Box-Behnken, com fatores codificados. X_1 = massa planta (Mp), X_2 = proporção etanol/água (EA) e X_3 = velocidade de agitação (v).....	31
Tabela 3.5 – Planejamento Fatorial Completo 3^2 , com fatores codificados. X_1 = massa planta (Mp) e X_2 = proporção etanol/água (EA).	33
Tabela 3.6 – Fatores estudados no Planejamento Fatorial Completo 3^2 e seus níveis +1, 0 e -1.	33
Tabela 3.7 – Gradiente de eluição da fase móvel (%) no método cromatográfico.....	35
Tabela 3.8 – Volumes utilizados para a construção da curva analítica de quercetrina.	36
Tabela 3.9 – Volumes utilizados para a construção da curva analítica de quercetrina.	36
Tabela 3.10 – Fatores selecionados para a avaliação da robustez e seus valores.....	38
Tabela 3.11 – Planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} utilizado para avaliar a robustez do método cromatográfico.....	39
Tabela 3.12 – Lista dos excipientes utilizados no teste preliminar, seu fabricante ou fornecedor e o respectivo lote.....	41
Tabela 3.13 – Fatores estudados no Planejamento Box-Behnken e seus níveis +1, 0 e -1.	42
Tabela 3.14 – Relação entre ângulo de repouso e fluidez (USP XXX, 2008).....	43
Tabela 4.1 – Área da quercetrina e do PI (cumarina) e razão entre elas e a concentração utilizada (n=3).	50
Tabela 4.2 – Área da afzelina e do PI (cumarina) e razão entre elas e a concentração utilizada (n=3).	50

Tabela 4.3 – Análise estatística das curvas analíticas para obtenção dos limites de detecção e quantificação.....	51
Tabela 4.4 – Resultados do teor de quercetrina e afzelina no Extrato Líquido de <i>C. langsdorffii</i> nas repetições no dia 1.....	53
Tabela 4.5 – Resultados do teor de quercetrina e afzelina no Extrato Seco de <i>C. langsdorffii</i> nas repetições no dia 1.....	53
Tabela 4.6 – Resultados do teor de quercetrina e afzelina no Extrato Líquido de <i>C. langsdorffii</i> nas repetições no dia 2.....	54
Tabela 4.7 – Resultados do teor de quercetrina e afzelina no Extrato Seco de <i>C. langsdorffii</i> nas repetições no dia 2.....	54
Tabela 4.8 – Resultados de variância (S^2) e do F_{calc} para o teor de quercetrina e afzelina no extrato líquido e extrato seco de <i>C. langsdorffii</i>	54
Tabela 4.9 – Resultados para a recuperação do padrão de quercetrina adicionado às amostras de Extrato Líquido de <i>C. langsdorffii</i>	55
Tabela 4.10 – Resultados para a recuperação do padrão de quercetrina adicionado às amostras de Extrato Seco de <i>C. langsdorffii</i>	55
Tabela 4.11 – Resultados para tempo de retenção (t_R) da quercetrina e razão entre as áreas de quercetrina e do PI na análise de robustez do método cromatográfico.	56
Tabela 4.12 – Resultados para as respostas sólidos solúveis (SS), rendimento de sólidos solúveis (θ_{SS}), flavonóides totais (FT), quercetrina (Q) e afzelina (A) estudadas no planejamento Box-Behnken para extração a partir das folhas de <i>C. langsdorffii</i> Desf.....	62
Tabela 4.13 – Valores de P obtidos da análise estatística para os fatores estudados na extração de quercetrina e afzelina das folhas de <i>C. langsdorffii</i>	68
Tabela 4.14 – Determinação das condições de inclinação ascendente em direção à região ótima de flavonóides totais.....	71
Tabela 4.15 – Resultados das análises de sólidos solúveis, rendimento de sólidos solúveis, flavonóides totais, quercetrina e afzelina para os pontos de inclinação ascendente ($n=3$).....	71
Tabela 4.16 – Resultados para as respostas sólidos solúveis (SS), rendimento de sólidos solúveis (θ_{SS}), flavonóides totais (FT), quercetrina (Q) e afzelina (A) estudadas no Planejamento Fatorial Completo 3^2 para extração a partir das folhas de <i>C. langsdorffii</i>	72
Tabela 4.17 – Previsão dos valores para as respostas otimizadas na extração a partir das folhas de <i>C. langsdorffii</i>	74
Tabela 4.18 – Resultados da caracterização dos Extratos Líquidos utilizados na secagem....	75
Tabela 4.19 – Resultados absolutos e degradação em porcentagem do teor de flavonóides totais, quercetrina e afzelina nos extratos secos de <i>C. langsdorffii</i> com diferentes excipientes ($n=1$).	85

Tabela 4.20 – Tabela decisória com a pontuação dos extratos secos de *C. langsdorffii* com seus respectivos excipientes. 87

Tabela 4.21 – Resultados para as respostas densidade compactada (d_c), índice de Carr (IC), ângulo de repouso (ρ), rendimento (θ), eficiência de secagem (ϕ) e a degradação de flavonóides totais (δ_{FT}) e dos marcadores químicos, quercetrina (δ_Q) e afzelina (δ_A) estudadas no planejamento Box-Behnken para secagem em *spray dryer* do extrato líquido de *C. langsdorffii*. 89

Tabela 4.22 – Valores estabelecidos para as respostas estudadas no processo de secagem para realizar a função desejabilidade..... 100

Tabela 4.23 – Valores previstos para as respostas estudadas na secagem em condições otimizadas..... 101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Representação das diversas etapas de desenvolvimento de um fitoterápico (SIMÕES <i>et al.</i> , 2001).....	2
Figura 1.2 – Representação do tripé a que se devem enquadrar os fitoterápicos (SIMÕES <i>et al.</i> , 2001).....	3
Figura 1.3 – Fotografia (A) da árvore, (B) das folhas nos galhos e (C) do tronco de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras no <i>campus</i> da USP de Ribeirão Preto.....	5
Figura 1.4 – Ilustração da distribuição do gênero <i>Copaifera</i> (região em verde).....	6
Figura 1.5 – Estrutura química dos flavonóis quercetrina e afzelina.	7
Figura 1.6 – Representação das formas farmacêuticas originadas de drogas vegetais e suas etapas de obtenção (SIMÕES <i>et al.</i> , 2001 com modificações).	11
Figura 1.7 – Esquema dos fatores possivelmente envolvidos na extração a partir de uma droga vegetal (LIST e SCHMIDT, 1989).....	12
Figura 1.8 – Esquema gráfico de um planejamento fatorial completo 2^2 (MYERS, 2003)....	17
Figura 1.9 – (A) modelo linear, (B) modelo quadrático. (NIST/ SEMATECH, 2011).	19
Figura 1.10 – Esquema gráfico do planejamento Box-Behnken com três variáveis e ponto central (MYERS, 2003).....	19
Figura 1.11 – Estruturas moleculares do manitol e sorbitol.....	24
Figura 1.12 – Estrutura molecular da lactose monohidratada (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).....	24
Figura 1.13 – Estrutura molecular da unidade de maltodextrina (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).....	25
Figura 1.14 – Estrutura molecular da amilose e amilopectina do amido (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).....	26
Figura 1.15 – Estrutura molecular da celulose microcristalina (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).....	26
Figura 1.16 – Estrutura molecular do dióxido de silício coloidal (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).....	27
Figura 3.1 – Fotografia do LM MSD 0.5 (Labmaq do Brasil Ltda., Brasil) e seus sistemas principais: 1) chave geral 2) controle do aquecimento; 3) controle de bombeamento de líquido; 4) câmara de secagem 5) separador de pó 6) indicador de temperatura de saída e 7) frasco coletor (LABMAQ, 2003).	40

- Figura 3.2** – Aparato utilizado para obtenção do ângulo de repouso dos extratos secos.43
- Figura 4.1** – Distribuição granulométrica das folhas secas e moídas coletadas de *C. langsdorffii*.47
- Figura 4.2** – Cromatogramas de: (A) pico de PI (cumarina) na amostra de excipiente manitol; (B) pico de PI na amostra de solução hidroalcoólica; (C) pico de PI e padrão de quercetrina; (D) pico de PI e padrão de afzelina; (E) perfil do Extrato Líquido de *C. langsdorffii*; (F) perfil do Extrato Seco de *C. langsdorffii*. PI (cumarina): $t_R = 40$ minutos e $\lambda_{m\acute{a}x} = 277$ e 309 nm; Quercetrina: $t_R = 53$ minutos e $\lambda_{m\acute{a}x} = 255$ e 349 nm; e Afzelina: $t_R = 61$ minutos e $\lambda_{m\acute{a}x} = 264$ e 343 nm.49
- Figura 4.3** – Curva analítica e equação da reta para quercetrina.50
- Figura 4.4** – Curva analítica e equação da reta para afzelina.51
- Figura 4.5** – Diagrama para a resposta razão entre as áreas de quercetrina e do PI na avaliação de robustez do método cromatográfico.57
- Figura 4.6** – Diagrama para a resposta tempo de retenção da quercetrina na avaliação da robustez do método cromatográfico.57
- Figura 4.7** – Diagrama para a resposta razão entre as áreas de afzelina e do PI na avaliação de robustez do método cromatográfico.58
- Figura 4.8** – Diagrama para a resposta tempo de retenção da afzelina na avaliação da robustez do método cromatográfico.58
- Figura 4.9** – Estimativa dos efeitos obtidos para cada fator estudado no planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} de acordo com as observações: (A) sólidos solúveis; (B) rendimento de sólidos solúveis; (C) flavonóides totais, (D) teor de quercetrina e (E) teor de afzelina. Valores positivos: e valores negativos:60
- Figura 4.10** – Superfícies de resposta para a extração de sólidos solúveis em função dos fatores: (A) proporção etanol/ água (EA) e massa de planta (MP); (B) velocidade de agitação (v) e massa de planta (Mp); (C) velocidade de agitação (v) e proporção etanol/ água (EA). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.63
- Figura 4.11** – Superfícies de resposta para rendimento de sólidos solúveis em função dos fatores: (A) proporção etanol/ água (EA) e massa de planta (MP); (B) velocidade de agitação (v) e massa de planta (Mp); (C) velocidade de agitação (v) e proporção etanol/ água (EA). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.65
- Figura 4.12** – Superfície de resposta para a extração de flavonóides totais em função dos fatores: (A) proporção etanol/ água e massa de planta; (B) velocidade de agitação e massa de planta; (C) velocidade de agitação e proporção etanol/ água. Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.67
- Figura 4.13** – Superfícies de resposta para teor de quercetrina (A), (B) e (C) e afzelina (D), (E) e (F) em função dos fatores proporção etanol/ água e massa de planta; velocidade de agitação (v) e massa de planta (Mp); velocidade de agitação (v) e proporção etanol/ água (EA), respectivamente. Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.69

- Figura 4.14** – Superfícies de resposta representativas do Planejamento Fatorial Completo 3^2 : (A) sólidos solúveis; (B) rendimento de sólidos solúveis.72
- Figura 4.15** – Resultados da densidade compactada para os extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* contendo diferentes excipientes (n=3).76
- Figura 4.16** – Resultados do índice de Carr para os extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* contendo diferentes excipientes (n=3).77
- Figura 4.17** – Resultados do ângulo de repouso para os extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* contendo diferentes excipientes (n=3).78
- Figura 4.18** – Resultados do diâmetro médio de partícula para os extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* contendo diferentes excipientes (n=3).79
- Figura 4.19** – Micrografia de MEV do extrato seco de *C. langsdorffii* obtido por *spray dryer* a partir do Extrato Líquido a 2,5% m/m.80
- Figura 4.20** – Micrografia de MEV dos excipientes antes da secagem e dos extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* a partir do Extrato Líquido a 2,5% m/m contendo diferentes excipientes.81
- Figura 4.21** – Resultados da umidade de equilíbrio para os extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* contendo diferentes excipientes (n=3).82
- Figura 4.22** – Resultados do rendimento para os extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* contendo diferentes excipientes (n=1).83
- Figura 4.23** – Resultados da degradação de flavonóides totais, quercetrina e afzelina para os extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* contendo diferentes excipientes (n=1).84
- Figura 4.24** – Superfícies de resposta para densidade compactada (d_c) em função dos fatores: (A) vazão da amostra (W_s) e temperatura de saída (T_s); (B) concentração da amostra (C_s) e temperatura de saída (T_s); (C) concentração da amostra (C_s) e vazão da amostra (W_s). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.90
- Figura 4.25** – Superfícies de resposta para índice de Carr (IC) em função dos fatores: (A) vazão da amostra (W_s) e temperatura de saída (T_s); (B) concentração da amostra (C_s) e temperatura de saída (T_s); (C) concentração da amostra (C_s) e vazão da amostra (W_s). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.92
- Figura 4.26** – Superfícies de resposta para ângulo de repouso (ρ) em função dos fatores: (A) vazão da amostra (W_s) e temperatura de saída (T_s); (B) concentração da amostra (C_s) e temperatura de saída (T_s); (C) concentração da amostra (C_s) e vazão da amostra (W_s). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.93
- Figura 4.27** – Superfícies de resposta para rendimento do processo de secagem (θ) em função dos fatores: (A) vazão da amostra (W_s) e temperatura de saída (T_s); (B) concentração da amostra (C_s) e temperatura de saída (T_s); (C) concentração da amostra (C_s) e vazão da amostra (W_s). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.95

Figura 4.28 – Superfícies de resposta para eficiência de secagem (ϕ) em função dos fatores: (A) vazãoda amostra (Ws) e temperatura de saída (Ts); (B) concentração da amostra (Cs) e temperatura de saída (Ts); (C) concentração da amostra (Cs) e vazãoda amostra (Ws). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central. 96

Figura 4.29 – Superfícies de resposta para degradação de flavonóides totais (δ_{FT}) em função dos fatores: (A) vazãoda amostra (Ws) e temperatura de saída (Ts); (B) concentração da amostra (Cs) e temperatura de saída (Ts); (C) concentração da amostra (Cs) e vazãoda amostra (Ws). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central..... 98

Figura 4.30 – Superfícies de resposta para degradação de quercetrina (δ_Q) em função dos fatores: (A) vazãoda amostra (Ws) e temperatura de saída (Ts); (B) concentração da amostra (Cs) e temperatura de saída (Ts); (C) concentração da amostra (Cs) e vazãoda amostra (Ws). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central. 99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA –	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE –	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EC –	<i>European Community</i>
HMG CoA –	Hidroxi- Metil- Glutarial co-enzima A
INMETRO –	Instituto Metrológico
MSR –	Metodologia de Superfície de Resposta
Rec. –	Recuperação
USP –	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

α –	nível de significância
β –	coeficiente
ρ –	ângulo de repouso (graus)
Δ –	fator de inclinação ascendente
$^{\circ}\text{GL}$ –	graus em Gay- Lussac
A –	afzelina (mg/mL)
a –	coeficiente angular
b –	coeficiente linear
C_s –	concentração da amostra
CV –	coeficiente de variação
d –	diâmetro (mm)
d_{50} –	diâmetro médio de partícula (μm)
d_{90} –	diâmetro igual ou acima do qual compreende 90% do diâmetro das partículas (μm)
d_b –	densidade bruta (g/cm^3)
d_c –	densidade compactada (g/cm^3)
EA –	proporção etanol/ água ($^{\circ}\text{GL}$)
FT –	flavonóides totais (mg/mL)
g –	grama
h –	altura (mm)
IC –	índice de Carr
LD –	limite de detecção
LQ –	limite de quantificação
m –	massa (g)
m_{exc} –	massa de excipiente (g)
m_f –	massa de extrato seco de <i>Copaifera langsdorffii</i> obtido após secagem (g)

m_i	massa de extrato de <i>Copaifera langsdorffii</i> inicial (g)
mL	mililitros
Mp	massa de planta (g)
PI	padrão interno
Q	quercetina (mg/mL)
R^2	coeficiente de correlação linear
S	desvio padrão
S^2	variância
SS	sólidos solúveis (% m/v)
T	temperatura de extração (°C)
t	tempo de extração (horas)
t_R	tempo de retenção (minutos)
T_s	temperatura de saída (°C)
UR	umidade relativa (% UR)
UV	ultravioleta
v	velocidade de agitação (rpm)
vol	volume (mL ou cm ³)
VR	valor real (μ g/mL)
VT	valor teórico (μ g/mL)
Ws	fluxo da amostra (g/min)
X	variável independente codificada
X_1	variável independente codificada para massa de planta
X_2	variável independente codificada para proporção etanol/ água
X_3	variável independente codificada para tempo de extração
X_4	variável independente codificada para temperatura de extração
X_5	variável independente codificada para velocidade de agitação
X_6	variável independente codificada para temperatura de saída

X_7 –	variável independente codificada para fluxo da amostra
X_8 –	variável independente codificada para concentração da amostra
Y –	variável independente
δ_A –	degradação de afzelina (%)
δ_{FT} –	degradação de flavonóides totais (%)
δ_Q –	degradação quercetrina (%)
θ –	rendimento de secagem (%)
θ_{SS} –	rendimento de sólidos solúveis (%)
φ –	eficiência de secagem (%)

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS	xi
1. Introdução	1
1.1. Medicamentos Fitoterápicos	1
1.2. Desenvolvimento de um Fitoterápico	1
1.3. Padronização	3
1.4. <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	5
1.4.1. Aspecto Químico	5
1.4.2. Atividades Biológicas.....	7
1.4.3. Aspectos Toxicológicos.....	9
1.5. Formas Farmacêuticas.....	9
1.6. Extração.....	11
1.6.1. Métodos Extrativos.....	13
1.6.2. Agente Extrator.....	13
1.6.3. Massa de Planta	14
1.6.4. Tempo, Temperatura e Agitação	14
1.7. Planejamento Experimental	15
1.7.1. Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)	18
1.7.2. Inclinação Ascendente (Descendente).....	19
1.7.3. Função Desejabilidade.....	21
1.8. Secagem em <i>Spray Dryer</i>	22
2. Objetivos	28
3. Materiais e Métodos	29
3.1. Droga Vegetal	29
3.1.1. Obtenção.....	29
3.1.2. Caracterização	29
3.2. Extração.....	29

3.2.1. Procedimento	29
3.2.2. Planejamentos Experimentais.....	30
3.2.3. Caracterização Físico-Química dos Extratos Líquidos	33
3.2.4. Validação do Método Cromatográfico	35
3.3. Secagem em <i>Spray Dryer</i>	39
3.3.1. Equipamento.....	39
3.3.2. Extratos Líquidos Utilizados para Secagem.....	40
3.3.3. Experimento Preliminar e Excipientes Estudados.....	41
3.3.4. Planejamento Experimental.....	41
3.3.5. Caracterização Físico-Química dos Extratos Secos	42
4. Resultados e Discussão	46
4.1. Droga Vegetal	46
4.1.1. Caracterização	46
4.2. Validação do Método Cromatográfico.....	47
4.2.1. Seletividade	48
4.2.2. Linearidade e Curva Analítica.....	49
4.2.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	51
4.2.4. Precisão.....	52
4.2.5. Exatidão	55
4.2.6. Robustez	56
4.3. Extração.....	59
4.3.1. Planejamento Fatorial Fracionário.....	59
4.3.2. Planejamento Box-Behnken	62
4.3.3. Inclinação Ascendente (Descendente).....	70
4.3.4. Planejamento Fatorial Completo 3^2	71
4.3.5. Otimização das Condições de Extração.....	73
4.4. Secagem em <i>Spray Dryer</i>	75
4.4.1. Caracterização dos Extratos Líquidos utilizados na secagem	75
4.4.2. Experimento Preliminar.....	75
4.4.3. Planejamento Box-Behnken	88
4.4.4. Otimização das Condições de Secagem	100
5. Conclusão	102
6. Referências	104

1. Introdução

1.1. Medicamentos Fitoterápicos

Apesar da imensa biodiversidade brasileira e ampla utilização das plantas medicinais no Brasil, o país ainda deixa a desejar quando se trata do desenvolvimento e pesquisas de plantas nativas para estabelecer sua qualidade, eficácia e segurança. Tanto é, que apenas 26% das espécies vegetais com registro na ANVISA são provenientes da América do Sul (CARVALHO *et al.*, 2008). Entretanto, desde 1994, a regulamentação de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos tem sido desenvolvida baseada nas leis européias e internacionais. Desta forma, os requerimentos legais para registro de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos demandam uma documentação completa contemplando dados de eficácia, segurança e controle de qualidade considerando os fitoterápicos como produtos industrializados que contenham a planta medicinal e/ou preparações dela com substâncias bioativas com a finalidade de tratar, aliviar, prevenir ou diagnosticar doenças (CALIXTO, 2000; BRASIL, 2004).

Sabendo-se que “não é objeto de registro ou cadastro a planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada” surgiu o Programa de Farmácia Vivas no nordeste do país como forma de atender à população carente. Entretanto, vale ressaltar que as plantas medicinais que não passam por padronização e não apresentam estudos de eficácia e segurança apresentam maiores riscos de efeitos adversos ou mesmo de não apresentarem efeito terapêutico (BRASIL, 2004; SILVA *et al.*, 2006).

1.2. Desenvolvimento de um Fitoterápico

De acordo com a legislação brasileira, o registro de um medicamento fitoterápico, pode ser feito de acordo com a Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado (BRASIL, 2008) ou, no caso de plantas que não estão contempladas nesta lista, o registro pode ser obtido através da apresentação de estudos sobre eficácia e segurança publicados em literaturas recomendadas e que sejam suficientes para registro. Entretanto, para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico inovador, diversos estudos devem ser realizados e, assim apresentados no ato de pedido de registro (BRASIL, 2004).

O desenvolvimento de um medicamento fitoterápico segue as mesmas etapas para qualquer tipo de medicamento. Afinal a diferença básica entre eles está na origem da matéria-prima. O desenvolvimento de um medicamento fitoterápico requer muito menos recursos e também menor tempo de pesquisa que um novo medicamento sintético, cujo valor de investimento pode chegar a mais de US\$ 1 bilhão e até 15 anos de pesquisa (PHRMA; 2011; BIAZÚS, 2008). Isto é devido ao vasto conhecimento popular no uso de plantas medicinais, estimando-se que haja uma redução dos custos no desenvolvimento do fitoterápico não ultrapassando 2 a 3% do previsto para o desenvolvimento de um novo medicamento sintético. Ainda, de acordo com a Comissão E (1998), os medicamentos fitoterápicos tendo como constituintes componentes ativos primários, secundários e coadjuvantes manifestam melhores efeitos e atividade terapêutica de maior amplitude que substâncias isoladas (BLUMENTHAL *et al.*, 1998; BIAZÚS, 2008).

Figura 1.1 – Representação das diversas etapas de desenvolvimento de um fitoterápico (SIMÕES *et al.*, 2001).

Além disso, sabe-se que um medicamento inovador que chega ao mercado alcança uma margem de lucro extraordinária, cria barreiras para competidores e um monopólio temporário adquirido por patentes (BIAZÚS, 2008).

Com o intuito de compreender melhor os altos investimentos requeridos para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico inovador, apresenta-se as etapas de seu desenvolvimento na Figura 1.1.

Como já discutido anteriormente, a legislação brasileira exige uma documentação completa de qualidade, eficácia e segurança. O requisito qualidade é assegurado através da padronização do medicamento fitoterápico e reprodutibilidade de produção; o requisito eficácia remete aos testes farmacológicos e a segurança é garantida por testes toxicológicos (Figura 1.2) (SIMÕES *et al.*, 2001).

Figura 1.2 – Representação do tripé a que se devem enquadrar os fitoterápicos (SIMÕES *et al.*, 2001).

1.3. Padronização

Chás de plantas são tradicionalmente utilizados pela população, muitas vezes até com a finalidade de tratar doenças. Entretanto, esta típica forma de uso e mesmo a planta em si não são padronizadas podendo acarretar efeitos adversos ou falta de eficácia aos seus usuários. Além disso, os constituintes químicos de uma espécie são altamente variáveis de acordo com a localização geográfica, sazonalidade, variações climáticas, alelopatia, entre outros fatores. Devido aos possíveis efeitos adversos, falta de eficácia e alta variabilidade do material vegetal, tem-se dado ênfase à padronização (ONG, 2004; CAPASSO *et al.*, 2000; BANKOVA, 2005; WANG *et al.*, 2009; GURIB-FAKIM, 2006).

A Comunidade Econômica Européia publicou recentemente a Diretiva 2004/24/EC (MHRA, 2011), referente à padronização das plantas medicinais. Esclarece que a qualidade de produtos vegetais apenas pode ser garantida se as matérias-primas são definidas de maneira rigorosa e detalhada incluindo a identificação botânica da planta utilizada, a região

geográfica, as condições climáticas e de colheita, assim como o preparo das amostras e as técnicas de extração, separação e as técnicas analíticas. Muitas vezes, tornam-se interessantes a combinação da padronização química e ensaios biológicos para correlacionar os constituintes químicos aos efeitos terapêuticos da planta medicinal (ONG, 2004).

Geralmente, a padronização química envolve a identificação dos constituintes ativos ou marcadores da planta por análise espectrofotométrica ou cromatográfica sendo que a análise química de extratos de plantas tem um papel importante no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos (ONG, 2004; BANKOVA, 2005).

Assim, a padronização permite garantir que haja a quantidade necessária dos constituintes ativos ou dos grupos de constituintes ativos da planta e, quando aplicável, que seja controlada a quantidade de constituintes tóxicos. Desta forma, a padronização torna-se essencial para garantir a qualidade além de permitir a reprodutibilidade do produto originado da planta (CAPASSO *et al.*, 2000; GURIB-FAKIM, 2006).

Além disso, deve-se levar em consideração a concentração e dosagem dos constituintes químicos nos produtos originados da planta. Tais constituintes quando ingeridos em doses excessivas podem provocar efeitos adversos assim como os medicamentos convencionais. Por outro lado, baixas doses podem não ter efeito terapêutico. Devido à alta variabilidade do material vegetal, utiliza-se geralmente uma concentração mínima ou uma faixa de concentração para os constituintes ativos ao invés de um valor exato assim como um limite de concentração máxima para os constituintes potencialmente tóxicos é igualmente necessário (GURIB-FAKIM, 2006).

A padronização é essencial para que se inicie o desenvolvimento do fitoterápico e, posteriormente, para realizar o controle de qualidade da produção deste medicamento. Este procedimento inicia-se com o estudo fitoquímico da planta que é o conhecimento e quantificação dos grupos de constituintes químicos e, mais rigorosamente, dos constituintes químicos em si característicos da planta estudada. Estes grupos de constituintes químicos ou os constituintes químicos característicos da planta são chamados marcadores químicos. Além disso, a padronização deve ocorrer no processo produtivo, desde o plantio até a produção industrial (ZHAO *et al.*, 2010).

Desta forma, a padronização possibilita que seja conhecida a constituição química em relação aos ativos ou grupos de ativos principais, bem como o efeito do processo produtivo sobre esta constituição química do produto originado da planta, seus efeitos farmacológicos e dosagem tóxica, além de permitir que o produto final seja, lote-a-lote,

reproduzido com as mesmas características químicas e físico-químicas, permitindo então a mesma intensidade terapêutica sem apresentar efeitos adversos (ZHAO *et al.*, 2010).

Finalmente, é importante salientar que produtos vegetais padronizados fornecem maior segurança e aumentam a confiabilidade do consumidor.

1.4. *Copaifera langsdorffii* Desf.

1.4.1. Aspecto Químico

O gênero *Copaifera* pertence à família botânica denominada atualmente como Leguminosae Juss. e sub-família Caesalpinioideae Kunth., sendo que a família botânica pode ser encontrada na literatura com a denominação anterior: Fabaceae Lindley (SOUSA, 2011). Algumas espécies têm denominação popular própria tanto em português como, eventualmente, em outras línguas. No Brasil, as espécies de *Copaifera* são conhecidas como copaíba, copaibeira, pau-de-óleo, copaúba, copaúva, copiúva. Em particular, a espécie *Copaifera langsdorffii* Desf. é denominada de copaíba vermelha, óleo vermelho ou copaíba da várzea no Amazonas, copaibeira em Minas, cupiúva ou podoi no Piauí e no Ceará e de oleiro ou cabimo na Venezuela (CARVALHO, 2004; VEIGA JÚNIOR, 2005; VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2002).

As árvores de copaíba são frondosas e de crescimento lento podendo apresentar de 5 a 40 m de altura. Suas folhas são compostas, pecioladas com folíolos alternos ou sobpostos (SOUSA, 2011; CARVALHO, 2004).

Figura 1.3 – Fotografia (A) da árvore, (B) das folhas nos galhos e (C) do tronco de *Copaifera langsdorffii* Desf. na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras no *campus* da USP de Ribeirão Preto.

copaeno, cipereno, β -copaeno, cariofileno, β -humuleno, muroleno, β -selineno, δ -cadineno e γ -cadineno encontrados nas frações hexânicas (LANGENHEIM *et al.*, 1986a, 1986b; MACEDO e LANGENHEIM, 1989a, 1989b).

Sousa (2011) isolou e identificou majoritariamente quercetina-3-O-ramnosídeo e canferol-3-O-ramnosídeo de frações dos extratos brutos hidroalcoólicos obtidos a partir das folhas da espécie *C. langsdorffii* e os utilizou como marcadores químicos para desenvolver e validar um método em CLAE para diferentes espécies deste gênero.

A quercetrina pode também ser denominada quercimelina, quercetina-3-ramnosídeo, quercetina-3-O-ramnosídeo, quercetina-3-L-ramnosídeo, quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo e a afzelina que pode também ser denominado canferol-3-ramnosídeo, canferol-3-O-glucoramosídeo, canferol-3-O- α -L-ramnopiranosídeo são flavonóis glicosilados que foram isolados e identificados em muitas outras fontes vegetais (THE PUBCHEM PROJECT, 2011).

A quercetrina é uma molécula com peso molecular 448,38 g/mol, coeficiente de partição de 0,216 e logP (octanol/água) de -0,540. É praticamente insolúvel em água fria, moderadamente solúvel em água quente e solúvel em etanol. Seus comprimentos de onda máximos, quando em etanol, são em 258 e 350 nm (THE PUBCHEM PROJECT, 2011).

A afzelina tem peso molecular 432,38 g/mol, coeficiente de partição de 0,811 e logP (octanol/água) de -0,146. Não é solúvel em água. (THE PUBCHEM PROJECT, 2011).

Figura 1.5 – Estrutura química dos flavonóis quercetrina e afzelina.

1.4.2. Atividades Biológicas

Apesar da *C. langsdorffii* ter uma grande utilização popular, os trabalhos científicos para confirmação de suas atividades biológicas ainda são em pequena quantidade. Muitas substâncias deste gênero foram identificadas, mas ainda não está estabelecida a relação entre

atividade e os componentes das diversas espécies. Alguns experimentos são realizados com óleo bruto e de espécies indeterminadas, muitas vezes sem análise química. Poucos trabalhos existem de avaliação da atividade de frações do óleo, de substâncias isoladas e ainda menos envolvendo extratos das folhas de *Copaifera sp* (VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2002; CARVALHO, 2004; VEIGA JÚNIOR, 2005; SANTOS *et al.*, 2008).

Entre as atividades farmacológicas mais estudadas cientificamente para *Copaifera sp* são: antiinflamatória, analgésica, antibacteriana, antitumoral, antioxidante, cicatrizante e gastroprotetora, anti-helmíntica, leishmanicida, tripanossomicida e relaxante muscular (CARVALHO, 2004; VEIGA JÚNIOR, 2005; VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2002; PAIVA *et al.*, 2003 e 2004).

Brancalion (2010) investigou a atividade antilitiásica do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *C. langsdorffii* em ratos. Os cálculos de oxalato de cálcio foram introduzidos na bexiga dos animais para o modelo de nefrolitíase. Teve como resultados a diminuição na massa média e no número médio dos cálculos e, ainda, observou que os cálculos se tornaram mais quebradiços quebrando com a metade da pressão necessária antes do tratamento.

Yokozawa *et al.* (1999) testou diversos flavonóides, entre eles afzelina e quercetrina, quanto ao efeito protetor da membrana de células renais. Ambos apresentaram efeito notório de proteção das células renais. Em seguida, propuseram que a atividade dos flavonóides é amplamente influenciada pelo número e posição dos grupamentos de hidroxilas fenólicas ligadas à estrutura básica.

Na literatura, encontram-se estudos de variadas atividades com a quercetrina e afzelina. Entretanto, a afzelina avaliada em atividades como antioxidante (KIM *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2009), antiinflamatória e anti-sistema complemento (MIN *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2005), inibidora de enzimas como HMG-CoA redutase e conversora de angiotensina-I (KWON *et al.*, 2010), tirosinase (RHO *et al.*, 2010), ciclooxigenase-2 (KIM *et al.*, 2008) e mieloperoxidase (REGASINI *et al.*, 2008) e de substâncias como óxido nítrico (KIM *et al.*, 2008) nem sempre apresentou resultados satisfatórios. Já a quercetrina, quando estudada concomitantemente nestes trabalhos, apresentou atividade.

1.4.3. Aspectos Toxicológicos

Há na literatura alguns dados sobre os aspectos toxicológicos do óleo de *Copaifera sp.* Opdyke¹ (1976 apud ALONSO, 2004), Leung e Foster² (1996 apud ALONSO, 2004) e Gruenwald³ (1998 apud ALONSO, 2004) indicam que o óleo de *Copaifera sp* não é tóxico em doses de até 2 g por dia. Quando administrada em doses maiores pode ocasionar diarreia, vômitos, insônia e irritação cutânea. Além disso, já foi citado que o óleo, por via interna, pode ser irritante para mucosas principalmente do trato urinário (ALONSO, 2004; GRUENWALD, BRENDLER e JAENICKE, 2000).

Um estudo apresentado no Congresso Brasileiro de Genética (ALVES *et al.*, 2009) avaliou o potencial mutagênico e ou antimutagênico do extrato metanólico das partes aéreas de *C. langsdorffii*, por meio do teste de micronúcleo (teste para a avaliação de segurança pré-clínica) em sangue periférico de camundongo Swiss. Os resultados apresentaram ausência de citotoxicidade do extrato metanólico de *C. langsdorffii*. Além disso, foi observado efeito antimutagênico quando os animais foram tratados simultaneamente com diferentes doses do extrato metanólico de *C. langsdorffii* (10, 20, 40 e 80 mg/kg) e doxorrubicina (15 mg/kg).

Outro estudo apresentado no mesmo evento avaliou o potencial mutagênico e ou antimutagênico em células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster) também pelo teste de micronúcleo, mas desta vez, utilizando o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *C. langsdorffii*. Os resultados encontrados demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* não apresentou atividade mutagênica nas concentrações de 30, 60 e 120 µL/mL e, apresentaram efeito quimiopreventivo quando combinadas com metil- metanosulfonato (400 µM) (CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2009b).

1.5. Formas Farmacêuticas

Para desenvolver uma forma farmacêutica deve-se realizar um estudo de pré-formulação onde são verificadas características do fármaco ou droga vegetal como seu aspecto, cor, sabor, suas características físico-químicas de solubilidade e coeficiente de partição e sua estabilidade física, química e microbiológica. Além disso, a via de administração mais adequada para ação do fármaco ou droga vegetal deve ser considerada (AULTON, 2005).

¹ OPDYKE, D. L. Balsam Copaiba. Food Cosmet. Toxicol., v. 14, p. 687, 1976.

² LEUNG A e FOSTER S. **Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics**. New York, NY: John Wiley, 1996.

³ GRUENWALD, J. I.; BRENDLER, T. e JAENICKE, C. PDR for herbal medicines. Medical Economics

Há diferentes terminologias e classificações para as formas farmacêuticas. Geralmente, são classificadas em líquidos, semi-sólidos e sólidos. As formas farmacêuticas mais utilizadas obtidas de drogas vegetais são os extratos que podem ser líquidos ou sólidos, também conhecidos como extratos secos. Estes extratos, por sua vez, podem ser consumidos como produto final sem modificações ou serem produtos intermediários empregados em outras preparações farmacêuticas para aí sim dar origem ao produto final (Figura 1.6). As formas farmacêuticas originadas de drogas vegetais estão brevemente citadas a seguir (AULTON, 2005; SIMÕES *et al.*, 2001).

Chás são formas farmacêuticas líquidas obtidas através de uma forma caseira de preparo podendo ser por infusão onde a droga vegetal é imersa em água quente até extração dos constituintes e, em seguida, separada por filtração ou por decocção onde a droga vegetal é cozida por alguns minutos na água fervente e, então filtrada. Os chás geralmente são preparados para consumo rápido devido à instabilidade microbiológica e, por isso, se tornam inviáveis para produção industrial (GURIB-FAKIM, 2006).

Tinturas referem-se a uma solução alcoólica ou hidroalcoólica resultante da extração da droga vegetal ou da diluição de extratos. Geralmente, 10 mL de tintura correspondem a 1 g da droga vegetal (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Outra preparação líquida originada de drogas vegetais são os extratos líquidos que se assemelham às tinturas, mas podem corresponder a variadas quantidades da droga vegetal. Se necessário os extratos podem ser padronizados em relação à quantidade de solvente, de constituintes químicos ou sólidos solúveis. Os extratos fluidos são um tipo de extrato líquido onde 1 mL de extrato fluido corresponde a 1 g da droga vegetal. Podem ser obtidos por diluição de extratos mais concentrados ou por concentração de tinturas ou extratos mais diluídos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Extratos moles são formas farmacêuticas semi-sólidas geralmente utilizadas como produtos intermediários obtidos por evaporação do solvente dos extratos e que contenha de 60 a 80% de resíduo (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Extratos secos são formas farmacêuticas sólidas, pulverulentas ou granuladas obtidas por retirada total do solvente do extrato através de técnicas diversas como liofilização, leito fluidizado ou *spray dryer* e são adicionados ou não de adjuvante/ excipiente (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Devem ser padronizados em teor de constituintes químicos.

Os chás, tinturas, extratos líquido, mole e seco, podem ser utilizados como produtos finais ou produtos intermediários dando origem a soluções, xaropes, suspensões, grânulos, cápsulas, comprimidos, dentre outros.

Figura 1.6 – Representação das formas farmacêuticas originadas de drogas vegetais e suas etapas de obtenção (SIMÕES *et al.*, 2001 com modificações).

1.6. Extração

A extração dos constituintes químicos de drogas vegetais consiste em um processo em que ocorrem os seguintes fenômenos: contato da droga vegetal com o solvente fazendo com ela se inche e se hidrate, possibilitando a permeabilidade das paredes celulares; solubilização dos constituintes químicos da planta de maneira seletiva; e transferência de massa dos constituintes químicos da droga vegetal solúveis para o solvente por difusão ou processo osmótico (LIST e SCHMIDT, 1989; JACQUES *et al.*, 2007).

Os protocolos para o processo de extração de constituintes químicos de plantas são diversos devido à variedade de suas características químicas, à complexidade destes e à variedade de matrizes vegetais. Além disso, o rendimento de extração dos constituintes químicos depende do processo extrativo em si e dos diversos fatores que o afetam (CONTINI *et al.*, 2008).

Há diversos processos extrativos descritos na literatura e que podem ser utilizados, sendo um fator importante a ser considerado de acordo com os objetivos da extração. Entre os métodos extrativos encontram-se métodos convencionais e clássicos como maceração estática, percolação e extração por Soxhlet os quais são geralmente recomendados pela Farmacopéia Brasileira (2010); e métodos extrativos mais modernos como maceração dinâmica (FERNANDES, NAKASHIMA e SERRA, 2004; DENNY *et al.*, 2007; LOPES FILHO, 1999), turbo-extração, extração assistida por ultrassom (HU, CAI e LIANG, 2008; LIAO *et al.*, 2008) e microondas (TATKE e JAISWAL, 2011).

Ademais, inúmeros são os fatores que influenciam os processos extrativos como a divisão da droga, o estado da droga, se fresca ou seca, massa utilizada de droga, natureza dos solventes, mistura dos solventes em diferentes proporções, volume de solvente, temperatura, agitação, pH e tempo de extração (PRISTA, ALVES e MORGADO, 1995; LIST e SCHMIDT, 1989; CHIRINOS *et al.*, 2007). Como exemplo, os fatores que afetam a extração em uma maceração dinâmica estão representados na Figura 1.7 e alguns deles são discutidos a seguir.

Figura 1.7 – Esquema dos fatores possivelmente envolvidos na extração a partir de uma droga vegetal (LIST e SCHMIDT, 1989).

1.6.1. Métodos Extrativos

Os métodos extrativos podem ser classificados de diferentes maneiras: convencionais ou clássicos por serem citados e recomendados pelas farmacopéias como a decocção, infusão, maceração estática, percolação, extração por Soxhlet. Enquanto isso há métodos extrativos considerados modernos amplamente estudados nas últimas décadas e maior produtividade, como maceração dinâmica, turbo-extração, extração assistida por ultrassom, microondas ou pulsos elétricos.

De acordo com List e Schmidt (1989), os métodos extrativos podem ser classificados como métodos que estabelecem uma concentração de equilíbrio e métodos exaustivos. Os métodos que estabelecem uma concentração de equilíbrio são aqueles em que ocorre a estabilização do processo de extração, ou seja, quando a distribuição das substâncias extraíveis entre o extrato e a droga vegetal alcança um valor constante. Os métodos extrativos que se incluem nesta classificação são: maceração estática e dinâmica, turbo-extração, extração assistida por ultrassom, microondas e energia elétrica.

A extração exaustiva é definida como a remoção completa das substâncias extraíveis da droga vegetal. Os métodos extrativos que se enquadram como exaustivos são percolação e a extração por Soxhlet (LIST e SCHMIDT, 1989).

1.6.2. Agente Extrator

O agente extrator também chamado solvente é um dos fatores que mais influenciam no processo de extração. Eles devem ser capazes de dissolver os constituintes químicos de interesse da planta sem que os alterem quimicamente separando-os do material vegetal residual.

Os principais requisitos para serem considerados na escolha de um solvente são: seletividade, facilidade de manipulação, custos, influência no meio ambiente e segurança.

Podem ser líquidos ou gases, orgânicos ou inorgânicos. Os solventes mais amplamente empregados são metanol, etanol, acetona e água. Entre estes solventes, o metanol apresenta a maior capacidade de extrair compostos fenólicos seguido do etanol e da água (CHIRINOS *et al.*, 2007). Sabe-se que a força de extração de uma solução metanólica corresponde à mesma força de extração que uma solução etanólica com concentração 10% maior do etanol (LIST e SCHMIDT, 1989).

O solvente contribui na extração seletiva de constituintes químicos dependendo de sua polaridade. A mistura de água e outros solventes pode ser utilizada possibilitando variar a

polaridade e, assim a capacidade de dissolver determinados componentes químicos da planta pelo agente extrator.

Quando se realiza a extração em uva utilizando-se álcool como solvente por exemplo, observa-se uma liberação progressiva dos fenóis da pele da uva em função do tempo de extração enquanto que o tempo não é tão significativo quando se utiliza água (PINELO *et al.*, 2005). Chirinos e colaboradores (2007) estudaram diferentes condições para extração de fenóis totais, antocianidinas totais e flavonóides totais de *Tropaeolum tuberosum*, entre elas diferentes solventes como metanol, acetona, etanol, água e hexano. A eficiência de extração para fenóis totais apresentou-se como: metanol>acetona=água≥etanol>hexano. Já a eficiência de extração para antocianidinas totais e flavonóides totais apresentou-se como: metanol=acetona>etanol=água>hexano. Assim, a escolha do solvente deve considerar os constituintes químicos de interesse e o objetivo da extração (VILEGAS; MARCHI e LANÇAS, 1997).

Além disso, é importante considerar que alguns solventes são tóxicos a exemplo do metanol (LEAF e ZATMAM, 1952) e que se devem utilizar solventes ambientalmente corretos para que os extratos sejam produzidos e comercializados industrialmente sem oferecer riscos ao consumidor e ao meio ambiente (DIOUF, STEVONOVICA e BOUTIN, 2009).

1.6.3. Massa de Planta

O aumento da massa de planta com volume constantes de solvente é relatado como positivo no aumento da extração como, por exemplo dos compostos fenólicos. Entretanto, rendimento em relação à massa de planta utilizada decresce (LIST e SCHMIDT, 1989). Portanto, é necessário que haja um equilíbrio envolvendo viabilidade econômica e descarte de solventes, além de evitar a saturação do solvente (PINELO, ARNOUS e MEYER, 2006).

1.6.4. Tempo, Temperatura e Agitação

O tempo de extração deve ser considerado principalmente nos métodos extrativos que estabelecem uma concentração de equilíbrio visto que há um tempo mínimo para que o agente extrator seja capaz de inchar e hidratar a droga vegetal, solubilizar os constituintes químicos e difundí-los no meio extrator. Outros fatores como temperatura e ausência ou presença de agitação assim como a velocidade de agitação podem influenciar no tempo de extração (PRISTA, ALVES e MORGADO, 1995).

O aumento da temperatura da extração provoca um aumento da extração dos constituintes químicos da droga vegetal, pois estes são mais facilmente solubilizados no meio e, assim alcançam o equilíbrio mais rapidamente. Entretanto, deve-se atentar para os constituintes químicos termolábeis que sofrem alteração química em altas temperaturas podendo afetar a qualidade do extrato (PRISTA, ALVES e MORGADO, 1995).

A agitação exerce influência acentuada na extração dos constituintes químicos da droga vegetal. Visto que o solvente em contato direto com a droga vegetal alcança a concentração de saturação dos constituintes químicos mais rapidamente que o solvente que não está, se for mantida em repouso, a extração dependerá basicamente do coeficiente de difusão no solvente, o qual pode ser aumentado pela agitação (PRISTA, ALVES e MORGADO, 1995).

1.7. Planejamento Experimental

Nas últimas duas décadas, novas teorias e metodologias sobre planejamento experimental foram desenvolvidas e estão sendo cada vez mais utilizadas de maneira eficiente na maioria das ciências. Tem sido utilizada amplamente na agricultura (WILLERS *et al*, 2008; LEVIGNE, RALET e THIBAUT, 2002; LEWIS e SJÖSTROM, 2010) no melhoramento da qualidade (BURSALI, ERTUNC e AKAY, 2006; ARTILES-LEÓN e MELLA-CABRERA, 1997) e na redução de custos. Recentemente, sua aplicação aumentou acentuadamente na biologia, pesquisa médica e estudos clínicos (LEON, 2010; LI, 2003). Como exemplo na biologia, pode ser citado o estudo da expressão gênica em microensaios (IMBEAUD e AUFFRAY, 2005; KERR e CHURCHILL, 2001) que é afetada por diferentes fatores assim como estudos clínicos em que os pacientes necessitam da combinação de diversos medicamentos e o objetivo é estudar a toxicidade e eficácia das diferentes combinações (LI, 2003).

Os avanços sobre planejamento experimental proporcionam uma ferramenta poderosa para gerar, interpretar e aplicar experimentos científicos de maneira mais eficaz. Há planejamentos experimentais multivariáveis que estudam diversos fatores simultaneamente e os planejamentos univariáveis que variam um único fator por vez. Os planejamentos multivariáveis têm certa vantagem sobre os univariáveis porque, se há uma interação significativa entre os fatores estudados, os planejamentos univariáveis não são capazes de detectar esta interação diferindo dos resultados dos planejamentos multivariáveis. Portanto, os

planejamentos univariáveis podem falhar desde que o efeito de um fator é dependente dos outros fatores envolvidos (FRANCIS *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2007).

De maneira geral, os planejamentos experimentais trabalham com fatores chamados variáveis independentes (X) em diferentes valores ou níveis (n). Um exemplo fictício poderia ser no estudo de extração de uma planta onde dois fatores são selecionados para o estudo podendo ser pH e temperatura sendo ambos estudados nos níveis codificados como baixo (-1) e alto (+1). Os valores codificados são relacionados com os valores reais, ou seja, pH 5 e 9 e temperatura 20 e 50°C. Além disso, o planejamento experimental tem por finalidade estudar uma resposta chamada variável dependente (y) (BOX e BEHKEN, 1960).

Os níveis dos planejamentos podem ser dois, três ou até cinco níveis de cada fator em questão. O total de ensaios realizados depende do número de fatores e de níveis. Assim, $n^X = n^\circ$ total de ensaios a serem realizados. Assim, quando temos dois fatores estudados em dois níveis, então $2^2 = 4$ ensaios (BOX e BEHKEN, 1960).

O planejamento é muito utilizado quando há diversos fatores a serem estudados, quando a região experimental de interesse é ampla e, principalmente, para triagem dos fatores com o objetivo de verificar qual deles possui maior impacto na resposta é o planejamento fatorial completo. Ele possibilita reduzir o número de fatores a serem investigados nos próximos planejamentos. Desta forma, espera-se eliminar fatores sem importância antes de investir em planejamentos mais elaborados. O planejamento fatorial completo mais simples é o 2^2 representado na Tabela 1.1 e na Figura 1.8 (MYERS, 2003; LI, 2003).

Tabela 1.1 – Planejamento fatorial completo 2^2 com o total de ensaios e os fatores X_1 e X_2 codificados em níveis +1 e -1.

Ensaio	X_1	X_2
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1

Figura 1.8 – Esquema gráfico de um planejamento fatorial completo 2^2 (MYERS, 2003).

Se o número de fatores utilizados em um planejamento fatorial completo se torna numeroso ainda que ele seja de dois níveis, o número de ensaios resultantes do estudo pode se tornar razoavelmente grande. Por exemplo, um planejamento fatorial completo 2^5 perfaz um total de 32 ensaios. Uma maneira de evitar este problema é realizar apenas uma fração específica do planejamento fatorial completo e o planejamento passa a denominar-se planejamento fatorial fracionário. Assim, pode ser realizada uma meia fração ou um quarto de fração. Exemplificando, a meia fração do planejamento 2^5 é representada 2^{5-1} perfazendo metade do total de ensaios, ou seja, 16 ensaios (MYERS, 2003; LI, 2003).

Define-se um planejamento fatorial fracionário como um experimento em que apenas uma fração das combinações de um planejamento fatorial completo é selecionada de maneira adequada. Diversas estratégias garantem a seleção adequada dos ensaios. Em um exemplo simples, primeiramente, denota-se que $2^{3-1} = 2^2$. A partir do planejamento fatorial completo 2^2 , apresentado na Tabela 1.1, inicia-se a construção do planejamento fatorial fracionário. Apesar de este planejamento ter o número de ensaios do 2^{3-1} , 4 ensaios, ele não possui a coluna do terceiro fator X_3 . Esta coluna é construída multiplicando-se os sinais de X_1 pelos de X_2 para obter $X_1 * X_2 = X_3$. Desta forma, obtém-se o planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} (Tabela 1.2). Desta forma, planejamentos fatoriais fracionários maiores podem ser construídos multiplicando os sinais das colunas do planejamento fatorial completo (NIST/ SEMATECH, 2011).

Tabela 1.2 – Planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} .

Ensaio	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	+1
2	-1	+1	-1
3	+1	-1	-1
4	+1	+1	+1

Entretanto, o planejamento fatorial fracionário não fornece estimativas dos efeitos tão precisas quanto um planejamento fatorial completo. Além disso, o planejamento fatorial fracionário impossibilita obter a estimativa de interação de X_1 e X_2 sem que esteja relacionada à estimativa do fator principal de X_3 (BARROS-NETO, SCARMINIO e BURNS, 1996; NIST/ SEMATECH, 2011).

1.7.1. Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

A metodologia superfície de resposta (MSR) compreende um grupo de técnicas estatísticas para explorar e construir modelos matemáticos. Através de um planejamento cuidadoso e análise dos resultados, o MSR permite relacionar a resposta obtida e os fatores estudados que a afeta. A MSR permite calcular a resposta em níveis intermediários que não foram realizados experimentalmente e direcionar para o objetivo desejado aumentando ou diminuindo a resposta. Além disso, a MSR permite que seja estimada a interação e até mesmo os efeitos quadráticos dos fatores possibilitando saber o formato da superfície da resposta estudada. É utilizada com objetivo de encontrar condições ótimas ou melhorar as condições já utilizadas, apontar problemas ou pontos fracos no processo, melhorar a robustez de produto ou processo em relação a influências externas ou não controláveis (MUTHUKUMAR, MOHAN e RAJENDRAN, 2003).

Visto que a MSR é capaz de detectar efeitos quadráticos torna-se interessante que o planejamento utilizado possibilite verificar a curvatura da região experimental fornecendo modelos quadráticos ou de segunda ordem. Tais experimentos devem ser de três níveis, 3^X ou mais já que os planejamentos de dois níveis fornecem modelos lineares ou de primeira ordem. Na Figura 1.9, está representada a curvatura dos modelos linear e quadrático.

Figura 1.9 – (A) modelo linear, (B) modelo quadrático. (NIST/ SEMATECH, 2011).

Por isso, há alguns planejamentos que são mais utilizados para estudar a MSR e entre eles encontra-se o planejamento Box-Behnken. Este planejamento possui características estatísticas desejáveis com apenas uma fração do total de ensaios requeridos em um planejamento fatorial completo de três níveis. Os níveis de seus fatores se encontram no meio das arestas e no centro quando se observa sua representação gráfica sendo que a geometria deste planejamento sugere o formato de uma esfera dentro da região experimental (Figura 1.10) (NIST/ SEMATECH, 2011; MYERS, 2003).

Figura 1.10 – Esquema gráfico do planejamento Box-Behnken com três variáveis e ponto central (MYERS, 2003).

1.7.2. Inclinação Ascendente (Descendente)

Freqüentemente, as condições iniciais dos experimentos se encontram afastadas da região onde a resposta é ótima devido ao pouco conhecimento do processo ou de quanto os fatores irão influenciar na resposta. Em tais condições, torna-se necessário direcionar o experimento para a região ótima utilizando um procedimento experimental, simples, rápido,

econômico e eficiente (NIST/ SEMATECH, 2011; PORTAL ACTION, 2011; MYERS, 2003).

Se o objetivo é obter a região ótima onde se observa a máxima resposta desejada, o método de inclinação ascendente pode ser aplicado, assim como se o objetivo é obter a região ótima onde se observa a mínima resposta desejada, o método da inclinação descendente pode ser aplicado (NIST/ SEMATECH, 2011; MYERS, 2003).

Para tanto, é comum assumir um modelo de primeira ordem (Equação 1.1) como aproximação da superfície da resposta aos fatores estudados. Assim, a inclinação é proporcional à grandeza dos coeficientes de regressão do modelo de primeira ordem e o sinal dos coeficientes estabelece a direção. Além disso, a direção da inclinação é determinada conforme o objetivo experimental, assim como a distância experimental do próximo ponto e do ponto inicial. Devem ser realizados experimentos em direção à resposta objetivada até que não haja mais progresso na resposta. Eventualmente, o experimento pode estar na região ótima. Há relatos na literatura de que é esperado que até dois experimentos de inclinação sejam suficientes (NIST/ SEMATECH, 2011; MYERS, 2003).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 \quad (1.1)$$

Para encontrar a inclinação (Δ), utilizam-se os coeficientes de regressão do modelo de primeira ordem (Equação 1.2). A inclinação (Δ) correlaciona os fatores X_1 e X_2 . Assim, quando $\Delta X_1=1$, $\Delta X_2=\beta_2/\beta_1$.

$$\Delta = \frac{\beta_2}{\beta_1} \quad (1.2)$$

Tabela 1.3 – Relação entre os fatores X_1 e X_2 no método de inclinação.

	Fatores codificados	
	X_1	X_2
Origem	0	0
Δ	1	β_2/β_1
Origem + Δ	1	β_2/β_1
Origem + 2Δ	2	$2 \beta_2/\beta_1$

1.7.3. Função Desejabilidade

A função desejabilidade é um dos métodos mais utilizados para otimizar experimentos multivariáveis. Este método permite encontrar condições que fornecem a resposta mais desejada a qual é a combinação de múltiplas respostas dentro de limites previamente estabelecidos evitando que alguma delas fique fora dos limites. Basicamente, a função desejabilidade permite transformar múltiplos problemas em um único utilizando-se de equações matemáticas (NIST/ SEMATECH, 2011).

Para utilizar a função desejabilidade é necessário estimar a relação das respostas em função dos fatores estudados. Esta estimativa é realizada por planejamentos experimentais e a aplicação de MSR, que fornece a equação de ajuste que representa a superfície, como por exemplo, no formato da Equação 1.3.

$$Y_i = f(X_1, X_2, X_3, \dots, X_n) \quad (1.3)$$

Derringer and Suich (1980) propuseram um dos mais conhecidos métodos de função desejabilidade onde se obtém uma desejabilidade global utilizando a média geométrica das respostas normalizadas, conforme demonstrado na Equação 1.4.

$$d_i(Y_i) = (d_1 \cdot d_2 \cdot d_3 \dots d_n)^{1/n} \quad (1.4)$$

onde n é o numero de respostas.

Ainda, para refletir a possível diferença de importância de cada resposta, a qual é estabelecida pelo pesquisador, atribuem-se pesos relativos para cada resposta variando-se de 0 para a menor importância até 1 para a máxima importância, conforme representado na Equação 1.5.

$$d_i(Y)_i = \begin{cases} 0 < w_i < 1 \\ w_1 + w_2 + w_3 + \dots + w_n = 1 \end{cases} \quad (1.5)$$

Variando-se a importância (w) de cada resposta, os valores dos fatores que fornecem a melhor resposta global, ou seja, maior desejabilidade, podem ser alterados.

Sabendo-se que o objetivo é a resposta maximizada ($\hat{Y}_i$), o valor de $d_i(Y_i)$ fica próximo de 1 quanto mais as respostas ficam otimizadas e se alguma das respostas estiver fora da faixa desejável, toda a função terá valor zero. Ou seja, se $d_i(Y_i)$ resultar em um valor otimizado ou maior que o valor mais alto estabelecido (A_i) não apresentará diferença na otimização, mas se $d_i(Y_i)$ resultar em um valor indesejável, menor que o valor mais baixo estabelecido (B_i), então terá valor zero (LIU e TANG, 2010).

$$d_i(Y_i) = \left[\frac{\hat{Y}_i - B_i}{A_i - B_i} \right]^w \begin{cases} \hat{Y}_i \leq B_i \\ B_i < \hat{Y}_i < A_i \\ \hat{Y}_i \geq A_i \end{cases} \quad (1.6)$$

1.8. Secagem em *Spray Dryer*

A técnica de secagem em *spray dryer*, também conhecida como secagem por aspersão, nebulização ou atomização, apesar de bem estabelecida, ainda é inovadora quando se trata de obter partículas cada vez mais sofisticadas. É amplamente utilizada em processos produtivos de diversas áreas entre elas alimentícia, química, de fertilizantes, produtos cerâmicos, de polímeros e farmacêutica (VEHRING; FOSS e LECHUGA-BALLESTEROS, 2007; WANG e LANGRISH, 2009).

Atualmente, estima-se que há mais que 15000 equipamentos de *spray dryer* de tamanho industrial em operação ao redor do mundo e aproximadamente o dobro de equipamentos em escala piloto e laboratorial (WANG e LANGRISH, 2009).

Na indústria farmacêutica, o *spray dryer* é muito utilizado para preparar pós que apresentam estabilidade físico-química e boas características morfológicas, propriedades de vazão e de dispersibilidade. Por isso, é utilizado para produzir vários tipos de formas farmacêuticas principalmente aerossóis administrados via pulmonar que devem apresentar propriedades aerodinâmicas adequadas (VEHRING; FOSS e LECHUGA-BALLESTEROS, 2007).

Além disto, o *spray dryer* é o principal equipamento para a secagem de materiais termossensíveis, como alimentos e materiais de origem biológica entre eles extratos e

produtos oriundos de plantas. Outro campo onde a secagem em *spray dryer* tem adquirido destaque recentemente é na microencapsulação de substâncias (FREITAS *et al.*, 2010).

A técnica de *spray dryer* consiste em bombear a amostra para dentro da câmara de secagem onde será aspergida, nebulizada em gotículas. Dentro da câmara, as gotículas formadas entram em contato com ar quente e seco o qual é capaz de absorver toda a umidade das gotículas dando origem ao pó que é arrastado da câmara para o sistema coletor. A secagem das gotículas ocorre rapidamente devido à sua grande superfície de contato com o ar quente e seco, ocorrendo em poucos minutos impedindo que amostra atinja temperatura maior que a temperatura de saída (OLIVEIRA e PETROVICK, 2010).

Apesar de simples, a secagem por *spray dryer* é influenciada por diversas variáveis que afetam diretamente a qualidade do produto obtido e do processo. As variáveis devem ser estudadas e controladas a fim de obter boas características tanto do produto quanto do processo. As variáveis existentes podem estar relacionadas ao produto de entrada como viscosidade, tensão superficial, presença ou não de excipiente e seu tipo, concentração da amostra, o tipo de solvente da amostra. Além disso, existem as variáveis do equipamento que podem influenciar tanto a qualidade do produto final quanto a qualidade do processo como a temperatura de saída e de entrada, o vazão da amostra que entra na câmara de secagem, a pressão de atomização, o tipo de bico atomizador, a vazão do gás de secagem (LIST e SCHMIDT, 1989; OLIVEIRA e PETROVICK, 2010).

O uso de excipientes na secagem por *spray dryer* é uma prática muito comum podendo ser utilizados excipientes com características diversas como amidos, açúcares como maltodextrina e lactose, polióis como sorbitol e manitol, celulose, dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcico, gelatina, gomas, entre muitos outros (OLIVEIRA e PETROVICK, 2010; ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

Para a secagem de extratos derivados de plantas, a seleção e o uso adequado de adjuvantes no processo de *spray drying* é uma fase de fundamental importância, visto que determina a estabilidade e a qualidade dos mesmos, podendo inclusive afetar as características de biodisponibilidade (OLIVEIRA e PETROVICK, 2010).

A seguir, as características dos excipientes utilizados neste trabalho serão brevemente lembradas de acordo com *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

O manitol, nome químico D-manitol, é um álcool hexahídrico ou poliol, isômero do sorbitol. É um pó branco, sem cheiro, não higroscópico, podendo apresentar-se na forma cristalina ou grânulos com bom fluxo. É bastante usado em formulações farmacêuticas para diversos fins

entre eles como diluente em formulações para compressões diretas ou granulações úmidas, para obtenção de pós para administração via pulmonar, para liberação controlada, entre outros. Sua solubilidade em temperatura de 20°C é de 1 parte em 5,5 de água e 1 parte em 83 de etanol 95% (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006). Há estudos na literatura que avaliaram o polimorfismo cristalino do manitol e as condições de secagem que o influenciaram (MAAS *et al.*, 2011), assim como a influencia da umidade na transição de polimorfismo (YOSHINARI *et al.*, 2003).

O isômero do manitol, o sorbitol também é um álcool hexahídrico ou poliól, de cor branca, sem cheiro e cristalino. Entretanto, é higroscópico. Há relatado quatro polimorfos cristalinos do sorbitol e uma forma amorfa o que acarreta uma variação no seu ponto de fusão. É bastante utilizado tanto na em formulações farmacêuticas como cosméticas e alimentícias. Sua solubilidade em temperatura de 20°C é de 1 parte em 0,5 de água e 1 parte em 25 de etanol 95% (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

Figura 1.11 – Estruturas moleculares do manitol e sorbitol.

A lactose é classificada como um dissacarídeo natural do leite formado pelos monossacarídeos glicose e galactose e pode apresentar-se como partículas cristalinas ou como pó branco. No estado sólido, a lactose monohidratada apresenta-se em diversas formas isoméricas dependendo da cristalização e das condições de secagem como, por exemplo, α -lactose monohidratada, β -lactose anidra e α -lactose anidra. Uma parte de lactose é solúvel em 5,24 partes de água a 20°C. É utilizada como agente ligante e diluente na compressão direta para obtenção de comprimidos ou na encapsulação e liofilização (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

Figura 1.12 – Estrutura molecular da lactose monohidratada (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

Outro açúcar utilizado neste trabalho foi a maltodextrina que é um polímero de glicose com pesos moleculares variados obtido a partir da hidrólise do amido. Dependendo de onde ocorreu a hidrólise do amido a maltodextrina contém certo valor de dextrose equivalente (DE) que é o seu poder redutor expresso em gramas de glicose por 100 g de maltodextrina. Pode apresentar peso molecular de 900 a 9000 g/mol. A solubilidade, higroscopicidade, sabor doce e compressibilidade da maltodextrina aumentam com o aumento da DE. Também é utilizado como diluente ou ligante em comprimidos e cápsulas (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

Figura 1.13 – Estrutura molecular da unidade de maltodextrina (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

Apesar da maltodextrina ser originada do amido, pouco ou nada tem de suas características. O amido apresenta em sua estrutura a amilose e a amilopectina que são polissacarídeos de α -glicose com peso molecular variando de 50000 a 160000 g/mol. É um pó branco inodoro e insípido com grânulos pequenos com formato ovóide ou esférico dependente da origem botânica, assim como o tamanho dos grânulos. É comumente utilizado como ligante, desintegrante ou diluente em formulações sólidas orais (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

O Capsul® é um amido de milho modificado. O amido é geralmente modificado para evitar suas características não desejáveis como géis coesivos e “aguados”, propriedades de vazão ruins, decomposição e resistência térmica, entre outras. Assim a modificação é feita por derivatização como eterificação, esterificação, reticulação, decomposição através de hidrólise enzimática ou ácida ou de oxidação, ou por tratamento físico por temperatura ou umidade. As modificações químicas estão relacionadas com a introdução de um grupo químico na molécula do amido resultando, muitas vezes, em mudanças notáveis em suas propriedades físico-químicas (SINGH, KAUR e MCCARTHY, 2007)

Figura 1.14 – Estrutura molecular da amilose e amilopectina do amido (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

A celulose microcristalina é obtida da despolimerização da celulose e é um pó branco cristalino, inodoro e insípido de partículas porosas. Há no mercado celulose microcristalina com diferentes tamanhos de partículas e umidade que apresentam diferentes propriedades e aplicações. Também muito utilizado como ligante, diluente, desintegrante ou lubrificante em formulações sólidas orais (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

Figura 1.15 – Estrutura molecular da celulose microcristalina (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

O dióxido de silício coloidal foi o único excipiente inorgânico utilizado. Por isso, ele apresenta propriedades físicas bastante diferentes. É um pó fino, bastante adsorvente e

possui área de superfície específica na ordem de 100 vezes maior que os outros excipientes utilizados. Por isso, apresenta baixa densidade aparente e boas características de vazão sendo amplamente utilizado em pós para melhorar o processo de compressão e encapsulação. É um excipiente muito utilizado em estudos para secagem por *spray dryer* de extratos vegetais (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

Este excipiente é seguro quando utilizado em produtos farmacêuticos de via oral ou tópica. Entretanto, injeções intraperitoneais e subcutâneas podem produzir reações locais e/ou granulomas. Além disso, é necessário tomar precauções ao manipulá-lo, pois sua inalação pode causar irritação do trato respiratório (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

Figura 1.16 – Estrutura molecular do dióxido de silício coloidal (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo estudar e otimizar o processo de extração por maceração dinâmica a partir das folhas de *C. langsdorffii* assim como o processo de secagem em *spray dryer*.

Para tanto, as seguintes metas foram estabelecidas:

- investigar os fatores do processo de extração por maceração dinâmica a partir das folhas de *C. langsdorffii*;
- otimizar o processo de extração para obter altos teores de sólidos solúveis, flavonóides totais e dos marcadores químicos, quercetrina e afzelina;
- estudar diversos excipientes como adjuvantes de secagem dos extratos em *spray dryer*;
- investigar os fatores do processo de secagem em *spray dryer*;
- avaliar as características físicas, físico-químicas e farmacotécnicas dos extratos secos por *spray dryer*;
- desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE para a quantificação dos marcadores químicos, quercetrina e afzelina tanto nos extratos líquidos quanto nos extratos secos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Droga Vegetal

3.1.1. Obtenção

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizadas folhas da planta *C. langsdorffii* coletadas na Universidade de São Paulo (USP) no *campus* de Ribeirão Preto – SP no período da tarde no mês de setembro. Uma exsicata deste espécime foi registrada no herbário da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP) pelo coletor S. P. Teixeira nº36 & G. D. Pedersoli sob número 12083 e a identificação botânica foi realizada pela Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP). O material vegetal foi limpo, seco em ambiente ventilado a sombra com temperatura de $30 \pm 5^\circ \text{C}$, moído em moinho de facas e armazenado em saco plástico hermeticamente fechado até utilização.

3.1.2. Caracterização

A amostra de material vegetal foi caracterizada, conforme a Farmacopéia Brasileira (2010), quanto: umidade, determinação de cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido clorídrico e substâncias extraíveis por álcool. Além disso, a distribuição granulométrica das folhas secas e moídas foi avaliada através de jogo de tamises (ANSEL *et al.*, 2000). As análises foram realizadas em triplicata.

3.2. Extração

3.2.1. Procedimento

O método de extração utilizado foi maceração dinâmica (LIST e SCHMIDT, 1989). A massa de planta foi adicionada ao solvente em erlenmeyer devidamente tampado com tampa esmerilhada. O contato da massa de planta com o solvente ocorreu por tempo pré-determinado, com temperatura controlada e sob agitação magnética. Ao final deste tempo, separou-se o residual de planta do extrato com auxílio de algodão e papel de filtro até obter o volume de 100 mL de extrato.

Utilizaram-se variadas quantidades de massa de planta que foram definidas conforme foram sendo obtidos os resultados dos planejamentos experimentais. Os solventes selecionados para a extração foram etanol e água ou a mistura deles em diferentes proporções.

Para determinar o volume de solvente adicionado à massa de planta para obter o volume de 100 mL de extrato, foram realizados testes preliminares com cada quantidade de massa de planta utilizada. Desta forma, verificou-se qual a quantidade de solvente se adsorvia à massa de planta e, assim, determinou-se a quantidade de solvente a se adicionar na extração.

3.2.2. Planejamentos Experimentais

Ao longo do estudo de extração, diversos planejamentos experimentais foram utilizados de acordo com o objetivo de extrair o máximo de sólidos solúveis, flavonóides totais e dos marcadores químicos selecionados: quercetrina e afzelina.

Executou-se o planejamento mostrado na Tabela 3.2 e avaliaram-se as respostas (Y_i): sólidos solúveis, rendimento de sólidos solúveis, flavonóides totais e teor dos marcadores quercetrina e afzelina. Mais especificamente, o planejamento fatorial fracionário selecionado foi 2^{5-2} perfazendo um total de 8 experimentos (BARROS NETO, SCARMINIO e BURNS, 1996). Os níveis utilizados no planejamento foram alto (+1) e baixo (-1) (Tabela 3.1). Para a construção da coluna de sinais para o fator temperatura de extração multiplicou-se os sinais dos fatores Mp, EA e t ($X_1 * X_2 * X_3$) e para a velocidade de agitação multiplicou-se os fatores Mp e EA ($X_1 * X_2$) (Tabela 3.2).

Tabela 3.1 – Denominação codificada e não codificada dos fatores estudados no planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} e seus níveis alto +1 e baixo -1.

Fatores	Denominação		Níveis	
	Codificados	Não Codificados	+1	-1
Massa de planta (g)	X_1	Mp	20	4
Proporção etanol/ água	X_2	EA	70: 30	0: 100
Tempo de extração (h)	X_3	t	6	1
Temperatura de extração (°C)	X_4	T	50	25
Velocidade de agitação (rpm)	X_5	v	600	300

Tabela 3.2 – Planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} com fatores codificados. X_1 = massa planta (Mp), X_2 = proporção etanol/ água (EA), X_3 = tempo de agitação (v), X_4 =temperatura de extração (T) e X_5 = velocidade de agitação (v).

Ensaio	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	+1	-1
3	-1	+1	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1
8	+1	+1	+1	+1	+1

A estimativa dos efeitos (ef) para cada fator em um planejamento fatorial fracionário com n ensaios e y_i respostas foi calculada através da Equação 3.1. Esta equação permitiu comparar a intensidade dos efeitos para cada fator estudado.

$$ef = \frac{\sum_{i=1}^n Y_i(+) - \sum_{i=1}^n Y_i(-)}{n/2} \quad (3.1)$$

Após selecionar os fatores que mais influenciaram na extração, o planejamento Box-Behnken (Tabela 3.4) foi selecionado a fim de avaliar a extração de sólidos solúveis, rendimento de sólidos solúveis, flavonóides totais e os marcadores quercetrina e afzelina das folhas de *C. langsdorffii*. O planejamento experimental e a análise dos resultados foram realizados utilizando-se o *Software Statistica 5*.

Assim, os níveis utilizados para a codificação dos fatores encontram-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Fatores estudados no planejamento Box-Behnken e seus níveis +1, 0 e -1.

Fatores	Denominação		Níveis		
	Codificados	Não codificados	-1	0	+1
Massa de planta (g)	X ₁	Mp	4	12	20
Proporção etanol/ água	X ₂	EA	30: 70	50: 50	70: 30
Velocidade de agitação (rpm)	X ₅	v	200	400	600

Tabela 3.4 – Planejamento Box-Behnken, com fatores codificados. X₁= massa planta (Mp), X₂= proporção etanol/água (EA) e X₅= velocidade de agitação (v).

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Os fatores estudados foram codificados de acordo com as Equações 3.2, 3.3 e 3.4.

$$X_1 = \frac{Mp - 12}{8} \quad (3.2)$$

$$X_2 = \frac{EA - 50}{20} \quad (3.3)$$

$$X_5 = \frac{v - 400}{200} \quad (3.4)$$

Para um planejamento envolvendo três fatores a equação tem a forma da Equação 3.5, onde Y é a resposta; X_i são os fatores estudados que influenciam a resposta Y ; β_0 é a constante; β_i é o coeficiente linear; β_{ii} é o coeficiente quadrático e β_{ij} ($i \neq j$) é a interação linear entre X_i e X_j .

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 \quad (3.5)$$

Devido à finalidade de extrair o máximo de flavonóides totais e os marcadores químicos: quercetrina e afzelina e conhecendo, através do Box-Behnken, a resposta obtida na região estudada, o método de inclinação ascendente foi selecionado para ser realizado em seguida possibilitando direcionar o estudo para a região de máxima resposta.

A inclinação ascendente é calculada através da relação entre os coeficientes de regressão linear da resposta estudada. Assim, ele é calculado como na Equação 3.6.

$$\Delta = \frac{\beta_2}{\beta_1} \quad (3.6)$$

Os coeficientes utilizados foram os lineares dos fatores: massa de planta e proporção etanol/ água.

Após encontrar a região de máxima extração dos flavonóides totais e dos marcadores químicos quercetrina e afzelina, foi realizado outro planejamento nesta região para

confirmação. O planejamento utilizado foi fatorial completo 3^2 que fez nove experimentos (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 – Planejamento Fatorial Completo 3^2 , com fatores codificados. X_1 = massa planta (Mp) e X_2 = proporção etanol/água (EA).

Ensaio	X_1	X_2
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	+1
4	+1	-1
5	+1	0
6	+1	+1
7	0	+1
8	0	-1
9	0	0

As relações utilizadas para a codificação dos fatores encontram-se nas Equações 3.7 e 3.8 e seus níveis na Tabela 3.6.

$$X_1 = \frac{Mp - 34}{9} \quad (3.7)$$

$$X_2 = \frac{EA - 83}{13} \quad (3.8)$$

Tabela 3.6 – Fatores estudados no Planejamento Fatorial Completo 3^2 e seus níveis +1, 0 e -1.

Fatores	Denominação		Níveis		
	Codificados	Não codificados	-1	0	+1
Massa de planta	X_1	Mp	25 g	34 g	43 g
Proporção etanol/ água	X_2	EA	70: 30	83: 17	96: 4

3.2.3. Caracterização Físico-Química dos Extratos Líquidos

Os extratos líquidos obtidos foram analisados físico-quimicamente por densidade (picnometria) e sólidos solúveis (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010), rendimento de sólidos solúveis (LIST e SCHMIDT, 1989), quantificação de flavonóides totais (COSTA *et al.*, 2010; DOWD, 1959) e quantificação de quercetrina e afzelina por CLAE.

3.2.3.1. *Rendimento de Sólidos Solúveis*

Para obter o valor de rendimento de sólidos solúveis utilizou-se a Equação 3.9 (LIST e SCHMIDT, 1989) onde θ_{ss} é o rendimento de sólidos solúveis; SS é o valor encontrado na análise de sólidos solúveis; vol é o volume obtido de extrato e Mp é a massa de planta utilizada.

$$\theta_{ss} = \frac{SS \times vol \times 100}{Mp} \quad (3.9)$$

3.2.3.2. *Quantificação de Flavonóides Totais*

O grupo de marcadores químicos quantificados foram flavonóides totais já que o estudo realizado por Sousa (2011) demonstrou que os compostos químicos majoritários identificados nos extratos hidroalcoólicos da folha de *C. langsdorffii* pertencem a este grupo. Para a quantificação de flavonóides totais, utilizou-se o método de complexação com cloreto de alumínio 2% em metanol. A quercetina (Sigma, lote 109H0882) foi utilizada como padrão de referência. As amostras foram diluídas em metanol para se obter concentração reacional de 8 µg/mL e analisadas por espectrofotômetro UV mini-1240 da Shimadzu em comprimento de 425 nm (COSTA *et al.*, 2010; DOWD, 1959). As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.3.3. *Quantificação de Quercetrina e Afzelina por CLAE*

Os marcadores químicos selecionados para o estudo da extração e secagem a partir das folhas de *C. langsdorffii* foram quercetrina (quercetin-3-O-ramnosídeo) (ChromaDex, lote 00017171-016) e afzelina (canferol-3-O-ramnosídeo) isolado e identificado no laboratório de farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP (NOGUEIRA, 2011; SOUSA, 2011).

As análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu (LC-20AT) com detector de arranjo de diodos (SPC-M20A) operando em 254 nm. Foi utilizada coluna de fase reversa da marca Shimadzu (Shim-Pack CLC-ODS (M) 4,6 mm x 250 mm, diâmetro de partícula de 5 µm, e diâmetro do poro de 100 Å). A fase móvel consistiu de metanol e solução aquosa acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) pH 2,5 operando com vazão de 0,8 mL/min de acordo com o gradiente a seguir (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 – Gradiente de eluição da fase móvel (%) no método cromatográfico.

Tempo (min)	Metanol (%)	Água Acidificada (%)
0	20	80
35	30	70
45	45	55
60	45	55
65	90	10
71	90	10
77	20	80

3.2.4. Validação do Método Cromatográfico

O método foi validado para a quercetrina contemplando os parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez. Devido à disponibilidade do padrão de afzelina não ser suficiente e devido a ambos marcadores químicos serem flavonóis glicosilados e possivelmente apresentarem características semelhantes, assim como comportamentos semelhantes na amostra, não foram contemplados os parâmetros de validação do método para a afzelina de exatidão (recuperação) e limite de detecção e quantificação.

3.2.4.1. Preparo das Amostras

Para o preparo das amostras, tanto os extratos líquidos quanto os secos foram pesados em balões volumétricos de 10 mL e dissolvidos em metanol com o auxílio de banho de ultrassom. Adicionou-se 50 μL de solução de cumarina 4000 $\mu\text{g/mL}$ como padrão interno. As soluções foram filtradas em filtro 0,45 μm para as análises. A quantidade a ser pesada dos extratos, correspondente ao ponto central da curva analítica, foi calculada visando obter próximo de 30 $\mu\text{g/mL}$ de quercetrina no balão volumétrico. Assim, a quantidade dos extratos líquidos adicionada ao balão volumétrico variou de 0,1 a 2,5 g e dos extratos secos foi aproximadamente de 15 mg.

3.2.4.2. Seletividade

Para avaliar a seletividade do método cromatográfico, os perfis cromatográficos das matrizes livres de qualquer adição de extrato – solução hidroalcoólica dos extratos líquidos e manitol dos extratos secos – e dos padrões quercetrina ou afzelina foram comparados para avaliar se nenhum interferente eluia no tempo de retenção destas substâncias e que seus picos estavam bem separados dos demais compostos presentes nas amostras. Além disso, a

comparação entre os espectros de UV dos picos de interesse foi realizada para os padrões e para as amostras (RIBANI *et al.*, 2004; SOUSA, 2011).

3.2.4.3. Linearidade e Curva Analítica

Para a quercetrina, foi elaborada a curva analítica com as concentrações de 10, 30, 50, 70 e 90 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3.8) sendo cada uma delas feita em triplicata a partir de três soluções-mãe de quercetrina na concentração de 1 mg/mL e com diluições a partir destas utilizando pipeta automática de 100 μL . Utilizou-se uma solução de cumarina (400 $\mu\text{g/mL}$) como padrão interno (PI).

Tabela 3.8 – Volumes utilizados para a construção da curva analítica de quercetrina.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Volume (μL)			
	Solução-mãe	PI	Metanol	Final
10	10	50	940	1000
30	30	50	920	1000
50	50	50	900	1000
70	70	50	880	1000
90	90	50	860	1000

Para a afzelina, foi elaborada a curva analítica com as concentrações de 5, 15, 25, 35 e 45 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3.9) sendo cada uma delas feita em triplicata a partir de três soluções-mãe de afzelina (0,5 mg/mL) e com diluições a partir destas utilizando pipeta automática de 100 μL . Utilizou-se uma solução de cumarina (400 $\mu\text{g/mL}$) como padrão interno (PI).

Tabela 3.9 – Volumes utilizados para a construção da curva analítica de quercetrina.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Volume (μL)			
	Solução-mãe	PI	Metanol	Final
5	10	50	940	1000
15	30	50	920	1000
25	50	50	900	1000
35	70	50	880	1000
45	90	50	860	1000

As análises estatísticas dos dados foram obtidas pelo método de regressão linear expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$, onde y corresponde à área do pico, x corresponde à concentração ($\mu\text{g/mL}$), a corresponde ao coeficiente angular e b ao coeficiente linear. O coeficiente de correlação R^2 também foi calculado (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003).

3.2.4.4. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Há diferentes maneiras de se obter os limites de detecção e de quantificação, mas o método baseado em parâmetros da curva analítica é o mais adequado por ser estatisticamente mais confiável (RIBANI *et al.*, 2004; BUENO, 2007; BRASIL, 2003). Para se calcular estes dados uma nova curva analítica foi feita na faixa de concentração próxima ao limite de detecção.

As concentrações 0,5, 1,0 e 1,5 µg/mL foram selecionadas de maneira visual conforme o ruído presente no cromatograma de uma amostra. As diluições foram feitas em triplicata a partir de uma solução-mãe 2 de concentração de 0,1 mg/mL obtida da diluição de 10 vezes da solução-mãe de quercetrina de 1 mg/mL. Três curvas analíticas foram obtidas por regressão linear. Em seguida, obtiveram-se a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear (Sb) e a estimativa do desvio padrão do coeficiente angular (Sa) da curva. O LD foi calculado de acordo com a Equação 3.10 e o LQ foi calculado de acordo com a Equação 3.11 (RIBANI *et al.*, 2004; BUENO, 2007).

$$LD = 3,3 \cdot \frac{Sb}{Sa} \quad (3.10)$$

$$LQ = 10 \cdot \frac{Sb}{Sa} \quad (3.11)$$

3.2.4.5. Precisão

A precisão foi avaliada de duas maneiras: repetibilidade ou precisão intra-ensaio e precisão intermediária ou precisão inter-ensaio (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003).

As amostras utilizadas para avaliar este parâmetro foram o extrato líquido de *C. langsdorffii* do Planejamento Box Behnken ensaio 15 e o extrato seco de *C. langsdorffii* também obtido do Planejamento Box Behnken ensaio 15. A análise dos teores foi realizada tanto para quercetrina quanto para afzelina.

Para a repetibilidade, seis preparações de cada amostra foram injetadas em sequência no mesmo dia (dia 1), pelo mesmo analista sob as mesmas condições instrumentais e cromatográficas. Para análise dos dados e determinação da precisão, calculou-se o coeficiente de variação (CV) entre os teores quantificados no dia 1. Desta forma, o método

cromatográfico foi considerado preciso para a quantificação realizada no mesmo dia e nas mesmas condições de análise se o CV fosse menor que 5%.

Para a precisão intermediária, outras seis preparações da amostra foram injetadas em sequência em outro dia (dia 2), pelo mesmo analista sob as mesmas condições instrumentais e cromatográficas. A variância dos teores do dia 1 e do dia 2 foram então obtidas para que se pudesse realizar a comparação dos resultados empregando-se o teste F. Para tanto, a razão entre a maior variância pela menor variância foi denominada F_{calc} . O valor de F_{calc} foi comparado com o F_{tabelado} com nível de significância (α) de 0,05 (5,05). Se F_{calc} for menor que F_{tabelado} não há diferença estatística entre a quantificação dos teores do dia 1 e do dia 2 nas mesmas condições de análise. Assim, pode-se avaliar se o método cromatográfico foi preciso para ensaios realizados em dias diferentes (BUENO, 2007; RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003).

3.2.4.6. Exatidão

A exatidão do método foi realizada enriquecendo-se as amostras – extrato líquido e extrato seco de *C. langsdorffii* - com o padrão de quercetrina em três diferentes concentrações (80, 100 e 120%) e avaliando-se sua recuperação dentro da faixa estudada. Para ambos os extratos, a recuperação foi calculada para o padrão através da razão entre sua concentração experimental e sua concentração teórica em porcentagem (RIBANI *et al.*, 2004; BUENO, 2007; BRASIL, 2003).

3.2.4.7. Robustez

Para avaliar a robustez do método utilizou-se a amostra de extrato líquido de *C. langsdorffii*. Os fatores selecionados para avaliação foram o conteúdo de metanol na fase móvel, o pH da água acidificada da fase móvel e a temperatura da coluna (Tabela 3.10). Com o objetivo de avaliar estes fatores, foi utilizado um planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} (Tabela 3.11).

Tabela 3.10 – Fatores selecionados para a avaliação da robustez e seus valores.

Fatores	Níveis	
	(-1)	(+1)
Conteúdo de metanol na fase móvel	2% a menos	2% a mais
pH da água da fase móvel	2,3	2,7
Temperatura da coluna	35°C	45°C

Tabela 3.11 – Planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} utilizado para avaliar a robustez do método cromatográfico.

Ensaio	Temperatura da coluna	pH da água da fase móvel	Conteúdo de metanol na fase móvel
1	-1	+1	-1
2	+1	+1	+1
3	-1	-1	+1
4	+1	-1	-1

As respostas avaliadas foram o tempo de retenção da quercetrina e da afzelina e o valor da razão entre as áreas de quercetrina ou afzelina e o padrão interno. As respostas foram analisadas pelo *software* Minitab 14.0 com nível de significância (α) de 0,05.

3.3. Secagem em *Spray Dryer*

3.3.1. Equipamento

Os extratos secos foram obtidos por secagem em *spray dryer* de escala laboratorial modelo LM MSD 0.5 (Labmaq do Brasil Ltda., Brasil) em regime de vazãoconcorrente. A câmara de secagem era cilíndrica feita de material de vidro de borosilicato medindo 130 mm de diâmetro e 510 mm de altura. As condições de secagem estudadas no Planejamento Box-Benken foram a temperatura de saída (Ts) e a vazão da amostra (Ws). No teste preliminar, a Ts utilizada foi de 80°C e a Ws foi de 5,0 g/min. O bico atomizador foi duplo fluido pneumático com orifício de abertura de 1,2 mm que operou com taxa de vazão de ar de 40 L/min e pressão de 5,0 bar. A vazão do gás de secagem foi de 0,6 m³/min. As condições de secagem estudadas foram selecionadas dentro do limite de inflamabilidade da mistura ar- etanol (BERTHOLD e LOFFLER, 1993). O extrato seco foi coletado em frasco seco e tarado e, em seguida, armazenado em frascos hermeticamente fechados contendo sílica.

Figura 3.1 – Fotografia do LM MSD 0.5 (Labmaq do Brasil Ltda., Brasil) e seus sistemas principais: 1) chave geral 2) controle do aquecimento; 3) controle de bombeamento de líquido; 4) câmara de secagem 5) separador de pó 6) indicador de temperatura de saída e 7) frasco coletor (LABMAQ, 2003).

3.3.2. Extratos Líquidos Utilizados para Secagem

O extrato líquido utilizado na secagem foi um extrato 1:5 (massa planta: volume de extrato) obtido por 72h de maceração seguida de percolação com solução hidroalcoólica a 70°GL. Este extrato foi denominado Extrato Líquido de *C. lagnsdorffii* 2,5% m/m. Para obter os extratos com maior valor de sólidos solúveis (12,5% m/m e 22,5% m/m) o extrato 2,5% m/m foi concentrado em rotoevaporador (Fisatom modelo 550) sob pressão reduzida de -700 mmHg e temperatura de 55°C até obter a concentração teórica de sólidos solúveis desejada. Os Extratos Líquidos obtidos (2,5; 12,5 e 22,5% m/m) foram caracterizados quanto à aos teores de sólidos solúveis, flavonóides totais, quercetrina e afzelina.

3.3.3. Experimento Preliminar e Excipientes Estudados

Inicialmente, foi realizado um estudo preliminar obtendo extrato seco de *C. langsdorffii* com diferentes excipientes tendo por finalidade comparar estes extratos e selecionar o excipiente que fornecesse as melhores características físicas.

A proporção de sólidos de *C. langsdorffii*: excipiente foi de 3:1 e foi mantida constante.

Os excipientes utilizados, seu fabricante ou fornecedor e o respectivo lote estão descritos na Tabela 3.12.

Tabela 3.12 – Lista dos excipientes utilizados no teste preliminar, seu fabricante ou fornecedor e o respectivo lote.

Excipiente		Fabricante ou Fornecedor	Lote
Nome químico	Nome Comercial		
Maltodextrina	Maltodextrina Mor-Rex 1920	Corn Products	0000361377
Dióxido de silício coloidal	Cabosil M-5	Makeni	1232691
Amido	Amido	Corn Products	0000394168
D-manitol	Manitol (oral)	Henrifarma	H360912012
Lactose monohidratada	Lactose M-200 (alimentício)	Henrifarma	13651
Sorbitol	Sorbitol pó	Cosmoquímica	45229
Celulose microcristalina	Celulose Microcristalina	Henrifarma	C1004047
Amido de milho modificado	Capsul	National Starch	HKY- 0840

3.3.4. Planejamento Experimental

O planejamento experimental utilizado para estudar as condições de secagem foi o Planejamento Box-Behnken (Tabela 3.4). As condições selecionadas para estudo foram: temperatura de saída (Ts), a vazão da amostra (Ws) e a concentração do extrato (Cs). Estes fatores foram codificados conforme as equações 3.12, 3.13 e 3.14 e a relação para cada nível encontram-se na Tabela 3.13.

$$X_6 = \frac{T_s - 100}{20} \quad (3.12)$$

$$X_7 = \frac{W_s - 7,5}{2,5} \quad (3.13)$$

$$X_8 = \frac{Cs - 12,5}{10} \quad (3.14)$$

Tabela 3.13 – Fatores estudados no Planejamento Box-Behnken e seus níveis +1, 0 e -1.

Fatores	Denominação		Níveis		
	Codificados	Não codificados	-1	0	+1
Temperatura de saída (°C)	X ₆	Ts	80	100	120
Vazão da amostra (g/min)	X ₇	Ws	5,0	7,5	10,0
Concentração do extrato (% m/m)	X ₈	Cs	2,5	12,5	22,5

3.3.5. Caracterização Físico-Química dos Extratos Secos

Os extratos secos obtidos foram avaliados por perda por dessecação, densidade aparente, compactação através do índice de Carr, fluidez através do ângulo de repouso, diâmetro médio e distribuição granulométrica (tamisação). As análises foram feitas em triplicata.

3.3.5.1. Umidade

A umidade dos extratos secos foi medida por método gravimétrico utilizando-se um equipamento de lâmpada de halogênio (MB 45, Ohaus Co., Pine Brook, NJ) pesando-se 0,5 g dos extratos secos. Para extratos secos por *spray dryer*, é considerada adequada umidade entre 3 e 7% (COUTO *et al.*, 2011).

3.3.5.2. Densidade Compactada

Este valor foi obtido colocando-se uma massa (*m*) do extrato seco em uma proveta de 10 mL limpa e seca. O extrato seco foi compactado com 200 pancadas sucessivas da proveta sobre um pedaço de borracha e o volume por ele ocupado foi anotado (*vol*). A densidade compactada (*d_c*) foi calculada conforme a Equação 3.15.

$$d_c = \frac{m}{vol} \quad (3.15)$$

3.3.5.3. Índice de Carr

O índice de Carr (IC) é uma medida indireta para avaliar a capacidade de compactação de pós. Para se calcular este índice, é utilizado a densidade compactada (*d_c*), ou seja o valor encontrado de densidade após realizar a compactação do pó na proveta, e a densidade bruta (*d_b*) que é o valor de densidade antes que o pó seja compactado (Equação 3.16).

$$IC = \frac{d_c - d_b}{d_b} \times 100 \quad (3.16)$$

Valores abaixo de 15% para o índice de Carr indicam uma excelente fluidez. Entretanto, valores do índice de Carr acima de 20% apresentam um vazão debilitado de certa maneira (USP XXX, 2008).

3.3.5.4. Ângulo de Repouso

O aparato utilizado consistiu de um funil de plástico considerando-se as medidas internas do funil da maneira como esquematizado no Esquema 1. Um grama do extrato seco foi suficiente para a realização das análises. Foram feitas três determinações.

Figura 3.2 – Aparato utilizado para obtenção do ângulo de repouso dos extratos secos.

Através da altura (h) e do diâmetro (d) do cone pôde-se calcular o ângulo de repouso (ρ) pela Equação 3.17.

$$\rho = \arctg \frac{2h}{d} \quad (3.17)$$

A partir do ângulo de repouso pôde-se analisar a fluidez dos extratos secos obtidos de acordo com a Tabela 3.14.

Tabela 3.14 – Relação entre ângulo de repouso e fluidez (USP XXX, 2008).

Ângulo repouso (°)	Fluidez
< 20	ótima

20 a 30	boa
30 a 40	aceitável
> 40	ruim

3.3.5.5. *Diâmetro Médio e Distribuição Granulométrica*

Foi utilizada a técnica de peneiramento. Para a seleção do tamanho de abertura dos tamises, realizou-se um teste inicial com os extratos secos, com a finalidade de obter a maior quantidade da amostra dentro da faixa de tamanho das malhas dos tamises selecionados. O tamanho da amostra variou de acordo com a quantidade de extrato seco disponível. Foram utilizados tamises produzidos pela Bronzinox Ltda. constituídos de tela em aço inox. Foram utilizadas malhas com abertura de: 855, 605, 400, 256, 181, 128, 98, 76,5, 54, e 45 μm . Os pós foram previamente tamisados em tamis 1000 μm para que os agregados fossem retirados e desconsiderados. O diâmetro médio de partícula (d_{50}) foi determinado através da distribuição granulométrica cumulativa (ANSEL *et al.*, 2000; AULTON, 2005).

3.3.5.6. *Umidade de Equilíbrio*

Um dessecador hermeticamente fechado contendo solução saturada de cloreto de sódio para proporcionar umidade de 75% UR e sob temperatura de 25°C foi utilizado. Cem miligramas de cada extrato seco foram pesados em recipiente aberto, seco e previamente tarado e armazenados no dessecador por 72 h. Após este período, os extratos foram pesados e a diferença de peso inicial e final foi considerada como a umidade absorvida por eles (KOPLEMAN *et al.*, 2001).

3.3.5.7. *Rendimento*

O rendimento do processo de secagem (θ) foi calculado com base na razão da massa de extrato seco obtida após secagem (m_f) pelos sólidos totais presentes na solução de alimentação. A Equação 3.18 apresenta como foi calculado o rendimento onde m_i é a massa de extrato de *C. langsdorffii* utilizada, m_{exc} é a massa de excipiente e Cs é a concentração do extrato de *C. langsdorffii* expresso em percentual (KOESTER *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2005).

$$\theta = \frac{m_f}{(Cs \cdot m_i / 100) + m_{exc}} \cdot 100 \quad (3.18)$$

3.3.5.8. Eficiência de Secagem

A eficiência de secagem (φ) foi calculada através da razão entre a massa de sólidos recolhida durante o tempo do processo de secagem pelo vazão da amostra (W_s) previamente ajustado, onde m_i é a massa de extrato de *C. langsdorffii* utilizada, m_{exc} é a massa de excipiente adicionado e t é o tempo de secagem.

$$\varphi = \frac{m_i + m_{exc}}{t \cdot W_s} \cdot 100 \quad (3.19)$$

3.3.5.9. Quantificação de Flavonóides Totais

O teor de flavonóides totais foi obtido pelo mesmo método descrito em 3.2.3.2.

3.3.5.10. Quantificação dos Marcadores Químicos por CLAE

Os marcadores químicos quercetrina e afzelina foram quantificados pelo mesmo método descrito em 3.2.3.3.

3.3.5.11. Degradação de Flavonóides Totais, Quercetrina e Afzelina

Para o cálculo de degradação de flavonóides totais, quercetrina e afzelina os extratos líquidos de partida e os extratos secos foram quantificados. Denominou-se de teor teórico o obtido na quantificação do extrato líquido de partida considerado na base seca e de teor prático o teor obtido na quantificação do extrato seco. Assim, fez-se a razão entre a diferença do teor teórico e do prático sobre o teor teórico em porcentagem.

4. Resultados e Discussão

4.1. Droga Vegetal

4.1.1. Caracterização

As folhas secas e moídas de *C. langsdorffii* apresentaram $6,51 \pm 0,20\%$ m/m de umidade, $2,94 \pm 0,07\%$ m/m de cinzas totais, $0,27 \pm 0,09\%$ m/m de cinzas insolúveis em ácido clorídrico e substâncias extraíveis em álcool de $32,12 \pm 0,93\%$ m/m.

De maneira geral, nas monografias da Farmacopéia Brasileira (2010) de plantas das quais se utilizam as folhas secas a média de limite máximo aceitável de umidade é de 10% m/m, de cinzas totais é de 5% m/m e de cinzas insolúveis é de 1% m/m. Portanto, os resultados encontrados para as folhas secas e moídas de *C. langsdorffii* estão aceitáveis.

O valor de substâncias extraíveis em álcool é considerado como o máximo possível de substâncias que se pode extrair da planta devido ao drástico método de extração que se utiliza para tanto. Cada planta apresenta uma quantidade de substâncias extraíveis em álcool de acordo com suas características. Assim, este valor é uma referência para possível comparação dos resultados de rendimento de extração de sólidos solúveis obtidos por outros métodos extrativos.

O diâmetro médio das folhas secas e moídas foi de $561 \mu\text{m}$ com distribuição granulométrica bimodal sendo que 90% delas apresentaram diâmetro, $d_{90\%}$, abaixo de $925 \mu\text{m}$ (Figura 4.1).

É importante analisar a distribuição granulométrica da droga vegetal utilizada, pois o tamanho de partícula pode influenciar a extração dos constituintes químicos. Há na literatura, estudos em que a droga vegetal utilizada foi padronizada em tamanhos de partícula de 825 a $150 \mu\text{m}$. Desta forma, o tamanho médio de partícula das folhas secas e moídas de *C. langsdorffii* utilizadas está coerente com os estudos realizados e disponíveis na literatura (LUTHRIA, BISWAS e NATARAJAN, 2007; DIOUF, STEVONOVICA e BOUTIN, 2009; FAN *et al.*, 2008; JACQUES *et al.*, 2007).

Figura 4.1 – Distribuição granulométrica das folhas secas e moídas coletadas de *C. langsdorffii*.

4.2. Validação do Método Cromatográfico

Para desenvolver o método analítico para as amostras de *C. langsdorffii* diferentes gradientes para fase móvel foram avaliados assim como diferentes colunas de fase reversa CN, C8 e C18, para que as condições cromatográficas que apresentaram melhor separação e resolução dos picos pudessem ser selecionadas.

Para a escolha do padrão interno, diversos padrões disponíveis em laboratório foram injetados: ácido caféico, ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico, aromadendrina e isosakuranetina. Todos estes padrões eluíram no mesmo tempo de retenção de outro pico da amostra e, por isso, foram descartadas como possibilidade de padrão interno. Em seguida, uma solução de cumarina foi injetada e observou-se que sua eluição no método desenvolvido ocorria em uma janela de análise ($t_R = 40$ min) e, portanto, a cumarina foi selecionada como padrão interno.

4.2.1. Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

Para avaliar se o método cromatográfico desenvolvido foi seletivo para a quercetrina e afzelina nas amostras de extrato líquido e extrato seco, comparou-se o perfil cromatográfico dos padrões com o perfil cromatográfico das amostras e dos excipientes (matrizes sem extrato de copaíba) além de confrontar seus tempos de retenção e os espectros de UV.

Como pode ser observado, a solução hidroalcoólica utilizada no estudo de extração (Figura 4.2 B) e o excipiente manitol (Figura 4.2 A) utilizado no estudo de secagem não apresentaram picos e nem interferentes que eluíssem com mesmo tempo de retenção do PI (cumarina) ou dos marcadores químicos quercetrina e afzelina.

Os picos do PI (cumarina) e dos marcadores químicos quercetrina e afzelina em cada cromatograma estavam sem interferentes visto que os comprimentos de onda máximos apresentaram as bandas espectrofotométricas características de cada substância considerando-se, assim, que não houve co-eluição.

Figura 4.2 – Cromatogramas de: (A) pico de PI (cumarina) na amostra de excipiente manitol; (B) pico de PI na amostra de solução hidroalcoólica; (C) pico de PI e padrão de quercetrina; (D) pico de PI e padrão de afzelina; (E) perfil do Extrato Líquido de *C. langsdorffii*; (F) perfil do Extrato Seco de *C. langsdorffii*. PI (cumarina): t_R = 40 minutos e $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 277 e 309 nm; Quercetrina: t_R = 53 minutos e $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 255 e 349 nm; e Afzelina: t_R = 61 minutos e $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 264 e 343 nm.

4.2.2. Linearidade e Curva Analítica

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI *et al.*, 2004).

A linearidade foi verificada na faixa de quantificação aplicada para as amostras utilizando as concentrações para a elaboração das curvas analíticas (Tabelas 4.1 e 4.2).

Tabela 4.1 – Área da quercetrina e do PI (cumarina) e razão entre elas e a concentração utilizada (n=3).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área Média		Razão
	Quercetrina	PI	
10	683979,0 $\pm$ 2804,1	871532,3 $\pm$ 9267,6	0,785 $\pm$ 0,008
30	2185681,7 $\pm$ 12884,9	895250,7 $\pm$ 9875,4	2,441 $\pm$ 0,013
50	3682549,7 $\pm$ 15011,7	883427,7 $\pm$ 9024,4	4,168 $\pm$ 0,035
70	5258439,3 $\pm$ 57567,6	885601,3 $\pm$ 13296,8	5,938 $\pm$ 0,025
90	6747748,7 $\pm$ 65068,6	890682,7 $\pm$ 11719,5	7,576 $\pm$ 0,027

Figura 4.3 – Curva analítica e equação da reta para quercetrina.

Tabela 4.2 – Área da afzelina e do PI (cumarina) e razão entre elas e a concentração utilizada (n=3).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área Média		Razão
	Afzelina	PI	
5	186435,3 $\pm$ 3441,6	812380,0 $\pm$ 6930,8	0,229 $\pm$ 0,002
15	653729,3 $\pm$ 3978,3	835856,3 $\pm$ 5744,4	0,782 $\pm$ 0,004
25	1136661,3 $\pm$ 2689,6	821891,3 $\pm$ 1456,0	1,383 $\pm$ 0,002
35	1604515,3 $\pm$ 9161,1	844433,7 $\pm$ 3592,8	1,900 $\pm$ 0,003
45	2043496,7 $\pm$ 9872,3	820350,3 $\pm$ 6640,4	2,491 $\pm$ 0,009

Figura 4.4 – Curva analítica e equação da reta para afzelina.

Como pode ser observado nas Figuras 4.3 e 4.4, os coeficientes de correlação linear (R^2) obtidos apresentaram valores acima de 0,999 aceito pela ANVISA e INMETRO (RIBANI *et al.*, 2004). Desta forma, o método cromatográfico é linear para a quantificação de quercetrina e afzelina na faixa de concentração avaliada.

4.2.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004; BUENO, 2007).

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004; BUENO, 2007).

O LD foi calculado de acordo com a Equação 3.10 e o LQ foi calculado de acordo com a Equação 3.11.

Para a quercetrina, o LD encontrado foi de 1,21 $\mu\text{g/mL}$ e o LQ foi de 3,66 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 4.3 – Análise estatística das curvas analíticas para obtenção dos limites de detecção e quantificação.

Concentração Quercetrina ($\mu\text{g/mL}$)	Área Quercetrina			Média	S
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
0,5	16141	16019	15989	16050	81
1	32877	34265	34249	33797	797
1,5	50611	51617	51720	51316	613
Coefficiente angular (a)	34470	35598	35731	35266	693
Coefficiente linear (b)	-1260	-1631	-1745	-1545	253

$$LD = 3,3 \cdot \frac{253}{693} = 1,21 \mu\text{g} / \text{mL} \quad (4.1)$$

$$LQ = 10 \cdot \frac{253}{693} = 3,66 \mu\text{g} / \text{mL} \quad (4.2)$$

Os LD e LQ encontrados foram relativamente altos vistos os resultados de Sousa (2011) que encontrou para a quercetrina 0,32 e 0,96 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Deve-se considerar que Sousa (2011) utilizou coluna monolítica e acetonitrila na fase móvel o que pode ter feito com que o método ficasse mais sensível e preciso apresentando, assim menores valores para limite de detecção e de quantificação para a quercetrina.

4.2.4. Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra sob condições definidas. A precisão foi avaliada de duas maneiras: repetibilidade ou precisão intra-ensaio e precisão intermediária ou precisão inter-ensaio (RIBANI *et al.*, 2004).

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições. Para tanto, foram feitas seis medições da mesma amostra, em diferentes preparações e a repetibilidade foi expressa através do coeficiente de variação (CV) (RIBANI *et al.*, 2004).

Como observado na Tabela 4.4 e Tabela 4.5, os valores de coeficiente de variação (CV) para a precisão das análises de quercetrina e afzelina apresentaram-se menores que 5%. Assim, pode-se dizer que o método utilizado não apresentou grandes dispersões nas respostas de uma mesma amostra tanto para o extrato líquido quanto para o extrato seco de *C. langsdorffii* e, por isso, apresenta repetibilidade.

Tabela 4.4 – Resultados do teor de quercetrina e afzelina no Extrato Líquido de *C. langsdoffii* nas repetições no dia 1.

Amostras	Teor (mg/mL)	
	Quercetrina	Afzelina
1	0,683	0,391
2	0,699	0,400
3	0,698	0,399
4	0,706	0,405
5	0,712	0,406
6	0,714	0,410
Média	0,702	0,402
S	0,011	0,007
CV(%)	1,6	1,7
S ²	0,00012	0,00005

Tabela 4.5 – Resultados do teor de quercetrina e afzelina no Extrato Seco de *C. langsdoffii* nas repetições no dia 1.

Amostras	Teor (mg/g)	
	Quercetrina	Afzelina
1	24,896	7,367
2	25,102	7,519
3	25,691	7,753
4	26,051	7,831
5	26,181	7,922
6	25,826	7,807
Média	25,625	7,700
S	0,518	0,212
CV(%)	2,0	2,8
S ²	0,268	0,045

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados.

Para a precisão intermediária, a mesma amostra da repetibilidade foi novamente preparada seis vezes de maneira semelhante, pelo mesmo analista sob as mesmas condições instrumentais e cromatográficas, porém em outro dia (dia 2).

Tabela 4.6 – Resultados do teor de quercetrina e afzelina no Extrato Líquido de *C. langsdoffii* nas repetições no dia 2.

Amostras	Teor (mg/mL)	
	Quercetrina	Afzelina
1	0,700	0,404
2	0,685	0,395
3	0,694	0,401
4	0,691	0,399
5	0,688	0,398
6	0,688	0,397
Média	0,691	0,399
S	0,005	0,003
CV(%)	0,8	0,8
S ²	0,00003	0,00001

Tabela 4.7 – Resultados do teor de quercetrina e afzelina no Extrato Seco de *C. langsdoffii* nas repetições no dia 2.

Amostras	Teor (mg/g)	
	Quercetrina	Afzelina
1	23,283	7,083
2	24,685	7,392
3	25,515	7,606
4	24,343	7,267
5	24,972	7,457
6	24,027	7,192
Média	24,471	7,333
S	0,776	0,190
CV(%)	3,2	2,6
S ²	0,602	0,036

Tabela 4.8 – Resultados de variância (S²) e do F_{calc} para o teor de quercetrina e afzelina no extrato líquido e extrato seco de *C. langsdoffii*.

	Extrato líquido		Extrato seco	
	Quercetrina	Afzelina	Quercetrina	Afzelina
S ² dia 1	0,00012	0,00005	0,268	0,045
S ² dia 2	0,00003	0,00001	0,602	0,036
F _{calc}	0,231	0,239	2,245	0,803

Todos os F_{calc} foram menores que o F_{tabelado} (5,05) quando n=6 para ambos os dias e nível de significância de 0,05. Desta forma, a dispersão dos resultados para as análises de extrato líquido e extrato seco de *C. langsdorffii* não apresentaram diferença significativa entre os diferentes dias.

4.2.5. Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um padrão (RIBANI *et al.*, 2004). Este parâmetro deve ser avaliado, pois a substância de interesse pode ser perdida ao diluir a amostra provinda de matrizes complexas em soluções mais simples ou retida na própria matriz durante o preparo da amostra, levando a erros de quantificação (BUENO, 2007).

Tabela 4.9 – Resultados para a recuperação do padrão de quercetrina adicionado às amostras de Extrato Líquido de *C. langsdorffii*.

Amostras	Concentração	VR	Rec (%)	Média	S	CV (%)
VT: 11,2 µg/mL						
1	80%	9,645	86,120	86,782	1,4	1,6
2		9,610	85,807			
3		9,903	88,419			
VT: 14,0 µg/mL						
1	100%	12,078	86,268	88,377	1,8	2,1
2		12,536	89,545			
3		12,504	89,317			
VT: 16,8 µg/mL						
1	120%	15,662	93,228	93,594	2,0	2,2
2		15,417	91,766			
3		16,092	95,787			

VR: valor real; VT: valor teórico; Rec (%): recuperação; S: desvio padrão;
CV: coeficiente de variação

Tabela 4.10 – Resultados para a recuperação do padrão de quercetrina adicionado às amostras de Extrato Seco de *C. langsdorffii*.

Amostras	Concentração	VR	Rec (%)	Média	S	CV (%)
VT: 11,2 µg/mL						
1	80%	10,965	97,902	94,213	3,3	3,498
2		10,255	91,559			
3		10,436	93,178			
VT: 14,0 µg/mL						
1	100%	12,488	89,199	91,670	2,3	2,500
2		13,122	93,726			
3		16,124	95,973			
VT: 16,8 µg/mL						
1	120%	15,866	94,438	94,884	0,9	0,999
2		10,965	97,902			
3		10,255	91,559			

VR: valor real; VT: valor teórico; Rec (%): recuperação; S: desvio padrão;
CV: coeficiente de variação

A recuperação do método apresentou-se com valores acima de 90% para o extrato seco nas três concentrações estudadas com coeficiente de variação menores que 5%. Já para o extrato líquido, a exatidão foi crescente da menor para a maior concentração também com coeficientes de variação abaixo de 5%. Na literatura, se aceita exatidão do método entre 80 a 120%. Portanto, o método é satisfatório quanto à exatidão para quantificação de quercetrina em extrato líquido e extrato seco de *C. langsdoffii*.

4.2.6. Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (RIBANI *et al.*, 2004).

Os fatores estudados para avaliar a robustez do método foram: temperatura da coluna, pH da água da fase móvel e a porcentagem de metanol na fase móvel. Para tanto, foi utilizado um planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} . As respostas avaliadas foram tempo de retenção e razão entre as áreas de quercetrina ou afzelina e do PI (cumarina) (Tabela 4.11).

Tabela 4.11 – Resultados para tempo de retenção (t_R) da quercetrina e razão entre as áreas de quercetrina e do PI na análise de robustez do método cromatográfico.

Ensaio	Temperatura da coluna	pH da água	Metanol na fase móvel	Resultados	
				t_R (min) quercetrina	Razão entre áreas
1	-1 (35°C)	+1 (2,7)	-1 (-2%)	58,643	2,44612
2	+1 (45°C)	+1 (2,7)	+1 (+2%)	49,711	2,39398
3	-1 (35°C)	-1 (2,5)	+1 (+2%)	53,676	2,56168
4	+1 (45°C)	-1 (2,5)	-1 (-2%)	55,540	2,45626

Como pode ser observado na Figura 4.5, na avaliação da razão entre as áreas de quercetrina e do padrão interno, nenhum valor de estimativa dos efeitos dos fatores foi acima de 1,501, acima do qual representa significância estatística ($\alpha=0,05$).

Figura 4.5 – Diagrama para a resposta razão entre as áreas de quercetrina e do PI na avaliação de robustez do método cromatográfico.

Como pode ser observado na Figura 4.6, na avaliação do tempo de retenção da quercetrina, nenhum valor de estimativa dos efeitos dos fatores foi acima de 67,36, acima do qual representa significância estatística ($\alpha=0,05$).

Figura 4.6 – Diagrama para a resposta tempo de retenção da quercetrina na avaliação da robustez do método cromatográfico.

Como pode ser observado na Figura 4.7, na avaliação da razão entre as áreas de afzelina e do padrão interno, nenhum valor de estimativa dos efeitos dos fatores foi acima de 0,227, acima do qual representa significância estatística ($\alpha=0,05$).

Figura 4.7 – Diagrama para a resposta razão entre as áreas de afzelina e do PI na avaliação de robustez do método cromatográfico.

Como pode ser observado na Figura 4.8, na avaliação do tempo de retenção da afzelina, nenhum valor de estimativa dos efeitos dos fatores foi acima de 77,59 acima do qual representa significância estatística ($\alpha=0,05$).

Figura 4.8 – Diagrama para a resposta tempo de retenção da afzelina na avaliação da robustez do método cromatográfico.

Estes resultados demonstram que o método cromatográfico desenvolvido para analisar extrato líquido e extrato seco de *C. langsdorffii* é um método robusto para o qual

pequenas variações na porcentagem de metanol da fase móvel e no seu pH ou na temperatura da coluna não induzem a erro analítico nas condições avaliadas.

4.3. Extração

4.3.1. Planejamento Fatorial Fracionário

Inicialmente, visto o grande número de possíveis fatores a serem investigados na extração e o desconhecimento da relação das variáveis sobre as respostas estudadas, o planejamento fatorial fracionário foi selecionado com a finalidade de realizar uma triagem dos fatores evitando que fatores importantes fossem excluídos do estudo e descartando fatores menos significantes.

Com referência na literatura (POMPEU, SILVA e ROGEZ, 2009; PIZARRO, GONZÁLEZ-SÁIZ e PÉREZ-DEL-NOTARIO, 2006; SHEIBANI e GHAZIASKAR, 2008; LIAO *et al.*, 2008), os fatores massa de planta, proporção etanol/ água, temperatura de extração, tempo de extração e velocidade de agitação foram selecionados para realizar o planejamento fatorial fracionário com a finalidade de selecionar três destes fatores para utilizá-los nos próximos experimentos do estudo de extração. Assim, utilizou-se um planejamento fatorial fracionário, ou seja, meia fração de um planejamento fatorial completo de cinco fatores e dois níveis, perfazendo 8 experimentos (Tabela 3.2). A partir dos resultados obtidos das repostas avaliadas (Y_i): sólidos solúveis (SS), rendimento de sólidos solúveis (θ_{SS}), flavonóides totais (FT) e os marcadores químicos quercetrina (Q) e afzelina (A), realizou-se o cálculo da estimativa dos efeitos através da Equação 3.1 para verificar as influências mais significativas na extração (Figura 4.2).

A intensidade (valor em módulo) da estimativa dos efeitos do planejamento fatorial fracionário permite avaliar, comparativamente entre os fatores, seu impacto nas respostas estudadas. De maneira geral, os fatores que menos influenciaram nas respostas foram tempo (t) e temperatura (T) seguidos da velocidade de agitação (v). Os fatores que mais influenciaram em todas as respostas foram massa de planta (M_p) e proporção de etanol/ água (EA).

Figura 4.9 – Estimativa dos efeitos obtidos para cada fator estudado no planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} de acordo com as observações: (A) sólidos solúveis; (B) rendimento de sólidos solúveis; (C) flavonóides totais, (D) teor de quercetrina e (E) teor de afzelina. Valores positivos: e valores negativos:

A literatura disponível relata resultados divergentes em relação à temperatura em métodos extrativos (MOURE *et al.*, 2001). De maneira geral, o aumento na temperatura tende a favorecer a extração através do aumento da solubilidade do soluto, do coeficiente de difusão

e da constante dielétrica da água (PINELO, SINEIRO e NUÑEZ, 2006). Já que nos experimentos realizados as temperaturas estudadas foram de 25°C e 50°C podem ter sido baixas para visualizar que a temperatura é capaz de afetar a solubilidade do soluto, o coeficiente de difusão e a constante dielétrica da água. Entretanto, é bastante custoso realizar o processo de extração em larga escala a temperaturas maiores que 50°C. Além disso, a temperatura não pode ser aumentada indefinidamente devido à instabilidade dos compostos fenólicos a temperaturas acima de 50°C (CACACE e MAZZA, 2003).

A velocidade de agitação teve maior intensidade do efeito nas respostas que o tempo de extração e a temperatura indicando que a homogeneização do solvente com o soluto auxilia a extração mesmo nas velocidades de 300 ou 600 rpm. Em uma comparação entre ensaios de extração sem e com agitação, seria possível que o efeito da agitação sobre as respostas pudesse ser mais pronunciado.

As observações das respostas de sólidos solúveis, flavonóides totais e teor de quercetrina e afzelina (Figura 4.9 A, C, D e E, respectivamente) apresentaram, para todos os fatores estudados, valores positivos da estimativa de efeitos. Portanto, pode-se inferir que a extração de sólidos solúveis, flavonóides totais, quercetrina e afzelina das folhas de *C. langsdorffii* foi diretamente proporcional aos fatores estudados. Assim, por exemplo, quanto maior a massa de planta utilizada e quanto maior a proporção etanol/ água, maior a extração de sólidos solúveis, flavonóides totais, quercetrina e afzelina das folhas de *C. langsdorffii*. Este resultado é coerente com a literatura (LIST e SCHIMIDT, 1989) visto que sólidos solúveis e compostos fenólicos, entre eles flavonóides e fenóis, são substâncias extraídas da planta e, quanto maior a massa de planta utilizada, maior sua disponibilidade para serem extraídos. Além disso, altas proporções de etanol em soluções hidroalcoólicas auxiliam a extração de flavonóides e compostos fenólicos (HUANG *et al.*, 2009; PINELO, SINEIRO e NUÑEZ, 2006).

A observação de rendimento de sólidos solúveis foi influenciada de maneira inversa à massa de planta o que representa que quanto maior a massa de planta utilizada menor o rendimento de sólidos solúveis. Isso ocorre provavelmente porque ocorre saturação no solvente também já observada e relatada na literatura (LIST e SCHIMIDT, 1989).

Desta forma, pôde-se selecionar massa de planta (Mp), proporção de etanol/ água (EA) e velocidade de agitação (v) para dar continuidade ao estudo de extração já que foram estes fatores os que influenciaram mais significativamente na extração de sólidos solúveis, rendimento de sólidos solúveis, flavonóides totais, quercetrina e afzelina.

4.3.2. Planejamento Box-Behnken

Através da técnica estatística de metodologia de superfície de resposta (MSR) foi possível obter a relação matemática da resposta com as variáveis por regressão múltipla, ou seja, foi possível obter uma equação empírica de previsão da resposta em função das variáveis estudadas. Além disso, a MSR permite identificar os efeitos das variáveis estudadas de forma isolada, assim como a interação entre elas e suas contribuições quadráticas

A influência dos fatores massa de planta, proporção etanol/ água e velocidade de agitação sobre a extração de sólidos solúveis (SS), rendimento de sólidos solúveis (θ_{SS}), flavonóides totais (FT), quercetrina (Q) e afzelina (A) foi estudada utilizando-se o planejamento Box-Behnken. Os resultados para cada resposta estudada estão apresentados na Tabela 4.12.

A precisão dos resultados pode ser avaliada através das observações obtidas no nível central do planejamento experimental (ensaios 13, 14 e 15), em que as diferenças foram menores que 1% para sólidos solúveis, rendimento de sólidos solúveis, flavonóides totais, quercetrina e afzelina.

A identificação dos parâmetros significativos foi realizada pelo *software Statistica 5*. Estabeleceu-se como significativos os parâmetros com $P < 0,05$ e negligenciados os parâmetros que apresentaram nível de significância maior que 0,05.

Tabela 4.12 – Resultados para as respostas sólidos solúveis (SS), rendimento de sólidos solúveis (θ_{SS}), flavonóides totais (FT), quercetrina (Q) e afzelina (A) estudadas no planejamento Box-Behnken para extração a partir das folhas de *C. langsdorffii* Desf.

Ensaio	Respostas				
	SS (% m/v)	θ_{SS} (%)	FT (mg/mL)	Q (mg/mL)	A (mg/mL)
1	0,79 $\pm$ 0,03	19,8 $\pm$ 0,6	0,173 $\pm$ 0,009	0,229	0,128
2	2,47 $\pm$ 0,01	12,3 $\pm$ 0,1	0,613 $\pm$ 0,074	0,907	0,502
3	0,99 $\pm$ 0,04	24,6 $\pm$ 0,9	0,367 $\pm$ 0,004	0,308	0,176
4	2,82 $\pm$ 0,02	14,1 $\pm$ 0,1	1,287 $\pm$ 0,026	0,943	0,546
5	0,93 $\pm$ 0,03	23,2 $\pm$ 0,8	0,355 $\pm$ 0,079	0,307	0,174
6	2,75 $\pm$ 0,02	13,7 $\pm$ 0,1	0,840 $\pm$ 0,022	0,923	0,525
7	0,91 $\pm$ 0,02	22,7 $\pm$ 0,6	0,292 $\pm$ 0,010	0,294	0,167
8	2,89 $\pm$ 0,02	14,5 $\pm$ 0,1	0,868 $\pm$ 0,022	0,958	0,540
9	1,90 $\pm$ 0,02	15,8 $\pm$ 0,2	0,544 $\pm$ 0,016	0,558	0,311
10	2,09 $\pm$ 0,02	17,4 $\pm$ 0,1	0,883 $\pm$ 0,070	0,690	0,401
11	1,91 $\pm$ 0,06	15,9 $\pm$ 0,5	0,531 $\pm$ 0,028	0,630	0,349
12	2,16 $\pm$ 0,04	17,9 $\pm$ 0,3	0,861 $\pm$ 0,021	0,762	0,435
13	2,06 $\pm$ 0,06	17,1 $\pm$ 0,5	0,639 $\pm$ 0,018	0,728	0,411
14	2,08 $\pm$ 0,01	17,4 $\pm$ 0,3	0,644 $\pm$ 0,012	0,737	0,412
15	2,04 $\pm$ 0,06	17,0 $\pm$ 0,5	0,642 $\pm$ 0,014	0,742	0,415

4.3.2.1. Análise estatística para Sólidos Solúveis (SS)

A Equação 4.3 é o modelo ajustado ($R^2 = 0,994$) obtido da análise estatística que relaciona a resposta, sólidos solúveis, e os fatores significativos codificados, massa de planta (X_1) e proporção etanol/ água (X_2).

$$SS = 2,065 + 0,913 X_1 + 0,124 X_2 - 0,220 X_1^2 - 0,076 X_2^2 \quad (4.3)$$

Os fatores massa de planta e proporção etanol/ água foram significativos afetando tanto com o efeito linear ($P=0,000$ e $P=0,001$, respectivamente) quanto com o quadrático ($P=0,001$ e $P=0,044$) para extração de sólidos solúveis das folhas de *C. langsdorffii*. As interações não apresentaram efeito significativo, ou seja, $P < 0,05$.

Os efeitos dos fatores estudados na extração de sólidos solúveis podem ser também observados na Figura 4.10, obtidas pelo método de superfície de resposta a partir da Equação 4.3.

Figura 4.10 – Superfícies de resposta para a extração de sólidos solúveis em função dos fatores: (A) proporção etanol/ água (EA) e massa de planta (MP); (B) velocidade de agitação (v) e massa de planta (Mp); (C) velocidade de agitação (v) e proporção etanol/ água (EA). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.

Na Figura 4.10 (B), observa-se uma região de sela, sendo máxima a extração de sólidos solúveis quando a proporção etanol/ água apresenta valor acima do nível 0, ou seja, acima de 50°GL e quando a velocidade de agitação se apresenta nos seus extremos, 100 ou 700 rpm.

Entretanto, a velocidade de agitação não apresentou significância sobre a extração de sólidos solúveis ($P=0,24$). Isso pode ser mais bem observado na Figura 4.10 (C) em que a variação da velocidade de agitação não alterou os valores da extração de sólidos solúveis.

4.3.2.2. Análise estatística para Rendimento de Sólidos Solúveis (θ_{ss})

A Equação 4.4 é o modelo ajustado ($R^2= 0,979$) obtido da análise estatística que relaciona a resposta, rendimento de sólidos solúveis, e os fatores significativos codificados, massa de planta (X_1) e proporção etanol/ água (X_2).

$$\theta_{ss} = 17,169 - 4,461 X_1 + 1,288 X_2 + 1,141 X_1^2 - 0,768 X_1 X_2 \quad (4.4)$$

O efeito linear dos fatores massa de planta e proporção etanol/ água ($P=0,000$ e $P=0,001$, respectivamente), o efeito quadrático do fator massa de planta ($P=0,008$) e o efeito da interação massa de planta e proporção etanol/ água ($P=0,031$) foram significativos para o rendimento na extração de sólidos solúveis das folhas de *C. langsdorffii*.

Os efeitos dos fatores estudados e de suas interações na extração de flavonóides totais apresentados na Figura 4.11 foram obtidos através da metodologia de superfície de resposta e foram construídas a partir da Equação 4.4.

Figura 4.11 – Superfícies de resposta para rendimento de sólidos solúveis em função dos fatores: (A) proporção etanol/ água (EA) e massa de planta (MP); (B) velocidade de agitação (v) e massa de planta (Mp); (C) velocidade de agitação (v) e proporção etanol/ água (EA). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.

As Figuras 4.11 (A) e (B) apresentam que o rendimento de sólidos solúveis é inversamente proporcional à massa de planta. Esta proporção é coerente visto que o rendimento de sólidos solúveis foi calculado de acordo com a Equação 4.4 que apresenta a quantidade de massa de planta no denominador. Assim, quanto menor a massa de planta maior será o rendimento de sólidos solúveis. Além disso, quando a massa de planta utilizada é menor, maior é a possibilidade dos sólidos solúveis presentes na planta se difundirem para o solvente já que não ocorre saturação. Estudos na literatura utilizando outras plantas relataram que o rendimento aumenta quando se diminui a massa de planta em relação à quantidade de solvente utilizada (HUANG *et al.*, 2009).

Na Figura 4.11 (A), pode-se observar que o rendimento de sólidos solúveis é maior quando a proporção etanol/ água é 50°GL ou maior concomitantemente com a massa de planta abaixo de 4 g. Assim, mesmo com a proporção etanol/ água em 50°GL ou maior, altas

quantidades de massa de planta forneceram baixo rendimento de sólidos solúveis. Esta situação ocorreu, pois há interação significativa entre estes fatores ($P=0,03$).

Na Figura 4.11 (C), apresenta uma região de sela. Mais uma vez, a máxima extração de sólidos solúveis foi observada quando a proporção etanol/ água apresentou valor acima do nível 0, ou seja, maior que 50°GL devido ao seu efeito linear significativo ($P=0,00$). Enquanto que a velocidade de agitação não apresentou efeito significativo ($P=0,56$) possibilitando observar apenas ligeiro aumento na extração quando se apresentava em seus valores extremos, 100 ou 700 rpm.

4.3.2.3. Análise estatística para Flavonóides Totais (FT)

A Equação 4.5 é o modelo ajustado ($R^2= 0,960$) obtido da análise estatística que relaciona a resposta, teor de flavonóides totais, e os fatores significativos codificados, massa de planta (X_1) e proporção etanol/ água (X_2).

$$FT = 0,642 + 0,313 X_1 + 0,187 X_2 - 0,075 X_1^2 + 0,112 X_1 X_2 \quad (4.5)$$

A Equação 4.5 apresenta que o efeito linear dos fatores massa de planta e proporção etanol/ água ($P=0,000$ e $P=0,000$, respectivamente), o efeito quadrático do fator massa de planta ($P=0,042$) e o efeito da interação massa de planta e proporção etanol/ água ($P=0,008$) foram significativos e afetaram a extração de flavonóides totais das folhas de *C. langsdorffii*.

Os efeitos dos fatores estudados e de suas interações na extração de flavonóides totais apresentados na Figura 4.12 foram obtidos através da metodologia de superfície de resposta e foram construídas a partir da Equação 4.5.

Figura 4.12 – Superfície de resposta para a extração de flavonóides totais em função dos fatores: (A) proporção etanol/ água e massa de planta; (B) velocidade de agitação e massa de planta; (C) velocidade de agitação e proporção etanol/ água. Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.

A interação entre massa de planta e proporção etanol/ água pode ser observada na Figura 4.12 (A). Mesmo em proporções etanol/ água favoráveis, acima de 50°GL, baixas quantidades de massa de planta resultou em baixa extração de flavonóides totais. A extração de flavonóides totais foi máxima quando se utilizou maior quantidade de massa de planta e maior proporção etanol/ água. Entretanto, não foi possível observar a região ótima em função da proporção etanol/ água e massa de planta.

Observando as Figuras 4.12 (B) e (C), pode-se observar que a velocidade de agitação não influenciou significativamente na extração de flavonóides totais.

4.3.2.4. Análise estatística para Teor de Quercetrina (Q) e Afzelina (A)

Ao analisar os resultados da análise estatística para teor de quercetrina e de afzelina foi possível encontrar diversas semelhanças visto a semelhança química e estrutural das duas

moléculas. A primeira delas foi a significância dos fatores massa de planta e proporção etanol/água (Tabela 4.13).

Tabela 4.13 – Valores de P obtidos da análise estatística para os fatores estudados na extração de quercetrina e afzelina das folhas de *C. langsdoffii*.

Efeito	Valor de P	
	Quercetrina	Afzelina
X_1	0,000*	0,000*
X_2	0,008*	0,002*
X_3	0,123	0,159
X_1^2	0,003*	0,003*
X_2^2	0,029*	0,031*
X_3^2	0,174	0,217
$X_1 * X_2$	0,529	0,926
$X_1 * X_3$	0,485	0,526
$X_2 * X_3$	1,000	0,913

* efeito significativo ($P < 0,05$)

Desta forma a Equação 4.6 e a Equação 4.7 foram obtidas como modelos ajustados ($R^2 = 0,985$ e $R^2 = 0,986$, respectivamente) da análise estatística que relaciona as respostas, teor de quercetrina e de afzelina, e os fatores significativos codificados, massa de planta (X_1) e proporção etanol/água (X_2) tanto com o efeito linear quanto o quadrático.

$$Q = 0,736 + 0,324 X_1 + 0,047 X_2 - 0,089 X_1^2 - 0,050 X_2^2 \quad (4.6)$$

$$A = 0,413 + 0,184 X_1 + 0,034 X_2 - 0,049 X_1^2 - 0,026 X_2^2 \quad (4.7)$$

Através da Equação 4.6 e da Equação 4.7 foram obtidas as superfícies de resposta que relacionam o teor de quercetrina e afzelina com os fatores estudados. Apresentam-se na Figura 4.13 as superfícies de resposta para teor de quercetrina e teor de afzelina.

Figura 4.13 – Superfícies de resposta para teor de quercetrina (A), (B) e (C) e afzelina (D), (E) e (F) em função dos fatores proporção etanol/ água e massa de planta; velocidade de agitação (v) e massa de planta (Mp); velocidade de agitação (v) e proporção etanol/ água (EA), respectivamente. Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.

Devido à significância dos efeitos linear e quadrático do fator massa de planta pode-se observar nas Figuras 4.13 (A) e (B) que seu aumento induz ao aumento no teor de quercetrina e afzelina nos extratos obtidos.

Somente nas Figuras 4.13 (C) e (F), foi possível observar o efeito quadrático do fator proporção etanol/ água bastante pronunciado. Estas figuras apresentam forma de pára- quedas, visto que permitem visualizar que a região experimental fornece a máxima resposta para o teor de quercetrina e afzelina nos extratos obtidos.

De maneira geral, no Planejamento Box-Behnken, foi observado que a mais alta proporção etanol/ água utilizada foi capaz de fornecer maiores valores de sólidos solúveis, flavonóides totais, quercetrina e afzelina nos extratos e até mesmo de rendimento de sólidos solúveis. Proporções de etanol em soluções hidroalcoólicas auxiliam a extração de flavonóides e compostos fenólicos (HUANG *et al.*, 2009; PINELO, SINEIRO e NUÑEZ, 2006). Alguns trabalhos encontrados na literatura relatam que a extração de fenóis totais ocorre com mais sucesso quando se utiliza maiores proporções de água (PROMMUAK; DE-EKNAMKUL e SHOTIPRUK, 2008). Entretanto, deve-se observar que a constante dielétrica da água decresce com o aumento da temperatura aumentando sua capacidade de interagir e, conseqüentemente, extrair solutos mais apolares como alguns flavonóides (CACACE e MAZZA, 2003).

Como já discutido no Planejamento Fatorial Fracionário, quanto maior a massa de planta utilizada, maior disponibilidade de sólidos solúveis e compostos fenólicos, entre eles flavonóides e fenóis, para serem extraídos visto que são substâncias extraídas da planta (LIST e SCHIMIDT, 1989).

Como as respostas estudadas: sólidos solúveis, rendimento de sólidos solúveis, flavonóides totais não apresentaram uma região ótima, ou seja, os valores dos fatores não permitiram observar a máxima resposta, decidiu-se realizar a inclinação ascendente.

4.3.3. Inclinação Ascendente (Descendente)

Como foi observado nos resultados do Planejamento Box-Behnken, ainda é possível aumentar a extração de sólidos solúveis e flavonóides totais quando ambas, massa de planta e proporção etanol/ água, são aumentadas. Por isso, decidiu-se aplicar a técnica experimental de inclinação ascendente que possibilita ao pesquisador caminhar de maneira perpendicular à região ótima.

Assim, para se obter as condições em direção á região ótima, utilizou-se a razão dos respectivos coeficientes dos fatores massa de planta e proporção etanol/ água da Equação 4.4

de predição da resposta de flavonóides totais, ou seja, 0,187/ 0,313. Assim, a cada aumento de nível 1 de massa de planta, aumenta-se 0,597 de proporção etanol/ água. Para obter os valores não codificados de massa de planta e proporção etanol/ água utilizaram-se as Equações 3.2 e 3.3, respectivamente. Os dois pontos selecionados estão descritos na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 – Determinação das condições de inclinação ascendente em direção à região ótima de flavonóides totais.

	Codificadas		Não codificadas	
	X ₁	X ₂	Mp (g)	EA (°GL)
Origem	0	0	12,0	50
Δ	1,00	0,597	8,0	12
A Origem+ 2,8Δ	2,75	1,640	34,0	83
B Origem+ 3,85Δ	3,85	2,297	42,8	96

Como pode ser observado na Tabela 4.15, os resultados das análises realizadas para o ponto B, que utilizou maior massa de planta e maior proporção etanol/ água, 43g e 96°GL, respectivamente, apresentaram menores valores de sólidos solúveis, flavonóides totais, quercetrina e afzelina em relação ao ponto A, 34g e 83°GL. Isso indica que foi possível encontrar a região ótima para a extração de sólidos solúveis e flavonóides totais. Entretanto, ainda torna-se necessário realizar um experimento de superfície de resposta nesta região para encontrar o ponto exato que corresponde às condições que apresentem o maior valor para a extração destas respostas.

Tabela 4.15 – Resultados das análises de sólidos solúveis, rendimento de sólidos solúveis, flavonóides totais, quercetrina e afzelina para os pontos de inclinação ascendente (n=3).

Análises	SS (% m/v)	θ _{SS} (% m/m)	FT (mg/mL)	Q (mg/mL)	A (mg/mL)
A	3,79± 0,20	11,69± 0,58	1,991± 0,125	1,586± 0,310	1,067± 0,211
B	2,00± 0,06	4,88± 0,15	1,390± 0,086	0,643± 0,040	0,413± 0,028

4.3.4. Planejamento Fatorial Completo 3²

O Planejamento Fatorial Completo 3² foi selecionado para visualizar a superfície de resposta da região ótima para extração máxima de sólidos solúveis, flavonóides totais, quercetrina e afzelina (Figura 4.14). Os resultados deste planejamento estão apresentados na Tabela 4.16.

Tabela 4.16 – Resultados para as respostas sólidos solúveis (SS), rendimento de sólidos solúveis (θ_{SS}), flavonóides totais (FT), quercetrina (Q) e afzelina (A) estudadas no Planejamento Fatorial Completo 3^2 para extração a partir das folhas de *C. langsdorffii*.

Ensaio	Observações				
	SS (% m/v)	θ_{SS} (%)	FT (mg/mL)	Q (mg/mL)	A (mg/mL)
1	3,42±0,04	13,61±0,15	1,553±0,058	1,254	0,624
2	3,34±0,02	13,29±0,07	1,738±0,041	1,315	0,643
3	1,54±0,00	6,14±0,02	0,978±0,007	0,491	0,278
4	4,66±0,03	10,82±0,06	2,156±0,039	1,701	0,859
5	4,35±0,07	10,11±0,16	2,462±0,049	1,638	0,770
6	2,51±0,01	6,42±0,02	1,844±0,101	0,838	0,483
7	2,30±0,02	7,45±0,05	1,685±0,085	0,779	0,449
8	3,47±0,06	10,20±0,16	1,579±0,043	1,260	0,638
9	4,27±0,05	14,27±0,18	2,407±0,161	1,626	0,775

Foram feitas também as superfícies das respostas avaliadas. Todas apresentaram perfil semelhante. A Figura 4.14 (A) e (B) representam as superfícies das respostas avaliadas.

Figura 4.14 – Superfícies de resposta representativas do Planejamento Fatorial Completo 3^2 : (A) sólidos solúveis; (B) rendimento de sólidos solúveis.

O Planejamento Fatorial Completo 3^2 permitiu visualizar que a proporção etanol/água foi significativa ($P<0,05$) com efeito linear e quadrático para a extração de sólidos solúveis, quercetrina e afzelina e com efeito linear para rendimento de sólidos solúveis e flavonóides totais. A região de proporção etanol/água que possibilitou a máxima extração foi próxima de 83°GL.

O fator massa de planta foi significativa com efeito linear para sólidos solúveis, flavonóides totais e quercetrina. Este resultado indica que aumentando a massa de planta de 25 para 43 g ainda há o aumento destas respostas.

Por outro lado, o aumento de massa de planta de 25 para 43 g não foi significativo para o rendimento de sólidos solúveis e para a extração de afzelina. Em relação ao rendimento de sólidos solúveis, esse resultado pode ser explicado pelo aumento da massa de planta proporcionalmente maior que a extração de sólidos solúveis visto que ambos são utilizados no cálculo para obter o rendimento de sólidos solúveis (Equação 3.7). Em relação à afzelina, o resultado pode ser explicado devido à saturação do solvente que ocorreu com o aumento da massa de planta. Uma hipótese para este resultado também não ter sido encontrado para as respostas de sólidos solúveis, flavonóides totais e quercetrina é que a solubilidade e outros fatores químicos intrínsecos de cada substância importantes para sua extração podem ser influenciados pela complexidade da matriz vegetal. Desta forma, o equilíbrio de extração encontrado para a afzelina foi utilizando-se massa de planta de 25 a 43 g enquanto que para sólidos solúveis, flavonóides totais e quercetrina o equilíbrio de extração é possível que seja encontrado utilizando-se maior massa de planta.

Considerando o objetivo inicial de estudar o processo extrativo de maceração dinâmica a partir das folhas de *C. langsdorffii* variando os fatores nele envolvidos com a finalidade de obter um extrato com altos teores de sólidos solúveis, flavonóides totais, quercetrina e afzelina, foi possível visualizar que estas repostas são maximizadas ou estão muito próximas da região de máxima quando a proporção etanol/ água é de cerca de 83°GL.

Comparando-se este estudo de maceração dinâmica com estudos de extração-percolação pode-se considerar o tempo da maceração dinâmica como mais vantajoso, de 1 h, frente a 72 h ou mais da maceração-percolação descritas na literatura (LIST e SCHMIDT, 1989).

4.3.5. Otimização das Condições de Extração

O ponto ótimo das condições de extração foi considerado para obter as máximas respostas, ou seja, máxima extração de sólidos solúveis, flavonóides totais, teor de quercetrina e afzelina e altos valores de rendimento de sólidos solúveis também. Para tanto, utilizou-se a função desejabilidade utilizando-se o *software* Minitab 14.0. Os valores estabelecidos para o *software* como baixo, alto e a resposta desejada foram retirados da região experimental do Planejamento Fatorial Completo 3^2 (Tabela 4.16) e todas as respostas foram determinadas com peso um.

O ponto determinado pela função desejabilidade para obter o valor máximo das respostas foi: massa de planta de 41 g e proporção etanol/ água de 79°GL com valor de

desejabilidade composta de 0,928. Este valor demonstra que o valor encontrado para os fatores fornecem o valor muito próximo do máximo estabelecido para todas as respostas.

O valor previsto para as respostas quando a extração realizada nestas condições consta na Tabela 4.17.

Tabela 4.17 – Previsão dos valores para as respostas otimizadas na extração a partir das folhas de *C. langsdorffii*.

Respostas	Valores previstos
Sólidos solúveis	4,604 % m/v
Rendimento de sólidos solúveis	12,06 % m/m
Flavonóides totais	2,462 mg/mL
Quercetrina	1,744 mg/mL
Afzelina	0,837 mg/mL

As condições ótimas obtidas devem ser consideradas para os objetivos propostos iniciais de obter um extrato líquido com altos teores de sólidos solúveis, flavonóides totais, teor de quercetrina e afzelina. Entretanto, deve-se atentar que o rendimento, ainda que maximizado, foi baixo principalmente comparado com o teor de substâncias extraíveis em álcool obtido pela extração exaustiva em Soxhlet de $32,12 \pm 0,93\%$ m/m. Se a resposta rendimento de sólidos solúveis tivesse sido considerada todo o planejamento seria realizado para obter sua maximização utilizando, por exemplo, um método exaustivo ou mesmo a maceração dinâmica com quantidade menor de massa de planta e alterando outros parâmetros como temperatura, velocidade de agitação, proporção etanol/ água entre outros.

Com estas informações, a relação entre a quantidade ótima de massa de planta para obter 100 mL de extrato otimizado de *C. langsdorffii* é de 1 parte para 2,5 partes de extrato. Como pode ser observado na Farmacopéia Brasileira (2010), há as tinturas e extratos que são geralmente obtidas por extração exaustiva. Há também os extratos fluidos comumente obtidos pela concentração das tinturas ou de extratos mais diluídos.

Entretanto, apesar da maceração dinâmica não ser exaustiva o equilíbrio em que ocorre a extração pode ser mais favorável para obter um extrato com teores mais elevados dos marcadores ou mesmo das substâncias ativas da planta e menores valores de sólidos solúveis os quais consideram tanto marcadores ou substâncias ativas quanto substâncias inertes ou até mesmo indesejáveis. Para poder ter a informação de qual destes métodos é mais seletivo, vantajoso e com menor custo seria ideal estudar e comparar ambos quanto a parâmetros físico-químicos como aspecto, teor de marcadores e sólidos solúveis, quanto realizar um estudo de custo.

4.4. Secagem em *Spray Dryer*

4.4.1. Caracterização dos Extratos Líquidos utilizados na secagem

Os Extratos Líquidos utilizados na secagem foram caracterizados quanto ao teor de sólidos solúveis, flavonóides totais, quercetrina e afzelina e estão apresentados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18 – Resultados da caracterização dos Extratos Líquidos utilizados na secagem.

Extrato Líquido	2,5% m/m	12,5% m/m	22,5% m/m
Sólidos solúveis (% m/m)	2,45±0,01	12,62±0,41	21,98±0,97
Flavonóides totais (mg/g)	1,158±0,040	5,801±0,062	10,209±0,107
Quercetrina (mg/g)	0,895	4,622	8,100
Afzelina (mg/g)	0,270	1,367	2,410

4.4.2. Experimento Preliminar

Para os extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos com os diferentes excipientes foram determinados a umidade, densidade compactada, índice de Carr, ângulo de repouso, umidade de equilíbrio a 75% UR, diâmetro médio de partícula, rendimento e degradação de flavonóides totais, quercetrina e afzelina. Em seguida, os valores obtidos foram comparados entre si e discutidos.

A umidade é um indicativo da eficiência do processo de secagem além de ser importante para manter a estabilidade química e microbiológica e as propriedades físicas como compactação, fluidez, densidade, aglomeração das partículas e distribuição de tamanho de partícula do pó. A umidade apresentada pelos extratos secos de *C. langsdorffii* variou de 4 a 6% e, portanto, estão adequadas de acordo com a literatura (3 a 7%) (COUTO *et al.*, 2011).

Observando a Figura 4.15, o extrato seco contendo manitol ($0,380 \pm 0,020$) seguido do extrato seco contendo cabosil ($0,377 \pm 0,022$) e do extrato seco puro obtido a partir do Extrato Líquido de *C. langsdorffii* a 12% m/m ($0,368 \pm 0,017$) foram os que apresentaram maior densidade compactada. É interessante que pós apresentem alta densidade compactada para que um grama do pó ocupe menor volume. Altos valores de densidade compactada são interessantes para ocupar menor volume no armazenamento e transporte do pó, assim como para a obtenção de comprimidos e, principalmente na encapsulação visto que cada tamanho de cápsula possui um volume determinado (COUTO *et al.*, 2011; GANESAN; ROSENTRATER, MUTHUKUMARAPPAN, 2008).

Figura 4.15 – Resultados da densidade compactada para os extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* contendo diferentes excipientes (n=3).

Em seguida, foi obtido o índice de Carr visto que este índice é uma relação entre a densidade bruta e a densidade compactada. Além disso, o índice de Carr é uma medida indireta da capacidade de compactação do pó. Valores abaixo de 15 para o índice de Carr indicam uma excelente fluidez e de 15 a 25 indicam fluidez razoável. Entretanto, pós com valores do índice de Carr acima de 25 apresentam um vazão debilitado de certa maneira (USP XXX, 2008).

Figura 4.16 – Resultados do índice de Carr para os extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* contendo diferentes excipientes (n=3).

Na Figura 4.16, pode-se observar que o extrato seco contendo manitol foi o que apresentou menor valor do índice de Carr ($27,3\% \pm 1,3$), portanto, o que apresentou maior capacidade de compactação entre os extratos secos obtidos.

Pós devem apresentar, além de boa compactação, boa fluidez para que seja possível alimentar a máquina compressora ou encapsuladora sem dificuldades. Estes parâmetros são essenciais para obter um produto com quantidades uniformes da droga e dos excipientes, assim como da dosagem (COUTO *et al.*, 2011).

Para obter uma medida indireta de fluidez realizou-se a medida do ângulo de repouso. Valores de ângulo de repouso abaixo de 20° indicam ótima fluidez, de 20° a 30° indicam boa fluidez, de 30° a 40° aceitável e acima de 40° fluidez ruim (USP XXX, 2008).

Figura 4.17 – Resultados do ângulo de repouso para os extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* contendo diferentes excipientes (n=3).

Na Figura 4.17, pode-se observar que o extrato seco puro obtido a partir do Extrato Líquido de *C. langsdorffii* a 12% m/m e o extrato seco contendo manitol foram os que apresentaram menor ângulo de repouso, $24^\circ \pm 0$ e $22^\circ \pm 1$, respectivamente.

A compactação e fluidez dependem do tamanho e distribuição de tamanho da partícula, da morfologia das partículas, umidade, higroscopicidade e característica eletrostática do material assim como da área superficial e da força de fricção entre elas. Por isso, foi obtido o diâmetro médio das partículas e foram feitas micrografias por microscopia eletrônica de varredura dos extratos secos. Geralmente, a fluidez do pó aumenta com o aumento do tamanho de partícula e, aparentemente há um tamanho crítico acima do qual a fluidez não é influenciada (ABDULLAH e GELDART, 1999; WALTON, 2000).

O extrato seco contendo manitol apresentou resultados que o qualificam como pó de melhor fluidez e compactação. Entretanto, o seu diâmetro médio de partícula apresentou valor intermediário ($244 \mu\text{m}$) quando comparado com os outros extratos secos (210 a $595 \mu\text{m}$) (Tabela 4.19).

Entretanto, outro fator importante que afeta a fluidez do pó é a aglomeração das partículas. Pós que tem boa fluidez normalmente não apresentam partículas aglomeradas nas micrografias como observado no extrato seco contendo cabosil e manitol (Figura 4.20 – 2b e 4b, respectivamente). Entretanto, pós com característica coesiva apresentam aglomeração em massa como apresentado pelo extrato seco contendo amido, lactose e celulose microcristalina (Figura 4.20 – 3b, 5b e 7b, respectivamente) (WALTON, 2000).

Figura 4.18 – Resultados do diâmetro médio de partícula para os extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* contendo diferentes excipientes (n=3).

O tamanho de partícula e a distribuição das partículas influenciam na fluidez do pó. Geralmente, maiores tamanhos de partícula e distribuições largas aumentam a fluidez do pó. O extrato seco contendo manitol apresentou resultados que o qualificam como pó de melhor fluidez e compactação. Entretanto, o seu diâmetro médio de partícula apresentou valor intermediário (244 μm) quando comparado com os outros extratos secos (210 a 595 μm) (Tabela 4.19). Além disso, o extrato seco contendo lactose apresentou baixa fluidez, todavia foi o que apresentou maior tamanho médio de partícula. É possível que este resultado seja devido à formação de aglomerados que foi observada nas micrografias (Figura 4.20 – 5b).

Assim, microscopia eletrônica de varredura permitiu visualizar a morfologia e detalhes da superfície das partículas.

Figura 4.19 – Micrografia de MEV do extrato seco de *C. langsdorffii* obtido por *spray dryer* a partir do Extrato Líquido a 2,5% m/m.

Aparentemente, as micrografias da Figura 4.20 – 3b, 5b e 7b apresentaram-se como aglomerados em massa onde não é possível observar o delineamento de cada partícula. Uma explicação é que as partículas aglomeraram-se antes da secagem impedindo a formação de cada uma completamente. Os resultados para fluidez e compactação destes extratos secos foram ruins e, portanto, coerente com estas micrografias. Estes aglomerados apresentaram-se com formato irregular

As micrografias da Figura 4.19 e da Figura 4.20 – 1b apresenta aglomerados também, entretanto pode-se observar que é possível delinear cada partícula. Desta forma, os aglomerados podem ter sido formados após a completa secagem de cada partícula.

As micrografias da Figura 4.20 – 2b, 4b e 8b apresentaram partículas mais dispersas com aglomerados formados de poucas partículas as quais estão bem delineadas entre si. Os extratos secos das Figura 4.19 e Figura 4.20 – 2b e 8b apresentaram formato arredondado enquanto que a Figura 4.20 – 4b apresentou partículas com formato irregular, algumas arredondadas outras pontiagudas.

A Figura 4.20 - 6b do extrato seco de manitol apresentou-se com formato de pêra e aparentemente maior que as partículas dos outros extratos secos.

Walton (2000) discutiu que geralmente ocorre formação de poucos aglomerados ou múltiplos aglomerados e raramente ocorrem aglomerados maciços como em pós de iogurte, leite desnatado e argila como observado na Figura 4.20 – 3b, 5b e 7b. Estes pós parecem formar uma fase contínua a qual age como uma barreira não porosa dificultando a transferência de massa. Isso é observado com materiais que apresentam plasticidade acarretando a distorção da partícula visto que há a liberação da pressão de vapor durante a secagem e, assim a partícula pode inflar e, em seguida, se romper formando crateras e buracos na superfície. Estas partículas são inevitavelmente ocas (WALTON e MUMFORD, 1999; WALTON, 2000).

Figura 4.20 – Micrografia de MEV dos excipientes antes da secagem e dos extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* a partir do Extrato Líquido a 2,5% m/m contendo diferentes excipientes.

- 1a: maltodextrina e 1b: extrato seco de *C. langsdorffii* contendo maltodextrina;
 2a: cabosil e 2b: extrato seco de *C. langsdorffii* contendo cabosil;
 3a: amido e 3b: extrato seco de *C. langsdorffii* contendo amido;
 4a: manitol e 4b: extrato seco de *C. langsdorffii* contendo manitol;
 5a: lactose e 5b: extrato seco de *C. langsdorffii* contendo lactose;
 6a: sorbitol e 6b: extrato seco de *C. langsdorffii* contendo sorbitol;
 7a: celulose microcristalina e 7b: extrato seco de *C. langsdorffii* contendo celulose microcristalina;
 8a: capsul e 8b: extrato seco de *C. langsdorffii* contendo capsul.

Outro parâmetro que pode influenciar a fluidez é a umidade presente no pó ou mesmo sua característica higroscópica (TEUNOU e FITZPATRICK, 1999). A umidade de equilíbrio é a habilidade de uma substância de atrair e manter consigo moléculas de água do meio ambiente por absorção e adsorção alterando de certa forma seu estado físico podendo aumentar seu volume ou se tornando pegajosa. Por isso, devem ser armazenadas em recipientes bem vedados (SCHWARTZ e GOODMAN, 1982).

Figura 4.21 – Resultados da umidade de equilíbrio para os extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* contendo diferentes excipientes (n=3).

Na Figura 4.21 observa-se que o extrato seco que adsorveu menos umidade do meio foi o extrato seco contendo cabosil, seguido dos extratos secos contendo amido, manitol e lactose. Estes extratos secos apresentaram média de umidade de equilíbrio entre 6 e 8% m/m.

O rendimento dos extratos secos obtidos variou entre 13 e 64%. Os extratos secos que apresentaram maior rendimento foi o extrato seco de *C. langsdorffii* puro obtido a partir do Extrato Líquido de *C. langsdorffii* 12% m/m e o extrato seco contendo cabosil (64 e 61%, respectivamente) (Figura 4.22).

Pode-se considerar que a proporção utilizada excipiente: sólidos da planta (1:3) foi adequada e que a presença de excipiente é importante para obter maiores rendimentos, principalmente quando se tem baixa concentração da amostra – Extrato Líquido de *C. langsdorffii* 2,5% m/m. Além disso, a concentração da amostra menor, por fornecer partículas com diâmetros de partículas menores, pode ter possibilitado a perda destas partículas juntamente com o ar de secagem no ciclone. A importância da concentração da amostra de partida também pode ser observada com o valor de rendimento do extrato seco obtido da secagem do Extrato Líquido de *C. langsdorffii* 12% m/m.

Figura 4.22 – Resultados do rendimento para os extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* contendo diferentes excipientes (n=1).

Gonnissen *et al.* (2007) encontrou rendimentos de 70, 82 e 75% ao secar acetaminofeno com eritritol, maltodextrina e manitol, respectivamente. Teixeira, Teixeira e Freitas (2010) encontraram rendimentos de até 69% e consideraram este valor um excelente resultado de rendimento para secagem em *spray dryer* em escala laboratorial, visto que a literatura raramente relata valores acima de 50%. Entretanto, é comum que o processo de secagem em *spray dryer* de escala laboratorial apresente rendimentos baixos quando comparado com escala industrial devido ao maior acúmulo do pó nas paredes já que o tempo de residência do ar e a distância radial do atomizador até a câmara é menor (AMERI e MAA, 2006).

Como pode ser observado na Figura 4.23 e na Tabela 4.19, os excipientes que menos permitiram degradação de flavonóides totais, quercetrina e afzelina foram: amido (4,2, 0,9 e 0,0%, respectivamente), capsul (0,6, 2,8 e 1,8%, respectivamente) e maltodextrina (2,2, 5,0 e 3,9%, respectivamente). Já a celulose microcristalina foi o excipiente que permitiu maior degradação de flavonóides totais (19,6%), quercetrina (21,4%) e afzelina (19,6%).

Figura 4.23 – Resultados da degradação de flavonóides totais, quercetrina e afzelina para os extratos secos de *C. langsdorffii* obtidos por *spray dryer* contendo diferentes excipientes (n=1).

Todos estes excipientes são, em nível molecular, polímeros de glicose. A maltodextrina é obtida por hidrólise da molécula do amido e o capsul por modificações, como eterificação, esterificação, reticulação, adição ou mesmo hidrólise da molécula do amido. Entretanto, todas mantêm a mesma conformação estrutural enquanto que a celulose microcristalina tem conformação diferente. Assim, possivelmente e, de alguma forma, a conformação molecular auxiliou a proteger ou expor os componentes do extrato sendo possível observar aumento ou diminuição da degradação dos componentes analisados.

Os extratos secos com os demais excipientes, cabosil, manitol, lactose e sorbitol apresentaram degradação semelhante aos extratos de *C. langsdorffii* secos sem utilizar excipientes. Estes excipientes são moléculas pequenas que estão presentes no extrato seco, mas provavelmente não foram capazes de proteger ou expor os componentes analisados.

Tabela 4.19 – Resultados absolutos e degradação em porcentagem do teor de flavonóides totais, quercetrina e afzelina nos extratos secos de *C. langsdorffii* com diferentes excipientes (n=1).

Amostras	Flavonóides totais (mg/g)			Quercetrina (mg/g)			Afzelina (mg/g)		
	Teor teórico	Teor prático	Degradação (%)	Teor teórico	Teor prático	Degradação (%)	Teor teórico	Teor prático	Degradação (%)
Cop 12%	48,224	47,052	2,4	38,416	34,663	9,8	11,457	10,329	9,8
Cop 2,5%	45,224	43,016	4,9	36,816	32,586	11,5	10,980	9,754	11,2
Maltodextrina	33,978	33,237	2,2	27,661	26,274	5,0	8,249	7,931	3,9
Cabosil	34,020	31,022	8,8	27,695	24,622	11,1	8,259	7,469	9,6
Amido	34,055	32,639	4,2	27,723	27,474	0,9	8,268	8,270	0,0
Manitol	34,014	30,889	9,2	27,690	25,456	8,1	8,258	7,706	6,7
Lactose	34,051	32,737	3,9	27,721	25,167	9,2	8,267	7,618	7,8
Sorbitol	34,080	30,293	11,1	27,744	25,051	9,7	8,274	7,587	8,3
Celulose Microcristalina	34,019	27,347	19,6	27,694	21,761	21,4	8,259	6,638	19,6
Capsul	34,003	33,815	0,6	27,681	26,897	2,8	8,255	8,111	1,8

Para selecionar um dos excipientes estudados e dar continuidade ao estudo das condições de secagem, foi dado um peso, ou importância às diversas respostas realizadas, assim como foi selecionado um valor limite para cada uma delas de acordo com informações da literatura, mas considerando também os resultados obtidos dos extratos secos estudados com a finalidade de conseguir selecionar o que apresentava as características mais desejáveis dentre eles.

Para densidade aparente, quanto maior seu valor mais interessante. Por isso, considerou-se o valor de 0,350 e peso 1. Assim, quando o resultado de densidade aparente para o extrato seco era acima deste valor o excipiente recebeu 1 ponto e abaixo, zero ponto.

Para o índice de Carr, que é um índice referente à compactação do pó e quanto mais baixo valor melhor a característica de compactação. Assim, foi considerado um peso 2 para o índice de Carr e valor 30 sendo que acima de 30 o excipiente recebia 0 ponto e abaixo recebia 2 pontos.

Quanto menor o ângulo de repouso melhor é a fluidez do pó. Na literatura, ângulo de repouso abaixo de 25° é considerado parâmetro de boa fluidez. E fluidez é característica importante para diversas operações unitárias e, por isso, recebeu peso 2.

A capacidade de adsorver/absorver água do meio, a umidade de equilíbrio, pode ser controlada com bom armazenamento do extrato seco. Por isso, o peso para umidade de equilíbrio foi de 1 e o valor definido como limite máximo foi de 8% de ganho de massa.

Devido ao rendimento em pequena escala ser baixo e também ter sido observado baixos rendimentos nas secagens realizadas, o peso definido para rendimento foi 1 e o valor limite mínimo foi de 50%.

Apesar do tamanho médio de partícula influenciar bastante na característica do pó, a sua distribuição granulométrica também influencia. Como foi observado que os extratos secos obtidos apresentaram faixa larga de tamanho de partícula, ou seja, não foi observado um diâmetro em que se concentrassem a maioria das partículas, considerou-se que tamanho médio de partícula acima de 200 μm receberia pontuação com peso 1, o que foi observado para todos os extratos secos.

Como a degradação dos marcadores químicos, quercetrina e afzelina e de outros componentes químicos representados pelos flavonóides totais no extrato é uma característica importante em secagem de extratos vegetais, considerou-se aceitável degradação de até 10% com peso 2.

Ao final, o excipiente com maior total de pontos foi considerado aquele que apresentou as características desejáveis para dar continuidade ao estudo do processo de secagem.

Tabela 4.20 – Tabela decisória com a pontuação dos extratos secos de *C. langsdorffii* com seus respectivos excipientes.

Amostras	d _c	IC	ρ	H	θ	d ₅₀	Degradação			TOTAL
							δ _{FT}	δ _Q	δ _A	
Cop 12%	1	0	2	0	1	1	2	2	2	11
Cop 2,5%	0	0	0	0	0	1	2	0	0	3
Maltodextrina	0	0	0	0	1	1	2	2	2	8
Cabosil	1	0	2	1	1	1	2	0	2	10
Amido	0	0	0	1	1	1	2	2	2	9
Manitol	1	2	2	1	0	1	2	2	2	13
Lactose	0	0	0	1	1	1	2	2	2	9
Sorbitol	0	0	0	0	0	1	0	2	2	5
Celulose Microcristalina	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
Capsul	0	0	0	0	0	1	2	2	2	7

Como pode ser observado na Tabela 4.20, o manitol foi o excipiente que forneceu ao extrato seco de *C. langsdorffii* as características mais desejáveis dentre os excipientes estudados. Em seguida, o extrato seco obtido a partir do Extrato Líquido a 12% m/m foi o que apresentou as melhores características. Por isso, decidiu-se utilizar no próximo experimento o manitol como excipiente e estudar a concentração do Extrato Líquido a ser seco.

Bruschi *et al* (2003) estudaram a secagem por *spray dryer* do extrato de própolis utilizando gelatina sem e com manitol como excipientes. As micropartículas de gelatina contendo manitol apresentaram o maior rendimento e a menor umidade nas mesmas condições de secagem entre as formulações estudadas. Ainda lembrou que o manitol é utilizado em formulações para secagem em *spray dryer* para melhorar suas características e evitar que o pó grude.

O manitol utilizado em formulações de acetaminofeno secas por *spray dryer* forneceu pós com boas características de fluxo, alta densidade e baixa umidade de equilíbrio. Além disso, o manitol aumentou a dureza dos comprimidos obtidos por compressão direta (GONNISSEN *et al.*, 2007).

Gonnissen *et al.* (2008) resuspenderam e secaram em *spray dryer* as drogas acetaminofeno, ibuprofeno e cimetidina utilizando manitol, eritritol, Glucidex® 9, Kollidon® CL, dióxido de silício coloidal e sorbitano de polioxietileno 20 como excipientes de secagem.

Demonstraram que as formulações foram viáveis para compressão direta tanto em escala laboratorial quanto industrial.

Gonnissen *et al.* (2007) obteve como resultado um pó vitrificado que grudou nas paredes da câmara, do ciclone e do bico atomizador quando utilizou o sorbitol como excipiente para secagem de acetaminofeno.

4.4.3. Planejamento Box-Behnken

Após selecionar o excipiente, manitol, iniciou-se o estudo do processo de secagem. Como foi observada também no experimento preliminar, a concentração do extrato proporcionou um extrato seco com boas características físicas. Assim, um dos fatores estudados foi a concentração do extrato (C_s). Com o objetivo de obter partículas maiores acreditando-se que o tamanho da partícula influenciaria nas suas características físicas, a vazão de alimentação da amostra (W_s) também foi selecionada para este estudo. O rendimento dos extratos foi outro aspecto a ser aprimorado e, por isso, o terceiro fator selecionado foi a temperatura de saída (T_s).

A influência dos fatores selecionados sobre as respostas densidade compactada (d_c), índice de Carr (IC), ângulo de repouso (ρ), rendimento (θ) eficiência de secagem (ϕ) e a degradação de flavonóides totais (δ_{FT}) e degradação dos marcadores químicos, quercetrina (δ_Q) e afzelina (δ_A) foi estudada utilizando-se o planejamento Box-Behnken. Os resultados para cada resposta estudada estão apresentados na Tabela 4.21.

A precisão dos resultados no processo de secagem pode ser avaliada através das observações obtidas no nível central do planejamento experimental (ensaios 13, 14 e 15), em que os valores para as respostas estudadas não apresentaram variação menor que 1%.

A identificação dos parâmetros significativos foi realizada pelo *software Statistica 5*. Estabeleceram-se como significativos os parâmetros com $P < 0,05$ e negligenciaram-se os parâmetros que apresentaram valores maiores. O nível de significância utilizado foi de 0,05.

Tabela 4.21 – Resultados para as respostas densidade compactada (d_c), índice de Carr (IC), ângulo de repouso (ρ), rendimento (θ), eficiência de secagem (φ) e a degradação de flavonóides totais (δ_{FT}) e dos marcadores químicos, quercetrina (δ_Q) e afzelina (δ_A) estudadas no planejamento Box-Behnken para secagem em *spray dryer* do extrato líquido de *C. langsdorffii*.

Ensaio	Resultados								
	d_c	IC	ρ	d_{50}	θ	φ	Degradação (%)		
	(g/cm ³)	(%)	(°)	(μ m)	(%)	(%)	δ_{FT}	δ_Q	δ_A
1	0,253±0,009	28±2	16±1	367	42	116	0	3	2
2	0,256±0,021	31±2	19±1	553	19	116	2	1	2
3	0,262±0,015	30±4	16±2	160	41	104	4	3	4
4	0,242±0,011	28±4	17±1	317	17	95	6	4	5
5	0,169±0,006	31±3	15±0	177	50	93	5	6	7
6	0,284±0,001	25±0	7±0	219	4	93	4	0	1
7	0,314±0,021	33±1	14±2	179	52	101	1	1	1
8	0,222±0,023	34±5	18±1	153	28	100	1	0	0
9	0,144±0,004	34±2	13±1	192	16	112	4	4	5
10	0,169±0,003	33±3	12±1	308	4	97	0	2	3
11	0,116±0,008	35±3	21±2	164	39	105	0	4	5
12	0,116±0,013	34±5	20±1	232	30	101	2	0	1
13	0,240±0,014	35±5	16±1	210	23	107	0	6	8
14	0,244±0,006	36±2	16±2	214	21	107	0	6	7
15	0,241±0,009	35±1	15±1	219	21	107	0	6	8

4.4.3.1. Análise Estatística para Densidade Compactada (d_c)

A Equação 4.8 é o modelo ajustado ($R^2 = 0,801$) obtido da análise estatística que relaciona a resposta, densidade compactada, e os fatores significativos codificados, temperatura de saída (X_6), vazão da amostra (X_7) e concentração da amostra (X_8).

$$d_c = 0,242 + 0,061 X_6^2 - 0,050 X_7^2 - 0,056 X_8^2 - 0,052 X_6 * X_8 \quad (4.8)$$

Os fatores temperatura de saída, vazão da amostra e concentração da amostra foram significativos afetando a resposta com o efeito quadrático ($P=0,01$, $P=0,02$ e $P=0,01$, respectivamente), assim como a interação dos fatores temperatura de saída e concentração da amostra ($P=0,01$).

Figura 4.24 – Superfícies de resposta para densidade compactada (d_c) em função dos fatores: (A) vazão da amostra (W_s) e temperatura de saída (T_s); (B) concentração da amostra (C_s) e temperatura de saída (T_s); (C) concentração da amostra (C_s) e vazão da amostra (W_s). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.

Como pode ser observado na Figura 4.24 (A) e (B), o aspecto de sela de cavalo e na Figura 4.24 (C) o pára-quedas indicando que o efeito quadrático dos fatores foi bastante pronunciado. Visto que se objetiva obter maior valor de densidade compactada tem-se que quando a temperatura de saída foi utilizada em seus valores extremos (80 e 120 °C) a densidade compactada dos extratos secos foi maior. Já os fatores vazão da amostra e concentração da amostra forneceram maior densidade compactada dos extratos secos em seus níveis intermediários, ou seja, de 7,5 g/min e 12,5 % m/m, respectivamente. A interação destes últimos fatores indica que ambos devem estar com este valor para haver a máxima resposta e se o valor de um deles alterar a resposta diminui.

Walton (2000) discutiu que, de maneira geral, se pode assumir que a densidade aumenta quando a concentração da amostra é aumentada e não com o aumento da temperatura do ar de secagem ou a pressão de atomização, apesar de resultados opostos já terem sido observados.

4.4.3.2. *Análise Estatística para Índice de Carr (IC)*

A Equação 4.9 é o modelo ajustado ($R^2 = 0,564$) obtido da análise estatística que relaciona a resposta, índice de Carr, e o fator significativo codificado, temperatura de saída (X_6).

$$IC = 34,750 - 4,528 X_6^2 \quad (4.9)$$

O fator temperatura de saída foi o único significativo afetando a resposta com o efeito quadrático ($P=0,008$).

Como pode ser observado na Figura 4.25 (A) e (B) há uma curvatura na resposta quando ocorre a variação da temperatura de saída indicando o efeito quadrático. Assim, o menor índice de Carr, o que está relacionado a uma boa capacidade de compactação, é observado quando a temperatura de saída tem seus valores extremos de 80 ou 120°C. Este resultado é coerente com os resultados da densidade compactada a qual foi maior quando a temperatura de saída (T_s) tinha valores extremos de 80 ou 120°C e visto que ambos remetem à capacidade de compactação do pó.

É possível que a temperatura em seus valores extremos possibilite a formação de tamanhos de partícula com maior distribuição granulométrica e, desta forma, aumente a capacidade de compactação do pó.

Figura 4.25 – Superfícies de resposta para índice de Carr (IC) em função dos fatores: (A) vazão da amostra (W_s) e temperatura de saída (T_s); (B) concentração da amostra (C_s) e temperatura de saída (T_s); (C) concentração da amostra (C_s) e vazão da amostra (W_s). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.

4.4.3.3. Análise Estatística para Ângulo de Repouso (ρ)

A Equação 4.10 é o modelo ajustado ($R^2 = 0,775$) obtido da análise estatística que relaciona a resposta, ângulo de repouso, e seus fatores significativos codificados, concentração da amostra (X_8) e a interação da concentração da amostra e temperatura de saída ($X_6 * X_8$).

$$\rho = 15,903 + 3,366 X_8 + 3,155 X_6 * X_8 \quad (4.10)$$

O fator concentração da amostra foi significativo afetando a resposta com o efeito linear ($P=0,002$) e sua interação com a temperatura de saída ($P=0,012$).

Figura 4.26 – Superfícies de resposta para ângulo de repouso (ρ) em função dos fatores: (A) vazão da amostra (W_s) e temperatura de saída (T_s); (B) concentração da amostra (C_s) e temperatura de saída (T_s); (C) concentração da amostra (C_s) e vazão da amostra (W_s). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.

Como pode ser observado na Figura 4.26 (B), quanto menor a concentração da amostra e maior a temperatura de saída, os extratos secos obtidos apresentaram menores ângulos de repouso.

Este resultado pode ser explicado pela formação de partículas menores e/ou mais arredondadas devido à baixa concentração da amostra. Além disso, a interação da baixa concentração da amostra com alta temperatura de saída permitiu a rápida evaporação do

solvente. Assim, possivelmente pela formação de partículas menores e/ou mais arredondas direcionou aos mais baixos valores de ângulo de repouso.

4.4.3.4. *Análise Estatística para Rendimento do Processo de Secagem (θ)*

A Equação 4.11 é o modelo ajustado ($R^2 = 0,860$) obtido da análise estatística que relaciona a resposta, rendimento do processo de secagem, e seus fatores significativos codificados, temperatura de saída (X_8) e a concentração da amostra (X_6) e

$$\theta = 21,868 - 14,529 X_6 + 9,596 X_6^2 + 9,081 X_8 \quad (4.11)$$

O fator temperatura de saída foi significativo afetando a resposta com o efeito linear e quadrática ($P=0,001$ e $P=0,020$) e a concentração da amostra com seu efeito linear ($P=0,006$).

O rendimento do processo de secagem foi influenciado pela temperatura de saída e pela concentração da amostra. Como pode ser observado nas Figuras 4.27 (A) e (B), a temperatura de saída foi um fator que influenciou diretamente o rendimento do processo de secagem e o aumento da temperatura pode ter levado ao baixo rendimento devido ao excipiente utilizado, manitol, poder ter se caramelizado a temperaturas mais altas que 100°C , promovendo a grande deposição de extrato seco na câmara de secagem.

Como já discutido no experimento preliminar, a concentração da amostra menor, por fornecer partículas com diâmetros de partículas menores, pode ter possibilitado a perda destas partículas juntamente com o ar de secagem no ciclone.

Figura 4.27 – Superfícies de resposta para rendimento do processo de secagem (θ) em função dos fatores: (A) vazãoda amostra (W_s) e temperatura de saída (T_s); (B) concentração da amostra (C_s) e temperatura de saída (T_s); (C) concentração da amostra (C_s) e vazãoda amostra (W_s). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.

4.4.3.5. Análise Estatística para Eficiência de Secagem (φ)

A Equação 4.12 é o modelo ajustado ($R^2 = 0,747$) obtido da análise estatística que relaciona a resposta, rendimento do processo de secagem, e seus fatores significativos codificados, a concentração da amostra (X_6) e vazãoda amostra (X_7).

$$\varphi = 107,070 - 6,502 X_7 - 6,901 X_6^2 \quad (4.12)$$

O fator concentração da amostra foi significativo afetando a resposta com o efeito quadrático ($P=0,016$) e a vazão da amostra com seu efeito linear ($P=0,004$).

Figura 4.28 – Superfícies de resposta para eficiência de secagem (ϕ) em função dos fatores: (A) vazão da amostra (W_s) e temperatura de saída (T_s); (B) concentração da amostra (C_s) e temperatura de saída (T_s); (C) concentração da amostra (C_s) e vazão da amostra (W_s). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.

Devido à eficiência de secagem estar relacionada diretamente ao vazão da amostra e este à razão entre a quantidade de amostra seca em um determinado tempo, é coerente que a concentração da amostra e o vazão da amostra sejam significativos para esta resposta. Como pode ser observado na Figura 4.28 (B) e (C), o efeito quadrático da concentração da amostra (C_s) é pronunciado apresentando a curvatura na superfície de resposta. Na Figura 4.28 (A) e (C), observa-se certa curvatura no eixo do vazão da amostra (W_s). Entretanto, seu efeito quadrático não foi significativo. Assim, a eficiência de secagem aumentou de maneira linear quando o valor do vazão da amostra era mais baixo.

Quando a concentração da amostra era menor havia maior quantidade de amostra a ser seca para ao final ter a mesma quantidade teórica de extrato seco em todos os ensaios.

Desta forma, para no final do processo de secagem obter aproximadamente 8 g de extrato seco, foi utilizado 250 g de Extrato Líquido a 2,5% m/m, 50 g de Extrato Líquido a 12,5% m/m e 28 g de Extrato Líquido a 22,5% m/m adicionados de 2 g de manitol. Assim, quando a quantidade de amostra a ser seca foi de 250 g ou de 28 g o tempo de secagem foi maior diminuindo a eficiência de secagem. É possível que o tempo para estas amostras foi maior devido à amplificação do erro na calibração do vazãoda amostra no aparelho ao secar maiores quantidades de amostra já que o controlador não era preciso e à maior viscosidade do Extrato Líquido a 22,5% m/m dificultando seu bombeamento para dentro da câmara de secagem.

4.4.3.6. *Análise Estatística para Diâmetro Médio de Partícula (d_{50})*

Não foi possível ajustar um modelo correlacionando os fatores estudados e o diâmetro médio de partícula ($R^2 = 0,000$). Assim, nenhum dos fatores foi significativo para esta resposta.

Isto pode ter ocorrido devido à agregação do pó acarretando resultados falsos do tamanho das partículas somado ao método de análise por tamisação que dificulta excluir os agregados antes de realizar a análise. Ou ainda a realmente não haver relação dos fatores estudados: concentração da amostra, vazãoda amostra e temperatura de saída com o tamanho da partícula dos extratos seco de *C. langsdoffii* utilizando manitol como excipiente.

4.4.3.7. *Análise Estatística para Degradação de Flavonóides totais, Quercetrina e Afzelina*

O modelo ajustado ($R^2 = 0,464$) para a degradação de flavonóides totais está representado pela Equação 4.13 obtido da análise estatística que relaciona a resposta, degradação de flavonóides totais, e seu fator significativo codificado, a concentração da amostra (X_6).

$$\delta_{FT} = 4,075 + 0,574 X_6 - 0,970 X_6^2 \quad (4.13)$$

O fator concentração da amostra foi significativo afetando a resposta com o efeito linear ($P=0,033$) e quadrático ($P=0,020$).

Figura 4.29 – Superfícies de resposta para degradação de flavonóides totais (δ_{FT}) em função dos fatores: (A) vazão da amostra (Ws) e temperatura de saída (Ts); (B) concentração da amostra (Cs) e temperatura de saída (Ts); (C) concentração da amostra (Cs) e vazão da amostra (Ws). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.

Também foi possível obter um modelo ajustado ($R^2=0,593$) para a degradação de quercetrina representado pela Equação 4.14. A degradação de quercetrina apresentou como fator significativo a concentração da amostra com seu efeito quadrático ($P=0,004$).

$$\delta_Q = 2,887 - 1,508 X_6^2 \quad (4.14)$$

Figura 4.30 – Superfícies de resposta para degradação de quercetrina (δ_Q) em função dos fatores: (A) vazãoda amostra (W_s) e temperatura de saída (T_s); (B) concentração da amostra (C_s) e temperatura de saída (T_s); (C) concentração da amostra (C_s) e vazãoda amostra (W_s). Em cada superfície, o demais fator encontra-se no nível central.

Com estes resultados podemos observar que a concentração da amostra foi a que mais influenciou a degradação do marcador químico quercetrina e dos flavonóides totais.

Isto pode ser observado tanto na Figura 4.29 quanto na Figura 4.30. Na Figura 4.29 (B) pode-se observar melhor o efeito linear do fator concentração da amostra enquanto que na Figura 4.29 (C) pode-se observar seu efeito quadrático com o aumento exponencial da degradação de flavonóides totais ao diminuir a concentração da amostra (C_s). Já na Figura 4.30, as superfícies de resposta são em formato de pára-quedas demonstrando o efeito quadrático dos fatores. Entretanto, apenas o efeito quadrático da concentração da amostra (C_s) foi significativo. Isto pode ter ocorrido porque quando a concentração da amostra é baixa as partículas formadas na aspersão ficam mais susceptíveis a degradação.

Entretanto, o marcador químico afzelina não apresentou nenhum fator significativo à sua degradação apesar de ser um flavonol bastante semelhante à quercetrina.

Com as respostas que apresentaram algum fator significativo no processo de secagem, foi realizada a função desejabilidade selecionando valores com base na literatura e coerentes com os resultados obtidos como objetivo.

4.4.4. Otimização das Condições de Secagem

Os valores das respostas para se obter o ponto ótimo das condições de secagem foram selecionados a partir dos resultados encontrados no Planejamento Box-Behnken. Os valores selecionados como baixo, alto e a resposta desejado para cada fator está apresentado na Tabela 4.22.

Tabela 4.22 – Valores estabelecidos para as respostas estudadas no processo de secagem para realizar a função desejabilidade.

Respostas	Objetivo	Valores			Peso
		Baixo	Alvo	Alto	
Densidade compactada	Maximizar	0,116	0,350	0,350	1
Índice de Carr	Minimizar	20	20	36	1
Ângulo de Repouso	Minimizar	7	7	21	1
Rendimento	Maximizar	4	60	60	1
Eficiência secagem	Alvo	93	100	116	1
Diâmetro médio partícula	Alvo	250	450	550	1
Degradação Flavonóides	Minimizar	0	0	6	1
Degradação Quercetrina	Minimizar	0	0	8	1
Degradação Afzelina	Minimizar	0	0	6	1

O ponto determinado pela função desejabilidade foi temperatura de saída de 80°C, vazão da amostra de 5,0 g/min e concentração da amostra de 20,7% m/m com valor de desejabilidade de 0,528. Este valor demonstra que o valor encontrado para os fatores fornecem valores não muito próximo dos objetivos estabelecidos para as respostas. Vale lembrar que as respostas consideradas foram nove dificultando a desejabilidade composta porque todas elas devem ser consideradas.

Tabela 4.23 – Valores previstos para as respostas estudadas na secagem em condições otimizadas.

Respostas	Resposta Prevista	Desejabilidade
Densidade compactada	0,255	0,592
Índice de Carr	29	0,434
Ângulo de Repouso	16	0,335
Rendimento	51	0,842
Eficiência secagem	108	0,522
Diâmetro médio partícula	283	0,166
Degradação Flavonóides	2,199	0,633
Degradação Quercetrina	1,531	0,809
Degradação Afzelina	0	1,000

5. Conclusão

Neste trabalho, foi possível otimizar as condições do processo de extração a partir das folhas de *C. langsdorffii* e do processo de secagem dos extratos líquidos através do emprego de planejamentos experimentais. Os planejamentos utilizados permitiram direcionar as condições de ambos os processos para a resposta desejada. No caso da extração, a resposta objetivada foi a maximização dos teores de sólidos solúveis, flavonóides totais, quercetrina e afzelina e no caso da secagem, a maximização das características relacionadas à fluidez e compactação. Desta forma, os processos otimizados permitiram obter extratos padronizados de *C. langsdorffii* e podem contribuir como modelo para otimizar outros processos e obter extratos padronizados de outras fontes vegetais.

Todavia, deve-se atentar que para a maximização de um conjunto de variáveis nem sempre as condições ótimas serão as mesmas que para outro conjunto de variáveis. Um exemplo foi observado no processo extrativo com a extração de sólidos solúveis, flavonóides totais, quercetrina e afzelina que apresentam tendência oposta ao rendimento de sólidos solúveis. Ademais, quanto maior o número de respostas estudadas maior a dificuldade de se encontrar a condição ótima em que se possa observar a maximização de todas as respostas objetivadas. Como exemplo, teve-se a otimização das condições do processo de secagem, onde haviam nove respostas estudadas e a desejabilidade composta foi de 52,8%, enquanto que no processo extrativo, onde foram estudadas quatro respostas, a função desejabilidade foi de 92,8%.

De qualquer maneira, a função desejabilidade foi essencial para definir as condições ótimas do processo extrativo por maceração dinâmica que apresentaram baixa temperatura e curto tempo de extração sendo provavelmente viável para aplicação em escala industrial. No entanto, apesar das relações complexas de extração demonstradas neste trabalho, o processo extrativo por maceração dinâmica foi adequado aos objetivos propostos apresentando bons resultados.

No processo de secagem, o excipiente manitol foi o que forneceu melhor característica para o extrato seco de *C. langsdorffii* e a secagem em *spray dryer* foi adequada, pois possibilitou obter um extrato com boas características físicas, físico-químicas e farmacotécnicas possibilitando obter formas farmacêuticas sólidas como cápsulas e possivelmente comprimidos por compressão direta.

O método de quantificação dos marcadores químicos da *C. langsdorffii* por CLAE foi adequado, pois apresentou linearidade, precisão, exatidão e robustez para os dois tipos de formas farmacêuticas desenvolvidas: extrato líquido e extrato seco.

Assim, é possível concluir que, a inserção de planejamentos experimentais no desenvolvimento farmacotécnico bem como a utilização de um método de análise confiável foram de fundamental importância para que se pudesse avaliar criticamente quais são os principais parâmetros a serem controlados na produção de extratos padronizados não somente em escala laboratorial, mas quiçá em escala industrial.

6. Referências

- ABDULLAH, E. C. e GELDART, D. The use of bulk density measurements as flowability indicators. **Powder Technology**, v. 102, p. 151-165, 2003.
- ALONSO, J. **Tratado De Fitofármacos Y Nutracéuticos**. Suipacha, Argentina, Editora: Corpus, p. 381c-383c, 2004.
- ALVES, J. M.; MUNARI, C. C.; MONTEIRO NETO, M. A. B.; BASTOS, J. K. e TAVARES, D. C. **Efeito protetor do extrato hidroalcoólico das partes aéreas da *Copaifera langsdorffii* contra danos induzidos por doxorubicina em sangue periférico** (Resumos). http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/resumos_index.asp# Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, SP, Brasil. 55., 2009.
- AMERI, M. e MAA, Y-F. Spray drying of biopharmaceuticals: stability and process considerations. **Drying Technology**, v. 24, p. 763-768, 2006.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G. e ALLEN-JR, L. V. **Farmacotécnica: formas de liberação e sistemas de liberação de fármacos**. 6 ed. Baltimore, EUA. Editora: Editorial Premier. Cap. 5, p. 175-250, 2000.
- ARTILES-LEÓN, N. e MELLA-CABRERA, F. Improvement of igniters' quality characteristics using experimental design. **Computers and Industrial Engineering**, v. 33, p. 145-148, 1997.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre, RS. Editora: Artmed. Cap. 10, p. 162-176 e 14, p. 208-222, 2005.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 114-117, 2005.
- BARROS-NETO, B; SCARMINIO, I. S. e BURNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Campinas, SP. Editora: UNICAMP, 1996.
- BERTHOLD, W. e LOFFLER, U. Safety characteristics and their significance for the design and operation of chemical plants. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 33, p.178-183, 1993.

BLAZÚS, M. A. **Estrutura e organização da cadeia de suprimento de insumos para fitoterápicos**. 2008, 100 f. Dissertação (Mestrado em Administração) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BLUMENTHAL, M.; BUSSE, W. R.; GOLDBERG, A.; GRUENWALD, J.; HALL, T.; RIGGINS, C. W. e RISTER, R. S. **The complete german commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines**. 1a ed. Austin, EUA, Editora: American Botanical Council. Cap. 1, p. 5-57, 1998.

BOX, G. E. P. e BEHNKEN D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometric**, v. 2, p. 455-475, 1960.

BRANCALION, A. P. S. Estudo fitoquímico e investigação da atividade antitumoral do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Copaifera langsdorffii*. 2010. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**". Diário Oficial da União, Brasília, DF, jun., 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 48, de 16 de março de 2004. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, abril, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 5, de 11 de dezembro de 2008. Determina a publicação da "**Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado**". Diário Oficial da União, Brasília, DF, dez., 2008.

BRUSCHI, M. L.; CARDOSO, M. L. C.; LUCHESI, M. B. e 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.

BUENO, P. C. P. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica em cromatografia gasosa para controle de qualidade de *Eucalyptus globulus* e seus produtos: planta, extratos, óleo essencial e xarope de eucalipto. 2007 102 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

BURSALI, N.; ERTUNC, S. e AKAY B. Process improvement approach to the saponification reaction by using statistical experimental design. **Chemical Engineering and Processing**, v. 45, p. 980-989, 2006.

- CACACE, J. E. e MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 379-389, 2003.
- CALIXTO J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Bsiological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.
- CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C. e MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p. S58-S65, 2000.
- CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A. e PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fi totorápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 314-319, 2008.
- CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP Editora: Tecmedd. Cap. 14, p. 221-256, 2004.
- CASCON, V. e GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyerand *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, p. 773-778, 2000.
- CHIRINOS, R.; ROGEZ, H.; CAMPOSA, D.; PEDRESCHI, R. e LARONDELLE, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, v. 55, p. 217-225, 2007.
- CONTINI, M.; BACCELLONI, S.; MASSANTINI, R.e ANELLI, G. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. **Food Chemistry**, v. 110, p. 659-669, 2008.
- COSTA, A. R. M.; MARQUIAFÁVEL, F. S.; VAZ, M. M. L. O. L.; ROCHA, B. A.; BUENO, P. C. P.; AMARAL P. L. M.; BARUD, H. S. e BERRETA-SILVA, A. A. Quercetin-PVP K25 solid dispersions: preparation, thermal characterization and antioxidant activity. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, doi 10.1007/s10973-010-1083-3, 2010.
- COUTO, R. O.; ARAÚJO, R. R.; TACON; L. A.; CONCEIÇÃO, E. C.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. e FREITAS, L. A. P. Development of a phytopharmaceutical intermediate product via spray drying. **Drying Technology**, v. 29, p. 709- 718, 2011.
- DENNY, C.; ZACHARIAS, M. E.; KOHN, L. K.; FOGGIO, M. A. e CARVALHO, J. E. Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 598, 2007.

DERRINGER, G. e SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214-219, 1980.

DIOUF, P. N.; STEVANOVICA, T. e BOUTIN, Y. The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 297-303, 2009.

DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analytical Chemistry**, v.31, p.1184-1187, 1959.

FAN, G.; HAN, Y. e GU, Z. e CHEN, D. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). **LWT**, v. 41, p. 155-160, 2008.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, V ed, Brasília, 2010.

FERNANDES, C. A. D; NAKASHIMA, T. e SERRA, G. E. Novas contribuições ao estudo da galactomanana bruta extraída de sementes de *Senna spectabilis* DC. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 353-358, 2004.

FERRARI, M.; PAGNONI, U. M.; PELIZZONI, F.; LUKES, V. e FERRARI, G. Terpenoids from *Copaifera langsdorffii*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 905-907, 1971.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S. e DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Química Nova**, v. 597, p. 179-186, 2007.

FRANCIS, F; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. M; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S; SZAKACS, G. e PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 15, p. 107-115, 2003.

FREITAS, L. A. P.; ANDRADE, T. C.; TEIXEIRA, C. C. C., TACON, L. A. e TSUKADA, M. Innovative applications of spray drying. In: JOSÉ, M. J. S. **Advances in chemical engineering**, Kerala, Editora: Transworld Research Network, 2010. Cap. 1, p. 1-13.

GANESAN, V.; K. A. ROSENTRATER e MUTHUKUMARAPPAN, K. Flowability and handling characteristics of bulk solids and powders – a review with implications for DDGS. **Biosystems Engineering**, v. 101, p. 425- 435, 2008.

GONNISSEN, Y.; REMON, J. P. e VERVAET, C. Development of directly compressible powders via co-spray drying. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 220- 226, 2007.

GONNISSEN, Y.; VERHOEVEN, E.; PEETERS, E.; REMON, J. P. e VERVAET, C. Coprocessing via spray drying as a formulation platform to improve the compactability of various drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 320-334, 2008.

GRUENWALD, J. BRENDLER. T e JAENICKE, C. **PDR for Herbal Medicines**, 2a ed. Editora: Medical Economics, Montvale, New Jersey, EUA, p. 220, 2000.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HU, Z.; CAI, M. e LIANG, H. Desirability function approach for the optimization of microwave-assisted extraction of saikosaponins from *Radix bupleuri*. **Separation and Purification Technology**, v. 61, p. 266-275, 2008.

HUANG, W.; XUE, A.; NIU, H.; JIA, Z. e WANGA, J. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1147-1154, 2009.

IMBEAUD, S. e AUFFRAY, C. ‘The 39 steps’ in gene expression profiling: critical issues and proposed best practices for microarray experiments. **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 1175-1182, 2005.

JACQUES, R. A.; FREITAS, L. S.; PÉREZ, V. F.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA, J. V. e CARAMÃO, E. B. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: a comparison with maceration. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, p. 6-12, 2007.

KERR, M. K. e CHURCHILL, G. A. Experimental design for gene expression microarrays. **Biostatistics**, v. 2, p. 183-201, 2001.

KIM, H. J.; CHOI, S. E.; PARK, K. H.; CHOI, H. K.; LEE, M. W e KIM, S. K. Anti-oxidative and inhibitory activities on nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (COX-2) production of flavonoids from seeds of *Prunus tomentosa* Thunberg. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, p. 424-8, 2008.

KOESTER, L. S.; XAVIER, C. R.; MAYORGA, P. e BASSANI, V. L. Avaliação da complexação de carbamazepina com β -ciclodextrina e obtenção em escala laboratorial e semi-

industrial de complexo em estado sólido. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, p. 187-92, 2004.

KOPLEMAN, S. H.; AUGSBURGER L. L.; NGUYENPHO, A.; ZITO, W. S. e MULLER, F. X. Selected physical and chemical properties of commercial *Hypericum perforatum* extracts relevant for formulated product quality and performance. **AAPS PharmSci**, v.3, p. 1-18, 2001.

KWON, E. K.; LEE, D. Y.; LEE, H.; KIM, D. O.; BAEK, N. I.; KIM, Y. E. e KIM, H. Y. Flavonoids from the buds of *Rosa damascena* inhibit the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase and angiotensin I-converting enzyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 882-6, 2010.

LABMAQ do Brasil Ltda. **Manual de Operações do Mini-Spray Dryer MSD 0.5**. Depto de Engenharia, 2003.

LANGENHEIM, J. H.; CONVIS, C. L.; MACEDO, C. A. e STUBBEBLINE, W. H. *Hymenaea* and *Copaifera* leaf sesquiterpenes in relation to lepidopteran herbivory in southeastern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, p. 41-49, 1986a.

LANGENHEIM, J. H.; MACEDO, C. A.; ROSS, M. K. e STUBBLEBINE, W. H. Leaf development in the tropical leguminous tree *Copaifera* in relation to microlepidopteran herbivory. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, p. 51-59, 1986b.

LEAF, G. e ZATMAN, L. J. A study of the conditions under which methanol may exert a toxic hazard in industry. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 9, p. 19-31, 1952.

LEE, S. Y.; MIN, B. S.; KIM, J. H.; LEE, J.; KIM, T. J.; KIM, C. S.; KIM, Y. H. e LEE, H. K. Flavonoids from the leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 273-6, 2005.

LEON, A. C. Two clinical trial designs to examine personalized treatments for psychiatric disorders. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 72, p. 593-537, 2010.

LEVIGNE, S.; RALET, M-C. e THIBAUT, J-F. Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using na experimental design. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 145-153, 2002.

LEWIS, J. e SJÖSTROM, J. Optimizing the experimental design of soil columns in saturated and unsaturated transport experiments. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 115, p. 1-13, 2010.

- LI, J. Factorial Designs. **Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics**, v.1, p. 364-378, 2003.
- LIAO, Z-G.; WANG, G-F.; LIANG, X-L.; ZHAO, G-W. e JIANG, Q-Y. Optimization of microwave-assisted extraction of active components from *Yuanhu zhitong* prescription. **Separation and Purification Technology**, v. 63, 424-433, 2008.
- LIMA, I. M. S.; ALVES, J. M.; SENEDESE, J. M.; ARAUJO, G. R.; BASTOS, J. K. e TAVARES, D. C. **Estudo in vitro do potencial mutagênico e/ou antimutagênico do extrato da copaíba através do ensaio do micronúcleo** (Resumos). http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/resumos_index.asp#. Águas de Lindóia, SP, Brasil. Congresso Brasileiro de Genética, 55., 2009.
- LIST, P. H. e SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. Londres, 1989.
- LIU, R-S e TANG, Y-J. Tuber melanosporum fermentation medium optimization by Plackett-Burman design coupled with Draper-Lin small composite design and desirability function. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3139-3146, 2010.
- LOPES FILHO, J. F. Avaliação da maceração dinâmica do milho após um curto período de hidratação e subsequente quebra do pericarpo do grão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, p. 322, 1999.
- LUTHRIA, D.; BISWAS, R. e NATARAJAN, S. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. **Food Chemistry**, v. 105, p. 325-333, 2007.
- MAAS, S. G.; SCHALDACH, G.; LITTRINGER, E. M.; MESCHER, A.; GRIESSER, U. J.; BRAUN, D. E.; WALZEL, P. E. e URBANETZ, N. A. The impact of spray drying outlet temperature on the particle morphology of mannitol. **Powder Technology**, doi: 10.1016/j.powtec.2011.06.024, 2011.
- MACEDO, C. A. e LANGENHEIM, J. H. A further investigation on leaf sesquiterpenes variation in relation to herbivory in two Brazilian populations of *Copaifera langsdorffii*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 17, p. 207-216, 1989a.
- MACEDO, C. A. e LANGENHEIM, J. H. Microlepidopteran herbivory in relation to leaf sesquiterpenes in *Copaifera langsdorffii* adult trees and their seedling progeny in a Brazilian woodland. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 17, p. 217-224, 1989b.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR., V. F.; GRYNBERG, N. F. e ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MHRA. **Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency**. Disponível em <<http://www.mhra.gov.uk/Howweregulate/Medicines/Herbalmedicines/>>. Acesso em: 28 ago. 2011.

MIN, B. S.; LEE, S. Y.; KIM, J. H.; LEE, J. K.; KIM, T. J.; KIM, D. H.; KIM, Y. H.; JOUNG, H.; LEE, H. K.; NAKAMURA, N.; MIYASHIRO, H. e HATTORI, M. Anti-complement activity of constituents from the stem-bark of *Juglans mandshurica*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 1042-4, 2003.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMIGUEZ, J. M.; SINEIRO, J. S.; DOMINGUEZ, H.; NUÑEZ, M. J. e PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

MUTHUKUMAR, M.; MOHAN, D. e RAJENDRAN, M. Optimization of mix proportions of mineral aggregates using Box-Behnken design of experiments. **Cement & Concrete Composites**, v. 25, p. 751-758, 2003.

MYERS, W. R. Response surface methodology. **Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics**, v. 1, p. 858-869, 2003.

NIST/SEMATECH **e-Handbook of Statistical Methods**. Disponível em <<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>>. Acesso em: 23 ago. 2011.

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

OHSAKI, A.; YAN, L. T.; ITO, S.; EDATSUGI, H.; IWATA, D. e KOMODA, Y. The isolation and the in vivo potent antitumor activity of cleoredane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desfon. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, p. 2889-2892, 1994.

OLIVEIRA, O. W. e PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 641-650, 2010.

ONG, E. S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 23-33, 2004.

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

PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; TOMÉ, A. R.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; SANTOSA, F. A. e RAO, V. S. N. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, p. 303- 307, 2003.

PHRMA. <<http://www.phrma.org.br>>. Acesso em 17 out. 2011.

PINELO, M.; ARNOUS, A. e MEYER, A. A. S. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 579-590, 2006.

PINELO, M.; DEL FABBRO, P.; MANZOCCO, L.; NUÑEZ, M. J. e NICOLI, M. C. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. **Food Chemistry**, v. 92, p. 109-117, 2005.

PINELO, M.; SINEIRO, J. e NUÑEZ, M. J. Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 57-63, 2006.

PIZARRO, C.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M. e PÉREZ-DEL-NOTARIO, N. Multiple response optimisation based on desirability functions of a microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of chloroanisoles and chlorophenols in oak barrel sawdust. **Journal of Chromatography A**, v. 1132, p. 8-14, 2006.

POMPEU, D. R.; SILVA, E. M. e ROGÉZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, doi:10.1016/j.biortech.2009.03.083, 2009.

PORTAL ACTION. Disponível em <<http://www.portalaction.com.br>>. Acesso em 18 out. 2011.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C. e MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**, 4 ed, v. 2, 1995.

PROMMUAK, C.; DE-EKNAMKUL, W. e SHOTIPRUK, A. Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. **Separation and Purification Technology**, v. 62, p. 444-448, 2008.

REGASINI, L. O.; VELLOSA, J. C.; SILVA, D. H.; FURLAN, M.; de OLIVEIRA, O. M.; KHALIL, N. M.; BRUNETTI, I. L.; YOUNG, M. C.; BARREIRO, E. J. e BOLZANI, V. S. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1739-44, 2008.

- RHO, H. S.; AHN, S. M.; LEE, B. C.; KIM, M. K.; GHIMERAY, A. K.; JIN, C. W. e CHO, D. H. Changes in flavonoid content and tyrosinase inhibitory activity in kenaf leaf extract after far-infrared treatment. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 7534-6, 2010.
- RIBANI, M.;BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. e MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J. e OWEN, S. C. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 5a ed., London/ Chicago, 2006.
- SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P., VEIGA JUNIOR, V. F. , PINTO, A. C. e NAKAMURA, C. V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 277-81, 2008.
- SCHWARTZ, S. S. e GOODMAN, S. H. **Plastics Materials and Processes**, New York, EUA. Editora: Van Nostrand Reinhold Company Inc. ISBN 0-442-22777-9, p.547, 1982.
- SHEIBANI, A. e GHAZIASKAR, H. S. Pressurized fluid extraction of pistachio oil using a modified supercritical fluid extraction and factorial design for optimization. **LWT**, v. 41, p. 1472-1477, 2008.
- SILVA, M. I. G; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S. e SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 455-462, 2006.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. e PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 3a ed, Porto Alegre/Florianópolis. Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, Cap. 1, p.13-26, 2001.
- SINGH, J.; KAUR, L. e MCCARTHY, O. J. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications-a review. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1-22, 2007.
- SOUSA, J. P. B. ***Copaifera langsdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal**. 2011. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

TATKE, P. e JAISWAL, Y. An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 5, p. 21-31, 2011.

TEIXEIRA, C. C. C.; TEIXEIRA, G. A. e FREITAS, L. A. P. Spray drying of extracts from red yeast fermentation broth. **Drying Technology**, v. 29, p. 342- 350, 2010.

TEUNOU, E. e FITZPATRICK, J. J. Effect of relative humidity and temperature on food powder flowability. **Journal of Food Engineering**, v. 42, p. 109-116, 1999.

THE PUBCHEM PROJECT. Disponível em <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 15 ago. 2011.

USP XXX. **United States Pharmacopeia**, 31a ed. United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, 2008.

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

VEHRING, R.; FOSS, W. R. e LECHUGA-BALLESTEROS, D. Particle formation in spray drying. **Aerosol Science**, v. 38, p. 728-746, 2007.

VEIGA JÚNIOR, V. F. *Copaifera* sp Linné. In: AMARAL, A. C. F.; SIMÕES, E. V. e FERREIRA, J. L. P. **Coletânea científica de plantas de uso medicinal**, Rio de Janeiro, RJ, Editora: Fiocruz, p. 34-57, 2005.

VEIGA JÚNIOR, V. F. e PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, p. 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O. e PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of *Copaiba* oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne- A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 248-254, 2007.

VILEGAS, J. H. Y.; MARCHI, E. e LANÇAS, F. M. Extraction of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* ('guaco') leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 266-270, 1997.

WALTON, D. E. e MUMFORD, C. J. The morphology of spray-dried particles: the effect of process variables upon the morphology of spray-dried particles. **Trans IChemE**, v. 77, p. 442-460, 1999.

WALTON, D. E. The morphology of spray-dried particles: a qualitative view. **Drying Technology**, v. 18, p. 1943- 1986, 2000.

WANG, J.; HEIJDEN, R.; SPRUIT, S.; HANKERMEIER, T.; CHAN, K.; GREEF, J.; XU, G. e WANG, M. Quality and safety of Chinese herbal medicines guided by a systems biology perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 31-41, 2009.

WANG, S. e LANGRISH, T. A review of process simulations and the use of additives in spray drying. **Food Research International**, v. 42, p. 13-25, 2009.

WILLERS, J. L.; MILLIKEN, G. A.; JENKINS, J. N.; O'HARA, C. G.; GERARD, P. D.; REYNOLDS, D. B.; BOYKIN, D. L.; GOOD, P. V. e HOOD, K. B. Defining the experimental unit for the design and analysis of site-specific experiments in commercial cotton fields. **Agricultural Systems**, v. 96, p. 237-249, 2008.

XU, G. H.; RYOO, I. J.; KIM, Y. H.; CHOO, S. J. e YOO, I. D. Free radical scavenging and antielastase activities of flavonoids from the fruits of *Thuja orientalis*. **Archive of Pharmacal Research**, v. 32, p. 275-82, 2009.

YOKOZAWA, T; DONG, E.; KAWAI, Y.; GEMBA, M. e SHIMIZU, M. Protective effects of some flavonoids on the renal cellular membrane. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 51, p. 9-14, 1999.

YOSHINARI, T.; FORBES, R. T.; YORK, P. e KAWASHIMA, Y. The improved compaction properties of mannitol after a moisture-induced polymorphic transition. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, p. 121-131, 2003.

ZHAO, Z.; LIANG, L.; CHAN, K.; LU, G.; LEE, E. L. M.; CHEN, H. e LI, L. A Unique issue in the standardization of chinese materia medica: processing. **Planta Medica**, v. 76, p. 1975-1986, 2010.