UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Sistemas microestruturados contendo extratos de *Chamomilla recutita* L.
para aplicações dermocosméticas**

Simone Vieira Pereira

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Sistemas microestruturados contendo extratos de *Chamomilla recutita* L.
para aplicações dermocosméticas**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Simone Vieira Pereira

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas

Ribeirão Preto
2015

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.

Simone Vieira Pereira

Sistemas microestruturados contendo extratos de *Chamomilla recutita* L. para aplicações dermocosméticas. Ribeirão Preto, 2015.

148 p.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Freitas, Luis Alexandre Pedro de

1. *Spray drying*. 2. *Spray freeze drying*. 3. Camomila. 4. Quitosana. 5. Micropartículas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Simone Vieira Pereira

Sistemas microestruturados contendo extratos de *Chamomilla recutita* L. para aplicações dermocosméticas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico às pessoas mais especiais em minha vida, meus pais, Edna e Valmir, meu noivo, Fábio e meu irmão, Rodrigo. Eles sempre estiveram ao meu lado me incentivando, me apoiando, fazendo o possível para que meus sonhos se realizassem. Sem eles não teria chegado até aqui.

Agradecimientos

À Deus pela dádiva da vida e por me guiar e me ensinar a vencer os obstáculos ao invés de parar diante deles.

Aos meus pais, Edna e Valmir, pelo amor incondicional, dedicação, incentivo, apoio e presença constante em minha vida. Eles me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com honestidade, dignidade e sinceridade. Foram sempre meus melhores amigos, a base da minha vida, meu porto seguro.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas, pelos valiosos ensinamentos, palavras sábias, atenção, paciência, compreensão, acolhimento, confiança e amizade. Agradeço também por ter me ensinado não só questões e conceitos relacionados aos conhecimentos técnicos e científicos, mas também lições de vida.

Ao meu noivo Fábio, pelo amor, carinho, paciência, apoio e dedicação. Por estar sempre ao meu lado me apoiando, ajudando, ouvindo e alegrando minha vida. Por compartilhar comigo momentos felizes, mas também por estar ao meu lado em momentos difíceis e tristes me acalmando e confortando com suas palavras sábias.

Ao meu irmão, Rodrigo, pelo amor, amizade sincera, ajuda e força sempre que precisei. Por estar sempre presente e me querer tão bem.

Aos meus avós e toda a minha família que mesmo longe sempre me apoiaram e torceram por mim.

Aos amigos de vários anos, Juliana Maria, Daiane, Bia, Luciana, Marcela, Rodrigo e Ana Rita por estarem comigo a tantos anos, dividindo grandes e importantes momentos. Obrigada pelo amor, apoio, força, ajuda, compreensão e amizade.

Aos meus amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Física Industrial pela amizade, carinho e ajuda durante todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes e sua equipe do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), pela ajuda com os estudos cromatográficos.

Aos técnicos de laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto por toda a ajuda na execução deste trabalho. Agradeço em especial aos técnicos: Aurea Donizeti Lanchote, Luiz Henrique Cenzi, Izabel Cristina Casanova Turatti, José Carlos Tomaz e Jacqueline Nakau Mendonça que além de sempre me ajudar, se tornaram grandes amigos e colegas de trabalho.

Aos funcionários da seção de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Eleni, Rafael e Rosana, pela dedicação, ajuda e assistência.

Às professoras, Maria José Vieira Fonseca e Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, pelas valiosas sugestões e dicas que contribuíram para o enriquecimento e melhoria deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido.

Á todos, que direta ou indiretamente, participaram desta etapa e contribuíram para a realização deste trabalho,

Muito Obrigada!

RESUMO

PEREIRA, S. V. **Sistemas microestruturados contendo extratos de *Chamomilla recutita* L. para aplicações dermocosméticas.** 2015. 148f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A *Chamomilla recutita* L. é uma das plantas medicinais mais cultivadas no Brasil e no mundo. Os extratos da *C. recutita* são de interesse para as indústrias farmacêuticas e cosméticas, visto que estes apresentam atividades anti-inflamatória, antioxidante e adstringente. A ação terapêutica do extrato pode ser mais pronunciada que a ação terapêutica de um de seus ativos isolados. No entanto, a incorporação de um extrato em uma formulação pode ser difícil devido à baixa estabilidade dos extratos, bem como à possibilidade de gerarem instabilidade das formulações. Microencapsulando o extrato com um carreador é possível aumentar estabilidade do extrato quanto evitar instabilidade na formulação. Além disso, a microencapsulação é capaz de fornecer outras vantagens, como uma liberação controlada. Dois processos foram estudados como alternativas para a microencapsulação do óleo essencial e do extrato hidroalcoólico da *C. recutita* usando quitosana como carreador: o *spray drying* e o *spray freeze drying*. Planejamentos fatoriais foram utilizados para determinar os fatores que mais influenciaram no diâmetro médio das micropartículas, eficiência de encapsulação e teor dos marcadores e rendimento do processo. A apigenina e a apigenina-7-glicosídeo foram usadas como marcadores do extrato hidroalcoólico e o óxido de bisabolol A foi usado como marcador do óleo essencial. Os processos de *spray drying* e *spray freeze drying* dos dois extratos foram otimizados e as micropartículas resultantes foram caracterizadas com relação ao diâmetro médio, rendimento do processo, teor e eficiência de encapsulação dos marcadores, atividade antioxidante *in vitro*, densidade, índice de Carr, fator de Hausner, umidade, morfologia, perfil de liberação *in vitro* e estabilidade. Os resultados mostraram que o processo de *spray drying* apresentou os melhores resultados para eficiência de encapsulação, com valores de aproximadamente 98%, 95% e 80% para apigenina, apigenina-7-glicosídeo e óxido de bisabolol A, respectivamente. As eficiências de encapsulação obtidas no processo de *spray freeze drying* foram de aproximadamente 59%, 58% e 38% para os mesmos marcadores, respectivamente. As micropartículas produzidas por *spray freeze drying* apresentaram formato irregular e poroso, enquanto as produzidas por *spray drying* apresentaram formato esférico e superfícies mais lisas, sem poros ou fissuras. Ao contrário do que ocorreu com o extrato hidroalcoólico, a perda do marcador do óleo foi elevada no processo de *spray drying*, com teor final de 35%. Os teores dos marcadores ficaram acima de 80% para o processo de *spray freeze drying* do óleo e acima de 90% para o extrato hidroalcoólico. As micropartículas produzidas por *spray drying* do extrato hidroalcoólico e do óleo e por *spray freeze drying* do extrato hidroalcoólico e do óleo apresentaram diâmetro médio de 5,1 μm , 5,0 μm , 31,0 μm e 96,4 μm , respectivamente. Ensaio de liberação *in vitro* mostraram que as micropartículas foram capazes de sustentar a liberação dos respectivos marcadores. Os estudos de permeação *in vitro* das micropartículas produzidas por *spray drying* do extrato hidroalcoólico também mostraram que estas foram capazes de sustentar a liberação. A microencapsulação proporcionou em todos os casos um aumento considerável da estabilidade. As micropartículas produzidas por *spray drying* do extrato hidroalcoólico apresentaram teores de marcadores no mínimo 50% maiores que o extrato puro após 90 dias. O *spray freeze drying* se mostrou como a melhor alternativa para produção de micropartículas de quitosana contendo o óleo essencial de *C. recutita*, enquanto o processo de *spray drying* se mostrou como uma ótima alternativa para microencapsulação do extrato hidroalcoólico da *C. recutita*.

Palavras-chave: *Spray drying*, *Spray freeze drying*, Camomila, Quitosana, Micropartículas

ABSTRACT

PEREIRA, S. V. **Microstructured systems containing *Chamomilla recutita* L. extract for dermocosmetic applications.** 2015. 148f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Chamomilla recutita L. is one of the most cultivated medicinal plants in Brazil and around the world. Its extracts are important to both the pharmaceutical and cosmetics industries due to its therapeutic applications, such as an anti-inflammatory, antioxidant, and astringent. The therapeutic effects of an extract may be more pronounced than those of an isolated active compound. However, the incorporation of an extract in a formulation is difficult due to the low stability of extracts and the potential instabilities they may cause in formulations. Microencapsulating an extract in a carrier is a potential way of increasing the stability of an extract and avoiding instabilities in a formulation. Compound microencapsulation also brings other advantages, such as controlled release rates. Two processes were studied as alternatives to microencapsulating *C. recutita* essential oil and *C. recutita* hydroalcoholic extract using chitosan as a carrier: spray drying and spray freeze drying. Factorial designs were used to determine which process factors most influence the mean diameter, encapsulation efficiency and content of the chemical markers, and process yield. Apigenin and apigenin-7-glucoside were used as chemical markers for the hydroalcoholic extract and bisabolol oxide A was used as the chemical marker for the essential oil. The spray drying and spray freeze drying processes for both the oil and hydroalcoholic extract were optimized and the resulting microparticles were further characterized to determine mean diameter, process yield, marker encapsulation efficiency and content, *in vitro* antioxidant activity, density, Carr index, Hausner factor, water content, morphology, *in vitro* release profiles and stability. The results showed spray drying had the best encapsulation efficiency results, with about 98%, 95% e 80% of the apigenin, apigenin-7-glucoside and bisabolol oxide A content, respectively, inside the microparticles. The encapsulation efficiencies obtained in the spray freeze drying process were about 59%, 58% e 38% for the same chemical markers, respectively. Microparticles produced by spray freeze drying were irregular and porous, whereas microparticles produced by spray drying were spherical and fairly smooth, without porous or cracks. Contrary to what happened with the hydroalcoholic extract, oil marker content was low for spray dried microparticles, with final content at 35%. Chemical markers contents were above 80% for the oil and above 90% for the hydroalcoholic extract in spray freeze dried microparticles. Spray dried microparticles containing extract and oil and spray freeze dried microparticles containing extract and oil had mean diameter of 5.1 μm , 5.0 μm , 31.0 μm and 96.4 μm , respectively. *In vitro* release profiles showed all microparticles were able to sustain their respective marker release rates. *In vitro* permeation studies of spray dried microparticles containing hydroalcoholic extract also showed sustained release rates for the corresponding markers. Microencapsulation also provided considerable increase in *C. recutita* hydroalcoholic extract stability and *C. recutita* essential oil stability. After 90 days spray dried microparticles containing hydroalcoholic extract presented marker content 50% higher than the pure hydroalcoholic extract. Spray freeze drying was the best alternative to produce chitosan microparticles containing *C. recutita* essential oil, while spray drying was shown to be an excellent way to microencapsulate *C. recutita* hydroalcoholic extract in chitosan.

Key-words: *Spray drying*, *Spray freeze drying*, Chamomile, Chitosan, Microparticles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da apigenina (a) e da apigenina-7-glicosídeo (b).	3
Figura 2 - Estrutura do óxido de bisabolol A.	4
Figura 3 - Estrutura da quitosana.....	8
Figura 4 - Esquema do processo de <i>spray drying</i> , onde BP é a bomba peristáltica, BN é o bico atomizador, e CA é a câmara de secagem (MARTINS, 2010).	9
Figura 5 - Esquema do processo de <i>spray freeze drying</i> , onde C é o compressor, V é a válvula de pressão, N é o bico atomizador, L é o nitrogênio líquido, P é a bomba peristáltica, S é a amostra e F é o liofilizador (modificado de (KONDO et al., 2009))......	11
Figura 6 - Mini <i>spray dryer</i> MSD 0.5 (Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, Brasil).	27
Figura 7 - Esquema da célula de difusão vertical de Franz. (Adaptado de PermeGear. Disponível em: < http://www.permegear.com/franz.htm >. Acesso em 15 dez. 2014)......	43
Figura 8 - Distribuição granulométrica das inflorescências secas e moídas de <i>C. recutita</i>	47
Figura 9 - Influência dos fatores estudados no planejamento fatorial fracionário da extração sobre o teor de sólidos e o teor de flavonóides totais dos extratos hidroalcoólicos.	49
Figura 10 - Gráficos de superfície de resposta do teor de sólidos (TS) dos extratos hidroalcoólicos obtidos no planejamento composto central em função dos fatores porcentagem de etanol (P _E), porcentagem de planta (P _P) e temperatura de extração (T _E)......	53
Figura 11 - Gráficos de superfície de resposta do teor de flavonóides totais (TFT) dos extratos hidroalcoólicos obtidos no planejamento composto central em função dos fatores porcentagem de etanol (P _E), porcentagem de planta (P _P) e temperatura de extração (T _E)......	55
Figura 12 - Gráficos de superfície de resposta da atividade antioxidante <i>in vitro</i> (IC ₅₀) dos extratos hidroalcoólicos obtidos no planejamento composto central em função dos fatores porcentagem de etanol (P _E), porcentagem de planta (P _P) e temperatura de extração (T _E).	57
Figura 13 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico otimizado de <i>C. recutita</i> obtido por CLAE.	60
Figura 14 - Curvas de calibração com equação da reta e coeficiente de correlação linear (r) obtidas por CLAE para apigenina e apigenina-7-glicosídeo em metanol.	61
Figura 15 - Perfis cromatográficos do extrato hidroalcoólico de <i>C. recutita</i> (A), apigenina (B), apigenina-7-glicosídeo (C), micropartículas de quitosana contendo o extrato de <i>C. recutita</i> (D) e quitosana (E).	62
Figura 16 - Influência dos fatores estudados no planejamento fatorial fracionário do SDE.	68

- Figura 17 - Gráfico de superfície de resposta do rendimento do processo (R_e) de SDE em função da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE) e da temperatura de saída do ar de secagem (T). 71
- Figura 18 - Gráfico de superfície de resposta do diâmetro médio (D_{50}) das micropartículas produzidas por SDE, em função da temperatura de saída do ar de secagem (T) e da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE). 73
- Figura 19 - Gráfico de superfície de resposta da eficiência de encapsulação do processo de SDE, com relação à, a) apigenina (EE_{Ap}) e b) apigenina-7-glicosídeo (EE_{ApG}), em função da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE) e da temperatura de saída do ar de secagem (T). .. 75
- Figura 20 - Gráfico de superfície de resposta do teor de: a) apigenina (θ_{Ap}) e b) apigenina-7-glicosídeo (θ_{ApG}) nas micropartículas obtidas pelo processo de SDE, em função da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE) e da temperatura de saída do ar de secagem (T). 77
- Figura 21 - Gráfico de superfície de resposta do diâmetro médio (D_{50}) das micropartículas produzidas por SFDE, em função da vazão de alimentação da amostra (VA) e da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE). 81
- Figura 22 - Gráfico de superfície de resposta da eficiência de encapsulação do processo de SFDE, com relação à, a) apigenina (EE_{Ap}) e b) apigenina-7-glicosídeo (EE_{ApG}), em função da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE) e da vazão de alimentação da amostra (VA). 83
- Figura 23 - Gráfico de superfície de resposta do teor de: a) apigenina (θ_{Ap}) e b) apigenina-7-glicosídeo (θ_{ApG}) nas micropartículas obtidas pelo processo de SFDE, em função da vazão de alimentação da amostra (VA) e da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE). 85
- Figura 24 - Cromatograma do óleo essencial da *C. recutita* obtido por CG-EM. 86
- Figura 25 - Cromatograma do óleo essencial da *Anthemis nobilis* obtido por CG-EM. 87
- Figura 26 - Curvas de calibração com equação da reta e coeficiente de correlação linear (r) obtida por CG-EM para óxido de bisabolol A em hexano. 89
- Figura 27 - Gráficos de superfície de resposta do rendimento do processo (R_e) do SDO em função dos fatores fluxo do ar de secagem (FA), razão entre quitosana e óleo na amostra (QO) e temperatura de saída do ar de secagem (T). 93
- Figura 28 - Gráficos de superfície de resposta do diâmetro médio (D_{50}) das micropartículas obtidas por SDO em função dos fatores temperatura de saída do ar de secagem (T), razão entre quitosana e óleo na amostra (QO) e fluxo do ar de secagem (FA). 95
- Figura 29 - Gráfico de superfície de resposta da eficiência de encapsulação do óxido de bisabolol A (EE_{OB}) no processo de SDO em função da razão entre quitosana e óleo na amostra (QO) e da temperatura de saída do ar de secagem (T). 97
- Figura 30 - Gráficos de superfície de resposta do teor de óxido de bisabolol A (θ_{OB}) nas micropartículas produzidas por SDO em função dos fatores fluxo do ar de secagem (FA), temperatura de saída do ar de secagem (T) e razão entre quitosana e óleo na amostra (QO). 99

Figura 31 - Gráfico de superfície de resposta do diâmetro médio (D_{50}) das micropartículas obtidas por SFDO em função da razão entre quitosana e óleo na amostra (QO) e da amplitude do bico ultrassônico (AP).	102
Figura 32 - Gráfico de superfície de resposta do teor de óxido de bisabolol A (θ_{OB}) nas micropartículas obtidas por SFDO em função da amplitude do bico ultrassônico (AP) e da razão entre quitosana e óleo na amostra (QO).	105
Figura 33 - MEV das micropartículas obtidas por SDE nas condições otimizadas.	116
Figura 34 - MEV das micropartículas obtidas por SDO nas condições otimizadas.....	117
Figura 35 - MEV das micropartículas obtidas por SFDE nas condições otimizadas.	118
Figura 36 - MEV das micropartículas obtidas por SFDO nas condições otimizadas.	118
Figura 37 - MEV do material liofilizado referente à mistura de quitosana e extrato hidroalcoólico.	119
Figura 38 - MEV do material liofilizado referente à mistura de quitosana e óleo essencial..	119
Figura 39 - Perfis de liberação <i>in vitro</i> da apigenina-7-glicosídeo pelo extrato hidroalcoólico liofilizado (EXT), mistura liofilizada de quitosana e extrato (MLQE), micropartículas obtidas por <i>spray freeze drying</i> do extrato (MSFDE) e micropartículas obtidas por <i>spray drying</i> do extrato (MSDE).	120
Figura 40 - Perfis de liberação <i>in vitro</i> do óxido de bisabolol A pela mistura liofilizada de quitosana e óleo (MLQO), micropartículas obtidas por <i>spray freeze drying</i> do óleo (MSFDO) e micropartículas obtidas por <i>spray drying</i> do óleo (MSDO).	121
Figura 41 - Retenção da apigenina pelas micropartículas obtidas por <i>spray drying</i> do extrato (MSDE), micropartículas obtidas por <i>spray freeze drying</i> do extrato (MSFDE), mistura liofilizada de quitosana e extrato (MLQE) e extrato hidroalcoólico liofilizado (EXT) nas temperaturas de 25°C e 40°C.	122
Figura 42 - Retenção da apigenina-7-glicosídeo pelas micropartículas obtidas por <i>spray drying</i> do extrato (MSDE), micropartículas obtidas por <i>spray freeze drying</i> do extrato (MSFDE), mistura liofilizada de quitosana e extrato (MLQE) e extrato hidroalcoólico liofilizado (EXT) nas temperaturas de 25°C e 40°C.....	122
Figura 43 - Retenção do óxido de bisabolol A pelas micropartículas obtidas por <i>spray drying</i> do óleo (MSDO), micropartículas obtidas por <i>spray freeze drying</i> do óleo (MSFDO), mistura liofilizada de quitosana e óleo (MLQO) e óleo puro (OP) nas temperaturas de 25°C e 40°C.	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}) utilizado na extração com os fatores estudados e seus níveis na forma codificada e não codificada.	20
Tabela 2 - Planejamento composto central utilizado na extração com os fatores estudados e seus níveis na forma codificada e não codificada.	21
Tabela 3 - Fluxo e gradiente de eluição da fase móvel do método cromatográfico usado para quantificação dos marcadores do extrato hidroalcoólico.	24
Tabela 4 - Planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}) utilizado no processo de SDE, com os fatores estudados e seus níveis na forma codificada e não codificada.	29
Tabela 5 - Planejamento fatorial completo (3^2+2) utilizado no processo de SDE, com os fatores estudados e seus níveis na forma codificada e não codificada.	30
Tabela 6 - Planejamento fatorial completo (3^2) utilizado no processo de SFDE.	31
Tabela 7 - Planejamento Box-Behnken usado no processo de SDO, com os fatores estudados e seus níveis na forma codificada e não codificada.	33
Tabela 8 - Planejamento fatorial completo (3^2), usado no processo de SFDO, com os fatores estudados e seus níveis na forma codificada e não codificada.	35
Tabela 9 - Resultados obtidos para as respostas estudadas no processo de extração do extrato hidroalcoólico de <i>C. recutita</i> seguindo o planejamento composto central.	51
Tabela 10- Análises estatísticas do teor de sólidos (TS) dos extratos hidroalcoólicos em função dos fatores estudados no processo de extração pelo planejamento composto central.	52
Tabela 11 - Análises estatísticas do teor de flavonóides totais (TFT) dos extratos hidroalcoólicos em função dos fatores estudados no processo de extração pelo planejamento composto central.	54
Tabela 12 - Análises estatísticas da atividade antioxidante (IC_{50}) dos extratos em função dos fatores estudados no processo de extração pelo planejamento composto central.	57
Tabela 13 - Condições ótimas obtidas para o processo extrativo, com relação aos fatores estudados no planejamento composto central.	58
Tabela 14 - Comparação entre os valores preditos e os valores obtidos nas condições ótimas do processo extrativo com relação às respostas avaliadas.	59
Tabela 15 - Concentrações de apigenina (C_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (C_{ApG}) obtidas no extrato hidroalcoólico otimizado nas repetições realizadas nos dias 1, 2 e 3.	63
Tabela 16 - Média (M), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) resultantes das concentrações de apigenina (C_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (C_{ApG}) obtidas no extrato hidroalcoólico otimizado nas repetições realizadas nos dias 1, 2 e 3.	63

Tabela 17 - Recuperação do padrão de apigenina adicionado às soluções de extrato hidroalcoólico otimizado.	64
Tabela 18 - Recuperação do padrão de apigenina-7-glicosídeo adicionado às soluções de extrato hidroalcoólico otimizado.	64
Tabela 19 - Valores de precisão e exatidão obtidos para baixas concentrações de apigenina e apigenina-7-glicosídeo para a determinação do limite inferior de quantificação do método para estes marcadores.	65
Tabela 20 - Resultados obtidos para as respostas estudadas no processo de SDE seguindo o planejamento fatorial completo.	69
Tabela 21 - Análises estatísticas do rendimento do processo (R_e) de SDE em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.	70
Tabela 22 - Análises estatísticas do diâmetro médio das micropartículas (D_{50}) obtidas no SDE em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.	72
Tabela 23 - Valores de p obtidos pelas análises estatísticas da eficiência de encapsulação da apigenina (EE_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (EE_{ApG}) no processo de SDE, em função dos fatores estudados pelo planejamento fatorial completo.	74
Tabela 24 - Valores de p obtidos pelas análises estatísticas do teor de apigenina (θ_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (θ_{ApG}) nas micropartículas obtidas pelo processo de SDE, em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.	76
Tabela 25 - Resultados obtidos para as respostas estudadas no processo de SFDE seguindo o planejamento fatorial completo.	79
Tabela 26 - Análises estatísticas do rendimento do processo (R_e) de SFDE em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.	80
Tabela 27 - Análises estatísticas do diâmetro médio das micropartículas (D_{50}) obtidas no processo de SFDE em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.	81
Tabela 28 - Valores de p obtidos pelas análises estatísticas da eficiência de encapsulação da apigenina (EE_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (EE_{ApG}) no processo de SFDE, em função dos fatores estudados pelo planejamento fatorial completo.	82
Tabela 29 - Valores de p obtidos pelas análises estatísticas do teor de apigenina (θ_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (θ_{ApG}) presente nas micropartículas obtidos por SFDE, em função dos fatores estudados pelo planejamento fatorial completo.	84
Tabela 30 - Dados complementares ao cromatograma de CG-EM do óleo essencial da <i>C. recutita</i>	86
Tabela 31 - Dados complementares ao cromatograma de CG-EM do óleo essencial da <i>Anthemis nobilis</i>	88
Tabela 32 - Resultados obtidos para as respostas estudadas no processo de SDO seguindo o planejamento Box-Behnken.	91

Tabela 33 - Análises estatísticas do rendimento do processo (R_e) de SDO em função dos fatores estudados no planejamento Box-Behnken.....	92
Tabela 34 - Análises estatísticas do diâmetro médio das micropartículas (D_{50}) obtidas no processo de SDO em função dos fatores estudados no planejamento Box-Behnken.....	94
Tabela 35 - Análises estatísticas da eficiência de encapsulação do óxido de bisabolol A (EE_{OB}) no processo de SDO em função dos fatores estudados no planejamento Box-Behnken.....	96
Tabela 36 - Análises estatísticas do teor de óxido de bisabolol A (θ_{OB}) nas micropartículas produzidas por SDO em função dos fatores estudados no planejamento Box-Behnken.....	98
Tabela 37 - Resultados obtidos para as respostas estudadas no processo de SFDO seguindo o planejamento fatorial completo.	100
Tabela 38 - Análises estatísticas do rendimento do processo (R_e) de SFDO em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.	101
Tabela 39 - Análises estatísticas do diâmetro médio (D_{50}) das micropartículas obtidas por SFDO em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.	101
Tabela 40 - Análises estatísticas da eficiência de encapsulação do óxido de bisabolol A (EE_{OB}) no processo de SFDO em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.	103
Tabela 41 - Análises estatísticas do teor de óxido de bisabolol A (θ_{OB}) nas micropartículas produzidas por SFDO em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.	104
Tabela 42 - Condições ótimas obtidas para os processos de SDE, SFDE, SDO e SFDO, com relação aos fatores estudados nos planejamentos fatoriais aplicados em cada processo.....	106
Tabela 43 - Comparação entre os valores preditos e os valores reais obtidos nas condições ótimas dos processos de SDE e SFDE, com relação às respostas avaliadas.	106
Tabela 44 - Comparação entre os valores preditos e os valores reais obtidos nas condições ótimas dos processos de SDO e SFDO, com relação às respostas avaliadas.	107
Tabela 45 - Quantidade de apigenina e apigenina-7-glicosídeo presentes no estrato córneo (EC) e na epiderme e derme (ED) após ensaio de permeação <i>in vitro</i>	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância por superfície de resposta
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Amplitude do bico ultrassônico
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DPPH	2,2-difenilpicrilhidrazil
D ₅₀	Diâmetro médio
EC	Estrato córneo
ED	Epiderme e derme
EE _{Ap}	Eficiência de encapsulação do processo com relação à apigenina
EE _{ApG}	Eficiência de encapsulação do processo com relação à apigenina-7-glicosídeo
EE _{OB}	Eficiência de encapsulação do processo com relação ao óxido de bisabolol A
FA	Fluxo do ar de secagem
FAC	Fluxo do ar comprimido
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FH	Fator de Hausner
IC	Índice de Carr
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% de DPPH
LIQ	Limite inferior de quantificação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MSR	Metodologia de superfícies de respostas
PAC	Pressão do ar comprimido
P _E	Porcentagem de etanol
P _P	Porcentagem de planta utilizada em relação ao solvente
QE	Razão entre quitosana e extrato hidroalcoólico na amostra
QO	Razão entre quitosana e óleo essencial na amostra
R _e	Rendimento do processo
SDE	<i>Spray drying</i> do extrato hidroalcoólico
SDO	<i>Spray drying</i> do óleo essencial

SFDE	<i>Spray freeze drying</i> do extrato hidroalcoólico
SFDO	<i>Spray freeze drying</i> do óleo essencial
<i>Span</i>	Polidispersividade
T	Temperatura de saída do ar de secagem
T _E	Temperatura de extração
t _E	Tempo de extração
TFT	Teor de flavonóides totais
TS	Teor de sólidos
V	Velocidade de agitação
VA	Vazão de alimentação da amostra
θ_{Ap}	Teor de apigenina
θ_{ApG}	Teor de apigenina-7-glicosídeo
θ_{OB}	Teor de óxido de bisabolol A

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. <i>Chamomilla recutita</i>	2
1.2. Microencapsulação	5
1.2.1. Micropartículas e suas aplicações farmacêuticas e cosméticas	5
1.2.2. Carreadores	6
1.2.3. Processos para a produção de micropartículas	9
1.3. Planejamento experimental e otimização de processos	11
1.3.1. Metodologia de superfície de resposta	13
1.3.2. Função Desejabilidade.....	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivos gerais	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Obtenção do material vegetal	19
3.2. Distribuição granulométrica das inflorescências.....	19
3.3. Índice de intumescência das inflorescências	19
3.4. Extração	19
3.4.1. Procedimento	19
3.4.2. Estudo do processo extrativo.....	20
3.4.3. Otimização do processo extrativo.....	22
3.5. Caracterização dos extratos hidroalcoólicos.....	22
3.5.1. Teor de sólidos.....	22
3.5.2. Flavonóides totais	22
3.5.3. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	23
3.5.4. Densidade	23
3.6. Método cromatográfico para quantificação dos marcadores do extrato hidroalcoólico...24	

3.6.1. Validação do método cromatográfico.....	24
3.7. Produção das micropartículas contendo o extrato	27
3.7.1. <i>Spray drying</i> do extrato hidroalcoólico	27
3.7.2. <i>Spray freeze drying</i> do extrato hidroalcoólico.....	30
3.8. Método cromatográfico para caracterização do óleo essencial e quantificação do marcador do mesmo.....	31
3.9. Produção das micropartículas contendo o óleo essencial	32
3.9.1. <i>Spray drying</i> do óleo essencial	33
3.9.2. <i>Spray freeze drying</i> do óleo essencial.....	34
3.10. Otimização dos processos de produção das micropartículas.....	35
3.11. Obtenção do material liofilizado contendo as frações de <i>C. recutita</i>	36
3.12. Caracterização dos processos e das micropartículas	36
3.12.1. Rendimento dos processos.....	36
3.12.2. Distribuição granulométrica das micropartículas	37
3.12.3. Teor dos marcadores nas micropartículas	37
3.12.4. Eficiência de encapsulação dos processos	38
3.12.5. Atividade antioxidante <i>in vitro</i> das micropartículas.....	39
3.12.6. Densidade das micropartículas	39
3.12.7. Índice de Carr e Fator de Hausner das micropartículas	40
3.12.8. Umidade das micropartículas	40
3.12.9. Morfologia das micropartículas	40
3.12.10. Liberação <i>in vitro</i> das frações de <i>C. recutita</i> a partir das micropartículas	41
3.12.11. Estabilidade das micropartículas	42
3.13. Estudos preliminares de permeação cutânea <i>in vitro</i>	42
3.14. Análises estatísticas	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. Obtenção do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial.....	47
4.2. Distribuição granulométrica das inflorescências.....	47
4.3. Índice de intumescência das inflorescências	48
4.4. Estudo do processo extrativo	48
4.4.1. Planejamento fatorial fracionário	48
4.4.2. Planejamento composto central	51
4.4.3. Otimização do processo extrativo e caracterização do extrato hidroalcoólico otimizado	58
4.5. Método cromatográfico para quantificação dos marcadores do extrato hidroalcoólico...	60

4.5.1. Validação do método cromatográfico.....	61
4.6. Produção das micropartículas contendo o extrato	65
4.6.1. <i>Spray drying</i> do extrato hidroalcoólico	66
4.6.2. <i>Spray freeze drying</i> do extrato hidroalcoólico.....	78
4.7. Método cromatográfico para caracterização do óleo essencial e quantificação do marcador do mesmo.....	85
4.8. Produção das micropartículas contendo o óleo essencial	90
4.8.1. <i>Spray drying</i> do óleo essencial	90
4.8.2. <i>Spray freeze drying</i> do óleo essencial.....	100
4.9. Otimização dos processos de produção das micropartículas.....	105
4.10. Caracterização dos processos e das micropartículas otimizadas	107
4.10.1. Rendimento dos processos.....	107
4.10.2. Distribuição granulométrica das micropartículas	108
4.10.3. Eficiência de encapsulação	110
4.10.4. Teor dos marcadores.....	111
4.10.5. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	112
4.10.6. Densidade das micropartículas	113
4.10.7. Índice de Carr e Fator de Hausner das micropartículas	114
4.10.8. Umidade das micropartículas	115
4.10.9. Morfologia das micropartículas	116
4.10.10. Liberação <i>in vitro</i> das frações de <i>C. recutita</i> a partir das micropartículas	120
4.10.11. Estabilidade das micropartículas	121
4.10.12. Estudos preliminares de permeação cutânea <i>in vitro</i>	124
5. CONCLUSÕES.....	127
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Chamomilla recutita*

Extratos de plantas, por possuírem um grande número de bioativos, são importantes produtos naturais com muitas aplicações terapêuticas. Desde a antiguidade têm sido utilizados para o tratamento de diversos problemas de saúde. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recentemente publicou normas para determinar a qualidade, segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos. A OMS também tem trabalhado para promover o uso de medicamentos fitoterápicos nos sistemas de saúde, reconhecendo assim sua importância. A facilidade de obtenção e sua eficácia tornaram os extratos vegetais foco de atenção mundial (ANSEL; POPOVICH; ALLEN-JR, 2000; CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2015; SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010; WEBER et al., 2008).

Camomila é uma das mais antigas e bem documentadas plantas medicinais do mundo (SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010). Desde a antiguidade, as inflorescências da camomila já eram utilizadas para obtenção de infusões, extratos líquidos e óleos essenciais. Devido às suas diversas propriedades terapêuticas, atualmente, destaca-se como a planta medicinal mais cultivada e consumida mundialmente. Estima-se que mais de um milhão de copos de chá desta planta são consumidos diariamente (BORSATO; DONI-FILHO; AHRENS, 2005; SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010).

Existem duas espécies de camomila a *Chamomilla recutita* L. e a *Anthemis nobilis* (camomila romana). *C. recutita*, também chamada de *Matricaria recutita*, *Matricaria chamomilla*, *Chamomilla chamomilla*, é a variedade de camomila mais comum usada para fins medicinais (ESMAEILI et al., 2011; FONSECA; TAVARES; HORVÁTH, 2007; SRIVASTAVA; GUPTA, 2009a; SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010). *C. recutita*, popularmente conhecida como camomila alemã, camomila húngara, camomila catinga, ou camomila selvagem (GUPTA et al., 2010; MCKAY; BLUMBERG, 2006) é pertencente à família *Asteraceae* e nativa da Europa e Ásia. Atualmente é encontrada em diversas regiões do mundo (BORSATO et al., 2009; GANZERA; SCHNEIDER; STUPPNER, 2006; SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010).

C. recutita possui inúmeras atividades medicinais e cosméticas. Seu uso como antiinflamatório, antioxidante e adstringente vem desde séculos atrás. Recentemente esta planta é utilizada na hidratação e proteção da pele, no tratamento de irritações cutâneas, dermatite atópica e eczema, queimaduras e assaduras, cicatrização de feridas, problemas gastrointestinais, cistites, hemorroidas, osteoporose, convulsões e depressões, vaginite, câncer, inflamações e

infecções por bactérias e fungos, hiperglicemia e diabetes, entre outras (FONSECA; TAVARES; HORVÁTH, 2007; GANZERA; SCHNEIDER; STUPPNER, 2006; KATO et al., 2008; LEE; HEO; KIM, 2010; MACHADO JUNIOR et al., 2006; MARTINS et al., 2009; SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010).

O interesse comercial da *C. recutita* está em suas inflorescências, que devido à presença de inúmeras classes de compostos ativos é muito utilizada para fins medicinais e cosméticos. Já foram identificados nas inflorescências da camomila alemã mais de 120 constituintes, incluindo 28 terpenóides e 36 flavonóides. Dentre os principais flavonóides encontra-se a apigenina e seus glicosídeos, quercetina e patuletina (GUPTA et al., 2010; MCKAY; BLUMBERG, 2006; SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010). Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal. Seu núcleo fundamental é constituído por 15 átomos de carbono com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (BEHLING et al., 2004). A apigenina e a luteonina são as flavonas mais abundantes encontradas em plantas e podem estar na sua forma livre ou conjugada. No entanto, a maioria das flavonas identificadas em plantas se encontra na forma conjugada, com um ou mais açúcares ligados aos grupos hidroxila (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

A apigenina e seus derivados glicosídicos, como a apigenina-7-glicosídeo, são encontrados nos extratos das inflorescências de camomila e são importantes componentes responsáveis pelas ações antiinflamatória e antioxidante desta planta (SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010; WEBER et al., 2008). As estruturas moleculares destes dois flavonóides são mostradas na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura da apigenina (a) e da apigenina-7-glicosídeo (b).

O óleo essencial é outro importante extrato originário da *C. recutita*. As inflorescências da camomila alemã contêm aproximadamente 0,2% a 2,0% de óleo essencial, que devido à sua importância terapêutica está entre os mais utilizados e valorizados óleos essenciais em nível internacional. Os principais constituintes do óleo essencial de camomila são o α -bisabolol e seus óxidos e os azulenos, como o camazuleno, sendo que os primeiros representam mais de

50% do óleo essencial. Assim como a apigenina e a apigenina-7-glicosídeo, o α -bisabolol e seus óxidos são bem reconhecidos por suas propriedades antiinflamatórias e antioxidantes (BORSATO et al., 2009; LEE; HEO; KIM, 2010; SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010). O óxido de bisabolol A (Figura 2) é um sesquiterpeno, derivado do α -bisabolol, encontrado em grande quantidade no óleo essencial de *C. recutita* (BORSATO et al., 2009; LEE; HEO; KIM, 2010; SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010).

Figura 2 - Estrutura do óxido de bisabolol A.

Recentemente, inúmeras áreas têm investido em inovação tecnológica buscando o aumento da eficiência do processo produtivo, o desenvolvimento de novos produtos e o aprimoramento de produtos existentes (AVELAR; DE SOUZA, 2006). Nas áreas farmacêutica e cosmética isso não é diferente. Nesse caso, pesquisas e desenvolvimentos têm abrangido não somente a síntese de novos medicamentos, mas também os processos de fabricação, buscando vantagens como maior eficácia e estabilidade às formulações e possibilidade da produção de novos sistemas de liberação (SCHMALTZ; SANTOS; GUTERRES, 2005).

A síntese e o isolamento de bioativos vegetais tem sido foco de pesquisas há bastante tempo. Isso porque, como mencionado anteriormente, os extratos são de fácil aquisição e uma rica fonte destes ativos. No entanto, os extratos líquidos e óleos essenciais, por serem constituídas de compostos ativos primários, secundários e coadjuvantes apresentam melhores efeitos e atividades terapêuticas de maior amplitude que seus bioativos isolados (BLAZÚS, 2008; BLUMENTHAL et al., 1998; COSTA-MACHADO, 2011; NÓBREGA; WAGEMAKER; CAMPOS, 2013).

Pelo fato de extratos líquidos e óleos essenciais proporcionarem inúmeros benefícios à pele, sua utilização em formulações farmacêuticas e cosméticas vem aumentando. Como já mencionado, o extrato e o óleo essencial de *C. recutita* possui uma ampla variedade de constituintes, o que pode fornecer para as formulações propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, hidratantes, emolientes, entre outras. Sendo assim, os extratos de camomila são de interesse para formulações de aplicação tópica. Apesar disso, há ainda poucos estudos sobre formulações tópicas contendo os extratos de camomila (DAL'BELO; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; NÓBREGA; WAGEMAKER; CAMPOS, 2013).

A mesma razão que tornou o uso de extratos interessante também é um dos principais empecilhos a sua ampla utilização. O fato dos derivados vegetais apresentarem um grande número de compostos pode causar instabilidade às formulações. Sendo assim, várias pesquisas têm buscado novas alternativas para sua incorporação (ANSEL; POPOVICH; ALLEN-JR, 2000; NÓBREGA, 2010; SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010; WEBER et al., 2008). Uma alternativa para a solução deste problema é a microencapsulação.

1.2. Microencapsulação

A microencapsulação é uma metodologia onde micropartículas são formadas por meio do aprisionamento dos compostos dentro de uma matriz protetora, o que promove uma proteção dos compostos do ambiente externo. Os compostos podem estar dispersos em uma matriz ou totalmente envolvidos por uma matriz protetora (CHAMBI et al., 2008; ESTEVINHO et al., 2013b; SILVA et al., 2003; SUAVE et al., 2006). Micropartículas são partículas sólidas que geralmente variam de 1 a 1000 μm . No entanto, o tamanho, a forma e a estrutura das micropartículas dependem de diferentes fatores, tais como do processo de produção, do carreador utilizado e do composto a ser microencapsulado (ESTEVINHO et al., 2013b; SILVA et al., 2003). A microencapsulação surgiu na década de 1930 e vem sendo estudada e empregada em diversas áreas tais como farmacêutica, química, alimentícia, cosmética, agrícola, dentre outras (SUAVE et al., 2006).

1.2.1. Micropartículas e suas aplicações farmacêuticas e cosméticas

Na área farmacêutica, o uso de sistemas microestruturados tem aumentado ao longo do tempo. A ampla utilização das micropartículas em formulações farmacêuticas é devido às vantagens que a microencapsulação proporciona, tais como aumento da estabilidade do composto encapsulado, sustentação e controle da liberação dos ativos, desenvolvimento de novos sistemas de liberação, maior facilidade na incorporação de ativos e redução na perda de substâncias voláteis (CAO-HOANG; FOUGÈRE; WACHÉ, 2011; GELFUSO et al., 2011; GHARSALLAOUI et al., 2007; MARCATO, 2009; RODRIGUES; GROSSO, 2008). Outra vantagem é que as micropartículas produzidas podem ser industrialmente utilizadas como um produto final com diferentes aplicações terapêuticas, ou como um produto intermediário nas preparações farmacêuticas (COUTO et al., 2011).

O uso de micropartículas pela indústria cosmética também tem aumentado. O mercado tem aumentado a procura por produtos ditos “naturais”. Esse termo tem se popularizado e como resultado indústrias farmacêuticas e cosméticas começaram a produzir os chamados

nutracosméticos: formulações cosméticas com ingredientes nutracêuticos. Além disso, a procura por produtos que forneçam resultados perceptíveis para o cliente também alimenta o desenvolvimento de novos compostos ativos (PATRAVALE; MANDAWGADE, 2008).

O uso de ingredientes nutracêuticos e a incorporação de novos compostos ativos em formulações são difíceis, em parte devido à dificuldade de combinar diversos compostos ativos e garantir a estabilidade da formulação. Além disso, é preciso desenvolver uma formulação que auxilie a função barreira da pele, mas que ao mesmo tempo seja capaz de levar os compostos ativos até uma ou mais camadas da pele, minimizando quaisquer efeitos adversos. Para tanto, é desejável que a formulação seja capaz de fornecer uma taxa de liberação sustentada do ativo para o sítio alvo na pele (PATRAVALE; MANDAWGADE, 2008).

Nesse sentido, a microencapsulação vem se mostrando uma alternativa interessante também para a indústria cosmética. A microencapsulação pode fornecer vantagens estéticas e funcionais para formulações, visto que pode aumentar a estabilidade da formulação, modular sua taxa de liberação, evitar incompatibilidades entre compostos ativos e a formulação e mascarar odores indesejáveis (BOWEY; NEUFELD, 2010; BUTTINI et al., 2008; DE JALÓN et al., 2001; GAVINI et al., 2004; GELFUSO et al., 2011; MARTINS et al., 2013; PATIL et al., 2010; PATRAVALE; MANDAWGADE, 2008). Devido a estas vantagens, a aplicação tópica de micropartículas vem sendo amplamente estudada e tem cada vez mais ganhado destaque (PATRAVALE; MANDAWGADE, 2008).

O processo de produção das micropartículas tem uma grande influência sobre seu formato. Dependendo do tipo de composto a ser liberado, o formato da micropartícula ideal pode variar de poroso a uma microcápsula. A escolha do carreador também pode influenciar tanto o formato das micropartículas como a gama de ativos que podem ser utilizados na sua produção. Sua escolha, portanto, é um importante passo na produção de micropartículas (ESTEVINHO et al., 2013b; SILVA et al., 2003).

1.2.2. Carreadores

Existem diferentes carreadores com características diversas que podem ser utilizados como matrizes para a produção de micropartículas. Alguns exemplos são maltodextrina, polióis como manitol e sorbitol, polímeros como polivinilpirrolidona, quitosana e PLGA (Poli(D,L-Lactida-co-glicolida)), amidos, gomas, celulose, dióxido de silício coloidal, entre muitos outros (COSTA-MACHADO, 2011; GAVINI et al., 2004; GELFUSO et al., 2011; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; TACON, 2012). Diante de uma grande variedade de carreadores, a escolha de qual utilizar não é uma tarefa fácil e deve levar em conta as características desejadas

para as micropartículas que serão produzidas. Dessa forma, verifica-se que a seleção e o uso adequado de carreadores é uma etapa de fundamental importância, visto que determina a estabilidade e qualidade das micropartículas obtidas, podendo inclusive afetar as características de liberação e biodisponibilidade das mesmas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

A utilização de polímeros como carreadores de micropartículas é muito interessante para a área farmacêutica, pois eles podem ser especificamente adaptados a uma ampla variedade de aplicações, dependendo do polímero escolhido (BOWEY; NEUFELD, 2010). As micropartículas poliméricas têm sido amplamente utilizada pelas indústrias farmacêuticas devido a capacidade de aumentar a estabilidade, diminuir a toxicidade e modificar o perfil de liberação de um ativo, além de permitir a orientação do ativo para um sítio de ação específico. (BOWEY; NEUFELD, 2010; PEREIRA et al., 2014).

A grande variedade de polímeros existentes e os diferentes processos que podem ser utilizados para a produção de micropartículas poliméricas possibilita a utilização destas para as mais diferentes vias de administração de um ativo. As características das micropartículas, tais como estabilidade, perfil de liberação e biodisponibilidade podem ser afetadas pelas propriedades do polímero e do ativo, razão entre ambos, método de produção, dentre outros (BOWEY; NEUFELD, 2010).

Os polímeros biodegradáveis tais como polímeros metacrilatos, policaprolactona (PCL), polímeros do ácido lático (PLA) e do ácido glicólico (PGA) e seus copolímeros como o PLGA, por serem não imunogênicos, atóxicos e biodegradáveis têm sido frequentemente utilizados para a produção de micropartículas poliméricas para aplicação farmacêutica. No entanto, possuem a desvantagem de serem caros e utilizarem solventes orgânico para sua síntese. Sendo assim, os polímeros naturais, tais como a quitosana, alginato e derivados da celulose tem ganhado bastante destaque (BOWEY; NEUFELD, 2010; GELFUSO, 2009).

Atualmente, um polímero que tem sido bastante usado para a produção de micropartículas para aplicações farmacêuticas, cosméticas e biomédicas é a quitosana (ALVARENGA, 2011; PEREIRA et al., 2014). São encontrados na literatura diversos estudos em que a quitosana foi utilizada para a produção de micropartículas contendo os mais diferentes tipos de ativos. Micropartículas de quitosana já foram preparadas, para veicular polifenóis e diferentes outros antioxidantes de origem naturais (FANG; BHANDARI, 2010; HARRIS et al., 2011; KOSARAJU; D'ATH; LAWRENCE, 2006; PEREIRA et al., 2014), aromas (ESTEVINHO et al., 2013a), plasmídeos de DNA (OLIVEIRA; SANTANA; RÉ, 2006), proteína (KUSONWIRIYAWONG et al., 2013) e fármacos para diferentes tipos de

administração (ALHALAWEH; ANDERSSON; VELAGA, 2009; GELFUSO et al., 2011; VENTURA et al., 2011).

As principais razões para a grande utilização da quitosana são, certamente, suas interessantes propriedades intrínsecas. Dentre estas pode-se citar a biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, características antifúngica e antibacteriana, propriedades de adsorção, características promotoras de absorção, entre outras. Além disso, a quitosana é obtida de fonte natural, sendo, depois da celulose, o biopolímero mais abundante na natureza. Além de todas as bioatividades da quitosana apresentadas acima, um fato que também tem tornado este polímero bastante atrativo para a produção de micropartículas destinadas a aplicação tópica é sua interação com a pele. Por ter característica catiônica, a quitosana tem a capacidade de bioaderir à pele, que é aniônica, o que mantém o ativo por mais tempo em contato com a mesma (ALVARENGA, 2011; BASTOS et al., 2012; BOWEY; NEUFELD, 2010; FELT; GURNY; BAEYENS, 2001; GELFUSO et al., 2011; VENTURA et al., 2011).

A quitosana (Figura 3), polímero natural composto de D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina, é um heteropolissacarídeo de cadeia linear resultante da N-desacetilação alcalina da quitina (ALVARENGA, 2011; BOWEY; NEUFELD, 2010; DAMIAN et al., 2005). A quitosana foi obtida pela primeira vez em 1859, pela desacetilação da quitina por meio do aquecimento desta em solução concentrada de hidróxido de potássio (DAMIAN et al., 2005). A solubilidade da quitosana depende da quantidade de grupamentos aminos na cadeia polimérica e, portanto, do grau de desacetilação, i.e., da proporção entre as unidades D-glicosamina acetiladas e não acetiladas. No entanto, de maneira geral a quitosana é insolúvel em água, solventes orgânicos e bases, mas solúvel na maioria das soluções ácidas com pH inferior a 6. O ácido acético é o mais usado para a solubilização da quitosana. Outros ácidos como clorídrico, nítrico, perclórico e fosfórico também são capazes de solubilizar a quitosana, porém apenas sob agitação prolongada, precisando às vezes até mesmo de aquecimento (ALVARENGA, 2011; DAMIAN et al., 2005).

Figura 3 - Estrutura da quitosana.

1.2.3. Processos para a produção de micropartículas

As micropartículas podem ser produzidas por diferentes processos. Tais processos podem ser físicos (e.g. *spray drying*), químicos (e.g. polimerização interfacial) ou físico-químicos (e.g. fluido supercrítico) (JYOTHI et al., 2010). Quando se trabalha com derivados de plantas, o *spray drying* é um dos mais utilizados. A ampla utilização do *spray drying* se deve às suas diversas vantagens, tais como simplicidade, rapidez, versatilidade, alta reprodutibilidade, facilidade na transposição de escala, possibilidade de controlar as propriedades das micropartículas, eliminação de etapas preliminares de processamento da amostra, possibilidade de produção contínua, entre outras (AMERI; MAA, 2006; ARAÚJO; TEIXEIRA; FREITAS, 2010; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; SOLLOHUB; CAL, 2010). O *spray drying* surgiu na metade do século XVIII, quando foi patenteada para a secagem de ovos (MONT, 1865). Hoje em dia seu uso tem se ampliado para diversas áreas, sendo muito utilizado pelas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e química (BOWEY; NEUFELD, 2010). Um esquema deste processo é apresentado pela Figura 4.

Figura 4 - Esquema do processo de *spray drying*, onde BP é a bomba peristáltica, BN é o bico atomizador, e CA é a câmara de secagem (MARTINS, 2010).

O processo de *spray drying* envolve quatro fenômenos simultâneos: atomização, contato entre o ar e as microgotículas, evaporação do solvente e a recuperação do pó. A atomização é realizada passando a solução a ser secada por um bico atomizador. O bico atomizador gera um *spray* fino de microgotículas dentro de uma câmara onde é passado ar quente ou um gás inerte. A grande área superficial das microgotículas, quando comparada ao volume, permite uma remoção relativamente rápida do solvente, formando as micropartículas. O tempo de secagem depende de diversos fatores do processo, tais como a diferença de temperatura entre o ar e o fluido entrando na câmara de secagem e a constituição do fluido. As micropartículas produzidas

são carregadas pelo fluxo de gás quente até um ciclone, onde o pó é separado do ar por forças centrífuga e gravitacional (BOWEY; NEUFELD, 2010; MASTERS, 1991). Apesar de ser uma técnica atraente, também sofre algumas limitações. Por exemplo, o uso de altas temperaturas para remoção do solvente pode levar a perdas de compostos voláteis ou termosensíveis (AL-HAKIM; STAPLEY, 2004).

Spray freeze drying é um processo de secagem relativamente novo na área farmacêutica, sendo estudado pela primeira vez por Mumenthaler e Leuenberger (1991). A duração de um processo de liofilização é controlada pelo tempo de difusão do vapor da água através do material que está sendo seco (MUMENTHALER; LEUENBERGER, 1991). Assim sendo, liofilizar micropartículas é interessante, pois diminui a espessura do sólido pela qual o vapor deve se difundir, aumentando a velocidade do processo (AL-HAKIM; STAPLEY, 2004). O *spray freeze drying* busca se aproveitar deste fato.

De forma resumida, o *spray freeze drying* consiste na atomização de uma solução sobre uma atmosfera criogênica, onde a solução é rapidamente congelada. Em seguida, as microgotículas congeladas são secas por liofilização originando as micropartículas (Figura 5). Trata-se de um processo interessante, visto que possui diversas vantagens sobre a liofilização, tais como produzir partículas mais esféricas, menor probabilidade de ocorrer uma separação de fases durante o congelamento devido a maior velocidade de congelamento das pequenas gotículas, e ainda a possibilidade de controlar e alterar vários parâmetros do processo, o que permite um maior controle sobre as características das micropartículas obtidas, fato de grande interesse para as indústrias (ALLOUE et al., 2007; CHAN; CHEW, 2003; DROOGE et al., 2005; KENNEDY et al., 2007; LEUENBERGER, 2002; NIWA et al., 2009; SCHIFFTER; CONDLIFFE; VONHOFF, 2010; SCHIFFTER, 2007). No entanto, o *spray freeze drying* não pode ser operado de forma contínua e é um processo caro, pois requer um alto tempo para secagem das micropartículas e geralmente utiliza vácuo para secagem (AL-HAKIM; STAPLEY, 2004; BOWEY; NEUFELD, 2010). Mesmo assim, o processo de *spray freeze drying* é promissor para a produção de micropartículas contendo derivados de plantas, uma vez que pode conciliar as vantagens das técnicas de *spray drying* e liofilização, duas importantes técnicas usadas para a produtos vegetais (CHAN; CHEW, 2003; COUTO et al., 2011; GAO et al., 2011; NIWA et al., 2009).

Figura 5 - Esquema do processo de *spray freeze drying*, onde C é o compressor, V é a válvula de pressão, N é o bico atomizador, L é o nitrogênio líquido, P é a bomba peristáltica, S é a amostra e F é o liofilizador (modificado de (KONDO et al., 2009).

Embora os processos de *spray drying* e *spray freeze drying* apresentem a vantagem do controle de diversos parâmetros do processo, a produção de micropartículas por estes podem ser influenciadas por diferentes fatores tais como vazão de alimentação da amostra, fluxo do ar, tipo de bico atomizador, pressão de atomização, viscosidade da amostra, tipo de solvente usado, concentração da amostra, natureza e quantidade do ativo, presença ou não de carreador e seu tipo, entre outros (CHAN; CHEW, 2003; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; SCHIFFTER, 2007). Como estes fatores podem afetar diretamente a qualidade do processo e do produto obtido, o estudo e o controle destes fatores são de grande importância para a obtenção de boas características tanto do produto quanto do processo. Uma ferramenta valiosa para o estudo de diversos fatores de um processo é o planejamento experimental (FERREIRA et al., 2007).

1.3. Planejamento experimental e otimização de processos

Devido aos vários benefícios que geram, tais como redução de custo e aumento da produtividade e da qualidade dos produtos, a otimização de processos tem sido alvo de várias pesquisas. Isso tem resultado em uma crescente busca por técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Sendo assim, os planejamentos experimentais são ferramentas cada vez mais importantes e de grande utilidade no delineamento de ensaios e processos, visto que além de possibilitarem a otimização dos mesmos, permitem a obtenção de um maior número de informações utilizando um menor número de experimentos. No entanto, cabe mencionar que diante das diversas aplicações de um planejamento, a escolha do que melhor se adéqua às condições experimentais do estudo é um fator de grande importância e deve ser feita com muita cautela (FERREIRA et al., 2007; PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Os planejamentos experimentais são classificados em univariados, quando se varia um único fator por vez, e multivariados, quando se estuda diversos fatores simultaneamente. Os planejamentos multivariados apresentam vantagens sobre os primeiros, pois além de possibilitar a avaliação das interações entre os fatores estudados, permite ainda verificar se esta interação é significativa para a resposta analisada. Este fato é de grande importância, pois muitas vezes a combinação entre os fatores é que gera os melhores resultados. Além disso, é importante salientar que se o efeito de um fator for dependente de outros fatores envolvidos no processo, os planejamentos univariados podem falhar (FERREIRA et al., 2007; PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Dentre os diferentes tipos de planejamentos experimentais, um que merece destaque é o planejamento fatorial, definido como aquele em que todos os fatores estudados variam de forma sistematizada (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Embora tenha surgido por volta da década de 50, a utilização do planejamento fatorial aumentou consideravelmente nas últimas décadas, devido ao desenvolvimento de diversos *softwares* estatísticos. A partir daí, novas metodologias e teorias sobre planejamentos fatoriais tem sido desenvolvidas, e a cada dia estão sendo mais utilizados em diversos campos da ciência a fim de fornecer informações seguras e eficientes e diminuir o empirismo das técnicas de tentativa e erro (COSTA-MACHADO, 2011; RODRIGUES; IEMMA, 2009). Os grandes avanços aplicados ao planejamento fatorial tem transformado o mesmo em uma ferramenta muito poderosa para gerar, interpretar e realizar experimentos científicos de maneira mais eficaz (FERREIRA et al., 2007).

Três conceitos são muito importantes nos planejamentos fatoriais, sendo eles: fatores, níveis e respostas. Os fatores, também denominados variáveis independentes, correspondem a cada variável do processo ou do ensaio. Os níveis são definidos como as condições de trabalho dos fatores. As respostas, também conhecidas como variáveis dependentes, são as características do processo ou do produto analisadas em função dos fatores (TACON, 2012).

De maneira geral, os planejamentos fatoriais avaliam a influência dos fatores, em diferentes valores ou níveis, sobre as respostas estudadas. Os planejamentos são representados por uma notação exponencial (X^n), onde X , indica o número de níveis em estudo e n , o número de fatores a ser estudado. Os níveis estudados podem ser dois, três ou até cinco níveis de cada fator em questão. Portanto, o total de ensaios realizados vai depender do número de fatores e de níveis utilizados. O caso mais simples é aquele em que para cada fator (n) existem apenas dois níveis (X) (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003; BOX; HUNTER; HUNTER, 1978).

Os planejamentos fatoriais são constituídos pelas combinações entre os níveis de dois ou mais fatores. Se todas as combinações possíveis entre os níveis de cada fator estão presentes, o planejamento fatorial é dito completo (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Dependendo do número de fatores e dos seus níveis avaliados, o número de experimentos resultantes do estudo pode ser grande, tornando-se demorado e de alto custo. Uma maneira para resolver este problema seria a utilização do planejamento fatorial fracionário. Isso porque, no planejamento fatorial fracionado, apenas uma fração das combinações de um planejamento fatorial completo é selecionada. No entanto, embora os planejamentos fatoriais fracionados possam ser mais vantajosos quando se tem um grande número de fatores e não se conhece ainda a relação completa destes fatores nas respostas avaliadas, é importante ter em mente que a maioria dos planejamentos fatoriais fracionários não fornecem estimativas dos efeitos de forma tão precisa quanto um planejamento fatorial completo. Além disso, ao contrário dos planejamentos fatoriais completos, alguns planejamentos fatoriais fracionários não permitem a otimização do processo. Sendo assim, quando o número de fatores estudados é grande, uma aplicação sequencial de planejamentos é, muitas vezes, a opção mais adequada. Geralmente para isso, é conveniente iniciar o estudo com um planejamento fatorial fracionário e, após a análise dos resultados, utilizar um outro planejamento fatorial (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978; COSTA-MACHADO, 2011; LI, 2003; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Diante do que foi dito acima, pode-se verificar que os planejamentos fatoriais têm recebido cada vez mais atenção, uma vez que permitem avaliar um grande número de variáveis com um reduzido número de experimentos, além de possibilitar a otimização do produto e do processo. Assim, a aplicação de planejamentos fatoriais no processo extrativo bem como nos processos de *spray drying* e *spray freeze drying* são de grande interesse devido aos vários fatores que podem influenciar tais processos.

1.3.1. Metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é um conjunto de técnicas estatísticas utilizadas para estudar e construir modelos matemáticos (COSTA-MACHADO, 2011). O uso de planejamentos fatoriais associado às análises dos resultados pela MSR é uma ferramenta importante na área estatística que fornece informações seguras e eficientes sobre o processo (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Por meio da MSR é possível verificar a relação entre os fatores estudados e as respostas obtidas, calcular as respostas em níveis que não foram realizados experimentalmente e ainda direcioná-las para o objetivo desejado, a fim de diminuir ou aumentar a resposta. Além disso, por meio da MSR, é possível verificar a interação entre os

fatores e até mesmo os efeitos quadráticos dos mesmos. Portanto, a MSR é usada para alcançar condições ótimas ou melhorar as condições já utilizadas, melhorar a robustez de um produto e/ou processo contra influências externas e não controláveis, bem como para identificar problemas ou pontos frágeis no processo (COSTA-MACHADO, 2011; MUTHUKUMAR; MOHAN; RAJENDRAN, 2003).

Como a MSR permite otimizar as condições do processo e identificar efeitos quadráticos dos fatores, é interessante que o planejamento utilizado permita observar a curvatura da região experimental, fornecendo assim modelos quadráticos ou de segunda ordem. Para que isso seja possível é necessário utilizar um planejamento com no mínimo três níveis, visto que os planejamentos de dois níveis geram apenas modelos lineares ou de primeira ordem (COSTA-MACHADO, 2011). Por isso, alguns planejamentos são mais frequentemente utilizados para estudar a MSR. Dentre estes estão o planejamento Box-Behnken e o planejamento composto central (COSTA-MACHADO, 2011; NIST/SEMATECH, 2012).

1.3.2. Função Desejabilidade

A função desejabilidade é um dos métodos mais utilizado para otimizar experimentos multivariáveis. Com este método é possível encontrar as condições do processo que fornecem a melhor combinação de múltiplas respostas dentro de limites previamente estabelecidos. Dessa maneira, a função desejabilidade permite transformar um problema de múltiplas respostas em um problema com uma única resposta, por meio de equações matemáticas (NIST/SEMATECH, 2012). Dependendo do que se deseja, a função desejabilidade pode ser utilizada com três objetivos, minimizar, maximizar ou atingir um determinado valor alvo (COSTA-MACHADO, 2011; TACON, 2012).

Para utilizar a função desejabilidade é preciso estimar a relação das respostas em função dos fatores estudados. Tal estimativa é feita por meio do planejamento fatorial associado à análise dos dados pela MSR. Para cada resposta Y_i existe uma função desejabilidade $d_i(Y_i)$ e, portanto, num processo com muitas respostas, tem-se uma função de desejabilidade global. A desejabilidade global (D) e as desejabilidades referentes a cada resposta ($d_i(Y_i)$) podem variar de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo de 1, mais desejável é a resposta. O cálculo da desejabilidade global pode ser feito como mostrado pela Equação 1, onde n é o número de respostas (DERRINGER; SUICH, 1980; RÉTHY; KOCZOR; ERDÉLYI, 2004).

$$D = [d_1(y_1) \times d_2(y_2) \times d_3(y_3) \times \dots d_n(y_n)]^{1/n}$$

Equação 1

Para definir a função desejabilidade, deve-se atribuir um peso para cada resposta, o qual define sua importância. Quanto maior o peso, mais importante é a resposta (DERRINGER; SUICH, 1980; RÉTHY; KOCZOR; ERDÉLYI, 2004). Assim, variando-se a importância ou peso de cada resposta os valores dos fatores responsáveis pela melhor desejabilidade global podem ser alterados (LIU; TANG, 2010).

Diante do exposto, fica claro a importância da *C. recutita* e seus extratos para as indústrias farmacêuticas e cosméticas, bem como as dificuldades inerentes a seu uso em formulações. A procura crescente por produtos naturais tem acelerado a busca por soluções que permitam a incorporação de extratos em formulações. O *spray freeze drying* e o *spray drying* se mostram como ótimas alternativas para resolver tal problema. De fato esses processos já foram utilizados com sucesso com outros extratos vegetais. No entanto, no que abrange nosso conhecimento não há na literatura trabalhos estudando estes processos para a produção de micropartículas de quitosana contendo extratos de *C. recutita*. Assim, o presente trabalho busca preencher essa lacuna. A seguir descreveremos como esses dois processos foram estudados para permitir a otimização da produção de micropartículas contendo o extrato hidroalcoólico e óleo essencial de *C. recutita*. Também descreveremos as vantagens e desvantagens das micropartículas produzidas por esses processos, focando em caracterizações que sejam de interesse para aplicações tópicas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo do presente trabalho foi estudar e otimizar os processos de microencapsulação por *spray drying* e *spray freeze drying* do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial da *Chamomilla recutita* L., a fim de comparar ambos os processos, bem como verificar a influência dos mesmos sobre estas duas frações de *C. recutita*.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar apigenina e apigenina-7-glicosídeo presentes no extrato de *C. recutita*.
- Desenvolver uma metodologia analítica por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (CG-EM) para caracterizar os compostos presentes no óleo essencial de *C. recutita* e quantificar o óxido de bisabolol A presente no mesmo.
- Estudar e otimizar o processo extrativo por meio de planejamentos fatoriais para a obtenção do extrato hidroalcoólico de *C. recutita*.
- Estudar os processos de *spray drying* e *spray freeze drying* do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *C. recutita* por meio de planejamentos fatoriais com o objetivo de determinar os fatores do processo que influenciam as características das micropartículas.
- Otimizar os processos de *spray drying* e *spray freeze drying* do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *C. recutita*.
- Caracterizar e comparar os processos de *spray drying* e *spray freeze drying* do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *C. recutita*, bem como as micropartículas obtidas em cada um deles.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção do material vegetal

O óleo essencial da *Chamomilla recutita* (Lote 257) e da *Anthemis nobilis* (Lote 294) foram adquiridos da Ferquima Ltda (Vargem Grande Paulista, Brasil). As inflorescências secas da *Chamomilla recutita* (Lote 040467) foram adquiridas da Flores e Ervas Comércio Farmacêutico Ltda - Florien (Piracicaba, Brasil). Uma amostra destas inflorescências foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto - USP (Herbário SPFR) sob o número de registro SPFR 15116. As inflorescências secas foram moídas utilizando-se moinho de facas SL31 (Solab Ltda, Piracicaba, Brasil).

3.2. Distribuição granulométrica das inflorescências

A distribuição granulométrica das inflorescências secas e moídas foi feita por meio de um conjunto de tamises (Bertel Ltda, Laranjeiras, Brasil) com aberturas de malha de 45 a 1400 µm e um vibrador de tamises modelo 01/02 (Bertel Ltda, Laranjeiras, Brasil).

3.3. Índice de intumescência das inflorescências

A determinação do índice de intumescência foi realizada conforme a Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Assim, 25 mL de solvente foram adicionados a uma proveta de 25 mL contendo 1 g de inflorescências secas e moídas. Em seguida, a proveta foi agitada a cada 10 minutos durante 1 hora e deixada em repouso por 3 horas a temperatura ambiente. O índice de intumescência foi obtido pela diferença entre o volume ocupado pelo material vegetal no final do ensaio e o seu volume inicial.

3.4. Extração

3.4.1. Procedimento

Os extratos hidroalcoólicos das inflorescências secas e moídas da *C. recutita* foram obtidos por maceração dinâmica. Esta foi selecionada pelo fato de ser um dos processos extrativos mais utilizados. A grande utilização da maceração dinâmica é devido às vantagens que apresenta como simplicidade, adequação a diferentes escalas: laboratoriais à industriais, alta eficiência de extração, dentre outras (CORREIA, 2006; TACON, 2012)

As extrações foram realizadas em um agitador magnético multi ponto com banho de ar termostatizado, TAB/15 (Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) e utilizando Erlenmeyers de 250 mL devidamente tampados com tampa esmerilhada. Ao final do processo extrativo, os extratos foram filtrados utilizando papel de filtro qualitativo (TACON, 2012).

3.4.2. Estudo do processo extrativo

3.4.2.1. Planejamento fatorial fracionário

Devido aos vários fatores que podem influenciar no processo de extração, uma análise mais precisa dos parâmetros de extração foi realizada utilizando-se planejamentos experimentais. Inicialmente, a fim de se estudar a influência de diversas condições extrativas sobre o teor de sólidos (TS) e teor de flavonóides totais (TFT) presentes nos extratos obtidos, executou-se o planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}) com dois níveis (-1 e 1) e cinco fatores (X_1 , X_2 , X_3 , X_4 e X_5), resultando em um total de 8 experimentos (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003). Os fatores estudados neste planejamento foram: temperatura de extração (T_E), porcentagem de planta utilizada em relação ao solvente (P_P), porcentagem de etanol (P_E), tempo de extração (t_E) e velocidade de agitação (V). A Tabela 1 mostra estes cinco fatores com seus níveis na forma codificada, -1 e +1, e não codificada (valores reais).

Tabela 1 - Planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}) utilizado na extração com os fatores estudados e seus níveis na forma codificada e não codificada.

Experimento	X_1 (T_E)	X_2 (P_P)	X_3 (P_E)	X_4 (t_E)	X_5 (V)
1	-1 (25)	-1 (10)	-1 (50)	-1 (1)	+1 (900)
2	-1 (25)	+1 (30)	-1 (50)	+1 (18)	-1 (300)
3	-1 (25)	-1 (10)	+1 (90)	+1 (18)	-1 (300)
4	-1 (25)	+1 (30)	+1 (90)	-1 (1)	+1 (900)
5	+1 (50)	-1 (10)	-1 (50)	+1 (18)	+1 (900)
6	+1 (50)	+1 (30)	-1 (50)	-1 (1)	-1 (300)
7	+1 (50)	-1 (10)	+1 (90)	-1 (1)	-1 (300)
8	+1 (50)	+1 (30)	+1 (90)	+1 (18)	+1 (900)

* X_1 - temperatura de extração ($^{\circ}\text{C}$). X_2 - porcentagem de planta (% m/v). X_3 - porcentagem de etanol (% v/v). X_4 - tempo de extração (h). X_5 - velocidade de agitação (rpm).

A análise estatística da influência de P_P , P_E , T_E , t_E e V sobre as respostas avaliadas, TS e TFT, foi realizada utilizando-se o *software* Statistica 7 (Statsoft Inc., EUA). Esta análise permitiu comparar a intensidade dos efeitos para cada fator estudado e então selecionar os três fatores que mais influenciaram na extração. Após a seleção dos fatores, o processo extrativo foi

então estudado por meio do planejamento composto central, o qual permitiu a otimização do processo.

3.4.2.2. Planejamento composto central

Com o objetivo de realizar uma análise mais detalhada do processo de extração, bem como possibilitar a otimização do mesmo, após o planejamento fatorial fracionário, um segundo conjunto de experimentos foi realizado seguindo o planejamento composto central. De acordo com os resultados obtidos no planejamento fatorial os fatores que exerceram maiores influência no processo extrativo foram P_P , P_E e T_E . Dessa forma estes fatores foram os selecionados para serem estudados pelo planejamento composto central (Tabela 2). Os experimentos foram realizados conforme descrito na Tabela 2 e utilizando uma velocidade de agitação de 900 rpm e tempo de extração de 1 hora. As respostas (variáveis dependentes) avaliadas no planejamento composto central foram teor de sólidos (TS), teor de flavonóides totais (TFT) e atividade antioxidante *in vitro* (IC_{50}) dos extratos.

Tabela 2 - Planejamento composto central utilizado na extração com os fatores estudados e seus níveis na forma codificada e não codificada.

Experimento	X_1	X_2	X_3	P_P (% m/v)	P_E (% v/v)	T_E (°C)
1	-1	-1	-1	10	40	30
2	+1	-1	-1	30	40	30
3	-1	+1	-1	10	80	30
4	+1	+1	-1	30	80	30
5	-1	-1	+1	10	40	60
6	+1	-1	+1	30	40	60
7	-1	+1	+1	10	80	60
8	+1	+1	+1	30	80	60
9	$-\alpha$	0	0	3,2	60	45
10	$+\alpha$	0	0	36,8	60	45
11	0	$-\alpha$	0	20	26,4	45
12	0	$+\alpha$	0	20	93,6	45
13	0	0	$-\alpha$	20	60	19,8
14	0	0	$+\alpha$	20	60	70,2
15	0	0	0	20	60	45
16	0	0	0	20	60	45
17	0	0	0	20	60	45

* X_1 - P_P codificado. X_2 - P_E codificado. X_3 - T_E codificado. P_P - porcentagem de planta utilizada em relação ao solvente. P_E - porcentagem de etanol. T_E - temperatura de extração. ** $\alpha = 1,68$.

3.4.3. Otimização do processo extrativo

A otimização da extração foi feita levando em consideração as respostas TS, TFT e IC₅₀ obtidas no planejamento composto central. Foi utilizado como ferramenta de otimização, o método da desejabilidade, por meio do *software* Minitab 14.0 (Minitab Inc., State College, EUA) módulo *Response optimizer*. Os valores estabelecidos para o *software* como baixo, alto e resposta desejada foram baseados nos dados experimentais obtidos para cada resposta ao seguir o planejamento composto central (Tabela 9). O ponto ótimo do processo extrativo foi determinado a fim de se maximizar TS e TFT e minimizar IC₅₀, i.e. maximizar atividade antioxidante, do extrato hidroalcoólico. Todas as respostas foram consideradas com o mesmo grau de importância e determinadas com peso um.

Os valores obtidos na otimização para os fatores estudados foram decodificados utilizando-se a Equação 2.

$$\text{valor codificado} = \frac{\text{valor decodificado} - 0,5(\text{nível alto} + \text{nível baixo})}{0,5(\text{nível alto} - \text{nível baixo})}$$

Equação 2

3.5. Caracterização dos extratos hidroalcoólicos

Os extratos hidroalcoólicos obtidos foram caracterizados com relação ao teor de sólidos, teor de flavonóides totais, atividade antioxidante *in vitro*, densidade e quantidade de apigenina e apigenina-7-glicosídeo, que foram os marcadores utilizados para o extrato hidroalcoólico.

3.5.1. Teor de sólidos

O teor de sólidos (TS) dos extratos hidroalcoólicos obtidos foi analisado de forma gravimétrica. Alíquotas dos extratos (~ 2 g) foram pesadas em placa de Petri e colocadas em estufa com temperatura de 105°C. As amostras foram pesadas até se obter peso constante. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de sólidos foi calculado em porcentagem (m/m) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; MARTINS et al., 2013; TACON, 2012).

3.5.2. Flavonóides totais

A quantificação de flavonóides totais presentes nos extratos hidroalcoólicos foi feita por meio do método da complexação com cloreto de alumínio 2% em metanol, e utilizando a quercetina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) como padrão de referência. As amostras foram analisadas por espectrofotômetro UV-Vis, modelo M 330 (Camspec Ltd, Cambridge, Reino Unido) em 425 nm após 1 hora de reação ao abrigo da luz (COSTA-MACHADO; BASTOS;

FREITAS, 2013). As análises foram realizadas em triplicata e quantidade de flavonóides totais presente nos extratos foi expressa em porcentagem (m/m) e denominada teor de flavonóides totais (TFT).

3.5.3. Atividade antioxidante *in vitro*

A avaliação de atividade antioxidante *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos foi determinada pelo método do radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH), o qual se baseia na redução do radical estável DPPH na presença de um antioxidante. Para a realização dos experimentos, primeiramente, para cada extrato foram feitas, em triplicata, soluções metanólicas em cinco concentrações. Em seguida, 50 µL de cada solução metanólica foi misturado com 2 mL de solução metanólica de DPPH (60 µM). As amostras foram então mantidas ao abrigo da luz durante 1 hora. Após este tempo as amostras foram analisadas por espectrofotômetro UV-Vis, modelo M 330 (Camspec Ltd, Cambridge, Reino Unido) em 517 nm. O metanol foi utilizado como branco, para zerar o espectrofotômetro, e a solução metanólica de DPPH (60 µM) sem adição das amostras foi usada como controle. As análises foram realizadas em triplicata e a porcentagem de inibição de cada amostra foi determinada de acordo com a Equação 3 (ABDOUL-LATIF et al., 2011; KULISIC et al., 2004).

$$Inibição (\%) = \left(\frac{Abs_{Controle} - Abs_{Amostra}}{Abs_{Controle}} \right)$$

Equação 3

Os resultados foram expressos em IC₅₀, que é a concentração correspondente à inibição de 50% do DPPH. A determinação do IC₅₀ foi feita por regressão linear. Para tanto, as porcentagens de inibição foram plotadas em função da concentração de cada amostra, e os valores de IC₅₀ foram determinados calculando a concentração correspondente à inibição de 50% (COSTA-MACHADO; BASTOS; FREITAS, 2013; MARTINS et al., 2013).

Para comparação, as atividades antioxidantes da quercetina e do α-tocoferol, compostos de reconhecida atividades antioxidantes, também foi determinada seguindo esta mesma metodologia. É importante mencionar que esta mesma metodologia também foi utilizada para a determinação da atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial neste presente trabalho.

3.5.4. Densidade

A densidade dos extratos hidroalcoólicos foi determinada por picnometria de acordo com a metodologia descrita pela Farmacopeia Brasileira (2010).

3.6. Método cromatográfico para quantificação dos marcadores do extrato hidroalcoólico

Os marcadores do extrato hidroalcoólico utilizados no presente trabalho foram apigenina e apigenina-7-glicosídeo. A quantificação destes marcadores foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando as curvas de calibração da apigenina (0,1 a 6 µg/mL) e da apigenina-7-glicosídeo (0,1 a 40 µg/mL) em metanol. Os padrões analíticos apigenina (grau de pureza $\geq 95\%$) e apigenina-7-glicosídeo (grau de pureza $\geq 97\%$) usadas para a construção das respectivas curvas foram obtidas da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil).

As análises de CLAE foram realizadas em um cromatógrafo modelo Ultimate 3000 (Thermo Scientific Inc., EUA) com detector de arranjo de diodos operando em comprimento de onda de 335 nm. O método selecionado foi baseado nos trabalhos de Repčák e Krausová (2009) e Švehlíková et al. (2004). Assim, as análises foram feitas utilizando uma coluna C-18 Phenomenex Luna (4,6 mm x 250 mm, tamanho de partículas de 5 µm e abertura de 100 Å) com pré-coluna de segurança (security guard, Phenomenex Luna). O volume de amostra injetado foi 20 µL. A fase móvel utilizada foi acetonitrila e água acidificada com ácido fosfórico (pH 3). O fluxo e o programa de gradiente da fase móvel usados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Fluxo e gradiente de eluição da fase móvel do método cromatográfico usado para quantificação dos marcadores do extrato hidroalcoólico.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Acetonitrila (%)	Água acidificada (%)
0	1,0	23,1	76,9
3	1,0	32,8	67,2
6	0,4	35,2	64,8
12	0,4	41,8	58,2
13	0,4	43,7	56,3
20	0,4	47,4	52,6
23	1,0	67,6	32,4
23,5	1,0	100	0
25	1,0	100	0
27,5	1,0	23,1	76,9
35	1,0	23,1	76,9

3.6.1. Validação do método cromatográfico

O método de CLAE usado para a quantificação de apigenina e apigenina-7-glicosídeo presentes no extrato hidroalcoólico foi validado considerando os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão e limite de quantificação.

3.6.1.1. Linearidade

A avaliação da linearidade do método foi feita por meio das curvas analíticas de apigenina e apigenina-7-glicosídeo em metanol. Para a apigenina, foi feita uma curva de calibração com as concentrações de 0,1; 1,0; 2,25; 4,0 e 6,0 µg/mL, em triplicata. Já a curva de calibração de apigenina-7-glicosídeo foi feita usando as concentrações de 0,1; 10; 20; 30 e 40 µg/mL, também em triplicata.

As curvas analíticas foram construídas utilizando a relação entre as concentrações e suas respectivas áreas. A análise estatística dos dados foi feita pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$, onde y corresponde à área do pico, a corresponde ao coeficiente angular, x corresponde à concentração e b corresponde ao coeficiente linear. As faixas lineares foram calculadas usando o coeficiente de correlação linear (r), com valor mínimo aceitável de 0,99 (BRASIL, 2003).

3.6.1.2. Seletividade

A fim de avaliar a seletividade do método, foi analisado o perfil cromatográfico da quitosana para verificar se algum interferente eluia no mesmo tempo de retenção dos marcadores apigenina e apigenina-7-glicosídeo. Para isto foram preparadas, em triplicata, soluções de 1 mg/mL de quitosana em ácido acético 1% (v/v). Assim como foi realizado para todas as amostras analisadas por CLAE, estas soluções foram filtradas, em filtro de membrana 0,22µm, antes de serem injetadas.

3.6.1.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade (precisão intra-corridas) e da precisão intermediária (precisão inter-corridas). A amostra utilizada para a avaliação deste parâmetro foi o extrato hidroalcoólico otimizado. A precisão foi determinada por meio das análises dos teores de apigenina e apigenina-7-glicosídeo na amostra.

Para verificar a repetibilidade do método, foram preparadas seis soluções de extrato hidroalcoólico otimizado, na mesma concentração (1 mg/mL) e estas foram então analisadas no mesmo dia (dia 1) sob as mesmas condições experimentais e cromatográficas. A repetibilidade do método foi determinada por meio do coeficiente de variação (CV) obtido usando os teores dos marcadores quantificados no dia 1. Para a avaliação da precisão intermediária, outras seis soluções do extrato hidroalcoólico otimizado, na mesma concentração usada no dia 1 (1mg/mL), foram preparadas, em outros dois dias (dia 2 e dia 3). Estas soluções foram analisadas nas mesmas condições experimentais e cromatográficas utilizadas no dia 1. A

precisão intermediária foi determinada por meio do coeficiente de variação (CV) obtido usando os teores dos marcadores quantificados no dia 1, no dia 2 e no dia 3 (BRASIL, 2003; BUENO, 2007; COSTA-MACHADO, 2011; RIBANI et al., 2004).

O cálculo de CV foi feito utilizando a Equação 4, onde DP é desvio padrão e CME é concentração média experimental. O método foi considerado preciso quando o coeficiente de variação foi menor que 5% (BRASIL, 2003; BUENO, 2007; COSTA-MACHADO, 2011; RIBANI et al., 2004).

$$CV(\%) = \left(\frac{DP}{CME} \right) \times 100$$

Equação 4

3.6.1.4. Exatidão

Para verificar a exatidão do método, soluções do extrato hidroalcoólico otimizado foram enriquecidas com os marcadores, apigenina e apigenina-7-glicosídeo, em três diferentes concentrações (80, 100 e 120%) dentro da faixa estudada, em triplicata, e foi então avaliada a recuperação destes dois marcadores. A recuperação (RC) foi calculada por meio da Equação 5, onde CE é a concentração experimental e CT é a concentração teórica. O método foi considerado exato quando o valor da recuperação ficou entre 80 e 120% (BRASIL, 2003; BUENO, 2007; COSTA-MACHADO, 2011; RIBANI et al., 2004).

$$RC(\%) = \left(\frac{CE}{CT} \right) \times 100$$

Equação 5

3.6.1.5. Limite inferior de quantificação

Para a determinação do limite inferior de quantificação (LIQ) do método para apigenina e apigenina-7-glicosídeo, concentrações de 0,01; 0,025 e 0,05 µg/mL de ambos os marcadores em metanol foram preparadas em sextuplicata. As soluções foram analisadas e então quantificadas com base nas curvas analíticas construída para cada um dos marcadores, como descrito no item 3.6.1.1. O LIQ foi determinado considerando os seguintes critérios: o pico de resposta no LIQ deve ser identificável e reprodutível apresentando valores de exatidão (RC) entre 80 e 120% e valores de precisão (CV) inferiores a 20% (BRASIL, 2003; FDA, 2001).

3.7. Produção das micropartículas contendo o extrato

Neste trabalho, as micropartículas contendo o extrato se referem àquelas produzidas utilizando o extrato hidroalcoólico obtido sob as condições otimizadas da extração. Estas micropartículas foram produzidas por dois diferentes processos, o *spray drying* e o *spray freeze drying*. Tal fato foi realizado com o objetivo de estudar e comparar os processos, bem como avaliar a viabilidade dos mesmos para a produção das micropartículas contendo o extrato de *C. recutita*.

3.7.1. *Spray drying* do extrato hidroalcoólico

O processo de *spray drying* do extrato hidroalcoólico (SDE) foi realizado em um *spray dryer* de escala laboratorial modelo MSD 0.5 (Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) como mostrado na Figura 6. Em todos os experimentos o aparelho operou utilizando o modo co-corrente e um bico atomizador duplo fluido, com diâmetro de abertura de 1,0 mm.

Figura 6 - Mini *spray dryer* MSD 0.5 (Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, Brasil).

Como existem diversos materiais que podem ser utilizados como carreadores no processo de *spray drying*, inicialmente foi realizado um estudo preliminar onde diferentes materiais foram testados. Este estudo permitiu selecionar aquele que apresentasse melhores resultados para a produção das micropartículas contendo o extrato. Após a seleção do carreador a ser usado, o processo de SDE foi estudado por meio de planejamentos fatoriais e posteriormente otimizado.

3.7.1.1. Experimentos preliminares

Os carreadores testados preliminarmente foram maltodextrina, goma arábica, sorbitol e quitosana, bem como diversas misturas destes. Para possibilitar uma comparação, todos os experimentos foram executados nas mesmas condições, ou seja, com vazão de alimentação da amostra de 5 mL/min, temperatura do ar de saída de 70°C, fluxo e pressão do ar comprimido, respectivamente, de 40 mL/min e 4 bar, e fluxo do ar de secagem de 1,5 m³/min. Em todos os experimentos a proporção de massa de carreador e massa de sólidos do extrato foi 1:1.

Diante dos resultados obtidos nos experimentos preliminares e devido às vantajosas propriedades intrínsecas para aplicações tópicas apresentadas pela quitosana, esta foi selecionada para a continuidade do trabalho. Assim, o próximo passo foi o estudo do processo de SDE utilizando a quitosana como carreador. Devido aos vários fatores que podem influenciar no processo *spray drying*, uma análise mais precisa dos parâmetros deste processo foi realizada utilizando-se planejamentos fatoriais (BOWEY; NEUFELD, 2010; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; ZHANG et al., 2010).

3.7.1.2. Estudo do processo por meio de planejamentos fatoriais

A produção, por *spray drying*, das micropartículas de quitosana contendo o extrato foi feita baseando-se em trabalhos presentes na literatura (KOSARAJU; D'ATH; LAWRENCE, 2006; OLIVEIRA; SANTANA; RÉ, 2006; FANG; BHANDARI, 2010; GELFUSO et al., 2011; HARRIS et al., 2011). Primeiramente, quantidade suficiente de quitosana (médio peso molecular e 85% de desacetilação, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) para produzir uma solução de 1% (m/m) foi dissolvida em uma solução aquosa de ácido acético 0,5% (v/v) (Synth Ltda, São Paulo, Brasil). Em seguida, seguindo os planejamentos fatoriais, em cada experimento foi adicionada quantidade suficiente do extrato hidroalcoólico. A mistura foi então levada ao mini *spray dryer* (Figura 6) para a produção das micropartículas. Este procedimento foi realizado separadamente para cada um dos experimentos referentes aos planejamentos fatoriais.

3.7.1.2.1. Planejamento fatorial fracionário

Inicialmente, o processo de SDE foi estudado por meio de um planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}) com dois níveis (-1 e +1) e cinco fatores, resultando em um total de oito experimentos (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003). Este planejamento foi utilizado para verificar a influência de diversos fatores sobre o rendimento do processo (R_e), diâmetro médio das micropartículas (D_{50}), teor de apigenina (θ_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo

(θ_{ApG}) nas micropartículas e a eficiência de encapsulação do processo com relação a apigenina (EE_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (EE_{ApG}). Os fatores estudados neste planejamento foram: temperatura de saída do ar de secagem (T), razão entre quitosana e extrato na amostra (QE), vazão de alimentação da amostra (VA), fluxo do ar comprimido (FAC) e pressão do ar comprimido (PAC). A Tabela 4 mostra estes cinco fatores com seus níveis na forma codificada, -1 e +1, e não codificada. Em todos os experimentos realizados no presente trabalho, QE foi determinado como a razão entre a massa de quitosana e a massa de sólidos do extrato hidroalcoólico na amostra. É importante salientar que a massa de sólidos do extrato hidroalcoólico na amostra foi calculada baseando no teor de sólidos do mesmo.

Tabela 4 - Planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}) utilizado no processo de SDE, com os fatores estudados e seus níveis na forma codificada e não codificada.

Experimento	X ₁ (T)	X ₂ (QE)	X ₃ (VA)	X ₄ (FAC)	X ₅ (PAC)
1	-1 (60)	-1 (0,5)	-1 (4)	-1 (40)	+1 (5)
2	-1 (60)	+1 (4,0)	-1 (4)	+1 (60)	-1 (3)
3	-1 (60)	-1 (0,5)	+1 (8)	+1 (60)	-1 (3)
4	-1 (60)	+1 (4,0)	+1 (8)	-1 (40)	+1 (5)
5	+1 (110)	-1 (0,5)	-1 (4)	+1 (60)	+1 (5)
6	+1 (110)	+1 (4,0)	-1 (4)	-1 (40)	-1 (3)
7	+1 (110)	-1 (0,5)	+1 (8)	-1 (40)	-1 (3)
8	+1 (110)	+1 (4,0)	+1 (8)	+1 (60)	+1 (5)

* X₁ - temperatura de saída do ar de secagem (°C). X₂ - razão entre quitosana e extrato na amostra (m/m). X₃ - vazão de alimentação da amostra (mL/min). X₄ - fluxo do ar comprimido (L/min). X₅ - pressão do ar comprimido (bar).

Os experimentos de SDE realizados seguindo o planejamento fatorial foram feitos de acordo com a Tabela 4 e utilizando fluxo do ar de secagem de 1,5 m³/min. A análise estatística da influência dos cinco fatores aqui estudados (T, QE, VA, FAC e PAC) sobre as respostas analisadas (R_e , D_{50} , θ_{Ap} , θ_{ApG} , EE_{Ap} e EE_{ApG}) foi feita por meio do *software* Statística 7 (Statsoft Inc., EUA).

3.7.1.2.2. Planejamento fatorial completo

Mediante os resultados obtidos, os fatores do SDE escolhidos para serem estudados pelo planejamento fatorial completo foram a temperatura de saída do ar de secagem (T) e a razão entre quitosana e extrato na amostra (QE). Um planejamento fatorial completo com três níveis, dois fatores, e duas replicatas no ponto central (3^2+2) foi utilizado. Assim como no planejamento anterior, as respostas avaliadas neste planejamento foram R_e , D_{50} , θ_{Ap} , θ_{ApG} , EE_{Ap}

e EE_{ApG} . A Tabela 5 mostra estes dois fatores estudados com os seus níveis na forma codificada, -1, 0 e +1, e não codificada.

Tabela 5 - Planejamento fatorial completo (3^2+2) utilizado no processo de SDE, com os fatores estudados e seus níveis na forma codificada e não codificada.

Experimento	X ₁	X ₂	T (°C)	QE (m/m)
1	-1	-1	70	1
2	-1	0	70	2
3	-1	+1	70	3
4	0	-1	90	1
5	0	0	90	2
6	0	+1	90	3
7	+1	-1	110	1
8	+1	0	110	2
9	+1	+1	110	3
10	0	0	90	2
11	0	0	90	2

* X₁ - T codificado. X₂ - QE codificado. T - temperatura de saída do ar de secagem. QE - razão entre quitosana e extrato na amostra.

Os valores do fluxo do ar de secagem, fluxo e pressão do ar comprimido, e vazão de alimentação da amostra foram fixados em 1,5 m³/min, 40 L/min, 4 bar e 5 mL/min, respectivamente para todos os experimentos deste planejamento.

3.7.2. *Spray freeze drying* do extrato hidroalcoólico

Assim, como realizado para o SDE, as micropartículas produzidas no processo de *spray freeze drying* do extrato hidroalcoólico (SFDE) foram preparadas utilizando como carreador a quitosana de médio peso molecular e 85% de desacetilação (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Essa decisão visou uma melhor comparação entre os processos de *spray drying* e *spray freeze drying* do extrato hidroalcoólico, bem como entre as características das micropartículas obtidas por estes dois processos.

O estudo do processo de SFDE foi realizada utilizando um planejamento fatorial completo com três níveis e dois fatores (3^2) totalizando 9 experimentos. Os fatores estudados foram vazão de alimentação da amostra (VA) e a razão entre quitosana e extrato na amostra (QE). O planejamento fatorial completo dos dois fatores aqui estudados com os seus níveis na forma codificada, -1, 0 e +1, e não codificada, é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Planejamento fatorial completo (3^2) utilizado no processo de SFDE.

Experimento	X ₁	X ₂	VA (mL/min)	QE (m/m)
1	-1	-1	8	1
2	-1	0	8	2
3	-1	+1	8	3
4	0	-1	12	1
5	0	0	12	2
6	0	+1	12	3
7	+1	-1	16	1
8	+1	0	16	2
9	+1	+1	16	3

* X₁ - VA codificado. X₂ - QE codificado. VA - vazão de alimentação da amostra. QE - razão entre quitosana e extrato na amostra.

A produção das micropartículas de extrato por SFDE consistiu de três etapas. A primeira etapa se refere ao preparo das amostras e foi a mesma realizada para o SDE, onde quantidade suficiente de quitosana para obter uma solução de 1% (m/m) foi dissolvida em uma solução aquosa de ácido acético 0,5% (v/v). Em seguida, de acordo com o planejamento apresentado na Tabela 6, quantidade suficiente de extrato hidroalcoólico foi adicionada à solução de quitosana. A segunda etapa foi caracterizada pela atomização da mistura de quitosana e extrato sobre uma atmosfera de nitrogênio líquido. A mistura foi bombeada por meio de uma bomba peristáltica até o bico atomizador, onde foi atomizada dentro do recipiente contendo o nitrogênio líquido. Foi utilizado um bico atomizador duplo fluído com diâmetro de abertura de 1,0 mm (Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) e pressão do ar comprimido de 3 bar. A vazão de alimentação da amostra em cada experimento foi determinada pelo planejamento fatorial completo (Tabela 6). Durante a atomização, nitrogênio líquido foi repostado para assegurar o congelamento instantâneo das microgotículas atomizadas. A terceira e última etapa foi a liofilização das amostras. Em cada experimento, no final da atomização de todo o conteúdo, a amostra foi levada ao liofilizador Christ Alpha 2-4 LSC plus (Martin Christ GmbH, Alemanha) para a obtenção das micropartículas. A liofilização foi feita por meio da secagem primária a 1,0 mbar por 96 horas seguida pela secagem secundária por 2 horas.

3.8. Método cromatográfico para caracterização do óleo essencial e quantificação do marcador do mesmo

O óleo essencial da *C. recutita* e da *Anthemis nobilis* (camomila romana) foram caracterizados por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (CG-EM). As análises

foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado à um espectrômetro de massa modelo QP-2010 (Shimadzu Co., Japão), utilizando uma coluna DB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) da marca J&W Scientific. O programa da temperatura do forno iniciou em 60°C, sendo aumentada numa taxa de 3°C/min até 240°C. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com fluxo constante de 1,1 mL/min. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL com razão de *split* de 1:10. As temperaturas de injeção e de interface foram, respectivamente, de 250°C e 290°C. A detecção no espectro de massa foi feita por meio do impacto de elétrons a 70 eV e aquisição dos dados foi feita no modo *scan* com varredura na faixa de 40 a 500 m/z. A identificação dos compostos voláteis foi realizada comparando-se os espectros de massa obtidos com os das bibliotecas espectrais WILEY 7, FFNSC1.3, e NIST 08.

O marcador do óleo essencial de *C. recutita* utilizado no presente estudo foi o óxido de bisabolol A. A quantificação deste marcador foi feita por meio da curva de calibração do óxido de bisabolol A grau de pureza $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) em hexano, usando as concentrações de 0,1; 10; 50; 100; 150 e 225 µg/mL, sendo cada uma delas feita em triplicata. O método de CG-EM utilizado para a quantificação de óxido de bisabolol A no óleo essencial de *C. recutita* foi o mesmo descrito acima para a caracterização dos óleos, com diferenças apenas no fato do método de quantificação utilizar *splitless* de 30 segundos como modo de injeção e a aquisição dos dados ter sido feita pelo monitoramento (Single Ion Monitoring) dos fragmentos 143, 180 e 220 m/z.

3.9. Produção das micropartículas contendo o óleo essencial

Assim como realizado para o extrato hidroalcoólico, as micropartículas contendo o óleo essencial também foram produzidas por *spray drying* e *spray freeze drying*, a fim de estudar e comparar estes dois processos, bem como avaliar a viabilidade dos mesmos para a produção das micropartículas contendo o óleo essencial de *C. recutita*. Como já mencionado, vários fatores podem influenciar tais processos e consequentemente a qualidade das micropartículas obtidas. Portanto, para permitir uma análise mais precisa, bem como a otimização dos processos de *spray drying* e *spray freeze drying* também para o óleo essencial de *C. recutita*, ambos os processos foram estudados por meio de planejamentos fatoriais. As respostas avaliadas pelos planejamentos e utilizadas para a otimização dos processos de *spray drying* e *spray freeze drying* do óleo essencial foram: rendimento do processo (R_e), diâmetro médio das micropartículas (D_{50}), teor de óxido de bisabolol A nas micropartículas (θ_{OB}) e eficiência de encapsulação dos processos com relação ao óxido de bisabolol A (EE_{OB}).

Cabe mencionar que devido aos bons resultados obtidos neste trabalho para o extrato hidroalcoólico, adicionado às vantajosas propriedades intrínsecas da quitosana para aplicação tópica, os processos de *spray drying* e *spray freeze drying* do óleo essencial foram feitos utilizando como carreador a quitosana de médio peso molecular e 85% de desacetilação (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil).

3.9.1. *Spray drying* do óleo essencial

O estudo e a posterior otimização do processo de *spray drying* do óleo essencial (SDO) foram realizados por meio do planejamento Box-Behnken com três níveis (-1, 0, +1) e três fatores (X_1 , X_2 , X_3), resultando em um total de 15 experimentos. Os fatores estudados foram temperatura de saída do ar de secagem (T), razão entre quitosana e óleo na amostra (QO) e fluxo do ar de secagem (FA). A Tabela 7 mostra estes três fatores com seus níveis na forma codificada, -1, 0 e +1, e não codificada. É importante mencionar que no presente trabalho os valores de QO correspondem à razão entre a massa de quitosana e a massa de óleo essencial na amostra.

Tabela 7 - Planejamento Box-Behnken usado no processo de SDO, com os fatores estudados e seus níveis na forma codificada e não codificada.

Experimento	X_1	X_2	X_3	T (°C)	QO (m/m)	FA (m ³ /min)
1	-1	-1	0	60	1	1,5
2	+1	-1	0	90	1	1,5
3	-1	+1	0	60	3	1,5
4	+1	+1	0	90	3	1,5
5	-1	0	-1	60	2	1,0
6	+1	0	-1	90	2	1,0
7	-1	0	+1	60	2	2,0
8	+1	0	+1	90	2	2,0
9	0	-1	-1	75	1	1,0
10	0	+1	-1	75	3	1,0
11	0	-1	+1	75	1	2,0
12	0	+1	+1	75	3	2,0
13	0	0	0	75	2	1,5
14	0	0	0	75	2	1,5
15	0	0	0	75	2	1,5

* X_1 - T codificado. X_2 - QO codificado. X_3 - FA codificado. T - temperatura de saída do ar de secagem. QO - razão entre quitosana e óleo na amostra. FA - fluxo do ar de secagem.

O processo SDO foi realizado baseado em trabalhos onde micropartículas contendo diferentes óleos foram produzidas por *spray drying*. (ESTEVINHO et al., 2013a; LI et al., 2013; QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011; RODRIGUES; GROSSO, 2008). Inicialmente, uma quantidade suficiente de quitosana para obter uma solução de 1% (m/m) foi adicionada à uma solução aquosa de ácido acético 0,5% (v/v) e agitada até que a quitosana se dissolvesse completamente. Em seguida, 5% (m/m) de surfactante (polissorbato 20 e 80 na proporção de 1:1) referente a massa de óleo usada em cada experimento, foi adicionado à solução de quitosana. A mistura foi então homogeneizada em um dispersor T25 digital Ultra-Turrax® (IKA®, Wilmington, EUA) a 15000 rpm. Após completa homogeneização da mistura, a agitação foi mantida, e quantidade suficiente de óleo referente a cada experimento (Tabela 7) foi então adicionada gota a gota à mistura. Após completa incorporação do óleo, a emulsão foi levada ao mini *spray dryer* MSD 0.5 (Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, Brasil), mostrado na Figura 6 para a produção das micropartículas. Este procedimento foi realizado separadamente para cada um dos experimentos do planejamento Box-Behnken (Tabela 7).

Em todos os experimentos o mini *spray dryer* operou utilizando o modo co-corrente, um bico atomizador duplo fluído, com diâmetro de abertura de 1,0 mm, vazão de alimentação da amostra de 5 mL/min, fluxo do ar comprimido de 35 mL/min e pressão do ar comprimido de 3 bar. Os demais parâmetros do processo de SDO variaram de acordo com o planejamento Box-Behnken (Tabela 7).

3.9.2. *Spray freeze drying* do óleo essencial

O estudo e a otimização do processo de *spray freeze drying* do óleo essencial (SFDO) para a obtenção das micropartículas foram realizados utilizando um planejamento fatorial completo com três níveis e dois fatores (3^2) totalizando 9 experimentos. Os fatores estudados foram a amplitude do bico ultrassônico (AP) e a razão entre quitosana e óleo na amostra (QO). O planejamento fatorial completo dos dois fatores aqui estudados com os seus níveis na forma codificada, -1, 0 e +1, e não codificada, é apresentado na Tabela 8. Os valores de amplitude são apresentados em porcentagem, sendo que 100% equivale a 114 microns.

Da mesma maneira que ocorreu no processo SFDE, a produção das micropartículas do óleo essencial por *spray freeze drying* consistiu de três etapas. A primeira etapa se refere ao preparo da emulsão de óleo e solução de quitosana, que foi feito da mesma forma que no processo de SDO e, portanto, está detalhadamente descrita no item 3.9.1. A segunda etapa foi caracterizada pela atomização da emulsão sobre uma atmosfera de nitrogênio líquido. A mistura foi bombeada por meio de uma bomba peristáltica até o bico atomizador ultrassônico modelo

630-0434 (Sonics & Materials Inc., Newtown, EUA) onde foi atomizada com auxílio de um processador ultrassônico modelo VCX 130 FSJ (Sonics & Materials Inc., Newtown, EUA) dentro do recipiente contendo nitrogênio líquido. Em todos os experimentos foi utilizada uma vazão de alimentação da amostra de 5 mL/min e o processador ultrassônico operou em uma frequência de 20 kHz e amplitudes determinadas pelo planejamento fatorial completo (Tabela 8). Durante a atomização, nitrogênio líquido foi repostado para assegurar o congelamento instantâneo das microgotículas atomizadas. A terceira e última etapa foi a liofilização das amostras, a qual foi feita da mesma forma como descrito no item 3.7.2

Tabela 8 - Planejamento fatorial completo (3^2), usado no processo de SFDO, com os fatores estudados e seus níveis na forma codificada e não codificada.

Experimento	X ₁	X ₂	AP (%)	QO (m/m)
1	-1	-1	30	1
2	-1	0	30	2
3	-1	+1	30	3
4	0	-1	50	1
5	0	0	50	2
6	0	+1	50	3
7	+1	-1	70	1
8	+1	0	70	2
9	+1	+1	70	3

* X₁ - AP codificado. X₂ - QO codificado. AP - amplitude do bico ultrassônico. QO - razão entre quitosana e óleo na amostra. **100% de amplitude corresponde a 114 microns.

3.10. Otimização dos processos de produção das micropartículas

As otimizações dos processos de *spray drying* e *spray freeze drying* do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial, foram feitas levando em consideração as seguintes respostas: rendimento do processo, diâmetro médio das micropartículas, teor de marcadores nas micropartículas e eficiência de encapsulação do processo com relação aos marcadores. Assim como na otimização do processo extrativo, as otimizações dos processos de SDE, SFDE, SDO e SFDO foram realizados pelo método da desejabilidade utilizando o *software* Minitab 14.0 (Minitab Inc., State College, EUA) módulo *Response optimizer*. Os valores estabelecidos para o *software* como baixo, alto e resposta desejada foram baseados nos dados experimentais obtidos para cada resposta ao seguir o planejamento fatorial aplicada em cada processo (Tabela 20, Tabela 25, Tabela 32 e Tabela 37). Os pontos ótimos dos processos de SDE, SFDE, SDO e SFDO foram determinados a fim de se obter máximo rendimento do processo, mínimo diâmetro médio das micropartículas, máximo teor dos marcadores nas micropartículas e máxima

eficiência de encapsulação do processo. Todas as respostas foram consideradas com o mesmo grau de importância e receberam o mesmo peso, que no caso foi 1. Os valores obtidos na otimização para os fatores estudados foram decodificados utilizando-se a Equação 2.

3.11. Obtenção do material liofilizado contendo as frações de *C. recutita*

As misturas liofilizadas do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial com quitosana, foram preparadas usando a razão entre a massa de quitosana e a massa de sólidos do extrato hidroalcoólico (QE) e a razão entre a massa de quitosana e a massa de óleo (QO) igual a 3. Antes do processo de liofilização propriamente dito, as misturas de quitosana com o extrato hidroalcoólico e com o óleo essencial foram preparadas seguindo a mesma metodologia utilizada para ao preparo das amostras para a produção das micropartículas contendo cada uma destas frações. Após o preparo das misturas, estas foram congeladas a -20°C por 24 horas. Decorrido este tempo, foram transferidas para o liofilizador (Christ Alpha 2-4 LSC plus, Martin Christ GmbH, Alemanha) onde foram liofilizadas nas mesmas condições de liofilização utilizadas no processo de *spray freeze drying*, isto é, secagem primária a 1,0 mbar por 96 horas seguida pela secagem secundária por 2 horas.

3.12. Caracterização dos processos e das micropartículas

Os processos de *spray drying* e *spray freeze drying* do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial, bem como as micropartículas produzidas pelos mesmos foram caracterizadas com relação ao: rendimento do processo, distribuição granulométrica, teor de marcadores, eficiência de encapsulação, atividade antioxidante *in vitro*, densidade aparente e compactada, Índice de Carr, Fator de Hausner, umidade, morfologia, liberação *in vitro* e estabilidade.

3.12.1. Rendimento dos processos

O rendimento dos processos (R_e) de *spray drying* e *spray freeze drying* foi calculado com base na razão da massa de micropartículas obtidas no final de cada experimento (m_f) e da massa inicial de sólidos presentes em cada experimento (m_i) como mostrado na Equação 6. No caso dos processos de SDE e SFDE, m_i corresponde a massa de sólidos presentes no extrato hidroalcoólico, obtida pelo teor de sólidos, mais a massa de quitosana presentes em cada experimento. Já para os processos de SDO e SFDO, m_i é referente à massa de óleo mais a massa de quitosana adicionadas em cada experimento. (BASTOS et al., 2012; MARTINS et al., 2013).

$$R_e(\%) = \left(\frac{m_f}{m_i} \right) \times 100$$

Equação 6

3.12.2. Distribuição granulométrica das micropartículas

A distribuição granulométrica das micropartículas foi determinada por difração a laser usando um difratômetro a laser modelo LS 13 320 (Beckman Coulter, Miami, EUA). As análises foram realizadas com uma suspensão das micropartículas em metanol (GELFUSO et al., 2011). A distribuição granulométrica das micropartículas foi avaliada por meio do diâmetro médio (D_{50}) e da polidispersividade (*span*) das micropartículas, que foi calculada de acordo com a Equação 7, onde D_{10} , D_{50} e D_{90} correspondem, respectivamente, aos diâmetros que 10%, 50% e 90% das micropartículas se apresentam. O valor de *span* representa uma medida da largura da distribuição de tamanho e indica a extensão da distribuição de tamanho das partículas (ALHALAWEH; ANDERSSON; VELAGA, 2009; MARTINS, 2014; NGUYEN; HERBERGER; BURKE, 2004).

$$span = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}}$$

Equação 7

3.12.3. Teor dos marcadores nas micropartículas

Como já mencionado, os marcadores usados para o extrato hidroalcoólico foram apigenina e apigenina-7-glicosídeo, enquanto que para o óleo essencial foi o óxido de bisabolol A. O teor destes marcadores nas micropartículas (θ) foi expresso em porcentagem e calculado de acordo com a Equação 8, onde *QTO* (quantidade total obtida) se refere à quantidade total dos marcadores realmente presente nas micropartículas, e *QTT* (quantidade total teórica) se refere à quantidade total dos marcadores que teoricamente deveriam estar presentes nas micropartículas levando em consideração a quantidade de extrato hidroalcoólico ou óleo essencial usada em cada experimento.

$$\theta(\%) = \left(\frac{QTO}{QTT} \right) \times 100$$

Equação 8

As quantidades totais de apigenina e de apigenina-7-glicosídeo realmente presentes nas micropartículas obtidas por SDE e SFDE, foram determinadas adaptando-se as metodologias descritas por Kosaraju, D'ath e Lawrence (2006) e Gelfuso et al. (2011). Assim, 10 mg destas micropartículas foram dispersas em 10 mL de solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) por 24 horas sob agitação de 500 rpm. Então, a dispersão foi deixada em banho de ultrassom por 30 minutos. Em seguida, 20 mL de metanol foi adicionado à dispersão e a mistura foi agitada à

500 rpm por 15 minutos. As amostras foram então filtradas (0,22 µm) e analisadas por CLAE (item 3.6) para a determinação de *QTO* da apigenina e *QTO* da apigenina-7-glicosídeo nas micropartículas contendo o extrato.

Já a determinação da quantidade total de óxido de bisabolol A realmente presente nas micropartículas obtidas por SDO e SFDO foi realizada baseando no trabalho de Quispe-Condori, Saldaña e Temelli (2011). Em um recipiente já contendo estas micropartículas previamente pesadas (10 mg), foi adicionado 5 mL de hexano. A mistura foi então levada para banho de ultrassom por 15 minutos. Em seguida a mistura foi centrifugada por 1 minuto a 830G. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e às micropartículas precipitadas foi adicionado mais 5 mL de hexano. A mistura foi novamente levada para banho de ultrassom e posteriormente centrifugada como já descrito. Este procedimento foi realizado 5 vezes para garantir que todo o óleo essencial presente nas micropartículas fosse extraído. Os sobrenadantes coletados em cada uma das cinco etapas foram misturados e então analisados por CG-EM (item 3.8), para a determinação de *QTO* do óxido de bisabolol A nas micropartículas contendo o óleo.

3.12.4. Eficiência de encapsulação dos processos

A eficiência de encapsulação dos processos de SDE, SFDE, SDO e SFDO foi determinada com relação aos marcadores do extrato e do óleo e representa a quantidade destes marcadores encapsulados nas micropartículas. O cálculo da eficiência de encapsulação (*EE*) foi obtido por meio da Equação 9 (LI et al., 2013). Como já mencionado *QTO* (quantidade total obtida) se refere à quantidade total dos marcadores presente nas micropartículas, e foi determinado como descrito no item 3.12.3. Já *QNE* (quantidade não encapsulada) corresponde à quantidade de marcadores que não foi encapsulada dentro das micropartículas, isto é, aos marcadores que ficaram na superfície das micropartículas.

$$EE(\%) = \left(\frac{QTO - QNE}{QTO} \right) \times 100$$

Equação 9

A determinação de *QNE* foi feita adaptando-se a metodologia descrita por Li et al. (2013). Para determinar o *QNE* referente à apigenina e o *QNE* referente à apigenina-7-glicosídeo, 10 mg de micropartículas contendo o extrato foram misturadas com 10 mL de metanol. A mistura foi então centrifugada por 1 minuto a 830 G e o sobrenadante coletado. Este procedimento foi realizado três vezes. Os sobrenadantes coletados foram então misturados e as quantidades de apigenina e de apigenina-7-glicosídeo presentes no mesmo foram quantificadas

por CLAE (item 3.6). A determinação de *QNE* referente ao óxido de bisabolol A nas micropartículas contendo o óleo foi feita da mesma maneira, mas usando hexano como solvente. A quantificação de óxido de bisabolol A no sobrenadante foi feita por CG-EM (item 3.8).

3.12.5. Atividade antioxidante *in vitro* das micropartículas

A atividade antioxidante *in vitro* das micropartículas, expressa em IC₅₀, também foi determinada pelo método do radical DPPH. Antes de realizar o ensaio propriamente dito de atividade antioxidante *in vitro*, as micropartículas foram rompidas para que todo o conteúdo de *C. recutita* presente nas mesmas fosse liberado. Para isto, 20 mg de micropartículas do extrato e do óleo foram adicionadas, respectivamente, à 20 mL de metanol e 20 mL de hexano e deixadas em banho de ultrassom por 45 minutos. A ruptura das micropartículas foi feita por sonicação, visto que a ruptura com o ácido acético poderia comprometer a eficiência do método (ANTOLOVICH et al., 2002).

Para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, a partir das soluções que continham as micropartículas rompidas foram feitas, em triplicata, para cada amostra, cinco diferentes concentrações. Em seguida, 50 µL de cada uma foi misturado com 2 mL de solução metanólica de DPPH (60 µM). O procedimento foi então realizado conforme descrito no item 3.5.3. Em cada ensaio, foi preparado também o branco e o controle positivo da reação.

3.12.6. Densidade das micropartículas

Para a determinação da densidade aparente e compactada adicionou-se uma massa (*m*) de micropartículas em uma proveta graduada de 10 mL. A densidade aparente (ρ_a) foi obtida pela razão da massa de amostra adicionada à proveta e o volume inicial (V_i) ocupado pela mesma na proveta, como mostrado na Equação 10 (PEREIRA, 2012; USP 30, 2007).

$$\rho_a (g/mL) = \frac{m}{V_i}$$

Equação 10

Para se obter a densidade compactada (ρ_c) a mesma amostra, ainda na proveta, foi submetida à compactação manual até o volume final (V_f) permanecer constante. Assim, a densidade compactada foi calculada conforme a Equação 11 (PEREIRA, 2012; USP 30, 2007).

$$\rho_c (g/mL) = \frac{m}{V_f}$$

Equação 11

3.12.7. Índice de Carr e Fator de Hausner das micropartículas

O Índice de Carr (IC) e o Fator de Hausner (FH) foram calculados utilizando a densidade compactada (ρ_c) e a densidade aparente (ρ_a) das micropartículas. Assim, o IC e o FH foram determinados conforme a Equação 12 e a Equação 13, respectivamente (PEREIRA, 2012; USP 30, 2007).

$$IC(\%) = \left(\frac{\rho_c - \rho_a}{\rho_c} \right)$$

Equação 12

$$FH = \frac{\rho_c}{\rho_a}$$

Equação 13

O IC e o FH estão relacionados com as propriedades de fluxo dos materiais. De acordo com a USP 30 (2007), valores menores que 11% para o IC e 1,11 para FH indicam um excelente fluxo, ao passo que valores de IC e FH maiores que 38% e 1,60, respectivamente, indicam um fluxo extremamente ruim.

3.12.8. Umidade das micropartículas

O teor de umidade das micropartículas contendo o extrato foi determinado por método gravimétrico, utilizando um analisador de umidade com lâmpada de halogênio MB 45 (Ohaus Co, Pine Brook, NJ) (COSTA-MACHADO, 2011; MARTINS et al., 2012; TACON, 2012). Já a avaliação do teor de umidade das micropartículas contendo o óleo foi feita pelo método de Karl Fischer com um Titrino Plus 870 KF (Metrohm, Herisau, Suíça), uma vez que estas micropartículas contém compostos voláteis (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; SOOTTITANTAWAT et al., 2003). Em ambos os métodos as análises foram realizadas em triplicata e usando 500 mg de micropartículas. O teor de umidade das micropartículas foi expresso em porcentagem (m/m).

3.12.9. Morfologia das micropartículas

A morfologia das micropartículas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Inicialmente as amostras foram recobertas com ouro em um *sputter coater* SCD050 (Bal-Tec, Fürstentun, Liechtenstein). Em seguida foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura EVO 50 (Carl Zeiss, Cambridge, Reino Unido) usando intensidade de 20 kV.

3.12.10. Liberação *in vitro* das frações de *C. recutita* a partir das micropartículas

O ensaio de liberação *in vitro* do extrato de *C. recutita* a partir das micropartículas foi realizado baseado nos trabalhos de Harris et al. (2011) e Martins (2014). Para comparação, as liberações *in vitro* do extrato hidroalcoólico liofilizado bem como da mistura liofilizada de extrato hidroalcoólico e quitosana também foram realizadas seguindo a mesma metodologia. Para os ensaios, quantidades de amostras correspondentes a 25 mg de extrato foram colocadas em Erlenmeyers contendo 50 mL de uma solução de 0,1 M de tampão fosfato (pH 6) com 40% (v/v) de metanol. As amostras foram mantidas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e sob agitação magnética por 24 horas. Durante os experimentos, alíquotas de 1 mL foram coletadas em intervalos de tempos determinados (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 e 24 horas) filtradas em filtro de membrana 0,22 μm e analisadas por CLAE (item 3.6) para determinar a quantidade de apigenina-7-glicosídeo liberada. O volume de amostra retirada foi repostado com a mesma quantidade de solução de 0,1 M de tampão fosfato (pH 6) com 40 % (v/v) de metanol.

Já o ensaio de liberação *in vitro* do óleo essencial de *C. recutita* a partir das micropartículas foi feito com base nos métodos descritos por O'Toole et al. (2012) e Ventura et al. (2011) e usando a mistura liofilizada de óleo essencial e quitosana como controle. Para a realização dos ensaios, quantidades de amostras correspondente a 10 mg de óleo essencial foram colocadas em Erlenmeyers contendo 50 mL de 0,1 M de tampão fosfato (pH 6) com 0,5% (v/v) de polissorbato 80. As amostras foram mantidas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e sob agitação magnética por 24 horas. Durante os experimentos, alíquotas de 1 mL foram coletadas, nos mesmos intervalos de tempos determinados para as amostras do extrato, e repostas com o igual volume de solução de 0,1 M de tampão fosfato (pH 6) com 0,5% (v/v) de polissorbato 80. As alíquotas coletadas foram misturadas com 1 mL de hexano e centrifugada por 5 minutos a 830 G para auxiliar na separação das fases aquosa e orgânica. A fase orgânica foi então coletada e analisada por CG-EM (item 3.8) para determinar a quantidade de óxido de bisabolol A liberado.

Todos os ensaios foram realizados em um agitador magnético multi ponto com banho de ar termostatizado, TAB/15 (Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) e utilizando Erlenmeyers de 100 mL devidamente tampados com tampa esmerilhada. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada amostra e a porcentagem de liberação dos marcadores (LB) foi determinada por meio da razão entre a quantidade de marcador liberada no meio em cada tempo (QL), e a quantidade inicial de marcador no meio (QI), como mostrado pela Equação 14.

$$LB(\%) = \left(\frac{QL}{QI} \right) \times 100$$

Equação 14

3.12.11. Estabilidade das micropartículas

A estabilidade das micropartículas durante a estocagem foi avaliada por um período de 90 dias sob duas condições: 25°C e 75% de umidade relativa e 40°C e 75% de umidade relativa. As estabilidades do extrato hidroalcoólico liofilizado, do óleo essencial e das misturas liofilizadas de extrato hidroalcoólico e quitosana e de óleo essencial e quitosana também foram realizadas como controle. Para a realização dos ensaios, as amostras foram colocadas em recipientes de polietileno opacos hermeticamente fechados, e estes por sua vez foram armazenados em dessecadores com umidade relativa de 75%, mantida por solução saturada de cloreto de sódio. Os dessecadores foram então mantidos em uma sala com temperatura controlada de 25°C e em estufa a 40°C. As amostras foram avaliadas nos dias 0, 7, 15, 30, 60 e 90. A estabilidade foi determinada por meio da quantificação da apigenina e apigenina-7-glicosídeo presentes nas amostras contendo o extrato por CLAE, e do óxido de bisabolol A presentes nas amostras contendo o óleo por CG-EM. A estabilidade foi expressa como retenção dos marcadores (*RT*) nas amostras e calculada de acordo com a Equação 15, onde *QR* é a quantidade remanescente de marcador em cada tempo analisado, e *QI* é a quantidade inicial de marcador, ou seja, quantidade de marcador presente nas amostras no dia zero. As análises foram realizadas em triplicata (LI et al., 2013).

$$RT(\%) = \left(\frac{QR}{QI} \right) \times 100$$

Equação 15

3.13. Estudos preliminares de permeação cutânea *in vitro*

Os estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* foram realizados com as micropartículas obtidas nas condições otimizadas do processo de SDE, visto que de maneira geral estas apresentaram melhores resultados que as obtidas nas condições otimizadas do processo de SFDE. Além disso, estas micropartículas estão sendo estudadas para o tratamento e a prevenção de radiodermite pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Emília Campos de Carvalho da Faculdade de Enfermagem de Ribeirão Preto, USP.

Para a avaliação da permeação e retenção as micropartículas, na concentração de 10,8% (correspondente a 3% de extrato), foram incorporadas à uma mistura de silicones Dow Corning

(DC) 9040 e DC 245 nas concentrações de 54,2% e 35%, respectivamente. Para comparação, 3% de extrato hidroalcoólico liofilizado também foi incorporado à mistura de silicones.

Os experimentos de permeação cutânea *in vitro* foram realizados em células de difusão vertical de Franz (Figura 7). Neste tipo de célula, uma membrana é colocada horizontalmente entre os compartimentos inferior (receptor) e o superior (doador). Estes dois compartimentos são mantidos fixos por meio de uma presilha de metal. A temperatura do compartimento receptor é mantida por um banho termostatzado de água circulante. A homogeneidade da solução receptora é assegurada pelo uso de uma barra magnética, visto que as células são posicionadas sobre uma plataforma de agitação.

Figura 7 - Esquema da célula de difusão vertical de Franz. (Adaptado de PermeGear. Disponível em: <<http://www.permegear.com/franz.htm>>. Acesso em 15 dez. 2014).

Neste estudo, foram utilizadas peles de orelhas de porcos como membrana de permeação. As orelhas de porcos foram coletadas após o abate dos animais (Olhos D'Água Indústria e Comércio de Carnes Ltda, Ipuã, Brasil). A pele foi cuidadosamente dissecada com auxílio de um bisturi para remoção do tecido subcutâneo e em seguida armazenada a -20°C . Para a realização dos experimentos, as peles foram colocadas nas células de Franz com área de difusão de $1,70\text{ cm}^2$ e com o estrato córneo (EC) voltado para o compartimento doador, e a região da derme voltada para o compartimento receptor. A solução receptora foi composta por 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,2) com 20% (v/v) de etanol. Esta solução foi continuamente agitada e mantida a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante todo o experimento.

As misturas de silicones contendo as micropartículas e aquelas contendo o extrato liofilizado (500 mg de cada) foram colocadas no compartimento doador, sobre a pele de orelha de porco. Vinte e quatro horas após a aplicação das misturas, as peles foram retiradas da célula de difusão e fixadas em uma superfície lisa (com o EC voltado para cima) de forma a deixar exposta apenas a área de permeação. Os excessos de formulações presentes nas superfícies das peles foram delicadamente removidos. O EC foi então removido por meio da técnica de *tape*

stripping, usando 16 pedaços de fita adesiva, sendo que a primeira fita foi desprezada, por conter excesso de formulação. As fitas foram colocadas em tubos falcon contendo 5 mL de solução extratora, composta por metanol e solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) na proporção de 2:1. Os tubos foram então agitados em vórtex por 5 minutos. As fitas foram retiradas dos tubos com o auxílio de pinças e as soluções foram transferidas para um segundo tubo falcon e levadas ao ar comprimido para evaporação total do solvente. O conteúdo dos tubos foi ressuspensionado em 1 mL de solução extratora, filtrado (0,22 µm) e analisado por CLAE (item 3.6).

Após a retirada do EC, a epiderme e derme (ED) referente à área de permeação foi recortada, picotada e os fragmentos foram colocados em tubos falcon, contendo 5 mL de solução extratora. Os tubos contendo os fragmentos de pele imerso na solução extratora foram levados a um dispersor T25 digital Ultra-Turrax® (IKA®, Wilmington, EUA) por 3 minutos a 10000 rpm, e logo após deixados em banho de ultrassom por 30 minutos. Em seguida foram agitados em vórtex durante 2 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 985 G. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos falcon e levadas ao ar comprimido para evaporação total do solvente. O conteúdo dos tubos foi ressuspensionado em 1 mL de solução extratora, filtrado (0,22 µm) e analisado por CLAE (item 3.6).

Ao final do experimento de permeação (24 horas), as soluções receptoras presentes nos compartimentos receptores de cada célula de difusão foram transferidas para tubos falcon e levadas ao ar comprimido para evaporação do solvente. O conteúdo dos tubos foi ressuspensionado em 1 mL de solução extratora, filtrado (0,22 µm) e analisado por CLAE (item 3.6).

3.14. Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados obtidos nos planejamentos fatoriais foram realizadas pela análise de variância (ANOVA), a fim de avaliar a significância dos efeitos dos fatores estudados sobre as respostas analisadas. Os dados foram analisados pelo *software* Statistica 7 (Statsoft Inc., EUA) e os efeitos dos fatores foram considerados significantes apenas quando o valor de *p* foi menor que 0,05. Quando possível, a análise do planejamento fatorial pela MSR foi utilizada para modelar a dependência entre as respostas analisadas e os fatores estudados por meio de uma equação polinomial, como mostrado pela Equação 16.

$$Y = A_0 + \sum_{i=1}^n A_i X_i + \sum_{i=1}^n A_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n A_{ij} X_i X_j$$

Equação 16

Na Equação 16, Y é a variável dependente (resposta), X_i são os fatores estudados, n é o número de fatores estudados e A_0 , A_i , A_{ii} e A_{ij} são os coeficientes obtidos pelo ajuste do modelo, sendo A_0 a interseção.

As determinações das características dos processos SDE, SFDE, SDO e SFDO otimizados e das micropartículas obtidas nestes foram realizadas em triplicata e apresentadas como média $\pm$ desvio padrão. As comparações entre SDE e SFDE e entre SDO e SFDO, nas condições otimizadas, foram feitas por meio de análises estatísticas usando o teste t-Student. ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni foi usada para comparações múltiplas. O *software* GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA) foi utilizado para todas as comparações. Os valores foram considerados significativamente diferentes quando o valor de p foi menor que 0,05.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial

Para assegurar que o extrato hidroalcoólico de *C. recutita* possuísse as características desejadas para o estudo, optou-se por estudar o processo extrativo do mesmo, bem como otimizá-lo com relação a vários fatores, tais como teor de sólidos, teor de flavonóides totais e atividade antioxidante *in vitro*. É importante mencionar que o processo extrativo para a obtenção do óleo essencial de *C. recutita* não foi estudado devido ao baixo rendimento, que é consequência do baixo teor de óleo essencial presente nas inflorescências de *C. recutita* (BORSATO et al., 2008; SRIVASTAVA; GUPTA, 2009a). Porém, para assegurar a autenticidade e qualidade do óleo essencial de *C. recutita* utilizado neste trabalho, o mesmo foi caracterizado por CG-EM e seu cromatograma foi comparado ao cromatograma do óleo essencial de camomila romana (*Anthemis nobilis*), também obtido por CG-EM.

Antes da realização do processo extrativo para a obtenção do extrato hidroalcoólico, as inflorescências secas de *C. recutita* foram moídas e em seguida foi determinado o índice de intumescência das mesmas.

4.2. Distribuição granulométrica das inflorescências

A distribuição granulométrica das inflorescências secas e moídas de *C. recutita* é mostrada na Figura 8. Estas apresentaram distribuição granulométrica Gaussiana, diâmetro médio (D_{50}) de 410 μm e D_{90} de 578 μm , o qual indica que 90% das inflorescências secas e moídas apresentaram diâmetro inferior a 578 μm .

Figura 8 - Distribuição granulométrica das inflorescências secas e moídas de *C. recutita*.

A análise da distribuição granulométrica do material vegetal é importante para o processo extrativo, uma vez que o tamanho das partículas influencia na extração dos constituintes químicos. Já é conhecido que quanto menor o tamanho de partícula, mais eficiente é o processo extrativo. Existem na literatura estudos de extração em que foram utilizados materiais vegetais com tamanho de partícula variando de 150 à 825 μm (COSTA-MACHADO, 2011; DIOUF; STEVANOVIC; BOUTIN, 2009; FAN et al., 2008; JACQUES et al., 2007; LUTHRIA; BISWAS; NATARAJAN, 2007). Portanto, como 90% das partículas apresentaram tamanho de partícula abaixo de 578 μm , optou-se por utilizar na extração todo o material vegetal moído.

4.3. Índice de intumescência das inflorescências

O índice de intumescência das inflorescências secas e moídas foi calculado para todos os solventes utilizados como líquido extrator no presente trabalho, pois só é possível extrair ativos de uma planta após o intumescimento da mesma (TACON, 2012). Os solventes utilizados foram soluções hidroalcoólicas com 26,4%, 40%, 50%, 60%, 80%, 84,8%, 90% e 93,6% de etanol, e os índices de intumescência obtidos para cada um deles foram, respectivamente, 7,6; 4,2; 2,4; 1,9; 1,8; 1,6; 1,4 e 1,3 mL/g.

4.4. Estudo do processo extrativo

4.4.1. Planejamento fatorial fracionário

O processo extrativo é uma etapa importante para a padronização do extrato de uma planta. No entanto, este processo possui um grande número de fatores que podem influenciar nas características do extrato obtido, tais como o tamanho de partícula da planta, a natureza e o volume do solvente utilizado, a mistura de solventes em diferentes proporções, a temperatura, o estado da planta (se seca ou fresca), a quantidade de planta utilizada, a agitação, o tempo de extração e o pH (COSTA-MACHADO; BASTOS; FREITAS, 2013). Neste contexto, o planejamento experimental surge como uma ferramenta poderosa, uma vez que fornece o máximo de informações sobre os fatores que influenciam as respostas avaliadas, com um menor investimento e em menos tempo (COSTA-MACHADO; BASTOS; FREITAS, 2013; LI, 2003; NORIEGA et al., 2012).

Pelo fato do processo de extração ser influenciado por vários fatores, primeiramente foi realizado um estudo preliminar do processo por meio de um planejamento fatorial fracionário, o qual permite avaliar claramente os fatores mais influentes em um processo. Neste tipo de

planejamento a interação entre os fatores são desconsideradas (COSTA-MACHADO; BASTOS; FREITAS, 2013). No entanto, o foco sobre os efeitos principais para fins de triagem é justificado pelo Princípio de Ordem Hierárquica, o qual afirma que os efeitos principais tendem a ser mais importantes do que as interações (CHAKRABORTY et al., 2009; COSTA-MACHADO; BASTOS; FREITAS, 2013).

Com base na literatura (COSTA-MACHADO; BASTOS; FREITAS, 2013; POMPEU; SILVA; ROGEZ, 2009; TACON; FREITAS, 2013), os fatores temperatura de extração (T_E), porcentagem de planta utilizada em relação ao solvente (P_P), porcentagem de etanol (P_E), tempo de extração (t_E) e velocidade de agitação (V) foram estudados pelo planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}) com o objetivo de se escolher três destes fatores para serem estudados nas próximas etapas do estudo da extração. As respostas analisadas foram teor de sólidos (TS) e teor de flavonóides totais (TFT) dos extratos.

A análise estatística da influência dos cinco fatores estudados sobre as duas respostas avaliadas no planejamento fatorial fracionário é mostrada na Figura 9. A análise desta figura permite verificar se os fatores estudados influenciaram significativamente o TS e o TFT, bem como verificar os fatores que mais influenciaram nas respostas estudadas.

Figura 9 - Influência dos fatores estudados no planejamento fatorial fracionário da extração sobre o teor de sólidos e o teor de flavonóides totais dos extratos hidroalcoólicos.

A intensidade (valor em módulo) da estimativa dos efeitos do planejamento fatorial fracionário permitiu avaliar, comparativamente, a influência que cada fator exerceu sobre as respostas estudadas (COSTA-MACHADO, 2011). A Figura 9 mostra que, de maneira geral, os três fatores que mais influenciaram as respostas estudadas foram P_P com intensidade da estimativa do efeito de 6,67, seguido por P_E que apresentou intensidade da estimativa do efeito de 4,16 e T_E com intensidade da estimativa do efeito de 1,98. A influência de P_P sobre TS e TFT está relacionada com o fato dos sólidos solúveis e compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides, serem substâncias extraídas da planta, o que faz com que sejam influenciados pela

quantidade de planta utilizada. Já a influência de P_E sobre TS e TFT é devido ao fato de diferentes porcentagens de etanol em soluções hidroalcoólicas resultar em polaridades diferentes e, portanto, interferirem de forma diferente na extração de flavonóides e sólidos solúveis (COSTA-MACHADO, 2011; HUANG et al., 2009; PINELO; SINEIRO; NÚÑEZ, 2006). Por fim, a influência de T_E sobre TS e TFT está relacionada com o fato da temperatura interferir na solubilidade do soluto, no coeficiente de difusão e na constante dielétrica da água, afetando assim a extração dos compostos e possivelmente auxiliando a extração de TFT (COSTA-MACHADO, 2011; PINELO; SINEIRO; NÚÑEZ, 2006).

Pode ser visto na Figura 9 que a influência de V sobre TS e TFT foi relativamente pequena e não significativa, o que mostra que mesmo na velocidade de 300 rpm ocorreu uma homogeneização satisfatória do solvente com o soluto, o que provavelmente impediu a saturação da camada limite, que é uma fina camada de solvente que mantém o contato direto com as partículas da planta. De acordo com a literatura, a agitação do meio resulta em efeitos convectivos com diminuição da camada limite, permitindo assim a transferência de massa dos constituintes químicos da planta para o solvente (COSTA-MACHADO; BASTOS; FREITAS, 2013; JACQUES et al., 2007; LIST; SCHMIDT, 1989; PRISTA; MORGADO, 1995).

Em métodos extrativos guiados pela concentração de equilíbrio, como é o caso da maceração dinâmica, o tempo de extração (t_E) é um fator que deve ser considerado. Isso porque, nesses métodos, há um tempo mínimo necessário para que o solvente intumesça e hidrate a planta, solubilize os compostos dentro das células e então os difunda no solvente (COSTA-MACHADO; BASTOS; FREITAS, 2013; PRISTA; MORGADO, 1995). No entanto, no presente trabalho pode ser visto que, de maneira geral, t_E não estava entre os fatores que mais influenciaram TS e TFT (Figura 9). A agitação nesse caso provavelmente promoveu uma rápida homogeneização do soluto no solvente, fazendo com que o equilíbrio fosse atingido antes de 1 hora, o menor tempo usado neste planejamento. Além disso, de acordo com a literatura, outros fatores, como a temperatura e a velocidade de agitação, podem influenciar no tempo de extração (COSTA-MACHADO; BASTOS; FREITAS, 2013; PRISTA; MORGADO, 1995).

Diante do que foi apresentado acima, P_P , P_E e T_E foram selecionados para a continuidade do estudo da extração, já que foram estes fatores os que mais influenciaram nas respostas avaliadas no planejamento fatorial fracionário, TS e TFT. Assim, o próximo passo foi utilizar o planejamento composto central para estudar mais detalhadamente o processo de extração da *C. recutita* para a obtenção do extrato hidroalcoólico, bem como para possibilitar a otimização deste processo.

4.4.2. Planejamento composto central

O planejamento composto central foi utilizado no processo extrativo a fim de se estudar a influência dos fatores, P_P , P_E e T_E sobre o teor de sólidos (TS), teor de flavonóides totais (FT) e atividade antioxidante *in vitro* (IC_{50}) dos extratos hidroalcoólicos. Além disso, este planejamento foi executado com o objetivo de otimizar o processo de extração do extrato hidroalcoólico de *C. recutita*. Os resultados obtidos para cada resposta estudada neste planejamento são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados obtidos para as respostas estudadas no processo de extração do extrato hidroalcoólico de *C. recutita* seguindo o planejamento composto central.

Experimento	TS (%)	TFT (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1	2,46	2,25	25,33
2	4,30	2,35	32,60
3	2,28	3,21	25,57
4	4,19	3,95	19,06
5	2,86	2,44	24,74
6	4,92	2,47	22,85
7	2,53	3,36	18,70
8	4,96	3,62	18,80
9	1,02	3,15	20,38
10	6,24	3,37	17,60
11	2,76	1,49	36,23
12	2,55	3,00	34,54
13	3,99	3,20	16,35
14	4,95	2,85	17,54
15	4,49	3,14	14,80
16	4,68	3,02	13,82
17	4,73	2,91	13,38

* TS - teor de sólidos. TFT - teor de flavonóides totais. IC_{50} - atividade antioxidante *in vitro* expressa como concentração inibitória de 50% de DPPH.

4.4.2.1. Teor de sólidos

O teor de sólidos (TS) dos extratos hidroalcoólicos seguindo o planejamento composto central variou de 1,02 a 6,24%. Os resultados obtidos pelas análises estatísticas do TS dos extratos hidroalcoólicos são apresentados na Tabela 10. Esta tabela mostra que o termo linear e quadrático da porcentagem de planta (P_P e P_P^2), o termo quadrático da porcentagem de etanol (P_E^2) e o termo linear da temperatura de extração (T_E) exerceram influência significativa no TS dos extratos hidroalcoólicos.

Tabela 10- Análises estatísticas do teor de sólidos (TS) dos extratos hidroalcoólicos em função dos fatores estudados no processo de extração pelo planejamento composto central.

Variáveis estudadas	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
P_P	21,2180	1	21,2180	154,5446	0,000005^a
P_P²	1,3412	1	1,3412	9,7685	0,016715^a
P _E	0,0604	1	0,0604	0,4396	0,528548
P_E²	5,3837	1	5,3837	39,2133	0,000419^a
T_E	0,9779	1	0,9779	7,1225	0,032055^a
T _E ²	0,0263	1	0,0263	0,1915	0,674875
P _P x P _E	0,0242	1	0,0242	0,1763	0,687189
P _P x T _E	0,0672	1	0,0672	0,4897	0,506638
P _E x T _E	0,00000	1	0,00000	0,0000	1,000000
Erro	0,96105	7	0,13729		

* P_P - porcentagem de planta utilizada em relação ao solvente. P_E - porcentagem de etanol. T_E - temperatura de extração. ^aSignificante com $p < 0,05$.

A Equação 17 é o modelo ajustado ($R^2 = 0,967$) obtido pelas análises estatísticas que relaciona o teor de sólidos (TS) dos extratos hidroalcoólicos com a porcentagem de planta utilizada em relação ao solvente (P_P), porcentagem de etanol (P_E) e temperatura de extração (T_E). Como o ajuste do modelo matemático usado é avaliado pelo R^2 , o valor do mesmo aqui obtido confirmou a validade e a adequação do modelo matemático. Além disso, o alto valor de R^2 obtido indica um bom grau de correlação entre os valores reais e previstos de TS dos extratos hidroalcoólicos (GAN; ABDUL MANAF; LATIFF, 2010; MARTINS, 2014).

$$TS(\%) = 4,63 + 1,25 \left(\frac{P_P - 20}{10} \right) - 0,35 \left(\frac{P_P - 20}{10} \right)^2 - 0,69 \left(\frac{P_E - 60}{20} \right)^2 + 0,27 \left(\frac{T_E - 45}{15} \right)$$

Equação 17

Os efeitos dos fatores significantes, P_P, P_E e T_E, sobre o teor de sólidos podem ser vistos na Figura 10. Esta figura mostra que quanto maior P_P maior TS. Além deste fato ter ocorrido também nos trabalhos de Costa-Machado (2011) e Tacon (2012), o resultado aqui obtido está de acordo com a literatura uma vez que sólidos solúveis são substâncias extraídas da planta e, portanto, quanto maior a quantidade de planta utilizada, maior sua disponibilidade para serem extraídos (COSTA-MACHADO, 2011; HUANG et al., 2009; PINELO; SINEIRO; NÚÑEZ, 2006; TACON, 2012).

Com base na Figura 10 pode ser verificado também que maiores valores de TS foram obtidos com valores intermediários de P_E. Uma hipótese para a explicação deste resultado pode

ser o fato de soluções hidroalcoólicas de polaridades intermediárias serem capazes de extrair tanto compostos polares quanto compostos apolares, o que provavelmente resulta em uma maior quantidade de sólidos solúveis extraídos.

Com relação à influência de T_E sobre TS, é possível observar que quanto maior a temperatura utilizada durante a extração, maior o teor de sólidos dos extratos obtidos (Figura 10). Embora exista uma divergência na literatura com relação à temperatura utilizada nos métodos extrativos (MOURE et al., 2001), o mais aceito é que o aumento da temperatura promove o aumento da solubilidade do soluto, do coeficiente de difusão e da constante dielétrica da água, favorecendo assim a extração de diversos compostos (COSTA-MACHADO; BASTOS; FREITAS, 2013; PINELO; SINEIRO; NÚÑEZ, 2006).

Figura 10 - Gráficos de superfície de resposta do teor de sólidos (TS) dos extratos hidroalcoólicos obtidos no planejamento composto central em função dos fatores percentagem de etanol (P_E), percentagem de planta (P_P) e temperatura de extração (T_E).

4.4.2.2. Flavonóides totais

A análise do teor de flavonóides totais (TFT) presente nos extratos hidroalcoólicos foi realizada uma vez que os flavonóides são uns dos principais bioativos responsáveis pelas ações terapêuticas dos extratos de *C. recutita* (GUPTA et al., 2010; MCKAY; BLUMBERG, 2006; SRIVASTAVA; GUPTA, 2009a; SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010; WEBER et al., 2008). Além disso, a determinação de TFT nos extratos hidroalcoólicos foi feita, pois dois flavonóides, apigenina e apigenina-7-glicosídeo, foram os marcadores do extrato hidroalcoólico utilizados para os estudos dos processos de *spray drying* e *spray freeze drying* do mesmo.

A Tabela 9 mostra que os valores de TFT presentes nos extratos hidroalcoólicos obtidos pelo planejamento composto central ficou entre 1,49 e 3,95% (m/m). Estes valores estão coerentes com a literatura, onde foram encontrados teores de flavonóides totais de 0,3 a 3,0% para extratos de *C. recutita* (FRANKE; SCHILCHER, 2005; REIS et al., 2011). No entanto, o teor mínimo de flavonóides totais presentes nos extratos de *C. recutita* deve ser de 2,5% (DOWD, 1959; REIS et al., 2011). Dessa forma, os valores de TFT aqui obtidos mostraram que embora alguns experimentos tenham apresentado valores adequados, outros apresentaram valores insatisfatórios.

As análises estatísticas mostraram que o TFT dos extratos hidroalcoólicos foi influenciado apenas pela porcentagem de etanol (Tabela 11). Como pode ser visto nesta tabela, a influência deste fator foi de forma linear e quadrática (P_E e P_E^2).

Tabela 11 - Análises estatísticas do teor de flavonóides totais (TFT) dos extratos hidroalcoólicos em função dos fatores estudados no processo de extração pelo planejamento composto central.

Variáveis estudadas	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
P_P	0,1651	1	0,1651	5,3030	0,054763
P_P^2	0,1378	1	0,1378	4,4114	0,073836
P_E	3,7619	1	3,7619	120,8066	0,000011^a
P_E^2	0,7053	1	0,7053	22,6484	0,002062^a
T_E	0,0156	1	0,0156	0,5022	0,501449
T_E^2	0,0080	1	0,0080	0,2582	0,626947
$P_P \times P_E$	0,0978	1	0,0978	3,1390	0,119734
$P_P \times T_E$	0,0392	1	0,0392	1,2584	0,298957
$P_E \times T_E$	0,0295	1	0,0295	0,9485	0,362543
Erro	0,2180	7	0,0311		

* P_P - porcentagem de planta utilizada em relação ao solvente. P_E - porcentagem de etanol. T_E - temperatura de extração. ^aSignificante com $p < 0,05$.

A Equação 18, obtida pelas análises estatísticas, é o modelo ajustado ($R^2 = 0,960$) que relaciona o teor de flavonóides totais (TFT) dos extratos hidroalcoólicos com a porcentagem de etanol (P_E).

$$TFT (\%) = 3,02 + 0,53 \left(\frac{P_E - 60}{20} \right) - 0,25 \left(\frac{P_E - 60}{20} \right)^2$$

Equação 18

O efeito da porcentagem de etanol sobre o teor de flavonóides totais dos extratos hidroalcoólicos pode ser visto na Figura 11. Os gráficos de superfície presentes nesta figura tendem à forma de sela devido à influência significativa de P_E^2 sobre TFT. Além disso, pode ser visto na Figura 11 que a influência do termo linear de P_E foi diretamente proporcional ao TFT, ou seja, quanto maior o P_E utilizado, maior foi o TFT obtido. Este resultado é coerente com a literatura, visto que altas proporções de etanol em soluções hidroalcoólicas favorecem a extração de compostos fenólicos, dentre eles flavonóides e fenóis (COSTA-MACHADO, 2011; HUANG et al., 2009; PINELO; SINEIRO; NÚÑEZ, 2006).

Figura 11 - Gráficos de superfície de resposta do teor de flavonóides totais (TFT) dos extratos hidroalcoólicos obtidos no planejamento composto central em função dos fatores porcentagem de etanol (P_E), porcentagem de planta (P_P) e temperatura de extração (T_E).

4.4.2.3. Atividade antioxidante *in vitro*

A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos obtidos no planejamento composto central foi realizada pelo método do radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH). Tal método foi escolhido por ser muito utilizado para a determinação da atividade antioxidante de compostos isolados, bem como para diferentes extratos de plantas. Outro fator

que também contribuiu para a utilização deste método foi sua sensibilidade, rapidez e uso de pequena quantidade de amostra (ABDOUL-LATIF et al., 2011; KULISIC et al., 2004; TACON, 2012).

A atividade antioxidante *in vitro* obtida foi expressa em IC₅₀, que corresponde à concentração necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH. Portanto, quanto menor o valor de IC₅₀ mais antioxidante é a amostra. Para comparação, as atividades antioxidantes da quercetina e do α -tocoferol, compostos de reconhecida atividade antioxidante, também foram determinadas pelo método do DPPH utilizado no presente trabalho. Os valores de IC₅₀ obtidos para esses dois compostos foram $1,14 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$ e $8,23 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, os quais estão em conformidade com a literatura (COSTA-MACHADO, 2011; KULISIC et al., 2004).

De acordo com a Tabela 9 os extratos hidroalcoólicos obtidos no planejamento composto central apresentaram IC₅₀ entre 13,38 e 36,23 $\mu\text{g/mL}$. Estes valores mostram que os extratos apresentaram uma menor atividade antioxidante que a quercetina e o α -tocoferol. No entanto, tais valores indicam que os extratos apresentaram boa atividade antioxidante, pois é necessária uma pequena concentração de extrato, na ordem de $\mu\text{g/mL}$, para inibir o radical DPPH, o que está de acordo com a literatura (ABDOUL-LATIF et al., 2011) e é semelhante à atividade antioxidante de outras plantas medicinais, tais como *Terminalia brasiliensis*, *Copaifera langsdorffii*, *Copernicia cerifera* e *Endopleura uchi*. (COSTA-MACHADO, 2011; LIMA et al., 2006; SOUSA et al., 2007; TACON; FREITAS, 2013).

As análises estatísticas realizadas para a atividade antioxidante *in vitro* (IC₅₀) dos extratos hidroalcoólicos obtidos pelo planejamento composto central são apresentadas na Tabela 12. Os resultados presentes nesta tabela mostram que apenas o termo quadrático da porcentagem de etanol (P_E^2) exerceu influência significativa sobre o IC₅₀ dos extratos.

A Equação 19 é o modelo ajustado ($R^2 = 0,904$) resultante das análises estatísticas, que relaciona atividade antioxidante *in vitro* (IC₅₀) dos extratos hidroalcoólicos e a porcentagem de etanol (P_E).

$$IC_{50}(\mu\text{g/mL}) = 14,06 + 7,37 \left(\frac{P_E - 60}{20} \right)^2$$

Equação 19

A Figura 12 permite uma visualização da influência da porcentagem de etanol sobre a atividade antioxidante *in vitro* (IC₅₀) apresentada pelos extratos hidroalcoólicos obtidos no planejamento composto central. A análise desta figura mostra que os menores valores de IC₅₀

e, portanto, maiores atividades antioxidantes, foram obtidos com valores intermediários de P_E . Isso indica que a atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos aqui obtidos provavelmente não está relacionada apenas com o teor de flavonóides totais presentes no extrato, mas também com os demais constituintes químicos extraídos, o que também ocorreu nos trabalhos de Kazan et al. (2014) e Kukula-Koch et al. (2013). Como já dito, valores intermediários de P_E resultaram em um maior teor de sólidos, isto é, maior quantidade de sólidos solúveis extraídos e consequentemente maior probabilidade de se ter compostos químicos com atividade antioxidante (KAZAN et al., 2014; KUKULA-KOCH et al., 2013).

Tabela 12 - Análises estatísticas da atividade antioxidante (IC_{50}) dos extratos em função dos fatores estudados no processo de extração pelo planejamento composto central.

Variáveis estudadas	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
P_P	2,3815	1	2,3815	0,2159	0,656327
P_P^2	27,3606	1	27,3606	2,4799	0,159313
P_E	50,4200	1	50,4200	4,5699	0,069868
P_E^2	610,4721	1	610,4721	55,3310	0,000145^a
T_E	17,5412	1	17,5412	1,5899	0,247743
T_E^2	7,8473	1	7,8473	0,7113	0,426903
$P_P \times P_E$	17,3755	1	17,3755	1,5749	0,249776
$P_P \times T_E$	0,8128	1	0,8128	0,0737	0,793896
$P_E \times T_E$	1,2880	1	1,2880	0,1167	0,742624
Erro	77,2316	7	11,0331		

* P_P - porcentagem de planta utilizada em relação ao solvente. P_E - porcentagem de etanol. T_E - temperatura de extração. ^aSignificante com $p < 0,05$.

Figura 12 - Gráficos de superfície de resposta da atividade antioxidante *in vitro* (IC_{50}) dos extratos hidroalcoólicos obtidos no planejamento composto central em função dos fatores porcentagem de etanol (P_E), porcentagem de planta (P_P) e temperatura de extração (T_E).

4.4.3. Otimização do processo extrativo e caracterização do extrato hidroalcoólico otimizado

A otimização do processo de extração da *C. recutita* para a obtenção do extrato hidroalcoólico foi realizada para permitir a obtenção de extratos padronizados e com todas as respostas (características) desejáveis. O ponto ótimo das condições de extração foi determinado a fim de se obter máxima extração de sólidos e de flavonóides totais, além de máxima atividade antioxidante (mínimo IC₅₀) dos extratos.

A otimização do processo extrativo foi feita pelo método da desejabilidade, sendo realizada com base nos resultados obtidos pela caracterização de TS, TFT e IC₅₀ dos extratos obtidos seguindo o planejamento composto central (Tabela 9). Este método foi utilizado pois é capaz de fornecer as melhores combinações dos fatores estudados de maneira a otimizar as respostas estudadas. Portanto, tal método é muito útil quando se depara com processos em que há uma grande variedade de respostas a serem consideradas (COLOMBARI, 2004).

As condições ótimas obtidas para o processo extrativo são mostradas na Tabela 13. Os valores codificados dos fatores foram fornecidos pelo *software* Minitab 14.0, enquanto que os valores decodificados (valores reais) foram obtidos de acordo com a Equação 2.

Tabela 13 - Condições ótimas obtidas para o processo extrativo, com relação aos fatores estudados no planejamento composto central.

Fator estudado	Valor codificado	Valor decodificado
Porcentagem de planta (P _P)	+1,680	36,8% (m/m)
Porcentagem de etanol (P _E)	+0,737	74,7% (v/v)
Temperatura de extração (T _E)	+1,587	68,8°C

A fim de validar os resultados obtidos na otimização e obter o extrato hidroalcoólico para as etapas posteriores do projeto, a extração foi realizada nas condições dadas como ótimas e o extrato hidroalcoólico obtido foi caracterizado com relação ao TS, TFT e IC₅₀. Assim, o processo extrativo foi realizado por 1 hora a 69°C, com velocidade de agitação de 900 rpm e utilizando 36,8% (m/v) de planta em etanol 74,7% (v/v). A Tabela 14 mostra a comparação entre estes valores para cada resposta estudada. Como pode ser visto nesta tabela, os valores preditos e obtidos nas condições otimizadas da extração foram próximos entre si para as três respostas avaliadas. A similaridade entre os valores preditos e obtidos validam a otimização do processo extrativo para a obtenção do extrato hidroalcoólico de *C. recutita* e mostram que o método da desejabilidade é uma ferramenta confiável e adequada para a otimização de tal processo.

Tabela 14 - Comparação entre os valores preditos e os valores obtidos nas condições ótimas do processo extrativo com relação às respostas avaliadas.

Resposta	Valor predito	Valor obtido ^a
Teor de sólidos (TS)	5,94% (m/m)	5,38 ± 0,03% (m/m)
Teor de Flavonóides totais (TFT)	3,66% (m/m)	4,11 ± 0,07% (m/m)
Atividade antioxidante <i>in vitro</i> (IC ₅₀)	18,45 µg/mL	18,19 ± 0,96 µg/mL

^a Média das triplicatas ± desvio padrão.

Com relação à caracterização do extrato hidroalcoólico otimizado, a Tabela 14 mostra que o mesmo apresentou TS de 5,38 ± 0,03% (m/m), valor alto e desejável. De acordo com a literatura, um alto teor de sólidos é desejável, pois, geralmente, quanto maior o teor de sólidos maior a probabilidade de extração dos ativos de interesse (TACON, 2012). A Tabela 14 mostra também que o extrato hidroalcoólico otimizado apresentou TFT de 4,11 ± 0,07% (m/m). Este valor foi considerado adequado, pois como já dito anteriormente, o teor mínimo de flavonóides totais presentes nos extratos de *C. recutita* deve ser de 2,5% (DOWD, 1959; REIS et al., 2011). Pode ser visto ainda na Tabela 14 que o extrato hidroalcoólico otimizado apresentou IC₅₀ de 18,19 ± 0,96 µg/mL, o que indica uma boa atividade antioxidante *in vitro*, uma vez que, como já mencionado, é necessário uma pequena concentração de extrato, na ordem de µg/mL, para inibir o radical DPPH (ABDOUL-LATIF et al., 2011; ARAÚJO; TEIXEIRA; FREITAS, 2010; KULISIC et al., 2004; LIMA et al., 2006; MARQUELE et al., 2006; SOUZA et al., 2007; TACON; FREITAS, 2013). Embora a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da *C. recutita* não esteja relacionado apenas com o TFT presentes no mesmo, o alto teor de flavonóides auxilia na atividade antioxidante dos extratos obtidos, uma vez que os flavonóides são capazes de neutralizar ou sequestrar os radicais livres devido a sua estrutura química e suas propriedades redutoras, além de quelar os metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação quanto da propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007; TACON, 2012).

Além das respostas avaliadas para a otimização do processo extrativo (Tabela 14) o extrato hidroalcoólico otimizado também foi caracterizado com relação à densidade e à quantidade de apigenina e apigenina-7-glicosídeo. Os valores obtidos para estas características foram, respectivamente, 0,89 ± 0,02 g/mL, 2,0 ± 0,1 mg/g e 20,1 ± 0,9 mg/g. A maior quantidade de apigenina-7-glicosídeo no extrato hidroalcoólico está de acordo com a literatura, pois em extratos de *C. recutita* a apigenina está presente em quantidades muito pequenas na forma livre, existindo predominantemente na forma glicosilada (MULINACCI et al., 2000; SRIVASTAVA; GUPTA, 2007, 2009a, 2009b).

4.5. Método cromatográfico para quantificação dos marcadores do extrato hidroalcoólico

Os marcadores do extrato hidroalcoólico selecionados no presente trabalho foram apigenina e apigenina-7-glicosídeo. Esta escolha baseou-se no fato destes bioativos serem, dentre os flavonóides presentes no extrato da *C. recutita*, uns dos mais promissores compostos, uma vez que estão entre os principais componentes responsáveis pelas ações terapêuticas deste extrato (GUPTA et al., 2010; MCKAY; BLUMBERG, 2006; SRIVASTAVA; GUPTA, 2009a; SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010; WEBER et al., 2008). Além disso, a Instrução Normativa N° 02 de 13 de maio de 2014 da ANVISA (BRASIL, 2014) determina a apigenina-7-glicosídeo como um marcador da *C. recutita*.

O método cromatográfico utilizado para a quantificação dos marcadores do extrato foi feito por CLAE. Para o desenvolvimento deste método diversas fases móveis em diferentes gradientes e fluxos foram avaliadas em três colunas de fase reversa, C18, C8 e CN. Isso foi realizado para que as condições cromatográficas que apresentassem melhor separação e resolução dos picos fossem selecionadas. A Figura 13 mostra o cromatograma do extrato hidroalcoólico otimizado de *C. recutita* utilizando o método analítico selecionado, o qual está detalhadamente descrito no item 3.6.

Figura 13 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico otimizado de *C. recutita* obtido por CLAE.

A fim de garantir a qualidade, segurança e confiabilidade do método cromatográfico desenvolvido para a quantificação dos marcadores do extrato, este método foi validado.

4.5.1. Validação do método cromatográfico

A validação do método cromatográfico por CLAE, usado para a quantificação dos marcadores do extrato hidroalcoólico otimizado foi realizada baseada nos parâmetros analíticos de linearidade, seletividade, precisão, exatidão e limite de quantificação.

4.5.1.1. Linearidade

A linearidade é a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico (BRASIL, 2003; BUENO, 2007; COSTA-MACHADO, 2011; RIBANI et al., 2004). Para a avaliação da linearidade do método, foram construídas curvas analíticas para a apigenina e para a apigenina-7-glicosídeo. As curvas foram montadas medindo a área sob os picos referentes a cada marcador quando soluções, em metanol, de apigenina (0,1 a 6 µg/mL) e de apigenina-7-glicosídeo (0,1 a 40 µg/mL) foram injetadas individualmente. As curvas obtidas são apresentadas na Figura 14.

Figura 14 - Curvas de calibração com equação da reta e coeficiente de correlação linear (r) obtidas por CLAE para apigenina e apigenina-7-glicosídeo em metanol.

Como mostrado na Figura 14, os coeficientes de correlação linear (r) obtidos para ambas as curvas apresentaram valores maiores que 0,99, que é o critério mínimo aceitável pela ANVISA (BRASIL, 2003). Isso indica que o método cromatográfico é linear para a quantificação de apigenina e apigenina-7-glicosídeo nas concentrações estudadas.

4.5.1.2. Seletividade

Seletividade, também denominada especificidade, é definida como a capacidade que o método possui em avaliar, de forma inequívoca, um composto em presença de outros

componentes. Assim, um método só é considerado seletivo se os resultados obtidos para o composto analisado não forem afetados por possíveis interferentes presentes na amostra. A determinação da seletividade de um método permite avaliar o grau de interferência de outros componentes que possam estar presentes, tais como, impurezas, excipientes, produtos de degradação e componentes da matriz. Dessa maneira, a seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (BRASIL, 2003; BUENO, 2007; COSTA-MACHADO, 2011; RIBANI et al., 2004).

A seletividade do método foi avaliada comparando os perfis cromatográficos dos padrões (apigenina e apigenina-7-glicosídeo) com os perfis cromatográficos das amostras (extrato hidroalcoólico otimizado e micropartículas de quitosana contendo o extrato) e da quitosana (carreador utilizado na produção das micropartículas). Os resultados mostraram que a quitosana não apresentou picos interferentes, referentes a compostos que eluíssem com mesmo tempo de retenção dos marcadores apigenina e apigenina-7-glicosídeo (Figura 15). Dessa forma, o método foi considerado seletivo para as amostras aqui estudadas.

Figura 15 - Perfis cromatográficos do extrato hidroalcoólico de *C. recutita* (A), apigenina (B), apigenina-7-glicosídeo (C), micropartículas de quitosana contendo o extrato de *C. recutita* (D) e quitosana (E).

4.5.1.3. Precisão

A precisão de um método avalia a proximidade dos resultados fornecidos por ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra sob condições definidas. Dessa forma, a precisão mostra a capacidade do método em produzir o mesmo resultado sempre que o procedimento é executado (BRASIL, 2003; USP 30, 2007; RIBANI, 2004). A avaliação da precisão do método foi feita por meio da repetibilidade (precisão intra-corrida) e da precisão intermediária (precisão inter-corridas) para os dois marcadores utilizados. Os resultados obtidos para a análise da precisão são apresentados na Tabela 15 e na Tabela 16.

Tabela 15 - Concentrações de apigenina (C_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (C_{ApG}) obtidas no extrato hidroalcoólico otimizado nas repetições realizadas nos dias 1, 2 e 3.

Replicata	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	C_{Ap} ($\mu\text{g/mL}$)	C_{ApG} ($\mu\text{g/mL}$)	C_{Ap} ($\mu\text{g/mL}$)	C_{ApG} ($\mu\text{g/mL}$)	C_{Ap} ($\mu\text{g/mL}$)	C_{ApG} ($\mu\text{g/mL}$)
1	1,968	19,372	2,026	20,164	2,003	19,867
2	2,014	19,817	2,106	20,371	2,020	19,619
3	2,011	19,520	2,070	20,061	2,026	19,768
4	2,043	20,313	2,103	19,597	2,017	19,372
5	1,982	20,115	2,100	20,835	2,062	19,471
6	2,046	19,917	2,106	20,783	2,026	19,917

Tabela 16 - Média (M), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) resultantes das concentrações de apigenina (C_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (C_{ApG}) obtidas no extrato hidroalcoólico otimizado nas repetições realizadas nos dias 1, 2 e 3.

	Replicatas do dia 1 (repetibilidade)		Replicatas dos dias 1, 2 e 3 (precisão intermediária)	
	C_{Ap} ($\mu\text{g/mL}$)	C_{ApG} ($\mu\text{g/mL}$)	C_{Ap} ($\mu\text{g/mL}$)	C_{ApG} ($\mu\text{g/mL}$)
M ($\mu\text{g/mL}$)	2,011	19,842	2,040	19,938
DP ($\mu\text{g/mL}$)	0,031	0,354	0,042	0,437
CV (%)	1,558	1,785	2,075	2,191

Analisando os dados da Tabela 16 pode-se observar que o método utilizado é preciso para ambos os padrões utilizados, uma vez que nenhum dos valores obtidos para o coeficiente de variação (CV%) foi maior que 5% (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

4.5.1.4. Exatidão

A exatidão de um método representa a proximidade entre os resultados obtidos experimentalmente e o seu valor real (BRASIL, 2003; BUENO, 2007; COSTA-MACHADO, 2011; RIBANI et al., 2004). Este parâmetro foi avaliado por meio da recuperação da apigenina (Tabela 17) e apigenina-7-glicosídeo (Tabela 18) adicionadas às soluções de extrato hidroalcoólico otimizado.

Tabela 17 - Recuperação do padrão de apigenina adicionado às soluções de extrato hidroalcoólico otimizado.

Replicata	CT	CE ($\mu\text{g/mL}$)	RC (%)	Média	DP	CV (%)
1	80% (1,8 $\mu\text{g/mL}$)	1,633	90,722	88,93	1,59	1,78
2		1,579	87,722			
3		1,590	88,333			
1	100% (2,25 $\mu\text{g/mL}$)	1,943	86,356	87,93	1,50	1,70
2		1,982	80,089			
3		2,010	89,333			
1	120% (2,7 $\mu\text{g/mL}$)	2,478	91,778	93,64	2,04	2,17
2		2,520	93,333			
3		2,587	95,815			

* CT - concentração teórica. CE - concentração experimental. RC - recuperação. DP - desvio padrão. CV - coeficiente de variação.

Tabela 18 - Recuperação do padrão de apigenina-7-glicosídeo adicionado às soluções de extrato hidroalcoólico otimizado.

Replicata	CT	CE ($\mu\text{g/mL}$)	RC (%)	Média	DP	CV (%)
1	80% (16 $\mu\text{g/mL}$)	15,428	96,425	93,62	2,71	2,89
2		14,564	91,025			
3		14,947	93,419			
1	100% (20 $\mu\text{g/mL}$)	18,888	94,440	92,92	3,35	3,61
2		17,815	89,075			
3		19,047	95,235			
1	120% (24 $\mu\text{g/mL}$)	21,408	89,200	90,98	2,41	2,65
2		22,495	93,729			
3		21,605	90,021			

* CT - concentração teórica. CE - concentração experimental. RC - recuperação. DP - desvio padrão. CV - coeficiente de variação.

Os dados presentes na Tabela 17 e na Tabela 18 mostram que o método utilizado é exato para a apigenina e apigenina-7-glicosídeo, uma vez que na literatura é aceito valores de

recuperação entre 80 e 120%. Além disso, estas tabelas mostram que em todos os casos o coeficiente de variação (CV%) foi menor que 5%, mostrando mais uma vez a exatidão e precisão do método (BRASIL, 2003; BUENO, 2007; COSTA-MACHADO, 2011; RIBANI et al., 2004).

4.5.1.5. Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) corresponde à menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003). Este parâmetro foi determinado para a apigenina e apigenina-7-glicosídeo, por meio das análises da precisão e exatidão do método para baixas concentrações de ambos os marcadores (Tabela 19).

Tabela 19 - Valores de precisão e exatidão obtidos para baixas concentrações de apigenina e apigenina-7-glicosídeo para a determinação do limite inferior de quantificação do método para estes marcadores.

Marcador	CT (µg/mL)	CE (µg/mL) ^a	Precisão (%) ^b	Exatidão (%) ^c
Apigenina	0,010	0,016 ± 0,003	20,52	156,67
	0,025	0,030 ± 0,006	18,48	120,67
	0,050	0,050 ± 0,001	2,57	99,11
Apigenina-7-glicosídeo	0,010	0,007 ± 0,004	47,89	73,33
	0,025	0,018 ± 0,005	25,46	72,00
	0,050	0,053 ± 0,002	3,77	106,00

* CT - concentração teórica. CE - concentração experimental. ^aMédia das sextuplicatas ± desvio padrão. ^bExpressa como coeficiente de variação (CV%). ^cExpressa como recuperação (RC%).

De acordo com os critérios determinados pelo FDA (FDA, 2001) e pelo Guia para validação de métodos analíticos e bionalíticos (BRASIL, 2003) o LIQ deve ser identificável e reprodutível apresentando valores de exatidão entre 80 e 120% e valores de precisão inferiores a 20%. Portanto, como pode ser visto na Tabela 19, o LIQ para ambos os marcadores foi 0,05 µg/mL.

4.6. Produção das micropartículas contendo o extrato

Como já dito anteriormente, as micropartículas contendo o extrato correspondem àquelas produzidas utilizando o extrato hidroalcoólico obtido sob as condições otimizadas da extração. Neste trabalho, tais micropartículas foram preparadas por dois diferentes processos, o *spray drying* e o *spray freeze drying*. Isso foi realizado com o objetivo de comparar os processos de SDE e SFDE, além de avaliar a viabilidade dos mesmos para a produção das

micropartículas contendo o extrato de *C. recutita*. Para que pudesse ser feito um estudo mais detalhado dos processos, bem como para possibilitar a otimização dos mesmos, ambos os processos foram estudados por meio de planejamentos fatoriais.

4.6.1. *Spray drying* do extrato hidroalcoólico

Diante da grande quantidade de materiais que podem ser utilizados como carreadores no processo de *spray drying*, experimentos preliminares foram realizados com diferentes materiais, a fim de selecionar aquele que apresentasse melhores resultados para a produção das micropartículas contendo o extrato. Selecionado o carreador a ser usado (no caso a quitosana), o processo de SDE foi então estudado por meio do planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}), seguido pelo planejamento fatorial completo (3^{2+2}) e, posteriormente otimizado.

4.6.1.1. Experimentos preliminares

Como já dito, antes do estudo propriamente dito do processo de SDE por meio de planejamentos fatoriais, micropartículas de extrato foram produzidas com diferentes carreadores, com o objetivo de selecionar aquele que apresentasse os melhores resultados para a continuidade do trabalho. Os carreadores utilizados foram maltodextrina, goma arábica, sorbitol e quitosana. A seleção destes materiais foi baseada na literatura, onde os mesmos foram utilizados para a produção de micropartículas contendo diferentes compostos (COSTA-MACHADO, 2011; ESTEVINHO et al., 2013a; FANG; BHANDARI, 2010; GELFUSO et al., 2011; HARRIS et al., 2011; KOSARAJU; D'ATH; LAWRENCE, 2006; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; TACON, 2012).

Diante dos resultados obtidos nos experimentos realizados com os quatro carreadores, a quitosana foi selecionada para a continuidade do trabalho. Esta foi escolhida uma vez que as micropartículas de quitosana apresentaram boa aparência, ao passo que as produzidas com sorbitol, maltodextrina e goma arábica ou misturas destes resultaram em um pó vitrificado. Em adição, quando comparado com a quitosana, o rendimento do processo de SDE foi bem menor quando se utilizou sorbitol, maltodextrina e goma arábica ou misturas destes, pois uma grande quantidade de amostra se aderiu nas paredes da câmara de secagem e do ciclone. Outro fator que também influenciou na escolha da quitosana como carreador foi o fato desta ser um ótimo adjuvante para aplicação tópica, uma vez que apresenta interessantes propriedades intrínsecas tais como atoxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, características antifúngica e antibacteriana, e ainda capacidade de se aderir à mucosa e à pele, permitindo uma liberação

sustentada do ativo (BASTOS et al., 2012; BOWEY; NEUFELD, 2010; FELT; GURNY; BAEYENS, 2001; GELFUSO et al., 2011).

Após a seleção da quitosana como o carreador a ser utilizado, o próximo passo foi o estudo, por meio de planejamentos fatoriais, do processo de SDE.

4.6.1.2. Planejamento fatorial fracionário

Como já dito, as características do processo de *spray drying* e das micropartículas nele obtidas podem ser influenciadas por diversos fatores (BOWEY; NEUFELD, 2010; CAL; SOLLOHUB, 2010; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; ZHANG et al., 2010). Devido ao grande número de fatores que podem ser estudados no processo de *spray drying* e o desconhecimento da influência destes fatores sobre as características do processo e das micropartículas obtidas, primeiramente foi realizado um estudo do processo por meio de um planejamento fatorial fracionário. Isto foi realizado para que pudesse ser feita uma triagem dos diferentes fatores e sua relação com as respostas estudadas, evitando assim que fatores importantes fossem excluídos do estudo e descartando fatores menos significantes.

O planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}), foi então utilizado para verificar a influência da temperatura de saída do ar de secagem (T), razão entre quitosana e extrato na amostra (QE), vazão de alimentação da amostra (VA), fluxo do ar comprimido (FAC) e pressão do ar comprimido (PAC) sobre o rendimento do processo (R_e), diâmetro médio das micropartículas (D_{50}), eficiência de encapsulação do processo com relação a apigenina (EE_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (EE_{ApG}) e teor de apigenina (θ_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (θ_{ApG}) nas micropartículas. A escolha destes cinco fatores foi feita com base nos experimentos preliminares e na literatura, a qual lista os mesmos como fatores influentes no processo de *spray drying* de diferentes compostos (ARAÚJO; TEIXEIRA; FREITAS, 2010; CAL; SOLLOHUB, 2010; COSTA-MACHADO, 2011; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; TACON, 2012; ZHANG et al., 2010).

As análises estatísticas das influências dos cinco fatores estudados sobre as respostas avaliadas são mostradas na Figura 16. Esta figura mostra que apenas T e QE exerceram influência significativa ($p < 0,05$) sobre as respostas estudadas. Estes dados estão de acordo com a literatura, a qual mostra que estes dois fatores geralmente influenciam significativamente o processo de *spray drying* de derivados vegetais (ARAÚJO; TEIXEIRA; FREITAS, 2010; SOUZA et al., 2007; TACON, 2012).

Figura 16 - Influência dos fatores estudados no planejamento fatorial fracionário do SDE.

4.6.1.3. Planejamento fatorial completo

O estudo da temperatura de saída do ar de secagem (T) e da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE), por meio do planejamento fatorial completo, foi feito a fim de verificar como estes dois fatores influenciavam as características do processo de SDE e das micropartículas obtidas pelo mesmo. Além disso, o estudo de T e QE por este planejamento também foi realizado para que fosse possível a otimização do processo. A avaliação da influência destes dois fatores bem como a otimização do processo, foram feitas utilizando as mesmas características (respostas) estudadas no planejamento fatorial fracionário, ou seja, R_e , D_{50} , EE_{Ap} , EE_{ApG} , θ_{Ap} e θ_{ApG} . Os resultados obtidos para estas características no planejamento fatorial completo são mostrados na Tabela 20. As condições de cada experimento estão descritas no item 3.7.1.2.2.

Tabela 20 - Resultados obtidos para as respostas estudadas no processo de SDE seguindo o planejamento fatorial completo.

Experimento	R _e (%)	D ₅₀ (μ m)	EE _{Ap} (%)	EE _{ApG} (%)	θ_{Ap} (%)	θ_{ApG} (%)
1	47,90	6,29	65,63	77,57	80,60	87,82
2	53,13	5,64	86,20	91,25	88,75	92,90
3	60,90	4,96	99,99	97,18	83,49	99,91
4	81,50	8,21	71,58	56,83	73,68	74,84
5	66,73	6,14	82,21	93,61	89,15	92,85
6	76,20	6,54	94,87	98,99	99,98	97,05
7	69,40	8,62	72,79	81,90	84,86	56,85
8	72,00	4,73	84,98	89,12	85,20	89,86
9	67,15	5,77	97,48	95,09	95,33	94,68
10	67,60	5,95	83,68	93,23	90,38	92,07
11	67,93	5,61	82,46	93,47	89,31	92,21

* R_e - rendimento do processo. D₅₀ - diâmetro médio das micropartículas. EE_{Ap} - eficiência de encapsulação da apigenina. EE_{ApG} - eficiência de encapsulação da apigenina-7-glicosídeo. θ_{Ap} - teor de apigenina. θ_{ApG} - teor de apigenina-7-glicosídeo.

4.6.1.3.1. Rendimento do processo

Como pode ser visto na Tabela 20, o rendimento do processo (R_e) do SDE variou de 47,90 a 81,50%. Embora tenha ocorrido uma grande variação entre os valores de R_e, os valores desta resposta aqui obtidos mostram a boa adequação do processo de *spray drying* para o extrato hidroalcoólico de *C. recutita*. Os valores de R_e obtidos no presente estudo foram próximos aos rendimentos obtidos em outros trabalhos onde micropartículas de quitosana contendo diferentes compostos foram produzidas por *spray drying*. Por exemplo, nos trabalhos de Alhalaweh, Andersson e Velaga (2009), Bastos et al. (2012), Ventura et al. (2011) e Kini, Dixit e Kulkarni (2011) os rendimentos variaram de 43,2 a 75,6%, 40,72 a 55,26%, 60,83 a 66,61 % e 40,57 a 61,72% quando micropartículas de quitosana contendo, respectivamente, zolmitriptano, suco de *Anacardium occidentale* L., gencitabina e piroxicam, foram produzidas por *spray drying*.

As análises estatísticas mostraram que o R_e do SDE foi influenciado significativamente pelo termo linear e quadrático da temperatura de saída do ar de secagem (T e T²), conforme pode ser visto na Tabela 21. É provável que a dependência do R_e pela temperatura esteja relacionada com a influência que esta exerce sobre a secagem das gotículas atomizadas. Isto porque as gotículas que não são secas assim que são atomizadas tendem a aderir à parede da câmara, reduzindo o rendimento do processo (MARTINS et al., 2012). Os dados da Tabela 21

também mostram que a razão entre quitosana e extrato na amostra não influenciou significativamente o R_e . Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que em diversos trabalhos foi observado que o rendimento do processo de *spray drying* não foi influenciado por diferentes razões entre a quitosana e os compostos encapsulados (BASTOS et al., 2012; KINI; DIXIT; KULKARNI, 2011; VENTURA et al., 2011).

Tabela 21 - Análises estatísticas do rendimento do processo (R_e) de SDE em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.

Variáveis estudadas	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
T	362,1856	1	362,1856	12,2165	0,017373 ^a
T ²	336,0307	1	336,0307	11,3343	0,019963 ^a
QE	4,9504	1	4,9504	0,1670	0,699725
QE ²	57,5496	1	57,5496	1,9411	0,222312
T x QE	58,1406	1	58,1406	1,9611	0,220295
Erro	148,2360	5	29,6472		

*T - temperatura de saída do ar de secagem. QE - razão entre quitosana e extrato na amostra.

^aSignificante com $p < 0,05$.

A equação resultante do ajuste das análises estatísticas ($R^2 = 0,838$) que relaciona o rendimento do processo (R_e) de SDE e a temperatura de saída do ar de secagem (T), é apresentada na Equação 20.

$$R_e(\%) = 70,09 + 7,77 \left(\frac{T - 90}{20} \right) - 11,52 \left(\frac{T - 90}{20} \right)^2$$

Equação 20

A Figura 17 mostra a superfície de resposta que retrata a influência linear e quadrática da temperatura sobre o R_e . Analisando esta figura pode ser observado que o gráfico tende ao aspecto de sela de cavalo, indicando que o efeito quadrático da temperatura foi bastante pronunciado. No entanto, a influência do termo linear deste fator pode ser verificada pelas diferentes alturas dos pontos finais da curva. Além disso, a Figura 17 mostra que devido a influência do termo quadrático da temperatura, os maiores rendimentos foram obtidos quando se utilizou valores intermediários de T.

Figura 17 - Gráfico de superfície de resposta do rendimento do processo (R_e) de SDE em função da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE) e da temperatura de saída do ar de secagem (T).

4.6.1.3.2. Tamanho das micropartículas

As micropartículas obtidas no processo de SDE apresentaram diâmetro médio (D_{50}) de 4,73 a 8,62 μm (Tabela 20). Estes valores foram similares aos obtidos por Alhalaweh, Andersson e Velaga (2009) e Kini, Dixit e Kulkarni (2011), onde micropartículas de quitosana contendo zolmitriptano e piroxicam, produzidas por *spray drying*, apresentaram diâmetro médio na faixa de 2,6 a 9,4 μm e 4 a 11 μm , respectivamente. Além disso, no processo de *spray drying* do extrato das folhas de oliveira usando quitosana como carreador, as micropartículas produzidas apresentaram diâmetro médio inferior a 9,9 μm (KOSARAJU; D'ATH; LAWRENCE, 2006).

As análises estatísticas realizadas para o D_{50} das micropartículas obtidas no processo de SDE estão apresentadas na Tabela 22. Os resultados destas análises mostram que os valores de D_{50} destas micropartículas foram significativamente influenciados pelo termo linear e quadrático da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE e QE^2). Tal fato está de acordo com Corrigan, Healy e Corrigan (2006) e Martins et al. (2012). Segundo estes autores, a concentração da amostra exerce um papel importante no tamanho das gotículas atomizadas. Dessa maneira, a concentração é um fator muito importante na determinação do tamanho das micropartículas produzidas por técnicas onde a amostra é atomizada, como por exemplo o *spray drying* (CORRIGAN; HEALY; CORRIGAN, 2006; MARTINS et al., 2012).

Tabela 22 - Análises estatísticas do diâmetro médio das micropartículas (D_{50}) obtidas no SDE em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.

Variáveis estudadas	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
T	0,8288	1	0,8288	1,8057	0,236778
T ²	1,8168	1	1,8168	3,9581	0,103316
QE	5,6940	1	5,6940	12,4053	0,016881^a
QE²	4,5465	1	4,5465	9,9054	0,025457^a
T x QE	0,5814	1	0,5814	1,2667	0,311493
Erro	2,2950	5	0,4590		

*T - temperatura de saída do ar de secagem. QE - razão entre quitosana e extrato na amostra.

^aSignificante com $p < 0,05$.

A Equação 21 é o modelo ajustado ($R^2 = 0,843$) obtido pelas análises estatísticas que relaciona o diâmetro médio das micropartículas (D_{50}) produzidas por SDE e a razão entre quitosana e extrato na amostra (QE).

$$D_{50}(\mu m) = 5,95 - 0,97(QE - 2) + 1,34(QE - 2)^2$$

Equação 21

A influência de QE sobre o diâmetro médio das micropartículas é retratada pela superfície de resposta apresentada na Figura 18. É possível verificar que as micropartículas produzidas usando os maiores e os menores valores de QE apresentaram maiores valores de D_{50} , quando comparadas àquelas produzidas com valores intermediários de QE. No *spray drying* a dependência do tamanho de partículas em função da razão de carreador na amostra está diretamente relacionada não só com o carreador utilizado, mas também com o ativo utilizado e com a interação entre ativo e carreador. Enquanto em alguns trabalhos, que estudaram o processo de *spray drying*, maiores valores de D_{50} foram obtidos com menores quantidades de carreador na amostra, em outros ocorreu o contrário, isto é, quanto maior a quantidade de carreador na amostra, maior foi o valor de D_{50} . (ALHALAWEH; ANDERSSON; VELAGA, 2009; CEVHER et al., 2006; GELFUSO et al., 2011; LI et al., 2013; TACON, 2012).

Como o tamanho de partícula aumenta com a viscosidade da amostra (ESTEVINHO et al., 2013b; KONDO et al., 2009), a relação não linear entre QE e D_{50} era esperada no presente trabalho para o processo de SDE, uma vez que a viscosidade da amostra foi notavelmente mais baixa quando se utilizou valores intermediários de QE. A maior viscosidade das amostras feitas com altos valores de QE está relacionada com a alta concentração de quitosana, ao passo que a

maior viscosidade das amostras feitas com baixos valores de QE é provavelmente explicada pela pequena solubilidade da quitosana na solução hidroalcoólica, a qual está presente em maior quantidade nas amostras com pequeno QE (ALVARENGA, 2011; KOSARAJU; D'ATH; LAWRENCE, 2006; LI et al., 2013; RINAUDO; PAVLOV; DESBRIÈRES, 1999).

Figura 18 - Gráfico de superfície de resposta do diâmetro médio (D_{50}) das micropartículas produzidas por SDE, em função da temperatura de saída do ar de secagem (T) e da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE).

4.6.1.3.3. Eficiência de encapsulação do processo

A eficiência de encapsulação do processo de SDE foi avaliada por meio da eficiência de encapsulação da apigenina (EE_{Ap}) e da apigenina-7-glicosídeo (EE_{ApG}). A Tabela 20 mostra que os valores de EE_{Ap} e EE_{ApG} obtidos neste processo variou de 65,63 a 99,99% e de 56,83 a 98,99%, respectivamente. Nos trabalhos de Gelfuso et al. (2011), Ventura et al. (2011), Kusonwiriawong et al. (2013) e Raval, Patel e Patel (2010) os valores de eficiência de encapsulação do processo obtidos foram, respectivamente, 45 a 82%, 77,95 a 96,83%, 72,49 a 86,72% e 85,6 a 98,9%, quando micropartículas contendo diferentes ativos foram produzidos por *spray drying* usando quitosana como carreador. A similaridade entre os valores de eficiência de encapsulação obtidos no presente trabalho com aqueles encontrados na literatura mostra a adequação do processo de *spray drying* para a produção de micropartículas de quitosana contendo o extrato de *C. recutita*.

Os valores de p obtidos pelas análises estatísticas da influência de T e QE sobre a EE_{Ap} e a EE_{ApG} são apresentados na Tabela 23. Os dados presentes nesta tabela mostraram que a eficiência de encapsulação de ambos os marcadores foi significativamente influenciada apenas pelo termo linear da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE). A influência de QE sobre

EE_{Ap} e EE_{ApG} é consistente com a literatura, pois esta determina que a proporção do material encapsulante e aquele a ser encapsulado é um fator que exerce forte influência na eficiência de encapsulação do processo (MARTINS; SIQUEIRA; FREITAS, 2012; ONEDA; RÉ, 2003).

Tabela 23 - Valores de p obtidos pelas análises estatísticas da eficiência de encapsulação da apigenina (EE_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (EE_{ApG}) no processo de SDE, em função dos fatores estudados pelo planejamento fatorial completo.

Variáveis estudadas	Valor de p	
	EE_{Ap}	EE_{ApG}
T	0,525395	0,995842
T ²	0,239103	0,500796
QE	0,000015^a	0,013537^a
QE ²	0,639648	0,158288
T x QE	0,065096	0,711547

*T - temperatura de saída do ar de secagem. QE - razão entre quitosana e extrato na amostra.

^aSignificante com $p < 0,05$.

Os modelos ajustados obtidos pelas análises estatísticas que relaciona a eficiência de encapsulação do processo de SDE com relação à apigenina (EE_{Ap}) e à apigenina-7-glicosídeo (EE_{ApG}) e a razão entre quitosana e extrato na amostra (QE) são mostrados, respectivamente, pela Equação 22 ($R^2 = 0,982$) e Equação 23 ($R^2 = 0,772$).

$$EE_{Ap}(\%) = 83,22 + 13,72(QE - 2)$$

Equação 22

$$EE_{ApG}(\%) = 90,64 + 12,49(QE - 2)$$

Equação 23

A influência que QE teve sobre EE_{Ap} e EE_{ApG} é mostrada pela Figura 19. Nesta figura é possível verificar que quanto maior o valor de QE usado, maior foi a eficiência de encapsulação do processo para ambos os marcadores. Isso é explicado pelo fato de que quanto maior é o valor de QE, maior é proporção de quitosana em relação ao extrato e, portanto, maior é a quantidade de polímero disponível na amostra para microencapsular a apigenina e a apigenina-7-glicosídeo presentes no extrato.

Figura 19 - Gráfico de superfície de resposta da eficiência de encapsulação do processo de SDE, com relação à, a) apigenina (EE_{Ap}) e b) apigenina-7-glicosídeo (EE_{ApG}), em função da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE) e da temperatura de saída do ar de secagem (T).

4.6.1.3.4. Teor de apigenina e apigenina-7-glicosídeo nas micropartículas

O teor de apigenina (θ_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (θ_{ApG}), dois importantes componentes nas ações terapêuticas do extrato de *C. recutita*, foi avaliado nas micropartículas obtidas pelo processo de SDE. A Tabela 20 mostra que o θ_{Ap} e o θ_{ApG} nestas micropartículas foi de 73,68 a 99,98% e de 56,85 a 99,91%, respectivamente. Estes valores mostram que, enquanto em determinadas condições do processo não houve praticamente nenhuma perda de apigenina e apigenina-7-glicosídeo, em outras condições as perdas destes flavonóides foram consideráveis.

As análises estatísticas realizadas para o teor dos marcadores nas micropartículas produzidas pelo processo de SDE mostraram que o θ_{Ap} foi influenciado significativamente apenas pelo termo linear da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE), enquanto que o θ_{ApG} foi significativamente influenciado pelo termo linear da temperatura (T), termos linear e quadrático da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE e QE^2), e pela interação destes dois termos (T x QE), como pode ser visto na Tabela 24. A influência da temperatura apenas sobre θ_{ApG} pode estar ligada à presença da ligação glicosídica. A ligação glicosídica da apigenina-7-glicosídeo pode ser quebrada por aquecimento em soluções ácidas, mesmo que diluídas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). A quitosana é solubilizada em solução de ácido acético e, portanto a mistura de extrato e quitosana utilizada para a produção de micropartículas está em um meio ácido. Assim, como a apigenina-7-glicosídeo presente no extrato está em meio ácido, durante o processo de *spray drying* há um aquecimento que pode romper a ligação glicosídica.

Tabela 24 - Valores de p obtidos pelas análises estatísticas do teor de apigenina (θ_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (θ_{ApG}) nas micropartículas obtidas pelo processo de SDE, em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.

Variáveis estudadas	Valor de p	
	θ_{Ap}	θ_{ApG}
T	0,427423	0,009896^a
T ²	0,676425	0,686641
QE	0,041417^a	0,000696^a
QE ²	0,651219	0,047576^a
T x QE	0,551632	0,022726^a

* T - temperatura de saída do ar de secagem. QE - razão entre quitosana e extrato na amostra.

^aSignificante com $p < 0,05$.

A equação resultante do ajuste das análises estatísticas ($R^2 = 0,647$) que relaciona o teor de apigenina (θ_{Ap}) nas micropartículas produzidas por SDE e a razão entre quitosana e extrato na amostra (QE) é apresentada na Equação 24. Neste caso, o valor de R^2 indicou que a variação de θ_{Ap} que ocorreu no planejamento fatorial completo não foi completamente explicada pelo modelo matemático aplicado. No entanto, embora o grau de correlação entre os valores preditos e reais não tenha sido bom, o modelo matemático foi útil para prever as tendências de θ_{Ap} em função dos fatores estudados (MARTINS, 2014).

$$\theta_{Ap}(\%) = 89,22 + 6,61(QE - 2)$$

Equação 24

A influência de QE sobre θ_{Ap} é retratada pela Figura 20, a qual mostra que quanto maior foi o valor de QE usado, maior foi o valor de θ_{Ap} obtido. Como já discutido para EE_{Ap} , a provável explicação para isto está relacionada com o fato de que maiores valores de QE geram uma maior proteção da apigenina, o que resulta em uma menor perda deste marcador.

A Figura 20 também mostra a influência de T e QE sobre θ_{ApG} . Pode ser visto que, ao contrário do que ocorreu para θ_{Ap} , a variação do teor de apigenina-7-glicosídeo não foi linear. Além disso é possível verificar que com o aumento da temperatura e a diminuição de QE houve uma diminuição de θ_{Ap} . Dessa maneira, para evitar que ocorra consideráveis perdas de apigenina-7-glicosídeo, a determinação dos parâmetros do processo de SDE deve ser feita com bastante cautela.

Figura 20 - Gráfico de superfície de resposta do teor de: a) apigenina (θ_{Ap}) e b) apigenina-7-glicosídeo (θ_{ApG}) nas micropartículas obtidas pelo processo de SDE, em função da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE) e da temperatura de saída do ar de secagem (T).

A Equação 25 é o modelo ajustado ($R^2 = 0,948$) obtido das análises estatísticas que relaciona o teor de apigenina-7-glicosídeo (θ_{ApG}) nas micropartículas produzidas por SDE com os fatores, razão entre quitosana e extrato na amostra (QE) e temperatura de saída do ar de secagem (T). Aqui, ao contrário do que ocorreu para o θ_{Ap} , o valor de R^2 foi alto, indicando uma boa adequação do modelo matemático para o θ_{ApG} , bem como uma proximidade entre os valores reais e preditos de θ_{ApG} nas micropartículas produzidas por SDE (GAN; ABDUL MANAF; LATIFF, 2010; MARTINS, 2014).

$$\theta_{ApG}(\%) = 92,41 - 6,54\left(\frac{T - 90}{20}\right) + 12,02(QE - 2) + 6,44\left(\frac{T - 90}{20}\right)(QE - 2) - 6,50(QE - 2)^2$$

Equação 25

O fato do θ_{Ap} e do θ_{ApG} terem sido influenciados por diferentes fatores em diferentes níveis, mostra, mais uma vez, a importância de se estudar e otimizar o processo de *spray drying* do extrato hidroalcoólico da *C. recutita*. Embora diversas respostas tenham mostrado resultados compatíveis com a literatura, mostrando que certas características estão ligadas ao processo utilizado, diversos fatores variaram de maneira única e inesperada. Diante de todos estes resultados é possível verificar que, embora atualmente o extrato de *C. recutita* seja um dos mais utilizados no mundo e a técnica de *spray drying* seja bem conhecida, ainda é necessário estudar e otimizar o processo de SDE para que seja possível a obtenção de micropartículas que apresentem as melhores características desejadas.

4.6.2. *Spray freeze drying* do extrato hidroalcoólico

Assim como realizado para o SDE, o processo de *spray freeze drying* do extrato hidroalcoólico (SFDE) também foi realizada utilizando a quitosana como carreador. Isso foi feito devido às vantajosas propriedades intrínsecas da quitosana, bem como à utilização do mesmo carreador possibilitar uma melhor comparação entre os dois processos e entre as micropartículas produzidas.

Inicialmente, pré-testes foram realizados a fim de se determinar quais os parâmetros do processo de SFDE seriam de maior interesse para serem estudados e otimizados. Assim, testes foram realizados variando alguns parâmetros do processo como a vazão de alimentação da amostra, a pressão do ar comprimido e a razão entre quitosana e extrato na amostra.

Após a realização de vários testes foi verificado que o estudo da pressão do ar comprimido era inviável. Isso porque baixos valores de pressão em geral levaram ao entupimento do bico e quando havia a atomização, esta era insatisfatória, uma vez que as microgotículas não eram completamente formadas antes da amostra entrar em contato com o nitrogênio, formando grandes placas congeladas. Por outro lado, quando eram utilizados valores altos de pressão havia uma grande perda tanto da amostra, que respingava para fora do recipiente coletor, quanto do nitrogênio líquido. Diante desse fato, a pressão do ar comprimido foi fixada em 3 bar. Este valor se mostrou alto o suficiente para evitar o entupimento do bico e atomizar completamente a amostra antes que a mesma entrasse em contato com o nitrogênio líquido, mas baixo o suficiente para evitar grandes perdas de nitrogênio e amostra.

Com relação à vazão de alimentação da amostra (VA) e à razão entre quitosana e extrato na amostra (QE), foi verificado nos pré-testes que ambos influenciaram no processo, o que é coerente com trabalhos onde o processo de *spray freeze drying* também foi estudado (KENNEDY et al., 2007; KONDO et al., 2009; SCHIFFTER; CONDLIFFE; VONHOFF, 2010). Assim, um planejamento fatorial completo (3^2) foi utilizado para avaliar a interferência destes dois fatores sobre as características (respostas): rendimento do processo (R_e), diâmetro médio das micropartículas (D_{50}), eficiência de encapsulação do processo com relação à apigenina (EE_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (EE_{ApG}) e teor de apigenina (θ_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (θ_{ApG}) nas micropartículas. Além de verificar a influência de VA e QE sobre estas respostas, o planejamento também foi aplicado objetivando a otimização do processo de SFDE.

Os resultados obtidos para as respostas, R_e , D_{50} , EE_{Ap} , EE_{ApG} , θ_{Ap} e θ_{ApG} , estudadas no processo de SFDE seguindo o planejamento fatorial completo (3^2) estão presentes na Tabela 25. As condições de cada experimento estão descritas no item 3.7.2.

Tabela 25 - Resultados obtidos para as respostas estudadas no processo de SFDE seguindo o planejamento fatorial completo.

Experimento	R _e (%)	D ₅₀ (μm)	EE _{Ap} (%)	EE _{ApG} (%)	θ _{Ap} (%)	θ _{ApG} (%)
1	87,99	21,69	38,68	29,89	99,62	99,28
2	84,60	24,27	45,80	45,91	99,88	99,32
3	95,15	36,04	59,58	58,73	99,94	99,96
4	82,07	41,71	31,77	37,28	99,61	99,17
5	95,84	46,97	47,77	42,93	99,92	99,58
6	98,72	49,71	61,08	55,67	99,78	99,81
7	80,72	57,60	33,83	32,14	99,58	98,98
8	92,53	74,93	43,18	48,77	99,96	99,48
9	78,24	104,20	56,75	62,45	99,87	99,67

* R_e - rendimento do processo. D₅₀ - diâmetro médio das micropartículas. EE_{Ap} - eficiência de encapsulação da apigenina. EE_{ApG} - eficiência de encapsulação da apigenina-7-glicosídeo. θ_{Ap} - teor de apigenina. θ_{ApG} - teor de apigenina-7-glicosídeo.

4.6.2.1. Rendimento do processo

A Tabela 25 mostra que o rendimento do processo (R_e) de SFDE ficou entre 78,24 e 98,72%. Tais valores mostram um excelente rendimento do processo mesmo em escala laboratorial. No trabalho de Kennedy et al. (2007) o rendimento do processo de *spray freeze drying* foi de 70 a 80% quando se utilizou o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) como carreador, o que foi semelhante ao obtido no presente estudo. O alto rendimento do processo é uma característica do processo de *spray freeze drying* e uma de suas vantagens sobre o *spray drying* (KENNEDY et al., 2007; NGUYEN; HERBERGER; BURKE, 2004; SCHIFFTER, 2007).

As análises estatísticas realizadas para o rendimento do processo de SFDE é mostrada na Tabela 26. Pode ser visto que esta resposta não foi significativamente influenciada por nenhum dos dois fatores estudados neste processo. Como o alto rendimento é característica do processo de *spray freeze drying*, já se esperava pouca ou nenhuma influência dos parâmetros do processo sobre o R_e do SFDE.

Tabela 26 - Análises estatísticas do rendimento do processo (R_e) de SFDE em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.

Variáveis estudadas	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
VA	44,0104	1	44,0104	0,6459	0,480380
VA ²	64,3356	1	64,3356	0,9441	0,402887
QE	75,8282	1	75,8282	1,1128	0,368925
QE ²	29,5168	1	29,5168	0,4332	0,557440
VA x QE	23,2324	1	23,2324	0,3409	0,600292
Erro	204,4295	3	68,1432		

*VA- vazão de alimentação da amostra. QE- razão entre quitosana e extrato na amostra.

^aSignificante com $p < 0,05$.

4.6.2.2. Tamanho das micropartículas

A Tabela 25 mostra que as micropartículas produzidas por SFDE apresentaram diâmetro médio (D_{50}) de 21,69 a 104,20 μm . Estes valores são bem próximos aos obtidos por Gao et al. (2011), Kondo et al. (2009) e Sonner, Maa e Lee (2002), onde micropartículas produzidas por *spray freeze drying* apresentaram diâmetro médio na faixa de 29,77 a 42,17 μm , 55,2 a 178,7 μm e 20 a 90 μm respectivamente. Esta similaridade entre os valores de D_{50} das micropartículas obtidas por SFDE e a literatura é indicativo de que o processo de *spray freeze drying* também é adequado para a produção de micropartículas de quitosana contendo o extrato de *C. recutita*.

As análises estatísticas, presentes na Tabela 27, mostraram que o D_{50} das micropartículas produzidas por SFDE foi influenciado significativamente pelos termos lineares da vazão de alimentação da amostra (VA) e da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE). A influência de ambos os fatores no diâmetro médio das micropartículas é explicada pelo fato destes fatores influenciarem no tamanho das gotículas formadas pela atomização e, portanto exercerem um papel importante no tamanho das micropartículas produzidas por processos onde a amostra é atomizada, o que é o caso do *spray freeze drying* (CORRIGAN; HEALY; CORRIGAN, 2006; MARTINS et al., 2012).

A equação resultante do ajuste das análises estatísticas ($R^2 = 0,965$) que relaciona o diâmetro médio (D_{50}) das micropartículas obtidas por SFDE com a vazão de alimentação da amostra (VA) e a razão entre quitosana e extrato na amostra (QE), é representada pela Equação 26.

$$D_{50}(\mu\text{m}) = 44,06 + 25,79\left(\frac{VA - 12}{4}\right) + 11,49(QE - 2)$$

Equação 26

Tabela 27 - Análises estatísticas do diâmetro médio das micropartículas (D_{50}) obtidas no processo de SFDE em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.

Variáveis estudadas	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
VA	3990,2288	1	3990,2288	63,6639	0,004108^a
VA ²	97,7668	1	97,7668	1,5599	0,300265
QE	792,3504	1	792,3504	12,6419	0,037940^a
QE ²	19,2407	1	19,2407	0,3070	0,618160
VA x QE	260,0156	1	260,0156	4,1485	0,134461
Erro	188,0296	3	62,6765		

*VA- vazão de alimentação da amostra. QE- razão entre quitosana e extrato na amostra.

^aSignificante com $p < 0,05$.

A Figura 21 mostra a superfície de resposta que retrata a influência linear de VA e QE sobre o diâmetro médio das micropartículas. Esta figura mostra que quanto maiores os valores de VA e de QE usados, maior foi o D_{50} . Tal fato é condizente com os resultados obtidos por Kondo et al. (2009) o qual também estudou o processo de *spray freeze drying* (KONDO et al., 2009). Ao se utilizar uma maior vazão da amostra, há uma maior probabilidade de formar maiores gotículas durante a atomização e, conseqüentemente, maiores micropartículas. Por outro lado, quanto maior o valor de QE, maior é o teor de sólidos na amostra, e portanto maior é a probabilidade de se obter maiores micropartículas (CORRIGAN; HEALY; CORRIGAN, 2006; KONDO et al., 2009; MARTINS et al., 2012).

Figura 21 - Gráfico de superfície de resposta do diâmetro médio (D_{50}) das micropartículas produzidas por SFDE, em função da vazão de alimentação da amostra (VA) e da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE).

4.6.2.3. Eficiência de encapsulação do processo

Assim como realizado para o SDE, a eficiência de encapsulação do processo de SFDE também foi avaliada com relação à apigenina (EE_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (EE_{ApG}). A Tabela 25 mostra que os valores de EE_{Ap} e EE_{ApG} referentes ao SDE ficaram entre 31,77 e 61,08% e entre 29,89 e 62,45%, respectivamente. Comparando estes valores com os valores de EE_{Ap} e EE_{ApG} obtidos no SDE, pode ser visto que o processo de SFDE apresentou uma eficiência de encapsulação bem menor para ambos os marcadores, o que é uma desvantagem para o *spray freeze drying*, visto que a encapsulação de um composto ativo traz várias vantagens tais como aumento da estabilidade, desenvolvimento de novos sistemas de liberação e redução da perda e degradação das substâncias (CAO-HOANG; FOUGÈRE; WACHÉ, 2011; COUTO et al., 2011; GHARSALLAOUI et al., 2007; MARCATO, 2009; RODRIGUES; GROSSO, 2008). As micropartículas produzidas por *spray freeze drying* são geralmente porosas devido a sublimação dos cristais de gelo formados durante o congelamento das gotículas, o que dificulta a encapsulação do ativo (AL-HAKIM; STAPLEY, 2004; CHEOW et al., 2011; DROOGE et al., 2005; NIWA et al., 2009).

Os valores de p obtidos pelas análises estatísticas da influência de VA e QE sobre a EE_{Ap} e a EE_{ApG} no processo de SFDE são apresentados na Tabela 28. Os dados presentes nesta tabela mostraram que a eficiência de encapsulação deste processo, com relação à ambos os marcadores, foi significativamente influenciada apenas pelo termo linear da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE), o que também ocorreu para o processo de SDE. Como já discutido, a influência de QE sobre EE_{Ap} e EE_{ApG} é consistente com a literatura, uma vez que a proporção entre o material encapsulante e encapsulado influencia a eficiência de encapsulação de um processo (MARTINS; SIQUEIRA; FREITAS, 2012; ONEDA; RÉ, 2003).

Tabela 28 - Valores de p obtidos pelas análises estatísticas da eficiência de encapsulação da apigenina (EE_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (EE_{ApG}) no processo de SFDE, em função dos fatores estudados pelo planejamento fatorial completo.

Variáveis estudadas	Valor de p	
	EE_{Ap}	EE_{ApG}
VA	0,248916	0,455316
VA^2	0,802129	0,754492
QE	0,002054^a	0,004875^a
QE^2	0,559782	0,961699
VA x QE	0,754027	0,873322

*VA- vazão de alimentação da amostra. QE- razão entre quitosana e extrato na amostra.

^aSignificante com $p < 0,05$.

A Equação 27 ($R^2 = 0,972$) e a Equação 28 ($R^2 = 0,950$) são os modelos ajustados obtidos pelas análises estatísticas que relaciona, respectivamente, a eficiência de encapsulação do processo de SFDE, com relação à apigenina (EE_{Ap}) e à apigenina-7-glicosídeo (EE_{ApG}), e a razão entre quitosana e extrato na amostra (QE).

$$EE_{Ap}(\%) = 45,97 + 12,19(QE - 2)$$

Equação 27

$$EE_{ApG}(\%) = 45,19 + 12,92(QE - 2)$$

Equação 28

A influência de QE sobre EE_{Ap} e EE_{ApG} no processo de SFDE é mostrada pela Figura 22. Esta figura mostra que quanto maior o valor de QE usado, maior foi a eficiência de encapsulação do processo para ambos os marcadores. Isso também ocorreu no SDE e como já mencionado, essa relação pode ser facilmente compreendida entendendo que uma maior quantidade de carreador presente na amostra facilita a encapsulação da apigenina e apigenina-7-glicosídeo presentes no extrato durante a formação das micropartículas.

Figura 22 - Gráfico de superfície de resposta da eficiência de encapsulação do processo de SFDE, com relação à, a) apigenina (EE_{Ap}) e b) apigenina-7-glicosídeo (EE_{ApG}), em função da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE) e da vazão de alimentação da amostra (VA).

4.6.2.4. Teor de apigenina e apigenina-7-glicosídeo nas micropartículas

O teor de apigenina (θ_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (θ_{ApG}) também foi avaliado nas micropartículas obtidas pelo processo de SFDE. Como pode ser visto na Tabela 25 os valores de θ_{Ap} e θ_{ApG} obtidos neste processo variaram, respectivamente, de 99,58 a 99,96% e de 98,98 a 99,96%, mostrando que de maneira geral houve uma perda muito pequena de ambos os marcadores neste processo. De maneira semelhante, no trabalho de Gao et al. (2011) o teor de

ativo presente nas micropartículas produzidas por *spray freeze drying* variou de 98,26% a 99,98%.

Pode ser visto que a perda máxima de ambos os marcadores no processo de SFDE foi bem menor que a perda dos mesmos no processo de SDE. Isto é explicado pelo fato do *spray freeze drying* utilizar baixas temperaturas, o que na maioria das vezes, promove uma pequena degradação das substâncias ativas (ALLOUE et al., 2007; CHAN; CHEW, 2003; DROOGE et al., 2005; KENNEDY et al., 2007; LEUENBERGER, 2002; NIWA et al., 2009; SCHIFFTER; CONDLIFFE; VONHOFF, 2010; SCHIFFTER, 2007).

As análises estatísticas realizadas para θ_{Ap} e θ_{ApG} nas micropartículas produzidas por SFDE mostraram que o teor de ambos os marcadores foi influenciado de maneira significativa pela razão entre quitosana e extrato na amostra (Tabela 29). No entanto, o efeito da influência deste fator não foi a mesma para os dois marcadores. Como pode ser visto na Tabela 29, enquanto θ_{Ap} foi influenciado significativamente pelo termo linear e quadrático da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE e QE²), θ_{ApG} sofreu influência significativa apenas do termo linear deste fator (QE).

Tabela 29 - Valores de p obtidos pelas análises estatísticas do teor de apigenina (θ_{Ap}) e apigenina-7-glicosídeo (θ_{ApG}) presente nas micropartículas obtidos por SFDE, em função dos fatores estudados pelo planejamento fatorial completo.

Variáveis estudadas	Valor de p	
	θ_{Ap}	θ_{ApG}
VA	0,873314	0,369008
VA ²	0,507561	0,594771
QE	0,017974^a	0,015642^a
QE ²	0,029499^a	0,876789
VA x QE	0,833905	0,950638

*VA- vazão de alimentação da amostra. QE- razão entre quitosana e extrato na amostra.

^aSignificante com $p < 0,05$.

As equações resultantes dos ajustes das análises estatísticas que relacionam o teor de apigenina (θ_{Ap}) e o teor de apigenina-7-glicosídeo (θ_{ApG}) nas micropartículas produzidas por SFDE com a razão entre quitosana e extrato na amostra (QE), são representadas pela Equação 29 ($R^2 = 0,927$) e pela Equação 30 ($R^2 = 0,897$), respectivamente.

$$\theta_{Ap}(\%) = 99,90 + 0,13(QE - 2) - 0,19(QE - 2)^2$$

Equação 29

$$\theta_{ApG}(\%) = 99,51 + 0,34(QE - 2)$$

Equação 30

A influência que QE exerceu sobre θ_{Ap} e θ_{ApG} é mostrada na Figura 23. Nesta figura, é possível verificar que quanto maior o valor de QE, maior o teor de apigenina e apigenina-7-glicosídeo. Como já discutido, a explicação disso é que quanto maior o valor de QE, maior a proporção de quitosana na amostra e, portanto, maior a probabilidade de ocorrer a proteção dos marcadores contra possíveis perdas durante o processo. No entanto, devido θ_{Ap} ter sido influenciada não só pelo termo linear de QE, mas também pelo termo quadrático deste fator, é possível notar que o maior teor deste marcador ocorre com valores intermediários de QE. A razão para essa não linearidade somente no caso da apigenina não está clara. Isso mostra mais uma vez a importância do estudo e otimização do processo de SFDE para a obtenção de micropartículas que contenham alto teor tanto de apigenina, quanto de apigenina-7-glicosídeo.

Figura 23 - Gráfico de superfície de resposta do teor de: a) apigenina (θ_{Ap}) e b) apigenina-7-glicosídeo (θ_{ApG}) nas micropartículas obtidas pelo processo de SFDE, em função da vazão de alimentação da amostra (VA) e da razão entre quitosana e extrato na amostra (QE).

4.7. Método cromatográfico para caracterização do óleo essencial e quantificação do marcador do mesmo

O óleo essencial de *C. recutita* foi caracterizado a fim de determinar sua composição, uma vez que esta pode ser influenciada por vários fatores, tais como sazonalidade, método de extração, condições experimentais utilizadas, entre outros. Tal fato acontece devido à vulnerabilidade que os constituintes deste óleo essencial apresentam tanto a fatores intrínsecos quanto extrínsecos. Além disso, a caracterização do óleo essencial de *C. recutita* foi realizada, porque dependendo do material vegetal usado e das condições extrativas aplicadas é possível obter produtos com baixa qualidade e, conseqüentemente, com propriedades bioativas e terapêuticas comprometidas (BORSATO et al., 2008). Os cromatogramas resultantes bem

como os dados obtidos por CG-EM para o óleo essencial da *C. recutita* estão apresentados na Figura 24 e na Tabela 30.

Figura 24 - Cromatograma do óleo essencial da *C. recutita* obtido por CG-EM.

Tabela 30 - Dados complementares ao cromatograma de CG-EM do óleo essencial da *C. recutita*.

Pico	Tempo de Retenção (min)	Área (%)	Composto Químico
1	26,549	14,59	β -Farneseno
2	27,538	1,15	Germacreno D
3	28,106	0,76	Biciclogermacreno
4	28,540	0,70	α -Farneseno
5	28,728	0,21	Naftaleno
6	31,299	0,66	Espatulenol
7	33,840	0,52	α -Muurolol
8	34,386	7,03	Óxido de bisabolol B
9	34,563	0,47	Não identificado
10	35,361	5,77	Óxido de bisabolona
11	35,522	2,08	α -Bisabolol
12	37,037	2,38	Camazuleno
13	38,096	54,71	Óxido de bisabolol A
14	41,110	0,38	Hexahidrofarnesil acetona
15	42,412	7,55	(E)-Tonghaosu ou (Z)- Tonghaosu
16	42,813	1,04	(E)-Tonghaosu ou (Z)- Tonghaosu

Existem na literatura diversos trabalhos que caracterizaram o óleo essencial da *C. recutita*. De acordo com estes trabalhos, este óleo é constituído por diferentes compostos químicos, tais como: óxido de bisabolol A, óxido de bisabolol B, α -bisabolol, camazuleno, β -farneseno, α -farneseno, limoneno, óxido de bisabolona, β -selineno, espatulenol, ácido linoleico, germacreno D, germacreno A, biciclogermacreno, γ -cadineno, artemísia cetona, α -muurolol, γ -muuroleno β -bisaboleno, óxido de bisaboleno, naftaleno, β -eudesmol, entre outros (BORSATO et al., 2008; GANZERA; SCHNEIDER; STUPPNER, 2006; KOWALSKI; WAWRZYKOWSKI, 2009; PETRONILHO et al., 2011; PIRZAD et al., 2011; PRESIBELLA et al., 2006; RAAL et al., 2012; SRIVASTAVA; GUPTA, 2009a). Dessa forma, a comparação dos resultados obtidos por CG-EM para o óleo essencial da *C. recutita* (Figura 24 e Tabela 30) com os dados da literatura mostram uma grande semelhança dos constituintes encontrados, o que evidencia a qualidade do óleo essencial de *C. recutita* usado neste estudo.

Com o objetivo de verificar a autenticidade do óleo essencial da *C. recutita*, o óleo essencial da *Anthemis nobilis* (camomila romana) também foi analisado. Devido ao alto custo do óleo essencial da *C. recutita*, este algumas vezes é adulterado com o óleo essencial da camomila romana, que é mais barato. Os resultados da caracterização do óleo essencial da *Anthemis nobilis* por CG-EM são apresentados na Figura 25 e na Tabela 31. O cromatograma presente na Figura 25, bem como os dados da Tabela 31 mostram que os compostos encontrados no óleo essencial da *Anthemis nobilis* estão de acordo com a composição descrita na literatura para este óleo (SRIVASTAVA; GUPTA, 2009a).

Figura 25 - Cromatograma do óleo essencial da *Anthemis nobilis* obtido por CG-EM.

Tabela 31 - Dados complementares ao cromatograma de CG-EM do óleo essencial da *Anthemis nobilis*.

Pico	Tempo de Retenção (min)	Área (%)	Nome do provável composto
1	4,437	0,09	Acetato de 2-metil butila
2	5,234	3,30	Isobutil isobutirato
3	5,368	0,29	Acetato de prenila
4	5,601	0,22	Ter-amil bromida ou Terc-pentil bromida
5	5,857	18,54	α -Pineno
6	6,278	0,72	Canfeno
7	7,133	18,05	β -Pineno
8	7,355	0,15	β -Mirceno
9	7,425	0,79	2-metilbutil-angelato
10	7,772	0,52	Isobutil 2-metil butirato
11	8,101	0,26	Isopentil-butirato
12	8,218	2,23	n-Amil butirato
13	8,902	11,45	Eucaliptol
14	9,137	0,39	Metacrilato de 2-metilbutil
15	9,519	18,01	Isobutil-angelato
16	9,979	4,70	Alil-tiglato ou Bromo-ciclohexano
17	10,914	0,40	Isobutil-angelato ou Etil 1-metil ciclopropano carboxilato ou (E)- 2-metil ácido crotônico
18	11,033	0,24	Isobutil-tiglato
19	11,515	0,26	2-metilbutil, 2-metil-butirato ou 3-metilbutil, 2-metil-butirato
20	13,122	3,55	Trans-pinocarveol
21	13,359	2,56	2-metilbutil-angelato
22	13,557	9,22	2-metilbutil-angelato ou Isobutil-angelato
23	14,025	2,40	Pinocarvona
24	14,684	0,24	Isobutil 3-hidroxi-2-metil butanoato
25	15,179	0,49	2-metil-2-butano angelato
26	15,401	0,70	Mirtenol
27	17,271	0,27	2-hidroxi-2-metil-but-3-enil-2-metil-2(Z)-butenoato

A comparação entre os dados apresentados pela Tabela 30 e pela Tabela 31, adicionados aos cromatogramas obtidos para os óleos essenciais da *C. recutita* e da *Anthemis nobilis* (Figura

24 e Figura 25) mostram que o óleo essencial da *C. recutita* usado neste trabalho não foi adulterado com óleo essencial da camomila romana. Além disso, como foi apresentado acima, os compostos encontrados no óleo essencial da *C. recutita* estão em conformidade com a literatura, o que mais uma vez garante a qualidade e autenticidade deste óleo.

Baseado nas áreas dos picos (Tabela 30) é possível verificar que o óleo essencial de *C. recutita* apresentou como principal constituinte o óxido de bisabolol A, o que também ocorreu nos trabalhos de Ganzera, Schneider e Stuppner (2006), Kowalski e Wawrzykowski (2009) e Raal et al. (2012). Portanto, devido ao fato do óxido de bisabolol A representar mais de 50% da composição do óleo essencial de *C. recutita*, adicionado ao fato deste constituinte ser um dos bioativos responsáveis pelas ações terapêuticas do óleo essencial de *C. recutita*, o óxido de bisabolol A foi selecionado no presente estudo como o marcador do óleo essencial de *C. recutita*. Segundo a literatura, as ações terapêuticas do óleo essencial de *C. recutita* são devidas principalmente aos seus constituintes sesquiterpenos, tais como o bisabolol e seus óxidos e os azulenos (LEE; HEO; KIM, 2010; OGATA et al., 2010; PETRONILHO et al., 2011; PRESIBELLA et al., 2006; RAAL et al., 2012). Além disso, a Instrução Normativa nº 02 de 13 de maio de 2014 da ANVISA (BRASIL, 2014) também determina como marcadores da *C. recutita* os derivados bisabolônicos, que incluem o óxido de bisabolol A.

A quantificação do óxido de bisabolol A nas amostras contendo o óleo essencial de *C. recutita* foi feita por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa, por meio da curva de calibração do óxido de bisabolol A em hexano (0,1 a 225 µg/mL) mostrada na Figura 26. Como pode ser visto nesta figura, o coeficiente de correlação linear (r) obtido foi maior que 0,99 indicando, portanto, a linearidade do método para a quantificação de óxido de bisabolol A (BRASIL, 2003).

Figura 26 - Curvas de calibração com equação da reta e coeficiente de correlação linear (r) obtida por CG-EM para óxido de bisabolol A em hexano.

4.8. Produção das micropartículas contendo o óleo essencial

A viabilidade dos processos de *spray drying* e *spray freeze drying* para a produção de micropartículas de quitosana contendo o óleo essencial de *C. recutita* também foi estudada neste trabalho. Devido ao fato da quitosana possuir pequena propriedade emulsificante, surfactantes não iônicos são necessários para que haja uma emulsificação do óleo na solução de quitosana, formando uma emulsão óleo/água (LI et al., 2013). Neste trabalho foram utilizados os surfactantes polissorbato 20 e 80 na proporção de 1:1. Emulsões feitas com uma combinação de surfactantes são mais estáveis que aquelas preparadas com apenas um surfactante, visto que a combinação de dois ou mais surfactantes podem não só emulsificar melhor óleo e água, mas também interagir para formar emulsões mais estáveis que previnem a aglomeração de gotas ou a floculação. Além disso, a combinação de surfactantes aumenta a retenção do óleo e produz gotas de menores tamanhos, quando comparado ao uso de apenas um surfactante. Portanto, a combinação de surfactantes provavelmente promove uma menor perda de óleo durante o processo e a produção de micropartículas com menores diâmetros (LI et al., 2013).

A concentração de 5% de surfactante foi escolhida baseada nos resultados obtidos por Li et al. (2013), onde esta quantidade resultou em menor viscosidade da emulsão de óleo de laranja e solução de quitosana. A viscosidade da amostra é uma propriedade importante, pois pode afetar a seleção e utilização de equipamentos bem como as condições do processo (LI et al., 2013). No caso do *spray drying* e *spray freeze drying* uma alta viscosidade da amostra pode impossibilitar a atomização.

Como já mencionado, vários fatores podem influenciar os processos de *spray drying* e *spray freeze drying* e as características das micropartículas por eles produzidas (BOWEY; NEUFELD, 2010; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; ZHANG et al., 2010). Portanto, para permitir uma análise mais precisa, bem como a otimização dos processos de SDO e SFDO, ambos os processos foram estudados por meio de planejamentos fatoriais. As respostas avaliadas pelos planejamentos e utilizadas para a otimização dos processos foram: o rendimento do processo (R_e), diâmetro médio das micropartículas (D_{50}), teor de óxido de bisabolol A (θ_{OB}) nas micropartículas e a eficiência de encapsulação dos processos com relação ao óxido de bisabolol A (EE_{OB}).

4.8.1. *Spray drying* do óleo essencial

O processo de *spray drying* do óleo essencial (SDO) foi estudado por meio do planejamento Box-Behnken. Os fatores estudados foram temperatura de saída do ar de secagem (T), razão entre quitosana e óleo na amostra (QO) e fluxo do ar de secagem (FA). A escolha

dos mesmos foi baseada em estudos preliminares e na literatura. (ARAÚJO; TEIXEIRA; FREITAS, 2010; CAL; SOLLOHUB, 2010; COSTA-MACHADO, 2011; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; TACON, 2012; ZHANG et al., 2010). A avaliação da influência destes três fatores sobre o processo de SDO, bem como a otimização deste processo foram realizadas utilizando as seguintes respostas: R_e , D_{50} , EE_{OB} e θ_{OB} . Os resultados destas respostas, obtidos no processo de *spray drying* do óleo seguindo o planejamento Box-Behnken, são mostrados na Tabela 32. As condições de cada experimento estão descritas no item 3.9.1. A seguir é apresentada uma discussão mais detalhada de cada uma das respostas estudadas.

Tabela 32 - Resultados obtidos para as respostas estudadas no processo de SDO seguindo o planejamento Box-Behnken.

Experimento	R_e (%)	D_{50} (μm)	EE_{OB} (%)	θ_{OB} (%)
1	24,21	6,43	47,31	46,96
2	24,34	5,98	52,05	24,52
3	23,38	3,69	81,33	54,44
4	37,85	5,47	82,96	36,99
5	24,65	4,95	75,45	56,93
6	24,57	6,37	69,92	29,51
7	23,01	5,29	72,20	32,00
8	34,85	5,34	58,13	22,03
9	25,71	6,50	49,59	49,45
10	24,45	4,46	77,50	51,95
11	23,91	6,22	54,83	27,01
12	49,88	4,98	79,93	34,49
13	24,14	5,96	61,24	41,97
14	23,94	6,16	63,64	44,47
15	24,08	5,76	67,32	39,48

* R_e - rendimento do processo. D_{50} - diâmetro médio das micropartículas. EE_{OB} - eficiência de encapsulação com relação ao óxido de bisabolol A. θ_{OB} - teor de óxido de bisabolol A nas micropartículas.

4.8.1.1. Rendimento do processo

O rendimento do processo de SDO ficou entre 23,01 e 49,88% (Tabela 32). Estes valores mostram que o R_e do *spray drying* foi menor para o óleo que para o extrato de *C. recutita*. Embora tenha ocorrido esta diferença entre R_e do processo de *spray drying* do óleo e do extrato, os valores aqui obtidos para o óleo ainda podem ser considerados bons. Em diversos trabalhos também foi observado um pequeno rendimento do processo quando micropartículas de quitosana foram produzidas por *spray drying*. Por exemplo, Gelfuso et al. (2011), Bastos et al.

(2012), Gavini et al. (2008) e Cevher et al. (2006) obtiveram rendimentos de processo aproximadamente entre 30 e 50% ao prepararem micropartículas de quitosana contendo diferentes compostos por *spray drying*. Além disso, é relativamente comum o processo de *spray drying* apresentar rendimento abaixo de 50% quando realizado em escala laboratorial. O menor rendimento do processo de *spray drying* em escala laboratorial quando comparado ao de escala industrial é devido ao maior acúmulo de material nas paredes da câmara, uma vez que o tempo de residência do ar e a distância radial do bico atomizador até a câmara é menor (AMERI; MAA, 2006; COSTA-MACHADO, 2011; MARTINS et al., 2013).

Os resultados obtidos pelas análises estatísticas do rendimento do processo de SDO estão presentes na Tabela 33. Esta tabela mostra que o R_e do SDO foi influenciado significativamente pelos termos lineares da temperatura de saída do ar de secagem (T), da razão entre quitosana e óleo na amostra (QO) e do fluxo do ar de secagem (FA), e ainda pela interação destes dois últimos fatores (QO x FA).

Tabela 33 - Análises estatísticas do rendimento do processo (R_e) de SDO em função dos fatores estudados no planejamento Box-Behnken.

Variáveis estudadas	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
T	86,9169	1	86,9169	9,2055	0,028947^a
T ²	0,6350	1	0,6350	0,0673	0,805721
QO	174,7969	1	174,7969	18,5131	0,007696^a
QO ²	53,4200	1	53,4200	5,6578	0,063273
FA	130,2427	1	130,2427	13,7943	0,013797^a
FA ²	36,1932	1	36,1932	3,8333	0,107579
T x QO	51,4159	1	51,4159	5,4456	0,066913
T x FA	35,5827	1	35,5827	3,7686	0,109888
QO x FA	185,3257	1	185,3257	19,6282	0,006826^a
Erro	47,2090	5	9,4418		

*T - temperatura de saída do ar de secagem. QO - razão entre quitosana e óleo na amostra. FA - fluxo do ar de secagem. ^aSignificante com $p < 0,05$.

A equação resultante do ajuste das análises estatísticas ($R^2 = 0,941$) que relaciona o rendimento do processo (R_e) de SDO com a temperatura de saída do ar de secagem (T), a razão entre quitosana e óleo na amostra (QO) e o fluxo do ar de secagem (FA) é representada pela Equação 31.

$$R_e(\%) = 24,06 + 3,30\left(\frac{T - 75}{15}\right) + 4,67(QO - 2) + 4,04\left(\frac{FA - 1,5}{0,5}\right) + 6,81(QO - 2)\left(\frac{FA - 1,5}{0,5}\right)$$

Equação 31

A influência de T, QO e FA sobre o rendimento do processo de SDO é mostrada pela Figura 27. A análise desta figura mostra que quanto maiores os valores de T, QO e FA usados, maior foi o R_e . A influência da quantidade de quitosana sobre o rendimento do processo também foi verificada por Gelfuso (2009) e Alhalaweh, Andersson e Velaga (2009). Ao produzirem, por *spray drying*, micropartículas de quitosana contendo diferentes compostos ativos, estes autores também observaram que o rendimento do processo aumentou a medida que se aumentou a proporção do polímero em relação ao ativo. A provável explicação para isto é a capacidade anti-plastificante da quitosana, o que diminui a tendência das micropartículas de aderirem à câmara de secagem e ao ciclone, aumentando assim o rendimento (ALHALAWEH; ANDERSSON; VELAGA, 2009).

Figura 27 - Gráficos de superfície de resposta do rendimento do processo (R_e) do SDO em função dos fatores fluxo do ar de secagem (FA), razão entre quitosana e óleo na amostra (QO) e temperatura de saída do ar de secagem (T).

Já com relação à temperatura, a influência deste fator sobre o rendimento do processo também foi observada no processo SDE aqui estudado e no trabalho de Martins et al. (2012).

A dependência do R_e da temperatura de saída do ar de secagem, bem como do fluxo do mesmo, provavelmente está relacionada à influência que estes dois fatores exercem sobre a secagem das gotículas atomizadas. Gotículas que não são secas rapidamente após serem atomizadas tendem a aderir na parede da câmara, reduzindo o rendimento do processo (MARTINS et al., 2012).

4.8.1.2. Tamanho das micropartículas

As micropartículas obtidas no processo de SDO apresentaram diâmetro médio de 3,69 a 6,50 μm (Tabela 32). Tais valores mostram que o D_{50} destas micropartículas foram próximos aos valores de D_{50} obtidos para as micropartículas produzidas por SDE. Além disso, pode ser visto que o diâmetros médios das micropartículas obtidas por SDO foram similares aos obtidos em outros trabalhos, onde micropartículas de quitosana contendo diferentes compostos foram produzidas por *spray drying*. (ALHALAWEH; ANDERSSON; VELAGA, 2009; GELFUSO et al., 2011; KINI; DIXIT; KULKARNI, 2011; KOSARAJU; D'ATH; LAWRENCE, 2006)

As análises estatísticas (Tabela 34) mostram que o D_{50} das micropartículas produzidas por SDO foi significativamente influenciado pelos termos linear e quadrático da temperatura de saída do ar de secagem (T e T^2), pelo termo linear da razão entre quitosana e óleo na amostra (QO), pela interação desses dois termos ($T \times \text{QO}$) e pela interação da temperatura de saída e do fluxo do ar de secagem ($T \times \text{FA}$). A influência de T , QO e FA no tamanho das micropartículas provavelmente está relacionada com o fato destes fatores exercerem um papel importante no tamanho das microgotículas formadas, e na velocidade que estas são secas imediatamente após a sua atomização (CORRIGAN; HEALY; CORRIGAN, 2006; MARTINS et al., 2012).

Tabela 34 - Análises estatísticas do diâmetro médio das micropartículas (D_{50}) obtidas no processo de SDO em função dos fatores estudados no planejamento Box-Behnken.

Variáveis estudadas	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
T	0,9807	1	0,9807	25,0498	0,004087^a
T²	0,3591	1	0,3591	9,1733	0,029123^a
QO	5,3268	1	5,3268	136,0624	0,000081^a
QO ²	0,2460	1	0,2460	6,2838	0,054042
FA	0,0259	1	0,0259	0,6610	0,453166
FA ²	0,0980	1	0,0980	2,5019	0,174551
T x QO	1,2388	1	1,2388	31,6416	0,002459^a
T x FA	0,4699	1	0,4699	12,0028	0,017955^a
QO x FA	0,1592	1	0,1592	4,0664	0,099810
Erro	0,1958	5	0,0392		

*T - temperatura de saída do ar de secagem. QO - razão entre quitosana e óleo na amostra. FA - fluxo do ar de secagem. ^aSignificante com $p < 0,05$.

A Equação 32 apresenta o modelo ajustado ($R^2 = 0,978$) obtido pelas análises estatísticas que relaciona o diâmetro médio das micropartículas (D_{50}) produzidas por SDO com a temperatura de saída do ar de secagem (T), a razão entre quitosana e óleo na amostra (QO) e o fluxo do ar de secagem (FA).

$$D_{50}(\mu m) = 5,96 + 0,35 \left(\frac{T - 75}{15} \right) - 0,31 \left(\frac{T - 75}{15} \right)^2 - 0,82(QO - 2) + 0,56 \left(\frac{T - 75}{15} \right) (QO - 2) - 0,34 \left(\frac{T - 75}{15} \right) \left(\frac{FA - 1,5}{0,5} \right)$$

Equação 32

A Figura 28 mostra a influência que os fatores T, QO e FA tiveram sobre o D_{50} das micropartículas obtidas por SDO. É possível verificar que o diâmetro das micropartículas diminuiu com a diminuição de T e FA, e o aumento de QO. Nos trabalhos de Alhalaweh, Andersson e Velaga (2009), Gelfuso et al. (2011) e Cevher et al. (2006) também foi observado uma diminuição no tamanho das micropartículas de quitosana contendo diferentes componentes produzidas por *spray drying* quando se aumentou a proporção deste polímero na amostra. O mecanismo que controla a influência desses fatores no processo não está claro. A relação de QO com o tamanho da micropartícula é diferente do visto no processo de SDE, onde menores partículas foram obtidas com valores intermediários de QE. Dessa maneira, fica claro que a maneira como o carreador e ativo interagem é marcante para a determinação do D_{50} das micropartículas produzidas por *spray drying*.

Figura 28 - Gráficos de superfície de resposta do diâmetro médio (D_{50}) das micropartículas obtidas por SDO em função dos fatores temperatura de saída do ar de secagem (T), razão entre quitosana e óleo na amostra (QO) e fluxo do ar de secagem (FA).

Já com relação à T e FA, poderia se esperar que o efeito dos mesmos sobre o D_{50} fosse o oposto do que ocorreu, visto que maiores valores de T e FA deveriam secar as microgotículas mais rapidamente, evitando a aglomeração. No entanto uma secagem muito rápida pode também impedir a encapsulação do ativo e facilitar a aglomeração das micropartículas, aumentando o valor do D_{50} .

4.8.1.3. Eficiência de encapsulação do processo

A eficiência de encapsulação do processo de SDO foi avaliada por meio da eficiência de encapsulação do óxido de bisabolol A (EE_{OB}). A Tabela 32 mostra que os valores de EE_{OB} obtidos neste processo ficaram entre 47,31 e 82,96%. Estes valores, apesar de um pouco menores, foram próximos aos obtidos para a eficiência de encapsulação do processo de SDE. No trabalho de Li et al. (2013) a microencapsulação do óleo de laranja por *spray drying* usando quitosana como carreador apresentou eficiência de encapsulação entre 80% e 94%. Já Gelfuso et al. (2011), obteve valores entre 45 e 82% também utilizando quitosana como carreador para a produção de micropartículas de minoxidil por *spray drying*.

As análises estatísticas referentes a EE_{OB} (Tabela 35) mostram que a eficiência de encapsulação do processo de SDO foi significativamente influenciada apenas pelo termo linear da razão entre quitosana e óleo na amostra (QO). Como já mencionado, segundo a literatura, a proporção do material encapsulante e aquele a ser encapsulado é um fator que exerce forte influência na eficiência de encapsulação de um processo (MARTINS; SIQUEIRA; FREITAS, 2012; ONEDA; RÉ, 2003).

Tabela 35 - Análises estatísticas da eficiência de encapsulação do óxido de bisabolol A (EE_{OB}) no processo de SDO em função dos fatores estudados no planejamento Box-Behnken.

Variáveis estudadas	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
T	21,9067	1	21,9067	0,5914	0,476599
T ²	25,9686	1	25,9686	0,7011	0,440585
QO	1738,9615	1	1738,9615	46,9492	0,001011^a
QO ²	2,4083	1	2,4083	0,0650	0,808888
FA	6,7905	1	6,7905	0,1833	0,686341
FA ²	17,9435	1	17,9435	0,4844	0,517435
T x QO	2,4035	1	2,4035	0,0649	0,809071
T x FA	18,2885	1	18,2885	0,4938	0,513614
QO x FA	1,9621	1	1,9621	0,0530	0,827088
Erro	185,1962	5	37,0392		

*T - temperatura de saída do ar de secagem. QO - razão entre quitosana e óleo na amostra. FA - fluxo do ar de secagem ^aSignificante com $p < 0,05$.

A equação resultante do ajuste das análises estatísticas ($R^2 = 0,908$) que relaciona a eficiência de encapsulação do processo de SDO com relação ao óxido de bisabolol A (EE_{OB}) e a razão entre quitosana e óleo na amostra (QO) é apresentada na Equação 33.

$$EE_{OB}(\%) = 64,07 + 14,74(QO - 2)$$

Equação 33

A influência de QO sobre EE_{OB} é mostrada pela Figura 29, onde pode ser visto que quanto maior o valor de QO usado, maior foi a eficiência de encapsulação do processo de SDO. Tal fato está de acordo com a literatura, visto que no trabalho de Li et al. (2013), a eficiência de encapsulação do processo de *spray drying* para a produção de micropartículas de quitosana contendo óleo de laranja aumentou com o aumento da proporção do polímero na amostra. Como já mencionado, o aumento da proporção de quitosana na amostra também resultou no aumento da eficiência de encapsulação do processo de SDE. Isto ocorre porque quanto maior a proporção de quitosana, maior a quantidade deste polímero disponível na amostra para microencapsular as frações de *C. recutita*.

Figura 29 - Gráfico de superfície de resposta da eficiência de encapsulação do óxido de bisabolol A (EE_{OB}) no processo de SDO em função da razão entre quitosana e óleo na amostra (QO) e da temperatura de saída do ar de secagem (T).

4.8.1.4. Teor de óxido de bisabolol A nas micropartículas

O teor de óxido de bisabolol A (θ_{OB}), um importante componente para as ações terapêuticas do óleo essencial de *C. recutita*, foi avaliado nas micropartículas obtidas pelo processo de SDO. Como pode ser visto na Tabela 32, os valores de θ_{OB} presentes nas micropartículas produzidas por este processo ficou entre 22,03 e 56,93%. Durante a secagem do óleo essencial de laranja, Ascheri, Marquez e Martucci (2003) obtiveram teores semelhantes

para alguns dos compostos ativos deste óleo, dependendo da emulsão utilizada. É provável que a elevada perda deste marcador esteja relacionada com a demora na formação da parede de quitosana ao redor do óleo durante o processo de secagem. Isso permite que as altas temperaturas promovam uma acentuada volatilização dos óleos essenciais (ASCHERI; MARQUEZ; MARTUCCI, 2003; LI et al., 2013).

As análises estatísticas, presentes na Tabela 36, mostram que o teor do óxido de bisabolol A no processo de SDO foi influenciado pelos termos lineares e quadráticos da temperatura de saída e do fluxo do ar de secagem (T , T^2 , FA e FA^2), pela interação destes dois termos ($T \times FA$) e pelo termo linear da razão entre quitosana e óleo na amostra (QO).

Tabela 36 - Análises estatísticas do teor de óxido de bisabolol A (θ_{OB}) nas micropartículas produzidas por SDO em função dos fatores estudados no planejamento Box-Behnken.

Variáveis estudadas	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
T	746,7780	1	746,7780	114,4048	0,000124^a
T²	43,3972	1	43,3972	6,6484	0,049526^a
QO	111,9001	1	111,9001	17,1429	0,008994^a
QO ²	17,5741	1	17,5741	2,6923	0,161757
FA	653,5279	1	653,5279	100,1190	0,000170^a
FA²	43,3972	1	43,3972	6,6484	0,049526^a
T x QO	6,2167	1	6,2167	0,9524	0,373934
T x FA	76,1543	1	76,1543	11,6667	0,018927^a
QO x FA	6,2167	1	6,2167	0,9524	0,373934
Erro	32,6375	5	6,5275		

*T - temperatura de saída do ar de secagem. QO - razão entre quitosana e óleo na amostra. FA - fluxo do ar de secagem. ^aSignificante com $p < 0,05$.

A Equação 34 é a equação resultante do ajuste das análises estatísticas ($R^2 = 0,981$) que relaciona o teor de óxido de bisabolol A (θ_{OB}) nas micropartículas produzidas por SDO com a temperatura de saída do ar de secagem (T), razão entre quitosana e óleo na amostra (QO) e o fluxo do ar de secagem (FA).

$$\theta_{OB}(\%) = 41,97 - 9,66\left(\frac{T - 75}{15}\right) - 3,43\left(\frac{T - 75}{15}\right)^2 + 3,74(QO - 2) - 9,04\left(\frac{FA - 1,5}{0,5}\right) - 3,43\left(\frac{FA - 1,5}{0,5}\right)^2 + 4,36\left(\frac{T - 75}{15}\right)\left(\frac{FA - 1,5}{0,5}\right)$$

Equação 34

A influência que QO, T e FA tiveram sobre θ_{OB} nas micropartículas obtidas por SDO é mostrada pela Figura 30. A análise desta figura permite verificar que θ_{OB} aumentou com a diminuição de T e FA, ou seja, quanto maior a temperatura e o fluxo do ar de secagem maior foi a perda de óleo essencial. O aumento desses fatores facilita a volatilização do óleo essencial. Essa relação também foi observada por Li et al. (2013) quando micropartículas de quitosana contendo óleo essencial de laranja foram produzidas por *spray drying*.

Além disso, pode ser visto na Figura 30 que um aumento de QO resultou em um aumento de θ_{OB} . O aumento da proporção de quitosana na amostra também promoveu um aumento do teor do óxido de bisabolol A nas micropartículas. Isso é indicativo que a quitosana é capaz de proteger o óleo essencial durante o processo e que, consequentemente, pode também ser capaz de aumentar a estabilidade do mesmo.

Figura 30 - Gráficos de superfície de resposta do teor de óxido de bisabolol A (θ_{OB}) nas micropartículas produzidas por SDO em função dos fatores fluxo do ar de secagem (FA), temperatura de saída do ar de secagem (T) e razão entre quitosana e óleo na amostra (QO).

4.8.2. *Spray freeze drying* do óleo essencial

O estudo do processo de SFDO foi feito por meio do planejamento fatorial completo (3^2) onde os fatores estudados foram a amplitude do bico ultrassônico (AP) e a razão entre quitosana e óleo na amostra (QO). A escolha de tais fatores foi feita com base na literatura (KONDO et al., 2009; NGUYEN; HERBERGER; BURKE, 2004; QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011; YU; JOHNSTON; WILLIAMS, 2006). As respostas utilizadas para verificar a influência destes dois fatores sobre o processo de SFDO foram as mesmas do SDO, isto é, R_e , D_{50} , EE_{OB} e θ_{OB} . Os valores obtidos para estas respostas, no SFDO estão na Tabela 37. As condições de cada experimento estão descritas no item 3.9.2. Uma discussão mais detalhada dos resultados obtidos para cada uma destas respostas é apresentada a seguir.

Tabela 37 - Resultados obtidos para as respostas estudadas no processo de SFDO seguindo o planejamento fatorial completo.

Experimento	R_e (%)	D_{50} (μm)	EE_{OB} (%)	θ_{OB} (%)
1	87,30	86,99	37,94	78,59
2	96,13	97,12	24,95	87,70
3	97,48	184,37	42,75	92,96
4	90,50	82,18	47,19	75,49
5	88,03	93,60	34,47	84,55
6	98,10	166,40	30,49	91,77
7	92,05	81,68	27,06	71,27
8	95,83	90,20	53,20	82,27
9	90,46	147,40	40,59	90,52

* R_e - rendimento do processo. D_{50} - diâmetro médio das micropartículas. EE_{OB} - eficiência de encapsulação com relação ao óxido de bisabolol A. θ_{OB} - teor de óxido de bisabolol A nas micropartículas.

4.8.2.1. Rendimento do processo

Pode ser visto na Tabela 37 que o rendimento do processo (R_e) de SFDO variou de 87,30 a 98,10%, semelhantes aos valores obtidos no SFDE. Novamente, altos rendimentos são esperados visto que isso é uma característica do processo de *spray freeze drying* (KENNEDY et al., 2007; NGUYEN; HERBERGER; BURKE, 2004; SCHIFFTER, 2007).

As análises estatísticas realizadas para o rendimento do processo de SFDO são apresentadas na Tabela 38. Os dados presentes nesta tabela mostram que esta resposta não foi significativamente influenciada por nenhum dos fatores estudados neste processo. Isso também ocorreu para o SFDE e provavelmente está relacionado com o fato do alto rendimento ser uma característica do processo de *spray freeze drying*.

Tabela 38 - Análises estatísticas do rendimento do processo (R_e) de SFDO em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.

Variáveis estudadas	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
AP	1,0988	1	1,0988	0,0631	0,817854
AP ²	1,9882	1	1,9882	0,1142	0,757667
QO	43,6445	1	43,6445	2,5071	0,211495
QO ²	0,9420	1	0,9420	0,0541	0,831026
AP x QO	34,6197	1	34,6197	1,9887	0,253277
Erro	52,2248	3	17,4083		

*AP - amplitude do bico ultrassônico. QO - razão entre quitosana e óleo na amostra.

^aSignificante com $p < 0,05$.

4.8.2.2. Tamanho das micropartículas

O diâmetro médio das micropartículas obtidas no processo de SFDO ficou entre 81,68 e 184,37 μm (Tabela 37). Estes valores são próximos àqueles obtidos por Kondo et al. (2009), para as micropartículas produzidas por *spray freeze drying*. As análises estatísticas, presentes na Tabela 39, mostram que o D_{50} das micropartículas produzidas por SFDO foi influenciado significativamente pelo termo linear da amplitude do bico ultrassônico (AP), pelo termo linear e quadrático da razão entre quitosana e óleo na amostra (QO e QO²) e pela interação destes dois fatores (AP x QO). A influência de QO sobre o D_{50} das micropartículas obtidas por SFDO é condizente com a literatura. Isto porque, como já mencionado, a concentração da amostra exerce um papel importante no tamanho das gotículas atomizadas, sendo portanto um fator importante na determinação do tamanho das micropartículas produzidas por processos onde a amostra é atomizada, como é o caso do *spray freeze drying* (CORRIGAN; HEALY; CORRIGAN, 2006; MARTINS et al., 2012).

Tabela 39 - Análises estatísticas do diâmetro médio (D_{50}) das micropartículas obtidas por SFDO em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.

Variáveis estudadas	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
AP	403,4400	1	403,4400	17,2814	0,025310 ^a
AP ²	0,6422	1	0,6422	0,0275	0,878814
QO	10194,5304	1	10194,5304	436,6850	0,000240 ^a
QO ²	1946,4640	1	1946,4640	83,3772	0,002776 ^a
AP x QO	250,5889	1	250,5889	10,7340	0,046556 ^a
Erro	70,0358	3	23,3453		

*AP - amplitude do bico ultrassônico. QO - razão entre quitosana e óleo na amostra.

^aSignificante com $p < 0,05$.

A Equação 35 é o modelo ajustado ($R^2 = 0,995$) obtido pelas análises estatísticas que relaciona o diâmetro médio das micropartículas (D_{50}) produzidas por SFDO com a amplitude do bico ultrassônico (AP) e a razão entre quitosana e óleo na amostra (QO).

$$D_{50}(\mu m) = 93,26 - 8,20\left(\frac{AP - 50}{20}\right) + 41,22(QO - 2) + 31,20(QO - 2)^2 - 7,92\left(\frac{AP - 50}{20}\right)(QO - 2)$$

Equação 35

A influência de AP e QO sobre o D_{50} das micropartículas produzidas por SFDO é mostrada pela superfície de resposta presente na Figura 31. A análise desta figura permite observar que os maiores valores de D_{50} foram obtidos com os maiores valores de QO e os menores valores de AP. Ao se utilizar maiores valores de QO, maior foi o teor de sólidos e a viscosidade da amostra. De acordo com a literatura, o aumento na viscosidade leva a maiores micropartículas após o SFD (ESTEVINHO et al., 2013b; SCHIFFTER; CONDLIFFE; VONHOFF, 2010). Embora a variação tenha sido pequena para valores pequenos de QO, no presente trabalho o aumento da amplitude levou a menores diâmetros médios. Isto está coerente com o trabalho de Chattopadhyay e Gupta (2002), onde em baixas potências (menor que 90W), um aumento da amplitude diminuiu o tamanho médio das micropartículas produzidas. No entanto, em condições diferentes a relação pode ser inversa (CHATTOPADHYAY; GUPTA, 2002).

Figura 31 - Gráfico de superfície de resposta do diâmetro médio (D_{50}) das micropartículas obtidas por SFDO em função da razão entre quitosana e óleo na amostra (QO) e da amplitude do bico ultrassônico (AP).

4.8.2.3. Eficiência de encapsulação do processo

Assim como realizado para o *spray drying* do óleo, a eficiência de encapsulação do processo de *spray freeze drying* do óleo também foi avaliada com relação ao óxido de bisabolol A (EE_{OB}). Como pode ser visto na Tabela 37, EE_{OB} referente ao processo de SFDO variou de 24,95 a 53,20%. Estes valores foram menores que aqueles obtidos no SDO. Isso também ocorreu para o extrato e como já dito é uma desvantagem do *spray freeze drying* frente ao *spray drying*, pois a encapsulação de um composto promove várias vantagens, tais como aumento da estabilidade, desenvolvimento de novos sistemas de liberação e redução da perda e degradação de substâncias (CAO-HOANG; FOUGÈRE; WACHÉ, 2011; COUTO et al., 2011; GHARSALLAOUI et al., 2007; MARCATO, 2009; RODRIGUES; GROSSO, 2008).

Os resultados obtidos pelas análises estatísticas de EE_{OB} referente ao processo de SFDO são apresentados na Tabela 40. Os dados presentes nesta tabela mostram que ambos os fatores estudados no processo de *spray freeze drying* do óleo (AP e QO) não influenciaram EE_{OB} deste processo. Como já mencionado, as micropartículas produzidas por *spray freeze drying* são em geral porosas devido a sublimação dos cristais de gelo formados durante o congelamento das gotículas, o que dificulta a encapsulação do ativo (AL-HAKIM; STAPLEY, 2004; CHEOW et al., 2011; DROOGE et al., 2005; NIWA et al., 2009).

Tabela 40 - Análises estatísticas da eficiência de encapsulação do óxido de bisabolol A (EE_{OB}) no processo de SFDO em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.

Variáveis estudadas	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
AP	38,5614	1	38,5614	0,1796	0,700282
AP ²	0,2632	1	0,2632	0,0012	0,974269
QO	0,4559	1	0,4559	0,0021	0,966145
QO ²	0,0330	1	0,0330	0,0002	0,990889
AP x QO	19,0133	1	19,0133	0,0886	0,785451
Erro	644,1890	3	214,7297		

*AP - amplitude do bico ultrassônico. QO - razão entre quitosana e óleo na amostra.

^aSignificante com $p < 0,05$.

4.8.2.4. Teor de óxido de bisabolol A nas micropartículas

O teor de óxido de bisabolol A (θ_{OB}) presente nas micropartículas produzidas por SFDO variou de 71,27 a 92,96% (Tabela 37). A perda do óxido de bisabolol A é consistente com a perda dos marcadores do extrato hidroalcoólico no processo de SFDE, bem como com a perda de ativos apresentada na literatura para o processo de *spray freeze drying* (GAO et al., 2011).

Os valores de θ_{OB} aqui obtidos mostram que a perda de óxido de bisabolol A foi bem menor no processo de SFDO quando comparado ao processo de SDO. Como em altas temperaturas há uma grande volatilização de óleos essenciais e devido ao fato do *spray freeze drying* promover uma pequena perda das substâncias devido a utilização de baixas temperaturas, tal fato era esperado (ALLOUE et al., 2007; CHAN; CHEW, 2003; DROOGE et al., 2005; KENNEDY et al., 2007; LEUENBERGER, 2002; NIWA et al., 2009; SCHIFFTER; CONDLIFFE; VONHOFF, 2010; SCHIFFTER, 2007).

As análises estatísticas realizadas para o teor de óxido de bisabolol A nas micropartículas obtidas pelo processo de SFDO são apresentadas na Tabela 41. Pode ser visto nesta tabela que θ_{OB} neste processo foi significativamente influenciado pelo termo linear da amplitude do bico ultrassônico (AP), pelo termo linear e quadrático da razão entre quitosana e óleo na amostra (QO e QO²) e pela interação destes dois fatores (AP x QO).

Tabela 41 - Análises estatísticas do teor de óxido de bisabolol A (θ_{OB}) nas micropartículas produzidas por SFDO em função dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.

Variáveis estudadas	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
AP	38,4646	1	38,4646	266,5255	0,000500 ^a
AP ²	0,0055	1	0,0055	0,0384	0,857097
QO	415,3164	1	415,3164	2877,7755	0,000014 ^a
QO ²	3,9604	1	3,9604	27,4423	0,013540 ^a
AP x QO	5,9597	1	5,9597	41,2953	0,007638 ^a
Erro	0,4330	3	0,1443		

*AP - amplitude do bico ultrassônico. QO - razão entre quitosana e óleo na amostra.

^aSignificante com $p < 0,05$.

A Equação 36 é o modelo ajustado ($R^2 = 0,999$) obtido pelas análises estatísticas que relaciona o teor de óxido de bisabolol A (θ_{OB}) nas micropartículas obtidas por SFDO com a amplitude do bico ultrassônico (AP) e a razão entre quitosana e óleo na amostra (QO).

$$\theta_{OB}(\%) = 84,88 - 2,53 \left(\frac{AP - 50}{20} \right) + 8,32(QO - 2) - 1,41(QO - 2)^2 + 1,22 \left(\frac{AP - 50}{20} \right) (QO - 2)$$

Equação 36

A Figura 32 mostra a influência de AP e QO sobre θ_{OB} nas micropartículas produzidas por SFDO. A superfície de resposta presente nesta figura mostra que quanto maior QO e menor AP, maior o teor do óxido de bisabolol A. Como já discutido anteriormente, quanto maior o valor de QO, maior a proporção de quitosana na amostra e, portanto, maior a probabilidade de

ocorrer a proteção do óxido de bisabolol A contra possíveis perdas. Com relação à amplitude do bico ultrassônico, a explicação pode estar ligada ao fato de que quanto maior é a amplitude do bico ultrassônico, maior a potência e, portanto maior a probabilidade que processos como cavitação ou o aquecimento da emulsão ocorra, o que pode levar à perda do óxido de bisabolol A (NGUYEN; HERBERGER; BURKE, 2004).

Figura 32 - Gráfico de superfície de resposta do teor de óxido de bisabolol A (θ_{OB}) nas micropartículas obtidas por SFDO em função da amplitude do bico ultrassônico (AP) e da razão entre quitosana e óleo na amostra (QO).

4.9. Otimização dos processos de produção das micropartículas

Os resultados obtidos para as respostas estudadas nos processos de *spray drying* e *spray freeze drying* do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial mostraram que nem todos os melhores valores de cada resposta foram obtidos nas mesmas condições. Dessa forma, para tentar obter, em cada um dos processos, micropartículas com todas as respostas desejadas, foi necessário realizar a otimização dos processos. Os valores ótimos dos fatores estudados nos processos de SDE, SFDE, SDO e SFDO foram determinados a fim de se obter máximo rendimento do processo, mínimo diâmetro médio das micropartículas, máximo teor dos marcadores nas micropartículas e máxima eficiência de encapsulação do processo. A otimização foi realizada pelo método da desejabilidade, pois como já mencionado, esta função matemática é capaz de fornecer as melhores combinações entre os fatores estudados e as respostas desejáveis (COLOMBARI, 2004).

As condições ótimas obtidas para os processos de SDE, SFDE, SDO e SFDO com relação aos fatores estudados em cada um, estão apresentadas na Tabela 42. Os valores codificados dos fatores foram fornecidos pelo *software* Minitab 14.0, enquanto que os valores decodificados (valores reais) foram obtidos de acordo com a Equação 2. Com relação aos

processos de *spray drying*, cabe mencionar que devido às limitações do equipamento de *spray dryer* os experimentos realizados nas condições otimizadas para o extrato e para o óleo foram feitos utilizando temperatura de saída do ar de secagem de 105°C e 70°C, respectivamente.

Tabela 42 - Condições ótimas obtidas para os processos de SDE, SFDE, SDO e SFDO, com relação aos fatores estudados nos planejamentos fatoriais aplicados em cada processo.

Processo	Fator estudado	Valor codificado	Valor decodificado
SDE	Temperatura de saída do ar de secagem (T)	+0,76	105,3°C
	Razão entre quitosana e extrato (QE)	+0,60	2,6
SFDE	Vazão de alimentação da amostra (VA)	-0,92	8,3 mL/min
	Razão entre quitosana e extrato (QE)	+1,00	3,0
SDO	Temperatura de saída do ar de secagem (T)	-0,35	69,8°C
	Razão entre quitosana e óleo (QO)	+1,00	3,0
	Fluxo do ar de secagem (FA)	+1,00	2,0 m ³ /min
SFDO	Amplitude do bico ultrassônico (AP)	+1,00	70,0%
	Razão entre quitosana e óleo (QO)	+0,34	2,3

Com o objetivo de validar os resultados obtidos na otimização dos processos, os mesmos foram realizados nas suas respectivas condições ótimas e, então caracterizados com relação às respostas desejadas. A Tabela 43 e a Tabela 44 mostram, respectivamente, as comparações entre os valores preditos e os valores obtidos nas condições ótimas dos processos de *spray drying* e *spray freeze drying* do extrato e do óleo.

Tabela 43 - Comparação entre os valores preditos e os valores reais obtidos nas condições ótimas dos processos de SDE e SFDE, com relação às respostas avaliadas.

Resposta	SDE		SFDE	
	Valor predito	Valor obtido ^a	Valor predito	Valor obtido ^a
R _e (%)	69,74	64,16 ± 2,58	94,40	92,89 ± 1,51
D ₅₀ (µm)	5,61	5,11 ± 0,47	33,45	30,98 ± 2,86
EE _{Ap} (%)	96,06	98,38 ± 1,23	60,15	58,71 ± 4,01
EE _{ApG} (%)	96,14	95,53 ± 2,01	57,44	59,88 ± 3,56
θ _{Ap} (%)	96,28	97,12 ± 1,27	99,88	99,85 ± 0,37
θ _{ApG} (%)	96,94	96,88 ± 1,43	99,86	98,77 ± 0,94

*R_e - rendimento do processo. D₅₀ - diâmetro médio das micropartículas. EE_{Ap} - eficiência de encapsulação com relação à apigenina. EE_{ApG} - eficiência de encapsulação com relação à apigenina-7-glicosídeo. θ_{Ap} - teor de apigenina nas micropartículas. θ_{ApG} - teor de apigenina-7-glicosídeo nas micropartículas. ^aMédia das triplicatas ± desvio padrão.

Tabela 44 - Comparação entre os valores preditos e os valores reais obtidos nas condições ótimas dos processos de SDO e SFDO, com relação às respostas avaliadas.

Resposta	SDO		SFDO	
	Valor predito	Valor obtido ^a	Valor predito	Valor obtido ^a
R _e (%)	42,99	44,68 ± 1,91	93,07	94,56 ± 0,97
D ₅₀ (µm)	4,63	4,97 ± 0,50	100,99	96,44 ± 3,25
EE _{OB} (%)	80,51	81,03 ± 1,01	41,07	38,88 ± 3,75
θ _{OB} (%)	37,67	35,15 ± 2,35	85,44	87,52 ± 1,68

*R_e - rendimento do processo. D₅₀ - diâmetro médio das micropartículas. EE_{OB} - eficiência de encapsulação com relação ao óxido de bisabolol A. θ_{OB} - teor de óxido de bisabolol A nas micropartículas. ^aMédia das triplicatas ± desvio padrão.

A Tabela 43 e a Tabela 44 mostram que, nos quatro processos estudados, os valores preditos e obtidos de todas as respostas foram próximos entre si. A similaridade entre os valores preditos e obtidos validam a otimização dos processos de SDE, SFDE, SDO e SFDO. Esses resultados novamente mostram que o uso da função desejabilidade para a otimização de processos é prática e eficiente.

4.10. Caracterização dos processos e das micropartículas otimizadas

Os processos de *spray drying* e *spray freeze drying* do extrato e do óleo realizados nas condições otimizadas, bem como as micropartículas neles obtidas foram caracterizados com relação ao rendimento do processo, distribuição granulométrica, teor de marcadores, eficiência de encapsulação, atividade antioxidante *in vitro*, densidade aparente e compactada, Índice de Carr, Fator de Hausner, umidade, morfologia, liberação *in vitro* e estabilidade.

4.10.1. Rendimento dos processos

O rendimento do processo é uma importante resposta a ser estudada, uma vez que indica quanto de matéria prima inicial é necessária para produzir uma determinada quantidade de micropartículas. Nas condições otimizadas, os processos de SDE, SFDE, SDO e SFDO apresentaram rendimento, respectivamente, de 64,16 ± 2,58%, 92,89 ± 1,51%, 44,68 ± 1,91% e 94,56 ± 0,97%. As análises estatísticas realizadas pelo teste t-Student mostraram que houve uma diferença significante entre os rendimentos dos processos de SDE e SFDE ($p = 0,0005$) e entre SDO e SFDO ($p = 0,0006$).

Os maiores rendimentos dos processos de *spray freeze drying* já eram esperados, visto que os resultados obtidos nos estudos dos processos mostraram que os rendimentos de SFDE e SFDO foram maiores que SDE e SDO. O alto rendimento é uma característica do processo de

spray freeze drying e uma de suas vantagens sobre o *spray drying* (KENNEDY et al., 2007; NGUYEN; HERBERGER; BURKE, 2004; SCHIFFTER, 2007). É importante lembrar que os valores de R_e obtidos no SDE e SDO estão em conformidade com a literatura, pois como já discutido é relativamente comum o processo de *spray drying* em escala laboratorial apresentar rendimento abaixo de 50%. (AMERI; MAA, 2006; COSTA-MACHADO, 2011; MARTINS et al., 2013).

Embora o *spray drying* tenha apresentado um menor rendimento que o *spray freeze drying*, o primeiro ainda deve ser considerado, pois em maiores escalas, o rendimento geralmente são maiores. Além disso, o *spray drying* apresenta algumas vantagens sobre o *spray freeze drying*, tais como maior reprodutibilidade, maior facilidade de transposição de escala e, ainda, maior simplicidade e rapidez, uma vez que as micropartículas são obtidas em apenas uma etapa enquanto no *spray freeze drying* são necessárias três (ARAÚJO; TEIXEIRA; FREITAS, 2010; CAL; SOLLOHUB, 2010; CEVHER et al., 2006; COUTO et al., 2011; GELFUSO et al., 2011; NIWA et al., 2009; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; ONEDA; RÉ, 2003; QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011; SCHIFFTER, 2007).

4.10.2. Distribuição granulométrica das micropartículas

As micropartículas produzidas por SDE, SFDE, SDO, e SFDO nas condições otimizadas apresentaram diâmetro médio de $5,11 \pm 0,47 \mu\text{m}$, $30,98 \pm 2,86 \mu\text{m}$, $4,97 \pm 0,50 \mu\text{m}$ e $96,44 \pm 3,25 \mu\text{m}$. Os valores de D_{50} obtidos mostram a boa adequação dos processos de *spray drying* e *spray freeze drying* para a produção de micropartículas de quitosana contendo o extrato e o óleo de *C. recutita*. Tal afirmação pode ser feita, uma vez que as micropartículas aqui produzidas apresentaram diâmetro médio próximos aquelas obtidas em outros estudos onde foram utilizados os mesmos processos (ALHALAWEH; ANDERSSON; VELAGA, 2009; CHEOW et al., 2011; GAO et al., 2011; GELFUSO et al., 2011; KENNEDY et al., 2007; KINI; DIXIT; KULKARNI, 2011; KONDO et al., 2009; PEREIRA et al., 2014; SONNER; MAA; LEE, 2002).

Os diâmetros médios das micropartículas obtidas nos processos de SDE e SFDE, e nos processos de SDO e SFDO foram estatisticamente diferentes pelo teste t-Student, com valores de p , respetivamente, de 0,0042 e 0,0004. O maior diâmetro das micropartículas produzidas por *spray freeze drying* quando comparado ao *spray drying* ocorre uma vez que no primeiro processo as micropartículas produzidas têm o mesmo diâmetro que a microgotículas que são produzidas pelo bico atomizador. No processo de *spray freeze drying*, as microgotículas mantem seu tamanho à medida que ocorre a sublimação dos cristais de gelo, e portanto, não

diminuem após a sublimação do solvente. Por outro lado, durante o processo de *spray drying* as microgotículas atomizadas diminuem de tamanho devido a evaporação do solvente, gerando micropartículas menores que as microgotículas (CHEOW et al., 2011; SONNER; MAA; LEE, 2002). No entanto, embora o processo de *spray drying* possa ser mais vantajoso, uma vez que produziu micropartículas menores que o *spray freeze drying*, ambos os processos foram capazes de produzir micropartículas com diâmetros na ordem de micrômetros, o que é bastante vantajoso para aplicação tópica.

A aplicação tópica de micro e nanopartículas vem cada vez mais ganhado destaque. Já se sabe que formulações tópicas desenvolvidas utilizando sistemas micro e nanoparticulados possuem várias vantagens. Esses sistemas podem ser capazes de proteger, sustentar, promover a absorção e até mesmo, de acordo com alguns autores, carregar os compostos ativos até as camadas mais profundas da pele. Porém, não há um consenso sobre qual seria o melhor tamanho das partículas para a aplicação tópica. Enquanto alguns autores determinam que micropartículas com até 10 μm são capazes de atravessar a pele de forma passiva, seja pela epiderme ou através do folículo piloso, outros autores afirmam que nem mesmo nanopartículas são capazes de atravessar a pele sem uma indução das mesmas, como por exemplo pela iontoforese. Entre os que afirmam que pode ocorrer a penetração das micro ou nanopartículas íntegras, há um consenso de que quanto menor o tamanho das partículas, maior a probabilidade destas atravessarem a pele (BOWEY; NEUFELD, 2010; DE JALÓN et al., 2001; GELFUSO et al., 2011; PITAKSUTTEEPONG; SOMSIRI; WARANUCH, 2007; SHIM et al., 2004; WATKINSON et al., 2013). É importante notar que independente das micropartículas aqui produzidas penetrarem ou não de forma íntegra na pele, formulação tópicas contendo estas micropartículas podem trazer muitos benefícios, como uma liberação mais prolongada do extrato e do óleo de *C. recutita* bem como o aumento da estabilidade da formulação.

A polidispersividade das micropartículas foi determinada pelo valor de *span*, o qual representa uma medida da distribuição de tamanhos das partículas e, portanto quanto menor seu valor, maior a homogeneidade das micropartículas (MARTINS, 2014). Os valores de *span* das micropartículas obtidas nas condições otimizadas foram $2,51 \pm 0,23$ para SDE, $3,00 \pm 0,77$ para SFDE, $2,06 \pm 0,11$ para SDO e $2,23 \pm 0,18$ para SFDO. Estes resultados estão coerentes com os valores de *span* encontrados na literatura para micropartículas produzidas por *spray freeze drying* (KENNEDY et al., 2007; NGUYEN; HERBERGER; BURKE, 2004) e *spray drying* usando a quitosana como carreador (ALHALAWEH; ANDERSSON; VELAGA, 2009; OLIVEIRA; SANTANA; RÉ, 2006; PEREIRA et al., 2014).

As análises estatísticas feitas pelo teste t-Student mostraram que as micropartículas produzidas por *spray drying* e *spray freeze drying*, tanto do extrato quanto do óleo, tiveram distribuições de tamanho (*span*) similares. Porém, no caso do SFDO esperava-se um menor valor do *span* devido a utilização do bico ultrassônico. O uso de um bico ultrassônico visa justamente a homogeneidade e o controle do tamanho das micropartículas. O *span* obtido provavelmente é reflexo da aglomeração das micropartículas, semelhante ao que ocorreu com Nguyen, Herberger e Burke (2004).

4.10.3. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação de um processo é uma característica muito importante na área farmacêutica, uma vez que a encapsulação de um composto traz várias vantagens, tais como aumento da estabilidade, desenvolvimento de novos sistemas de liberação e redução da perda e degradação de substâncias (CAO-HOANG; FOUGÈRE; WACHÉ, 2011; GHARSALLAOUI et al., 2007; MARCATO, 2009; RODRIGUES; GROSSO, 2008). Outra vantagem é o fato da microencapsulação produzir micropartículas que podem ser industrialmente utilizadas como um produto farmacêutico final com diferentes aplicações terapêuticas, ou como um produto intermediário para formulações farmacêuticas e cosméticas (COUTO et al., 2011). No entanto, não é simples obter uma alta eficiência de encapsulação, pois esta é influenciada por vários fatores, tais como o processo utilizado e seus parâmetros, a homogeneidade da amostra, e a natureza e a proporção do material encapsulante e encapsulado (MARTINS; SIQUEIRA; FREITAS, 2012; ONEDA; RÉ, 2003).

Nas condições otimizadas, o processo de *spray drying* apresentou alta eficiência de encapsulação com relação aos marcadores do extrato e do óleo, uma vez que os valores da EE_{Ap} e da EE_{ApG} obtidos no processo de SDE foram, respectivamente, $98,38 \pm 1,23\%$, $95,53 \pm 2,01\%$ e o valor da EE_{OB} obtido pelo processo de SDO foi $81,03 \pm 1,01\%$. Estes valores são similares aos valores de eficiência de encapsulação obtidos nos processos de *spray drying* de diferentes substâncias usando a quitosana como carreador (HARRIS et al., 2011; KOSARAJU; D'ATH; LAWRENCE, 2006; LI et al., 2013; O'TOOLE et al., 2012). Os altos valores de EE_{Ap} , EE_{ApG} e EE_{OB} mostram que a grande maioria de apigenina e apigenina-7-glicosídeo presentes no extrato, e de óxido de bisabolol A presente no óleo, foram encapsulados na matriz de quitosana, o que é muito vantajoso visto os diversos benefícios que a encapsulação apresenta. Além disso, a alta eficiência de encapsulação obtida nos processos de SDE e SDO mostraram a grande adequação do *spray drying* para a microencapsulação do extrato e do óleo essencial de *C. recutita*.

Quando realizados nas condições otimizadas, o processo de SFDE apresentou EE_{Ap} e EE_{ApG} de $58,71 \pm 4,01\%$ e $59,88 \pm 3,56\%$, respectivamente, ao passo que o processo de SFDO apresentou EE_{OB} de $38,88 \pm 3,75\%$. Estes valores mostram que quando comparado ao *spray drying*, os processos de *spray freeze drying* do extrato e do óleo apresentaram uma eficiência de encapsulação bem menor. As análises estatísticas realizadas pelo teste t-Student mostraram uma diferença significativa entre a eficiência de encapsulação dos processos de SDO e SFDO com relação à EE_{OB} ($p = 0,0028$), bem como entre os processos de SDE e SFDE com relação à EE_{Ap} ($p=0,0037$) e à EE_{ApG} ($p=0,0006$). Isso é uma grande desvantagem para o *spray freeze drying*, pois como já mencionado, a encapsulação de um ativo promove inúmeras vantagens (CAO-HOANG; FOUGÈRE; WACHÉ, 2011; COUTO et al., 2011; GHARSALLAOUI et al., 2007; MARCATO, 2009; RODRIGUES; GROSSO, 2008).

A explicação para a diferença entre os valores de EE_{Ap} , EE_{ApG} e EE_{OB} obtidos nos processos de *spray drying* e *spray freeze drying* do extrato e do óleo está relacionada com a estrutura das micropartículas formadas em cada um deles (ASCHERI; MARQUEZ; MARTUCCI, 2003). Enquanto o *spray drying* produziu micropartículas com paredes íntegras (Figura 33 e Figura 34), que separam bem o conteúdo de marcadores presentes dentro e fora, o *spray freeze drying* originou micropartículas porosas com sulcos e fissuras (Figura 35 e Figura 36).

4.10.4. Teor dos marcadores

As micropartículas produzidas por SDE nas condições otimizadas apresentaram θ_{Ap} e θ_{ApG} de $97,12 \pm 1,27\%$ e $96,88 \pm 1,43\%$, respectivamente. Estes valores mostram que houve uma pequena perda tanto de apigenina quanto apigenina-7-glicosídeo durante o processo de *spray drying* do extrato. Já com relação ao processo de *spray drying* do óleo a perda do marcador foi bem maior, visto que as micropartículas obtidas por SDO nas condições otimizadas apresentaram θ_{OB} de $35,15 \pm 2,35\%$. Embora a perda de óxido de bisabolol A tenha sido grande no processo de SDO, tal fato está de acordo com a literatura, visto que no trabalho de Li et al. (2013) o processo de *spray drying* para a produção de micropartículas de quitosana contendo o óleo essencial de laranja também promoveu uma grande perda do óleo. O menor valor de θ_{OB} quando comparado aos valores de θ_{Ap} e θ_{ApG} ocorre pelo fato do óleo essencial ser muito mais sensível a temperatura que o extrato hidroalcoólico, o que culmina com uma maior perda de óleo que de extrato.

As micropartículas produzidas por SFDE nas condições otimizadas apresentaram, respectivamente, θ_{Ap} e θ_{ApG} de $99,85 \pm 0,37\%$ e $98,77 \pm 0,94\%$, ao passo que as obtidas nas

condições otimizadas do SFDO apresentaram θ_{OB} de $87,52 \pm 1,68\%$. Os teores são coerentes com resultados publicados onde a técnica de *spray freeze drying* também foi utilizada (GAO et al., 2011).

De acordo com as análises estatísticas realizadas pelo teste t-Student, enquanto houve uma diferença significativa do θ_{OB} nas micropartículas produzidas por SDO e SFDO ($p < 0,0001$), nos processos de SDE e SFDE não houve uma diferença significativa do θ_{Ap} nem do θ_{ApG} . Estes resultados mostram que as perdas dos marcadores do extrato foram iguais em ambos os processos estudados (SDE e SFDE), ao passo que, para o óleo, a perda de seu marcador foi menor durante o processo de *spray freeze drying* quando comparado ao processo de *spray drying*.

Embora no processo de *spray drying* o composto seja exposto à altas temperaturas por um curto período de tempo, essa exposição é capaz de promover uma perda maior de óleo que de extrato, devido a maior suscetibilidade dos óleos essenciais à temperatura (FREITAS et al., 2010; LI et al., 2013; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Cabe citar também que o maior valor de θ_{OB} nas micropartículas produzidas por SFDO quando comparada àquelas obtidas por SDO é explicado pelo fato da temperatura baixa, utilizada no processo de *spray freeze drying*, promover uma menor perda de óleo que a temperatura alta, usada no processo de *spray drying* (SCHIFFTER, 2007). Como o objetivo é que se tenha um alto teor dos marcadores nas micropartículas, no caso do óleo, o *spray freeze drying* se mostrou mais vantajoso para esta aplicação.

4.10.5. Atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante *in vitro* das micropartículas também foi realizada pelo método do radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH). Como já descrito, este método foi selecionado devido ao fato de ser um dos mais utilizados para a avaliação da atividade antioxidante de derivados vegetais e compostos isolados, e também devido às suas vantagens, tais como rapidez, sensibilidade e uso de pequena quantidade de amostra. Além disso, esse método permite analisar tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas (ABDOUL-LATIF et al., 2011; KULISIC et al., 2004; TACON, 2012).

A atividade antioxidante *in vitro* das micropartículas obtidas nas condições otimizadas do SDE, SFDE, SDO e SFDO foi determinada, a fim de verificar se as atividades antioxidantes do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial foram influenciadas pelos processos de *spray drying* e *spray freeze drying*. Os valores de IC_{50} obtidos para as micropartículas produzidas por SDE e SFDE nas condições otimizadas foram, respectivamente, $18,75 \pm 1,07 \mu\text{g/mL}$ e $19,53 \pm$

1,12 $\mu\text{g/mL}$, ao passo que as micropartículas obtidas por SDO e SFDO nas condições otimizadas apresentaram IC_{50} de $63,65 \pm 1,22 \mu\text{g/mL}$ e $54,82 \pm 1,01 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. O extrato hidroalcoólico e o óleo essencial utilizados nos processos de *spray drying* e *spray freeze drying* também foram avaliados com relação à atividade antioxidante, apresentando IC_{50} de $18,19 \pm 0,96 \mu\text{g/mL}$ e $40,55 \pm 1,42 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

As análises estatísticas realizadas por ANOVA, seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni mostraram que não houve diferença significativa entre os valores de IC_{50} das micropartículas produzidas por SDE, SFDE e do extrato hidroalcoólico. Isso demonstra que de acordo com a metodologia escolhida, os processos de *spray drying* e *spray freeze drying* não influenciaram a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico. O mesmo não ocorreu para o óleo essencial, visto que neste houve uma diminuição mensurável da atividade antioxidante, com o consequente aumento dos valores de IC_{50} para as micropartículas. Tal fato pode ser afirmado, uma vez que valores de IC_{50} das micropartículas obtidas por SDO, SFDO e do óleo puro foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni, com $p < 0,05$.

O aumento dos valores de IC_{50} para as micropartículas produzidas por SDO e por SFDO pode ser entendido, em parte, como consequência da perda do óleo durante o processo de produção. Pode ser visto que para o marcador escolhido, óxido de bisabolol A, houve uma relação entre seu teor nas micropartículas e o aumento do valor de IC_{50} . As micropartículas produzidas por SDO tiveram um menor teor de óxido de bisabolol A e um maior aumento de IC_{50} do que as produzidas por SFDO.

4.10.6. Densidade das micropartículas

A densidade pode ser influenciada por vários fatores, como por exemplo características dos materiais utilizados, tamanho, distribuição granulométrica, aglomeração, área superficial, morfologia, umidade e higroscopicidade das partículas (ABDULLAH; GELDART, 1999; GANESAN; ROSENTRATER; MUTHUKUMARAPPAN, 2008; WALTON, 2000). As densidades das micropartículas foram avaliadas por meio da densidade aparente e densidade compactada das mesmas.

As micropartículas produzidas nas condições otimizadas dos processos de *spray drying* apresentaram densidade aparente de $0,216 \pm 0,008 \text{ g/mL}$ (SDE) e $0,314 \pm 0,003 \text{ g/mL}$ (SDO), e densidade compactada de $0,297 \pm 0,011 \text{ g/mL}$ (SDE) e $0,451 \pm 0,020 \text{ g/mL}$ (SDO). Já as micropartículas obtidas por *spray freeze drying* nas condições otimizadas tiveram densidade aparente de $0,021 \pm 0,005 \text{ g/mL}$ (SFDE) e $0,034 \pm 0,002 \text{ g/mL}$ (SFDO) e densidade compactada

de $0,035 \pm 0,009$ g/mL (SFDE) e $0,057 \pm 0,003$ g/mL (SFDO). Tais valores estão coerentes com a literatura (AL-HAKIM; STAPLEY, 2004; CHEOW et al., 2011; DROOGE et al., 2005; NIWA et al., 2009).

As comparações, feitas usando o teste t-Student, entre os valores de densidades das micropartículas obtidas por SDE e SFDE, e entre as densidades das micropartículas produzidas por SDO e SFDO, mostraram que as densidades foram significativamente maiores ($p < 0,0001$) para as micropartículas produzidas por *spray drying*, tanto para o extrato quanto para o óleo. Tal fato está de acordo com a literatura, e ocorre porque enquanto o *spray drying* frequentemente produz micropartículas íntegras, o *spray freeze drying* gera micropartículas porosas como pode ser visto no item 4.10.9 (AL-HAKIM; STAPLEY, 2004; CHEOW et al., 2011; DROOGE et al., 2005; NIWA et al., 2009).

Para as indústrias farmacêuticas é mais interessante que os pós apresentem altos valores de densidade, pois assim, ocupam menor volume no armazenamento e transporte (COUTO et al., 2011; GANESAN; ROSENTRATER; MUTHUKUMARAPPAN, 2008). Diante disso, pode ser visto que com relação a esta característica, o processo de *spray drying* foi mais vantajoso que o processo de *spray freeze drying* para a produção das micropartículas contendo o extrato e o óleo essencial de *C. recutita*.

4.10.7. Índice de Carr e Fator de Hausner das micropartículas

O IC e o FH foram utilizados no presente trabalho para estudar as propriedades de fluxo das micropartículas obtidas por SDE, SFDE, SDO e SFDO nas condições otimizadas. O IC e o FH são métodos simples e rápidos para a análise das características de fluxo dos pós e são, geralmente, utilizadas para correlacionar as propriedades de compactação e escoabilidade dos mesmos (AULTON, 2001; USP 30, 2007). Os valores de IC obtidos para as micropartículas produzidas por SDE, SFDE, SDO e SFDO nas condições otimizadas foram, respectivamente, $27,34 \pm 1,39\%$, $37,10 \pm 2,37\%$, $30,31 \pm 2,63\%$ e $39,43 \pm 2,26\%$. Já os valores de FH obtidos para as micropartículas produzidas por *spray drying* e *spray freeze drying* do extrato e do óleo foram $1,38 \pm 0,03$ (SDE), $1,59 \pm 0,06$ (SFDE), $1,44 \pm 0,06$ (SDO) e $1,65 \pm 0,06$ (SFDO). Tais valores mostram que as propriedades de fluxo das micropartículas obtidos no presente trabalho foram ruins, indicando uma alta compressibilidade e uma pequena capacidade de fluxo livre das micropartículas (QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011; USP 30, 2007). Nos trabalhos de Costa-Machado (2011), Tacon (2012) e Quispe-Condori, Saldaña e Temelli (2011), onde o processo de *spray drying* também foi usado para produzir micropartículas de extratos de plantas, as propriedades de fluxo também foram ruins. O processo de *spray freeze*

drying usado por Cheow et al. (2011) e Schiffter, Condliffe e Vonhoff (2010) também produziu micropartículas com propriedades de fluxo ruim.

As análises estatísticas realizadas usando o teste t-Student demonstraram uma diferença significativa entre o IC ($p = 0,0086$) e FH ($p = 0,0290$) obtidos nos processos de SDE e SFDE, bem como entre o IC ($p = 0,0198$) e FH ($p = 0,0203$) obtidos nos processos de SDO e SFDO. Os maiores valores de IC e FH obtidos nos processos de *spray freeze drying*, tanto do óleo quanto do extrato, em comparação com o *spray drying*, mostram que as propriedades de fluxo das micropartículas produzidas por *spray freeze drying* foram piores que as obtidas por *spray drying*. Tal fato é coerente com as morfologias das micropartículas obtidas nestes dois processos. Pode ser visto na Figura 33, Figura 34, Figura 35 e Figura 36 que enquanto as micropartículas produzidas por SDE e SDO foram esféricas, as produzidas por SFDE e SFDO, apesar de algumas tenderem a forma esférica, a maioria teve um formato irregular, o que contribui para um fluxo ruim.

4.10.8. Umidade das micropartículas

A umidade de um produto seco pode ser considerada um indicativo da eficiência do processo de secagem. Além disso a umidade está relacionada com a estabilidade química e microbiológica do produto seco, bem como com as propriedades físicas como compactação, fluidez, densidade, aglomeração e distribuição de tamanho das partículas presentes no produto seco (COUTO et al., 2011).

A umidade das micropartículas produzidas nas condições ótimas dos processos de SDE e SDO foram, respectivamente, $3,28 \pm 0,18 \%$ e $5,69 \pm 0,15 \%$. Tais valores estão de acordo com a literatura onde valores de até 7% de umidade são considerados adequados para o processo de *spray drying* de derivados vegetais (COUTO et al., 2011; TACON, 2012). As micropartículas obtidas pelos processos de SFDE e SFDO nas condições otimizadas, apresentaram umidade de $1,09 \pm 0,09 \%$ e $4,85 \pm 0,23 \%$, respectivamente. Estes resultados estão coerentes com resultados obtidos em outros trabalhos que produziram micropartículas por *spray freeze drying* (AL-HAKIM; STAPLEY, 2004; MUMENTHALER; LEUENBERGER, 1991).

Os resultados obtidos pelo teste t-Student mostraram que a umidade das micropartículas produzidas por *spray freeze drying* foram significativamente menores que aquelas produzidas por *spray drying*, tanto para o extrato ($p = 0,0030$), quanto para o óleo ($p = 0,0125$). Isso mostra que o processo de *spray freeze drying* é capaz de retirar de forma mais eficiente o solvente, o que pode ser vantajoso já que uma menor umidade pode reduzir o risco de contaminação

microbiológica e aumentar a estabilidade do composto (COSTA-MACHADO, 2011; COUTO et al., 2011).

4.10.9. Morfologia das micropartículas

As micrografias das micropartículas produzidas nas condições otimizadas dos processos de SDE, SDO, SFDE e SFDO estão apresentadas, respectivamente, na Figura 33, Figura 34, Figura 35 e Figura 36. Para possibilitar uma comparação, também foram analisadas as morfologias da mistura liofilizada de quitosana e extrato, e da mistura liofilizada de quitosana e óleo como, apresentadas na Figura 37e Figura 38 respectivamente.

Figura 33 - MEV das micropartículas obtidas por SDE nas condições otimizadas.

A Figura 33e a Figura 34, mostram que as micropartículas obtidas por *spray drying* do extrato e do óleo, nas condições otimizadas, foram esféricas. No caso do SDE, as micropartículas apresentaram superfícies lisas, sem poros, sulcos ou fissuras. As micropartículas produzidas por SDO não apresentaram superfícies completamente lisas e algumas micropartículas apresentaram um aspecto rugoso. Embora algumas micropartículas do SDE e SDO tenham se aglomerado umas às outras, elas são facilmente delineadas e é possível identificar claramente micropartículas individuais. Isso indica que os aglomerados foram

formados após a completa secagem de cada micropartícula (COSTA-MACHADO, 2011). A morfologia das micropartículas obtidas por SDE e SDO foi similar à morfologia de micropartículas de quitosana, contendo diferentes componentes, produzidas por *spray drying* (ALHALAWEH; ANDERSSON; VELAGA, 2009; GELFUSO et al., 2011; KOSARAJU; D'ATH; LAWRENCE, 2006).

Figura 34 - MEV das micropartículas obtidas por SDO nas condições otimizadas.

As micrografias das micropartículas produzidas por *spray freeze drying* do extrato (Figura 35) e do óleo (Figura 36) foram similares aquelas obtidas por Niwa et al. (2009), onde micropartículas poliméricas contendo fenitoína foram produzidas por *spray freeze drying*. Estas micrografias mostram que as micropartículas produzidas por SFDE e SFDO apresentaram formato irregular, sendo algumas arredondadas e outras pontiagudas. Isto pode ter ocorrido devido à falta de tempo para a microencapsulação das frações de *C. recutita* pela quitosana antes do congelamento por nitrogênio, e/ou devido ao descongelamento de algumas microgotículas durante a etapa de liofilização do processo de *spray freeze drying*. O descongelamento das microgotículas durante a etapa de liofilização pode ocorrer, uma vez que nesta etapa não é possível manter uma temperatura tão baixa como a do nitrogênio líquido, onde as microgotículas foram congeladas (KENNEDY et al., 2007).

Figura 35 - MEV das micropartículas obtidas por SFDE nas condições otimizadas.

Figura 36 - MEV das micropartículas obtidas por SFDO nas condições otimizadas.

Na Figura 35 e na Figura 36 é possível observar também que as superfícies das micropartículas não são lisas e apresentam poros, sulcos e fissuras, ao contrário das micropartículas obtidas no processo de *spray drying* do extrato e do óleo. Tal fato explica a menor eficiência de encapsulação das micropartículas produzidas por SFDE e SFDO quando comparado com aquelas produzidas por SDE e SDO. A porosidade das micropartículas obtidas no processo de *spray freeze drying* é devido à sublimação do solvente na etapa da liofilização, o que gera poros onde previamente haviam cristais de gelo (AL-HAKIM; STAPLEY, 2004; CHEOW et al., 2011; DROOGE et al., 2005; NIWA et al., 2009).

A Figura 37 e a Figura 38 mostram os materiais liofilizados referentes, respectivamente, à mistura de quitosana e extrato hidroalcoólico e à mistura de quitosana e óleo essencial. Estas figuras mostram que as partículas provenientes da liofilização são grandes e irregulares, em formatos pontiagudos. Além disso, é possível observar que as partículas liofilizadas, assim como aquelas provenientes do *spray freeze drying*, são porosas devido à sublimação do solvente.

Figura 37 - MEV do material liofilizado referente à mistura de quitosana e extrato hidroalcoólico.

Figura 38 - MEV do material liofilizado referente à mistura de quitosana e óleo essencial.

4.10.10. Liberação *in vitro* das frações de *C. recutita* a partir das micropartículas

A caracterização do perfil de liberação das frações de *C. recutita* pelas micropartículas foi realizado a fim de determinar se as micropartículas apresentavam modificações no perfil de liberação em relação ao material liofilizado. Além disso, objetivou-se comparar como as micropartículas obtidas nos processos otimizados de SDE, SFDE, SDO e SFDO liberavam o extrato e o óleo de *C. recutita* nelas presentes.

O objetivo do ensaio de liberação *in vitro* realizado neste trabalho não foi mimetizar as condições fisiológicas de liberação tópica. No entanto, como as micropartículas podem ser comercializadas como produto final, sua caracterização *in vitro* também é importante. Essa caracterização permite determinar um padrão para caracterização das mesmas como matéria prima para outras formulações ou como produto final.

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados usando como marcadores a apigenina-7-glicosídeo e o óxido de bisabolol A, respectivamente, para amostras contendo o extrato e o óleo. Foram caracterizadas micropartículas produzidas por SDE, SFDE, SDO e SFDO, o extrato hidroalcoólico liofilizado, a mistura liofilizada de quitosana e extrato hidroalcoólico e a mistura liofilizada de quitosana e óleo. Os resultados obtidos no estudo de liberação *in vitro* referentes às amostras contendo o extrato são apresentados na Figura 39 e os resultados referentes às amostras contendo o óleo são apresentados na Figura 40.

Figura 39 - Perfis de liberação *in vitro* da apigenina-7-glicosídeo pelo extrato hidroalcoólico liofilizado (EXT), mistura liofilizada de quitosana e extrato (MLQE), micropartículas obtidas por *spray freeze drying* do extrato (MSFDE) e micropartículas obtidas por *spray drying* do extrato (MSDE).

Como pode ser visto na Figura 39 e Figura 40, as micropartículas, em todos os casos, apresentaram uma liberação mais lenta e sustentada. O extrato liofilizado liberou mais de 90% do marcador em 5 horas. A mistura liofilizada de extrato e quitosana teve uma diminuição, mas

ainda assim liberou 60% do teor do marcador no mesmo tempo. No caso das micropartículas, o processo de *spray drying* se mostrou mais eficaz na sustentação da liberação (Figura 39). Isso era esperado uma vez que as micropartículas produzidas por SDE obtiveram uma melhor eficiência de encapsulação.

Figura 40 - Perfis de liberação *in vitro* do óxido de bisabolol A pela mistura liofilizada de quitosana e óleo (MLQO), micropartículas obtidas por *spray freeze drying* do óleo (MSFDO) e micropartículas obtidas por *spray drying* do óleo (MSDO).

Como não é possível liofilizar somente o óleo essencial, apenas a mistura liofilizada de óleo e quitosana foi utilizada como controle para as micropartículas obtidas por SDO e SFDO. Assim como aconteceu para as micropartículas contendo o extrato, as micropartículas produzidas por SDO e SFDO também apresentam uma liberação mais lenta que a mistura liofilizada de óleo e quitosana. A liberação das micropartículas produzidas por SDO foi a mais lenta (Figura 40). Como as micropartículas produzidas por SFDO tiveram uma menor eficiência de encapsulação, é de se esperar que a taxa de liberação seja maior também.

Os resultados aqui obtidos estão coerentes com outros trabalhos onde micropartículas de quitosana contendo diferentes ativos também promoveram uma liberação sustentada do ativo (GELFUSO et al., 2011; HARRIS et al., 2011). Na presença de água, a quitosana forma uma camada de gel ao seu redor. Dessa forma, para que o ativo seja liberado o mesmo deve se solubilizar na água e atravessar essa camada de gel, o que retarda sua liberação (GELFUSO et al., 2011; OLIVEIRA; SANTANA; RÉ, 2006).

4.10.11. Estabilidade das micropartículas

Este estudo foi realizado para verificar a estabilidade das micropartículas obtidas por SDE, SFDE, SDO e SFDO nas condições otimizadas, bem como comparar os processos de *spray drying* e *spray freeze drying* na capacidade de retenção dos marcadores do extrato e do

óleo de *C. recutita*. A estabilidade do extrato liofilizado, do óleo essencial, da mistura liofilizada de quitosana e extrato hidroalcoólico, e da mistura liofilizada de quitosana e óleo essencial também foi avaliada para fins comparativos. Para o estudo, as amostras foram mantidas a 75% de umidade, por noventa dias, em duas temperaturas, 25°C e 40°C. A estabilidade foi avaliada usando como marcadores a apigenina (Figura 41) e a apigenina-7-glicosídeo (Figura 42) para as amostras contendo o extrato, e o óxido de bisabolol A para as amostras contendo o óleo (Figura 43).

Figura 41 - Retenção da apigenina pelas micropartículas obtidas por *spray drying* do extrato (MSDE), micropartículas obtidas por *spray freeze drying* do extrato (MSFDE), mistura liofilizada de quitosana e extrato (MLQE) e extrato hidroalcoólico liofilizado (EXT) nas temperaturas de 25°C e 40°C.

Figura 42 - Retenção da apigenina-7-glicosídeo pelas micropartículas obtidas por *spray drying* do extrato (MSDE), micropartículas obtidas por *spray freeze drying* do extrato (MSFDE), mistura liofilizada de quitosana e extrato (MLQE) e extrato hidroalcoólico liofilizado (EXT) nas temperaturas de 25°C e 40°C.

Figura 43 - Retenção do óxido de bisabolol A pelas micropartículas obtidas por *spray drying* do óleo (MSDO), micropartículas obtidas por *spray freeze drying* do óleo (MSFDO), mistura liofilizada de quitosana e óleo (MLQO) e óleo puro (OP) nas temperaturas de 25°C e 40°C.

Os valores de retenção dos marcadores ao final de 90 dias foram comparados estatisticamente por ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni. Os resultados dessa análise mostraram que a 25°C não houve uma diferença significativa no teor de apigenina para as amostras produzidas por SDE e SFDE. Também não houve diferença significativa entre os teores das micropartículas produzidas por SFDE e da mistura liofilizada. As micropartículas produzidas por SDE apresentaram teor de apigenina superior aos da mistura liofilizada de extrato hidroalcoólico e do extrato puro.

Já a 40°C, as micropartículas produzidas por SDE apresentaram o maior teor de apigenina. As micropartículas produzidas por SFDE apresentaram teor superior tanto ao da mistura liofilizada como do extrato puro. Dessa maneira, os resultados apresentados na Figura 41 mostram que o processo de *spray drying* foi a melhor alternativa para aumento da estabilidade quando a apigenina é considerada.

Considerando o segundo marcador, a apigenina-7-glicosídeo, as análises estatísticas mostraram que todas as diferenças de teor final apresentadas na Figura 42 foram significantes. Assim, novamente o processo de *spray drying* se mostrou a melhor alternativa para aumento da estabilidade, dessa vez tanto a 25°C como 40°C. As micropartículas produzidas por SFDE também apresentaram bons resultados, retendo mais que 76% do teor de apigenina-7-glicosídeo após 90 dias. É interessante também notar a grande variação entre os resultados para a mistura liofilizada a 25°C e a 40°C. Enquanto no primeiro caso a mistura se mostrou bastante superior ao extrato puro, a presença da quitosana teve um efeito muito menor a 40°C.

Os teores de óxido de bisabolol A para as micropartículas produzidas por SDO, SFDO bem como da mistura liofilizada de quitosana e óleo essencial e do óleo essencial puro são apresentados na Figura 43. Os resultados das análises estatísticas mostram que apenas os teores

da mistura liofilizada e do óleo essencial puro não foram significativamente diferentes, tanto a 25°C como a 40°C. Isto é, a adição de quitosana seguida de liofilização não é suficiente para aumentar a estabilidade do óleo. Por se tratar de um produto mais volátil, esse resultado é esperado.

O processo de *spray drying* também se mostrou mais vantajoso para o óleo. Os teores finais com esse processo ficaram em cerca de 82% e 71% para 25°C e 40°C, respectivamente. O perfil das micropartículas produzidas por SFDO, embora tenham apresentado teores finais menores (54% e 40%, respectivamente) ainda apresentaram resultados bem superiores ao do óleo essencial puro e da mistura liofilizada de óleo essencial e quitosana.

4.10.12. Estudos preliminares de permeação cutânea *in vitro*

Estudos preliminares de permeação *in vitro* usando orelhas de porco foram realizados, a fim de verificar se as micropartículas obtidas por SDE nas condições otimizadas influenciavam na permeação e retenção cutânea da apigenina e apigenina-7-glicosídeo presentes no extrato de *C. recutita*. Para comparação, a permeação e retenção cutânea de ambos os flavonóides, a partir do extrato hidroalcoólico liofilizado de *C. recutita* também foi avaliada. Para a realização dos ensaios, as micropartículas e o extrato liofilizado foram incorporados em uma mistura de silicones (DC 9040 e DC 245), a qual serviu apenas como veículo. Os resultados destes ensaios são mostrados na Tabela 45.

Tabela 45 - Quantidade de apigenina e apigenina-7-glicosídeo presentes no estrato córneo (EC) e na epiderme e derme (ED) após ensaio de permeação *in vitro*.

Marcadores	Extrato liofilizado		Micropartículas do SDE	
	EC	ED	EC	ED
Apigenina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	$0,78 \pm 0,10$	$1,70 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,09$
Apigenina-7-glicosídeo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	$9,40 \pm 1,31$	$3,67 \pm 0,53$	$0,79 \pm 0,11$	$0,24 \pm 0,11$

Os dados presentes na Tabela 45 demonstram que quando o extrato liofilizado foi analisado houve uma maior permeação da apigenina que da apigenina-7-glicosídeo. Isto provavelmente está relacionado com a estrutura e a polaridade destes dois flavonóides. A apigenina é menor, o que facilita sua permeação, ao passo que a apigenina-7-glicosídeo, além de ser maior, é mais hidrofílica devido a sua ligação glicosídica, o que dificulta a sua permeação (SILVA et al., 2010).

Como pode ser visto na Tabela 45, a menor quantidade de apigenina e apigenina-7-glicosídeo no EC e na ED, no ensaio com as micropartículas, quando comparada ao ensaio com o extrato liofilizado mostra que as micropartículas foram capazes de sustentar a liberação de ambos os flavonóides. Em concordância com estes resultados, no estudo de permeação *in vitro* realizado por Gelfuso (2009) micropartículas de quitosana contendo minoxidil também foram capazes de sustentar a liberação deste fármaco.

Os resultados obtidos no presente trabalho para os estudos preliminares de permeação cutânea *in vitro* indicam que as micropartículas estejam liberando de forma sustentada os flavonóides na superfície da pele e só então estes estejam permeando o EC. É provável que as micropartículas não estejam permeando a pele de forma íntegra. No entanto, os dados com relação ao perfil de liberação da apigenina e apigenina-7-glicosídeo ainda são inconclusivos. Trabalhos realizados pelo grupo estão sendo feitos nesta área para elucidar a maneira como esta liberação está ocorrendo.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho objetivou o estudo, a otimização e comparação dos processos de *spray drying* e *spray freeze drying* para produção de micropartículas de quitosana contendo óleo essencial ou extrato hidroalcoólico de *C. recutita* visando aplicações tópicas. Primeiramente, diversos estudos foram realizados para determinar condições ótimas de extração para o extrato hidroalcoólico, o melhor carreador a ser utilizado para a produção das micropartículas e metodologias para caracterização das mesmas.

O processo de extração do extrato hidroalcoólico foi estudado para garantir que este apresentasse características desejadas, como alto teor de sólidos, alto teor de flavonóides totais e boa atividade antioxidante. O estudo do processo extrativo por meio de planejamentos fatoriais permitiu identificar os fatores do processo que mais influenciaram nas características do extrato hidroalcoólico e otimizar o processo. A otimização permitiu a produção de extrato hidroalcoólico de *C. recutita* padronizado e com boas características quanto ao teor de sólidos e teor de flavonoides totais, além de boa atividade antioxidante *in vitro*.

Os estudos dos carreadores mostraram que a quitosana foi a melhor escolha. Os demais carreadores estudados, maltodextrina, goma arábica e sorbitol, apresentaram baixos rendimentos e micropartículas vitrificadas. Misturas dos carreadores também não apresentaram resultados melhores que os vistos para quitosana. Além disso, outro fator que influenciou na escolha da quitosana como carreador foi o fato desta apresentar vantajosas propriedades intrínsecas, principalmente para a aplicação tópica.

O uso de planejamentos fatoriais nos processos de *spray drying* e *spray freeze drying* do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial possibilitou identificar e estudar os fatores dos processos que influenciaram nas características das micropartículas bem como direcionar o processo para alcançar as respostas desejadas. A otimização destes processos permitiu, dentro do possível, obter micropartículas com alto rendimento do processo, baixo diâmetro médio, alto teor dos marcadores e alta eficiência de encapsulação.

No processo de *spray drying* para a produção de micropartículas de quitosana contendo o óleo essencial, houve altas perdas de óxido de bisabolol A e baixo rendimento do processo na maioria dos experimentos, mas a otimização obteve bons resultados. Apenas o teor de óxido de bisabolol A ficou distante do valor máximo obtido nos experimentos.

Os resultados obtidos para as micropartículas de quitosana contendo o extrato hidroalcoólico produzidas por *spray drying* foram muito bons. Os diâmetros médios foram pequenos e os teores e as eficiências de encapsulação da apigenina e da apigenina-7-glicosídeo foram altos. Os testes de liberação e permeação *in vitro* indicaram que as micropartículas foram

capazes de sustentar a liberação da apigenina e da apigenina-7-glicosídeo. Além disso, a estabilidade das micropartículas se mostrou muito superior ao extrato puro. Estes resultados, embora não sejam definitivos, são ótimos indicadores de que o uso dessas micropartículas é vantajoso ao uso do extrato puro ou das micropartículas produzidas por *spray freeze drying* para aplicações tópicas.

As micropartículas de quitosana contendo óleo essencial obtidas por *spray drying* também mostraram resultados interessantes. Elas apresentaram diâmetros médios bem menores que as micropartículas produzidas por *spray freeze drying*. O rendimento do processo otimizado também foi bom, principalmente considerando a escala laboratorial usada. Embora o teor de óxido de bisabolol A tenha ficado baixo, cerca de 37%, a eficiência de encapsulação foi alta, e 80% do marcador estava encapsulado. A boa estabilidade das micropartículas produzidas por *spray drying* provavelmente se deve aos altos valores da eficiência de encapsulação. Assim, apesar do baixo teor, as micropartículas contendo óleo essencial produzidas por *spray drying* são interessantes, visto que apresentam maior estabilidade, liberação *in vitro* sustentada e menor diâmetro médio.

A otimização usando a função desejabilidade também se mostrou adequada para o processo de *spray freeze drying*. Tanto para o extrato hidroalcoólico quanto para o óleo, a maior parte das respostas otimizadas ficou próxima dos valores máximos obtidos nos experimentos. As micropartículas produzidas também apresentaram, em geral, estabilidades superiores aos respectivos extratos puros ou misturados com quitosana. A baixa densidade das micropartículas produzidas por *spray freeze drying* é um fator que pode dificultar sua utilização. A densidade ficou cerca de 10 vezes menor que a das micropartículas produzidas por *spray drying*.

As micropartículas de quitosana contendo o extrato hidroalcoólico produzidas por *spray freeze drying* se mostraram, de maneira clara, menos interessantes que as produzidas por *spray drying*. Embora os teores de marcadores e o rendimento foram próximos, a eficiência de encapsulação foi muito menor usando *spray freeze drying*. Essa diferença se manifestou na maior estabilidade das micropartículas produzidas por *spray drying*. Além disso, a probabilidade da incorporação de micropartículas produzidas por *spray drying* causar instabilidade à formulação é menor, visto que a maior parte do extrato está encapsulada em quitosana.

A comparação entre as micropartículas de quitosana contendo óleo essencial de *C. recutita* produzidas por *spray drying* ou por *spray freeze drying* é mais complexa. De modo geral, em relação ao marcador óxido de bisabolol A, o processo de *spray drying* apresentou baixo teor e alta eficiência de encapsulação enquanto o processo de *spray freeze drying*

apresentou alto teor e baixa eficiência de encapsulação. A baixa eficiência de encapsulação se refletiu na menor estabilidade das micropartículas produzidas por *spray freeze drying*. No entanto, a estabilidade não foi menor o suficiente para descartar o processo. Isso porque, ao final de 90 dias a 40°C, as micropartículas produzidas por *spray drying* e *spray freeze drying* apresentaram teor de óxido de bisabolol A equivalente a 71% e 40% do teor original, respectivamente. Os teores originais eram de 35,2% e 87,5%, respectivamente. Assim, ao final do período de 90 dias as micropartículas continham 25% e 35%, respectivamente, do teor de óxido de bisabolol A originalmente presente no óleo. Ambos são bons resultados tendo em mente que o óleo puro continha menos de 5% do teor original no mesmo período. Mas do ponto de vista da atividade antioxidante, as micropartículas produzidas por *spray freeze drying* são mais interessantes, pois possuem maior teor de óxido de bisabolol A depois do período de estocagem, e os resultados de IC₅₀ medidos já mostraram que quanto maior o teor, menor o valor de IC₅₀. Portanto, descartando alguma instabilidade causada pelo óleo não encapsulado na formulação, as micropartículas produzidas por *spray freeze drying* são uma boa alternativa.

O foco do presente trabalho foi nos processos de produção das micropartículas. Assim foram comparados dois processos, o *spray drying* e o *spray freeze drying*, para determinar as vantagens e desvantagens apresentadas por cada processo no que tange a seu uso para produção de micropartículas contendo extratos vegetais. Nesse sentido, a escolha do óleo essencial e do extrato hidroalcoólico da *C. recutita* foi interessante primeiro por serem extratos de uma planta medicinal muito cultivada e utilizada no Brasil e no mundo e segundo por terem características muito diferentes. Foi possível ver claramente, por exemplo, que o alto rendimento é uma característica do processo de *spray freeze drying*, pois não variou com a adição do óleo ou do extrato à quitosana. O mesmo não pode se dizer do processo de *spray drying*, onde o rendimento depende além, das condições do processo, do tipo de extrato utilizado. Foi possível verificar também que o *spray drying* não foi uma boa alternativa para extratos muito voláteis. Embora o *spray freeze drying* possa ser usado nesses casos, aparenta ser característica do processo gerar micropartículas porosas, dificultando a encapsulação do ativo. Nesse sentido talvez seja interessante explorar outros processos, para trabalhar com extratos muito voláteis.

Como consequência do foco no processo, não foi objetivo do presente trabalho o desenvolvimento de uma formulação contendo as micropartículas produzidas. Como as micropartículas podem ser comercializadas como produto final, sua caracterização ainda é de interesse. Todas as micropartículas produzidas foram capazes de aumentar a estabilidade dos extratos e sustentar sua liberação. Portanto, dados os resultados aqui obtidos, fica claro que o

estudo nesse sentido é interessante, principalmente para as micropartículas contendo o extrato hidroalcoólico da *C. recutita* produzidas por *spray drying*.

O processo de *spray drying* é antigo e amplamente adotado em diversas indústrias. Trata-se, portanto, de uma técnica confiável e de fácil implementação em escala industrial, visto a disponibilidade de equipamentos e mão de obra qualificada. Assim sendo, e levando em conta as vantagens apresentadas pelas micropartículas de quitosana contendo extrato hidroalcoólico da *C. recutita* produzidas por *spray drying* sobre as produzidas por *spray freeze drying*, o processo de *spray drying* se mostrou como a melhor alternativa.

O processo de *spray freeze drying* é ainda relativamente novo na área farmacêutica. Atualmente é mais caro e trabalhoso produzir micropartículas por meio deste processo, principalmente devido ao uso de nitrogênio líquido e vácuo para a liofilização. No entanto, trata-se de um processo ainda em desenvolvimento. Já existem pesquisas estudando alternativas ao uso de nitrogênio líquido e a liofilização à pressão atmosférica. Este avanço pode permitir no futuro uma transposição de escala com custo viável. Portanto, o *spray freeze drying* pode vir a ser um importante processo de fabricação na indústria farmacêutica e cosmética, sendo inclusive uma boa alternativa para produção de micropartículas de quitosana contendo óleo essencial de *C. recutita*.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOUL-LATIF, F. M.; MOHAMED, N.; EDOU, P.; ALI, A. A.; DJAMA, S. O.; OBAME, L. C.; BASSOLÉ, I. H. N.; DICKO, M. H. Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and methanol extract of *Matricaria chamomilla* L. from Djibouti. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 9, p. 1512–1517, 2011.

ABDULLAH, E. C.; GELDART, D. The use of bulk density measurements as flowability indicators. **Powder Technology**, v. 102, n. 2, p. 151–165, 1999.

AL-HAKIM, K.; STAPLEY, A. G. F. Morphology of spray-dried and spray-freeze-dried whey powders. In: 14th International Drying Symposium (IDS 2004), São Paulo, Brazil. **Proceedings Drying 2004**, v. C, p. 1720–1726, 2004.

ALHALAWEH, A.; ANDERSSON, S.; VELAGA, S. P. Preparation of zolmitriptan-chitosan microparticles by spray drying for nasal delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 3, p. 206–14, 2009.

ALLOUE, W. A. M.; DESTAIN, J.; AMIGHI, K.; THONART, P. Storage of yarrowia lipolytica lipase after spray-drying in the presence of additives. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 1357–1361, 2007.

ALVARENGA, E. S. Characterization and properties of chitosan. In: ELNASHAR, M. **Biotechnology of biopolymers**. 1 ed. Croácia: Copyright, 2011. cap. 5, p. 91–108.

AMERI, M.; MAA, Y. F. Spray drying of biopharmaceuticals: stability and process considerations. **Drying Technology**, v. 24, n. 6, p. 763–768, 2006.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN-JR, L. **Farmacotécnica: formas de liberação e sistemas de liberação de fármacos**. 6 ed. São Paulo, Brasil, 2000.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183–198, 2002.

ARAÚJO, R. R.; TEIXEIRA, C. C. C.; FREITAS, L. A. P. The preparation of ternary solid dispersions of an herbal drug via spray drying of liquid feed. **Drying Technology**, v. 28, n. 3, p. 412–421, 2010.

ASCHERI, D. P. R.; MARQUEZ, M. O. M.; MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja: seleção de material de parede. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 1–6, 2003.

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

AVELAR, A. C.; DE SOUZA, C. G. . **Revista Gestão Industrial**, v. 2, n. 2, 2006.

BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1996.

BASTOS, D. S.; GONÇALVES, M. P.; ANDRADE, C. T.; ARAÚJO, K. G. L.; ROCHA LEÃO, M. H. M. Microencapsulation of cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) juice using a new chitosan–commercial bovine whey protein isolate system in spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 4, p. 683–692, 2012.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285–292, 2004.

BIAZÚS, 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.; RISTER, R. S. **The complete german commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines**. 1. ed. Austin, EUA: American Botanical Council, 1998. cap. 1, p. 5–57.

BORSATO, A. V.; DONI-FILHO, L.; CÔCCO, L. C.; PAGLIA, E. C. Rendimento e composição química do óleo essencial da camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] extraído por arraste de vapor d'água, em escala comercial. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 129–136, 2008.

BORSATO, A. V.; DONI-FILHO, L.; RAKOCEVIC, M.; CÔCCO, L. C.; PAGLIA, E. C. Chamomile essential oils extracted from flower heads and recovered water during drying process. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 33, n. 4, p. 500–512, 2009.

BORSATO, A. V.; DONI-FILHO, L.; AHRENS, D. C. Secagem da camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Raeuchert] com cinco vazões específicas do ar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 7, n. 3, p. 65–71, 2005.

BOWEY, K.; NEUFELD, R. J. Systemic and mucosal delivery of drugs within polymeric microparticles produced by spray drying. **BioDrugs**, v. 24, n. 6, p. 359–377, 2010.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for Experimenters: Design, Innovation and Discovery**. 2 ed. New Jersey, USA: John Wiley & Sons Inc., 1978.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 02, de 13 de maio de 2014. **Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado e Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado**. Brasília, DF, 2014.

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

BUTTINI, F.; COLOMBO, P.; WENGER, M. P. E.; MESQUIDA, P.; MARRIOTT, C.; JONES, S. A. Back to basics: the development of a simple, homogenous, two-component dry-powder inhaler formulation for the delivery of budesonide using miscible vinyl polymers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 3, p. 1257–1267, 2008.

CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray drying technique I: Hardware and process parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 575–86, 2010.

CAO-HOANG, L.; FOUGÈRE, R.; WACHÉ, Y. Increase in stability and change in supramolecular structure of β -carotene through encapsulation into polylactic acid nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 42–49, 2011.

CEVHER, E.; ORHAN, Z.; MÜLAZIMOĞLU, L.; ŞENSOY, D.; ALPER, M.; YILDIZ, A.; ÖZSOY, Y. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 317, n. 2, p. 127–35, 2006.

CHAKRABORTY, B.; COLLINS, L. M.; STRECHER, V. J.; MURPHY, S. A. Developing multicomponent interventions using fractional factorial designs. **Statistics in medicine**, v. 28, n. 21, p. 2687–2708, 2009.

CHAMBI, H. N. M.; ALVIM, I. D.; BARRERA-ARELLANO, D.; GROSSO, C. R. F. Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular mass: Production, characterisation and release profiles. **Food Research International**, v. 41, n. 3, p. 229–236, 2008.

CHAN, H. K.; CHEW, N. Y. K. Novel alternative methods for the delivery of drugs for the treatment of asthma. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 7, p. 793–805, 2003.

CHATTOPADHYAY, P.; GUPTA, R. B. Protein nanoparticles formation by supercritical antisolvent with enhanced mass transfer. **AIChE Journal**, v. 48, n. 2, p. 235–244, 2002.

CHEOW, W. S.; NG, M. L. L.; KHO, K.; HADINOTO, K. Spray-freeze-drying production of thermally sensitive polymeric nanoparticle aggregates for inhaled drug delivery: effect of freeze-drying adjuvants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 289–300, 2011.

COLOMBARI, R. R. **Aplicação de delineamento de experimentos para o processo de solda à projeção**. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2004.

CORREIA, C. C. **Padronização e otimização das condições de extração de *Peumus boldus***. 2006. 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

CORRIGAN, D. O.; HEALY, A. M.; CORRIGAN, O. I. Preparation and release of salbutamol from chitosan and chitosan co-spray dried compacts and multiparticulates. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, n. 3, p. 295–305, 2006.

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

COSTA-MACHADO, A. R. M. **Obtenção de produtos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.: otimização da extração e secagem em spray dryer utilizando planejamentos experimentais**. 2011. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

COSTA-MACHADO, A. R. M.; BASTOS, J. K.; FREITAS, L. A. P. Dynamic maceration of *Copaifera langsdorffii* leaves: a technological study using fractional factorial design. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 79–85, 2013.

COUTO, R. O.; ARAÚJO, R. R.; TACON, L. A.; CONCEIÇÃO, E. C.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R.; FREITAS, L. A. P. Development of a phytopharmaceutical intermediate product via spray drying. **Drying Technology**, v. 29, n. 6, p. 709–718, 2011.

DAL'BELO, S. E.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing *Aloe vera* extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. **Skin research and Technology**, v. 12, n. 4, p. 241–6, 2006.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 2, p. 195–205, 2005.

DE JALÓN, E. G.; BLANCO-PRÍETO, M. J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226, n. 1-2, p. 181–184, 2001.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

DIOUF, P. N.; STEVANOVIC, T.; 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, n. 2, p. 297–303, 2009.

DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 7, p. 1184–1187, 1959.

DROOGE, D. J.; HINRICHS, W. L. J.; DICKHOFF, B. H. J.; ELLI, M. N. A.; VISSER, M. R.; ZIJLSTRA, G. S.; FRIJLINK, H. W. Spray freeze drying to produce a stable Δ^9 -tetrahydrocannabinol containing inulin-based solid dispersion powder suitable for inhalation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 2, p. 231–240, 2005.

ESMAEILI, A.; SAREMNIA, B.; KOOHIAN, A.; REZAZADEH, S. Mechanism of nanocapsules of *Matricaria recutita* L. extract formation by the emulsion–diffusion process. **Superlattices and Microstructures**, v. 50, n. 4, p. 340–349, 2011.

ESTEVINHO, B. M. A. N.; ROCHA, F. A. N.; SANTOS, L. M. S.; ALVES, M. A. C. Using water-soluble chitosan for flavour microencapsulation in food industry. **Journal of Microencapsulation**, p. 1–9, 2013a.

ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F.; SANTOS, L.; ALVES, A. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, n. 2, p. 138–155, 2013b.

FAN, G.; HAN, Y.; GU, Z.; CHEN, D. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 155–160, 2008.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510–523, 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 Ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**. 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2013.

FELT, O.; GURNY, R.; BAEYENS, V. Delivery of antibiotics to the eye using a positively charged polysaccharide as vehicle. **AAPS PharmSci**, v. 3, n. 4, p. 87–93, 2001.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179–186, 2007.

FONSECA, F. N.; TAVARES, M. F. M.; HORVÁTH, C. Capillary electrochromatography of selected phenolic compounds of *Chamomilla recutita*. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, n. 1-2, p. 390–399, 2007.

FRANKE, R.; SCHILCHER, H. **Chamomile: Industrial Profiles**. New York, USA: Taylor & Francis Group, 2005.

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

GAN, C. Y.; ABDUL MANAF, N. H.; LATIFF, A. A. Optimization of alcohol insoluble polysaccharides (AIPS) extraction from the *Parkia speciosa* pod using response surface methodology (RSM). **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 825–831, 2010.

GANESAN, V.; ROSENTRATER, K. A.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Flowability and handling characteristics of bulk solids and powders – a review with implications for DDGS. **Biosystems Engineering**, v. 101, n. 4, p. 425–435, 2008.

GANZERA, M.; SCHNEIDER, P.; STUPPNER, H. Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. **Life Sciences**, v. 78, n. 8, p. 856–861, 2006.

GAO, Y.; ZHU, C. L.; ZHANG, X. X.; GAN, L.; GAN, Y. Lipid-polymer composite microspheres for colon-specific drug delivery prepared using an ultrasonic spray freeze-drying technique. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 6, p. 549–556, 2011.

GAVINI, E.; CHETONI, P.; COSSU, M.; ALVAREZ, M. G.; SAETTONE, M. F.; GIUNCHEDI, P. PLGA microspheres for the ocular delivery of a peptide drug, vancomycin using emulsification/spray-drying as the preparation method: *in vitro/in vivo* studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 207–212, 2004.

GAVINI, E.; RASSU, G.; MUZZARELLI, C.; COSSU, M.; GIUNCHEDI, P. Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 2, p. 245–252, 2008.

GELFUSO, G. M. **Desenvolvimento de sistemas de liberação para a administração tópica passiva e iontoforética do minoxidil no tratamento da alopecia androgênica**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T.; SIMÃO, P. S.; FREITAS, L. A. P.; LOPEZ, R. F. V. Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 7, p. 650–658, 2011.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007.

GUPTA, V.; MITTAL, P.; BANSAL, P.; KHOKRA, S. L.; KAUSHIK, D. Pharmacological potential of *Matricaria recutita* – A review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 2, n. 1, p. 12–16, 2010.

HARRIS, R.; LECUMBERRI, E.; MATEOS-APARICIO, I.; MENGÍBAR, M.; HERAS, A. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 2, p. 803–806, 2011.

HUANG, W.; XUE, A.; NIU, H.; JIA, Z.; WANG, 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, n. 3, p. 1147–1154, 2009.

JACQUES, R. A.; FREITAS, L. S.; PÉREZ, V. F.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA, J. V.; CARAMÃO, E. B. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: a comparison with maceration. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 14, n. 1, p. 6–12, 2007.

JYOTHI, N. V. N.; PRASANNA, P. M.; SAKARKAR, S. N.; PRABHA, K. S.; RAMAIAH, P. S.; SRAWAN, G. Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 187–197, 2010.

KATO, A.; MINOSHIMA, Y.; YAMAMOTO, J.; ADACHI, I.; WATSON, A. A.; NASH, R. J. Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 8206–8211, 2008.

KAZAN, A.; KOYU, H.; TURU, I. C.; YESIL-CELIK TAS, O. Supercritical fluid extraction of *Prunus persica* leaves and utilization possibilities as a source of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 55–59, 2014.

KENNEDY, M. T.; ALI-REYNOLDS, A.; FARRIER, C.; BURKE, P. A. Atomizing into a chilled extraction solvent eliminates liquid gas from a spray-freeze drying microencapsulation process. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 10, p. 4459–4472, 2007.

KINI, A. G.; DIXIT, M.; KULKARNI, P. K. Enhancement of solubility and dissolution rate of poorly water soluble drug by spray drying using different grade of chitosan. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 231–235, 2011.

KONDO, M.; NIWA, T.; OKAMOTO, H.; DANJO, K. Particle characterization of poorly water-soluble drugs using a spray freeze drying technique. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 7, p. 657–662, 2009.

KOSARAJU, S. L.; D'ATH, L.; LAWRENCE, A. Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 2, p. 163–167, 2006.

KOWALSKI, R.; WAWRZYKOWSKI, J. Essential oils analysis in dried materials and granulates obtained from *Thymus vulgaris* L., *Salvia officinalis* L., *Mentha piperita* L. and *Chamomilla recutita* L. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 24, n. 1, p. 31–35, 2009.

KUKULA-KOCH, W.; ALIGIANNIS, N.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, A. L.; GLOWNIAK, K.; KALPOUTZAKIS, E. Influence of extraction procedures on phenolic content and antioxidant activity of *Cretan barberry* herb. **Food chemistry**, v. 138, n. 1, p. 406–413, 2013.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 633–640, 2004.

KUSONWIRIYAWONG, C.; LIPIUN, V.; VARDHANABHUTI, N.; ZHANG, Q.; RITTHIDEJ, G. C. Spray-dried chitosan microparticles for cellular delivery of an antigenic protein: physico-chemical properties and cellular uptake by dendritic cells and macrophages. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 6, p. 1677–1697, 2013.

LEE, S. H.; HEO, Y.; KIM, Y. C. Effect of German chamomile oil application on alleviating atopic dermatitis-like immune alterations in mice. **Journal of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 35–41, 2010.

LEUENBERGER, H. Spray freeze-drying – the process of choice for low water soluble drugs? **Journal of Nanoparticle Research**, v. 4, n. 1-2, p. 111–119, 2002.

LI, J. Factorial Designs. **Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics**, v. 1, p. 364–378, 2003.

LI, Y.; AI, L.; YOKOYAMA, W.; SHOEMAKER, C. F.; WEI, D.; MA, J.; ZHONG, F. Properties of chitosan-microencapsulated orange oil prepared by spray-drying and its stability to detergents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 13, p. 3311–3319, 2013.

LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS FILHO, P. R.; GOUVÊA, C. M. C. P. *In vitro* evaluation of the antioxidant activity of the hydroalcoholic extract of leaves of bardana. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 4, p. 531–536, 2006.

LIST, P.; SCHMIDT, P. **Phytopharmaceutical technology**. Londres: Heyden & Son Limited, 1989.

LIU, R. S.; 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, n. 9, p. 3139–3146, 2010.

LUTHRIA, D. L.; BISWAS, R.; NATARAJAN, S. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 325–333, 2007.

MACHADO JUNIOR, J. C.; FLORÃO, A.; MATTANA, F. V. R.; ROCHA, F. H.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Flow cytometry as instrument for evaluating the immunopotential of medicinal plant extracts and their isolated compounds. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 645–655, 2006.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 2, p. 1–37, 2009.

MARQUELE, F. D.; STRACIERI, K. M.; FONSECA, M. J. V.; FREITAS, L. A. P. Spray-dried propolis extract I: physicochemical and antioxidant properties. **Pharmazie**, v. 61, n. 4, p. 325–330, 2006.

MARTINS, M. D.; MARQUES, M. M.; BUSSADORI, S. K.; MARTINS, M. A. T.; PAVESI, V. C. S.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; FERNANDES, K. P. S. Comparative analysis between *Chamomilla recutita* and corticosteroids on wound healing: an *in vitro* and *in vivo* study. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 2, p. 274–278, 2009.

MARTINS, R. M. **Desenvolvimento de dispersões sólidas microparticuladas contendo carbamazepina por spray congealing**. 2010. 166 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

MARTINS, R. M.; MACHADO, M. O.; PEREIRA, S. V.; NOSARI, A. B. F. L.; TACON, L. A.; FREITAS, L. A. P. Microparticulated hydrochlorothiazide solid dispersion: enhancing dissolution properties via spray drying. **Drying Technology**, v. 30, n. 9, p. 959–967, 2012.

MARTINS, R. M.; PEREIRA, S. V.; SIQUEIRA, S.; SALOMÃO, W. F.; FREITAS, L. A. P. Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 657–663, 2013.

MARTINS, R. M. **Influência de micro e nanopartículas lipídicas sólidas na eficácia de formulações fotoprotetoras bioativas**. 2014. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

MARTINS, R. M.; SIQUEIRA, S.; FREITAS, L. A. P. Spray congealing of pharmaceuticals: study on production of solid dispersions using Box-Behnken design. **Drying Technology**, v. 30, n. 9, p. 935–945, 2012.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**. 5 ed. New York, USA: Wiley, 1991.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 7, p. 519–530, 2006.

MONT, C. A. LA. **Improvement in preserving eggs**. US 51263, 28 nov. 1865.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145–171, 2001.

MULINACCI, N.; ROMANI, A.; PINELLI, P.; VINCIERI, F. F.; PRUCHER, D. Characterization of *Matricaria recutita* L. flower extracts by HPLC-MS and HPLC-DAD analysis. **Chromatographia**, v. 51, n. 5-6, p. 301–307, 2000.

MUMENTHALER, M.; LEUENBERGER, H. Atmospheric spray-freeze drying: a suitable alternative in freeze-drying technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 72, n. 2, p. 97–110, 1991.

MUTHUKUMAR, M.; MOHAN, D.; RAJENDRAN, M. Optimization of mix proportions of mineral aggregates using Box Behnken design of experiments. **Cement and Concrete Composites**, v. 25, n. 7, p. 751–758, 2003.

NGUYEN, X. C.; HERBERGER, J. D.; BURKE, P. A. Protein powders for encapsulation: a comparison of spray-freeze drying and spray drying of darbepoetin alfa. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 3, p. 507–14, 2004.

NIST/SEMATECH. **e-Handbook of Statistical Methods**. Disponível em: <<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>>. Acesso em: 17 jul. 2013.

NIWA, T.; SHIMABARA, H.; KONDO, M.; DANJO, K. Design of porous microparticles with single-micron size by novel spray freeze-drying technique using four-fluid nozzle. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, n. 1-2, p. 88–97, 2009.

NÓBREGA, A. T. **Desenvolvimento e avaliação da eficácia de formulações cosméticas contendo extrato de camomila ou seus componentes isolados**. 2010. 172 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

NÓBREGA, A. T.; WAGEMAKER, T. A. L.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Antioxidant activity of *Matricaria chamomilla* L. extract and clinical efficacy of cosmetic formulations containing this extract and its isolated compounds. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 10, n. 2, p. 249–261, 2013.

NORIEGA, P.; MAFUD, D. F.; SOUZA, B.; SOARES-SCOTT, M.; RIVELLI, D. P.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Applying design of experiments (DOE) to flavonoid extraction from *Passiflora alata* and *P. edulis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p. 1119–1129, 2012.

O'TOOLE, M. G.; HENDERSON, R. M.; SOUCY, P. A.; FASCIOTTO, B. H.; HOBLITZELL, P. J.; KEYNTON, R. S.; EHRINGER, W. D.; GOBIN, A. S. Curcumin encapsulation in submicrometer spray-dried chitosan/Tween 20 particles. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 8, p. 2309–2314, 2012.

OGATA, I.; KAWANAI, T.; HASHIMOTO, E.; NISHIMURA, Y.; OYAMA, Y.; SEO, H. Bisabololoxide A, one of the main constituents in German chamomile extract, induces apoptosis in rat thymocytes. **Archives of Toxicology**, v. 84, n. 1, p. 45–52, 2010.

OLIVEIRA, B. F.; SANTANA, M. H. A.; RÉ, M. I. Spray-dried chitosan microspheres as a pDNA carrier. **Drying Technology**, v. 24, n. 3, p. 373–382, 2006.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Spray drying of plant extracts: basic remarks and application. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 641–650, 2010.

ONEDA, F.; RÉ, M. The effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dried microspheres containing organic salts. **Powder Technology**, v. 130, n. 1-3, p. 377–384, 2003.

PATIL, S.; BABBAR, A.; MATHUR, R.; MISHRA, A.; SAWANT, K. Mucoadhesive chitosan microspheres of carvedilol for nasal administration. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, n. 4, p. 321–331, 2010.

PATRAVALE, V. B.; MANDAWGADE, S. D. Novel cosmetic delivery systems: an application update. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, n.1, p. 19–33, 2008.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106–110, 2005.

PEREIRA, G. G.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; ALBERNAZ, M. S.; CANEMA, D.; WEISMÜLLER, G.; BARROS, E. B.; MAGALHÃES, L.; LIMA-RIBEIRO, M. H. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Microparticles of *Aloe vera*/vitamin E/chitosan: microscopic, a nuclear imaging and an *in vivo* test analysis for burn treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 2, p. 292–300, 2014.

PEREIRA, S. V. **Obtenção de dispersões sólidas microparticuladas de piroxicam por *spray congealing***. 2012. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

PETRONILHO, S.; MARASCHIN, M.; DELGADILLO, I.; COIMBRA, M. A.; ROCHA, S. M. Sesquiterpenic composition of the inflorescences of Brazilian chamomile (*Matricaria recutita* L.): Impact of the agricultural practices. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1482–1490, 2011.

PINELO, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. Mass transfer during continuous solid–liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 1, p. 57–63, 2006.

PIRZAD, A.; SHAKIBA, M. R.; ZEHTAB-SALMASI, S.; MOHAMMADI, S. A.; SHARIFI, R. S.; HASSANI, A. Effects of irrigation regime and plant density on essential oil composition of German Chamomile (*Matricaria chamomilla*). **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 17, n. 2, p. 107–118, 2011.

PITAKSUTEEPPONG, T.; SOMSIRI, A.; WARANUCH, N. Targeted transfollicular delivery of artocarpin extract from *Artocarpus incisus* by means of microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 3, p. 639–645, 2007.

POMPEU, D. R.; SILVA, E. M.; ROGÉZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 6076–6082, 2009.

PRESIBELLA, M. M.; VILLAS-BÔAS, L. D. B.; BELLETTI, K. M. S.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Comparison of chemical constituents of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert essential oil and its anti-chemotactic activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 5, p. 717–724, 2006.

PRISTA, LL. V.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 4 ed, v. 2. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1995.

QUISPE-CONDORI, S.; SALDAÑA, M. D. A.; TEMELLI, F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 9, p. 1880–1887, 2011.

RAAL, A.; ORAV, A.; PÜSSA, T.; VALNER, C.; MALMISTE, B.; ARAK, E. Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in commercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from different countries. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 632–638, 2012.

RAVAL, J. A.; PATEL, J. K.; PATEL, M. M. Formulation and *in vitro* characterization of spray dried microspheres of amoxicillin. **Acta Pharmaceutica**, v. 60, n. 4, p. 455–465, 2010.

REIS, P. E. D.; CARVALHO, E. C.; BUENO, P. C. P.; BASTOS, J. K. Aplicação clínica da *Chamomilla recutita* em flebites: estudo de curva dose-resposta. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 19, n. 1, p. 3–10, 2011.

REPČÁK, M.; KRAUSOVÁ, T. Phenolic glucosides in the course of ligulate flower development in diploid and tetraploid *Matricaria chamomilla*. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 19–22, 2009.

RÉTHY, Z.; KOCZOR, Z.; ERDÉLYI, J. Handling contradicting requirements using desirability functions. **Acta Polytechnica Hungarica**, v. 1, n. 2, p. 5–12, 2004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. **Polymer**, v. 40, n. 25, p. 7029–7032, 1999.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamentos de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

RODRIGUES, R. A. F.; GROSSO, C. R. F. Cashew gum microencapsulation protects the aroma of coffee extracts. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 1, p. 13–20, 2008.

SCHIFFTER, H. Spray-freeze-drying in the manufacture of pharmaceuticals. **European Pharmaceutical Review**, v. 12, p. 67–71, 2007.

SCHIFFTER, H.; CONDLIFFE, J.; VONHOFF, S. Spray-freeze-drying of nanosuspensions: the manufacture of insulin particles for needle-free ballistic powder delivery. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 4, p. S483–S500, 2010.

SCHMALTZ, C.; SANTOS, J. V.; GUTERRES, S. S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. **Infarma**, v. 16, n. 13-14, p. 80–85, 2005.

SHIM, J.; KANG, H. S.; PARK, W. S.; HAN, S. H.; KIM, J.; CHANG, I. S. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, n. 3, p. 477–484, 2004.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas II: aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 1–20, 2003.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P. G. L.; MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 125–131, 2010.

SOLLOHUB, K.; CAL, K. Spray drying technique II: current applications in pharmaceutical technology. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 587–97, 2010.

SONNER, C.; MAA, Y. F.; LEE, G. Spray-freeze-drying for protein powder preparation: particle characterization and a case study with trypsinogen stability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 10, p. 2122–2139, 2002.

SOOTTITANTAWAT, A.; YOSHII, H.; FURUTA, T.; OHKAWARA, M.; LINKO, P. Microencapsulation by spray drying: influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 7, p. 2256–2262, 2003.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOUZA, J. P. B.; TACON, L. A.; CORREIA, C. C.; BASTOS, J. K.; FREITAS, L. A. P. Spray-dried propolis extract II: prenylated components of green propolis. **Die Pharmazie**, v. 62, n. 7, p. 488–492, 2007.

SRIVASTAVA, J. K.; GUPTA, S. Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9470–9478, 2007.

SRIVASTAVA, J. K.; GUPTA, S. Health promoting benefits of chamomile in the elderly population. In: WATSON, R. R. **Complementary and alternative therapies in the aging population**. Oxford, UK: Elsevier, 2009a. cap. 8, p. 135–158.

SRIVASTAVA, J. K.; GUPTA, S. Extraction, characterization, stability and biological activity of flavonoids isolated from chamomile flowers. **Molecular and Cellular Pharmacology**, v. 1, n. 3, p. 138, 2009b.

SRIVASTAVA, J. K.; SHANKAR, E.; GUPTA, S. Chamomile: a herbal medicine of the past with bright future. **Molecular Medicine Reports**, v. 3, n. 6, p. 895–901, 2010.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T., SILVA, D. A. K., MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, p. 12–20, 2006.

ŠVEHLÍKOVÁ, V.; BENNETT, R. N.; MELLON, F. A.; NEEDS, P. W.; PIACENTE, S.; KROON, P. A.; BAO, Y. Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). **Phytochemistry**, v. 65, n. 16, p. 2323–2332, 2004.

TACON, L. A. **Estudo da extração e secagem por spray dryer das cascas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. Humiriaceae**. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

TACON, L. A.; FREITAS, L. A. P. Box-Behnken design to study the bergenin content and antioxidant activity of *Endopleura uchi* bark extracts obtained by dynamic maceration. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 65–71, 2013.

USP 30. **United States Pharmacopeia**, Rockville: The United States Pharmacopeial Convection, 2007.

VENTURA, C. A.; CANNAVÀ, C.; STANCANELLI, R.; PAOLINO, D.; COSCO, D.; MANTIA, A. L.; PIGNATELLO, R.; TOMMASINI, S. Gemcitabine-loaded chitosan microspheres: characterization and biological *in vitro* evaluation. **Biomedical Microdevices**, v. 13, n. 5, p. 799–807, 2011.

WALTON, D. E. The morphology of spray-dried particles a qualitative view. **Drying Technology**, v. 18, n. 9, p. 1943–1986, 2000.

WATKINSON, A. C.; BUNGE, A. L.; HADGRAFT, J.; LANE, M. E. Nanoparticles do not penetrate human skin – a theoretical perspective. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 8, p. 1943–1946, 2013.

WEBER, B.; HERRMANN, M.; HARTMANN, B.; JOPPE, H.; SCHMIDT, C. O.; BERTRAM, H. J. HPLC/MS and HPLC/NMR as hyphenated techniques for accelerated characterization of the main constituents in Chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 4, p. 755–760, 2008.

YU, Z.; JOHNSTON, K. P.; WILLIAMS, R. O. Spray freezing into liquid versus spray-freeze drying: influence of atomization on protein aggregation and biological activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 9–18, 2006.

ZHANG, C. H.; HUANG, L. X.; WANG, C. P.; MUJUMDAR, A. S. Experimental and numerical investigation of spray-drying parameters on the dried powder properties of *Ginkgo biloba* seeds. **Drying Technology**, v. 28, n. 3, p. 380–388, 2010.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. cap. 23, p. 578-614.