UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Padronização e avaliação biológica de extratos secos de *Psidium*
guajava L. obtidos por *spray drying*

Maurette dos Reis Vieira Fernandes

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Padronização e avaliação biológica de extratos secos de *Psidium guajava* L. obtidos por *spray drying*

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: Maurette dos Reis Vieira Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Pereira Oliveira

Ribeirão Preto

2013

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Fernandes, Maurette dos Reis Vieira

Padronização e avaliação biológica de extratos secos de *Psidium guajava* L. obtidos por *spray drying*.

Ribeirão Preto, 2013.

237p.; 30cm.

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

Orientador: Oliveira, Wanderley Pereira

1. *Spray dryer*. 2. *Psidium guajava*. 3. Extratos secos. 4. Atividade antioxidante.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Maurette dos Reis Vieira Fernandes

Título do trabalho: Padronização e avaliação biológica de extratos secos de *Psidium guajava* L. obtidos por *spray drying*

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. Wanderley Pereira Oliveira

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Trabalho realizado no Departamento de
Ciências Farmacêuticas da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, Laboratório de
Pesquisa e Desenvolvimento em Processos
Farmacêuticos (LAPROFAR)*

Apoio Financeiro

CNPq

*Esta tese é dedicada à minha
família, Eduardo, Rafael e
Henrique, pelo amor e apoio
incondicionais em todas as horas.*

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira*, que mesmo sabendo da minha formação anterior, na área de análises clínicas, confiou em abrir as portas do LAPROFAR e me aceitar como sua aluna de Doutorado. Agradeço pela orientação dedicada, conhecimentos transmitidos e o exemplo constante de profissional justo e competente.

A todos os funcionários do laboratório de bioquímica, especialmente à *Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini* pela colaboração valiosa na realização dos ensaios com células humanas. O seu carinho e dedicação em tudo o que faz é notável.

Ao laboratório do *Prof. Dr. Severino Matias de Alencar*, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pela valiosa colaboração com os testes de atividade antioxidante, o que ampliou enormemente o conhecimento nesta área.

Ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL – MG, Instituto de Ciências Biomédicas, pela disponibilidade para a realização dos testes de atividade antimicrobiana e pelo convívio agradável e ao mesmo tempo sério e consistente com os objetivos acadêmicos.

Ao *Prof. Dr. Daniel Sivieri Cordeiro*, a *Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca* e a *Dra. Luciana Mariko Kabeya* pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

Agradecimentos especiais à *Dra. Cláudia Regina Fernandes de Souza* pelo exemplo de dedicação à pesquisa e pelos inúmeros ensinamentos que direta ou indiretamente me foram passados durante os anos de convivência.

Ao técnico do LAPROFAR *Marcelo Luis Lombardi Martinez* pelo auxílio constante, apoio e amizade. Seu trabalho foi de grande importância para a realização deste estudo.

Ao grupo do LAPROFAR, Diego, Lucimara, Maira, Camila, Danielle, Patrícia e Vanessa pela equipe que formamos baseada em trabalho em conjunto e amizade verdadeira.

Ao grande amigo *Tales Alexandre Costa e Silva* pela amizade e dedicação, sua ajuda foi fundamental em todo o meu caminho.

A amiga *Tassiele Andréa Heinrich* por seu companheirismo, carinho e amizade verdadeira. Levarei lembranças felizes de todos os momentos compartilhados...

À coordenação do Curso de Pós-graduação pela política de incentivo à produção acadêmica em especial à funcionária *Eleni Angeli Passos* pela atenção e dedicação.

Aos integrantes do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP pela oportunidade de desenvolver uma parte importante do trabalho.

A todos, amigos e familiares, por serem incentivadores e compreensivos nos momentos difíceis ou de ausência.

As Irmãs Beneditinas da Fundação *Vita et Pax*, em especial à irmã Marina que, com seu estímulo e carinho tornou nosso convívio fraternal, fortalecendo a cada dia nossa amizade. Deixará saudades...

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

Aos órgãos de incentivo à pesquisa e desenvolvimento CAPES, CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos!

*“Feliz aquele que transfere o que
sabe e aprende o que ensina”.*

(Cora Coralina)

RESUMO

Fernandes, M. R. V. **Obtenção, padronização e avaliação biológica de extratos secos a partir da espécie *Psidium guajava* L. pelo processo *spray drying***. 2013. 237 f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A planta *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae), popularmente conhecida por goiabeira, é muito utilizada na medicina tradicional devido às suas propriedades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória. O objetivo deste trabalho foi a obtenção, padronização e avaliação das atividades biológicas de extratos secos de *P. guajava* obtidos por *spray drying*, com ênfase na influência exercida por diferentes adjuvantes tecnológicos sobre as propriedades físico-químicas dos extratos padronizados. A primeira etapa do trabalho foi a coleta das folhas de quatro cultivares de *Psidium guajava* (Paluma, Pedro Sato, Século XXI e Santana da Vargem). A variedade Pedro Sato apresentou os maiores teores de substâncias bioativas correlacionadas com a atividade antioxidante, sendo, portanto selecionada para prosseguimento do trabalho. A solução extrativa foi obtida utilizando o método de extração por maceração dinâmica à temperatura de 56 °C, por 60 min, utilizando etanol 70% (v/v) como solvente extrator e proporção planta/solvente de 1/10 (m/v). O extrato obtido foi concentrado até teor de sólidos de 10,7 % e acrescido dos adjuvantes de secagem nas proporções de 40 e 80% (base seca). Os adjuvantes empregados neste trabalho (isolados ou em associação) foram a goma arábica (Encapsia), amido modificado (Dry Flo), β -ciclodextrina (Kleptose), celulose microcristalina (Microcel MC 102), dióxido de silício coloidal (Aerosil 200) e maltodextrina (Mor-Rex 1910). A etapa de secagem foi desenvolvida em um *spray dryer* de bancada modelo SD-05 da LabPlant, sendo os parâmetros operacionais fixados em: temperatura de entrada do ar de secagem (T_{ge}): 150 °C, vazão do ar de secagem (W_g): 60 m³/h, vazão de alimentação do extrato (W_{susp}): 4 g/min, pressão do ar de atomização (P_{atm}): 1,5 bar e vazão do ar de atomização (W_{atm}): 15 lpm. Os extratos secos obtidos foram caracterizados quanto às características físico-químicas, morfológicas e atividade antioxidante. Foram selecionadas três amostras de extratos secos (maltodextrina:Aerosil, maltodextrina:encapsia:aerosil e β -ciclodextrina na proporção de 80%) para os estudos de estabilidade e ensaios de atividade antioxidante (DPPH, ABTS, ORAC, FRAP e ensaios em modelos celulares, QL_{lum}) e antimicrobiana (bactérias e fungos). A atividade dos extratos secos de *P. guajava* sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados com PMA pelo método da quimioluminescência mostra resultados de inibição da QL_{lum} de forma dependente da concentração e não tóxica sobre os neutrófilos. Os extratos secos foram ativos contra *S. aureus* e *C. glabrata*, e inativos contra as bactérias Gram negativas avaliadas. Os resultados deste estudo podem contribuir para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas e para a validação de aplicações clínicas da *Psidium guajava*, espécie inserida no elenco de espécies vegetais selecionadas para estudos pelo Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais e incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), justificando a importância da investigação da sua viabilidade tecnológica.

Palavras chave: *Psidium guajava*, padronização de extratos vegetais, *spray dryer*, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Fernandes, M. R. V. **Obtaining, standardization and biological assessment of dry extracts from *Psidium guajava* L. species by spray drying process.** 2013. 237 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Psidium guajava Linn. (Myrtaceae), popularly known as guava, is widely used in traditional medicine due to its antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties. The aim of this work was to standardization and evaluation of the biological activities of spray drying dried extracts of *P. guajava*, with emphasis on the influence exerted by different carriers on the physicochemical properties of dried extracts. The first stage of the study was the collection of leaves of four cultivars of *Psidium guajava* (Paluma, Pedro Sato, Century XXI and Santana's Vargem). The variety Pedro Sato showed the highest levels of bioactive substances correlated with antioxidant activity, and therefore selected for further work. The extraction solution was obtained using the dynamic maceration method at a temperature of 56 °C for 60 min using ethanol 70% (v/v) as extractor solvent and plant/solvent ratio of 1/10 (m/v). The extract obtained was concentrated until a solid contents of 10.7% and added with the carriers in proportions of 40 to 80% (dry basis). The carriers used in this study (alone or in blends) were arabic gum (Encapsia), modified starch (Dry Flo), β -cyclodextrin (Kleptose), microcrystalline cellulose (MC Microcel 102), colloidal silicon dioxide (Aerosil 200) and maltodextrin (Mor-Rex 1910). The drying runs was performed in a bench top spray dryer model SD-05 LabPlant, and the operational parameters set at: inlet temperature of the drying air (T_{gi}): 150 °C, flow rate of the drying air (W_g): 60 m³/h, feed flow rate of extract (W_{susp}): 4 g/min, atomizing air pressure (P_{atm}): 1.5 bar and atomizing air flow rate (W_{atm}): 15 lpm. Spray dried preparations were characterized by physico-chemical, morphological and antioxidant activity. Three samples of dried extracts was selected (maltodextrin: Aerosil, maltodextrin: encapsia: aerosil and β -cyclodextrin in the proportion of 80%) for stability studies and trials of antioxidant activity (DPPH, ABTS, ORAC, FRAP and assays in cell models, Q_{Lum}) and antimicrobial (bacteria and fungi). The activity of dried extracts of *P. guajava* by cellular test that measured the luminol-enhanced chemiluminescence (CL_{lum}) produced by phorbol myristate acetate (PMA) stimulated neutrophils show results Q_{Lum} inhibition of concentration-dependent manner and nontoxic on neutrophils. The dried extracts were active against *S. aureus* and *C. glabrata*, and inactive against Gram-negative bacteria evaluated. The results of this study may contribute to the development of novel dosage forms for validation and clinical applications of the *Psidium guajava*, medicinal specie included in the list of plant species selected for study by the Research Program on Medicinal Plants and included in the National List of Medicinal Plants Interest SUS (RENISUS), justifying the importance of research of its technological feasibility.

Key words: *Psidium guajava*; standardized dried extracts, spray dryer, drying carriers, antioxidant activity, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Psidium guajava</i> : (a,b): tronco; (c,d): folha; (e): flores; (f): frutos.....	08
Figura 2 - Típicas evoluções de temperatura de secagem de gotículas atomizadas em corrente gasosa aquecida.....	23
Figura 3 - Estrutura molecular do dióxido de silício coloidal	27
Figura 4 - Estrutura molecular da celulose microcristalina	28
Figura 5 - Estrutura molecular da unidade de maltodextrina	28
Figura 6 - Estrutura molecular da goma arábica.....	29
Figura 7 - Estrutura molecular da β -ciclodextrina com 7 unidades de glicose.....	30
Figura 8 - Exemplos de configurações típicas de secadores por nebulização com escoamentos concorrente e contracorrente.....	32
Figura 09 - Diagrama de Atividade de água descrevendo os efeitos no crescimento microbiano e taxas de reação	42
Figura 10 - Estabilização do radical livre DPPH	47
Figura 11 - Possíveis reações com o radical DPPH	47
Figura 12 - Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio	50
Figura 13 - Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe ³⁺	52
Figura 14 - Exemplo de um processo da oxidação da fluoresceína na presença de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) diidroclorido (AAPH)	53
Figura 15 - Princípio do ensaio ORAC usando a sonda fluorescente	55
Figura 16 - Neutrófilo maduro	56
Figura 17 - Esquema simplificado de algumas vias de sinalização ativadas em neutrófilos estimulados com PMA, que culminam na produção de ERO	57
Figura 18 - Representação simplificada do mecanismo proposto para descrever a origem e a regulação da quimioluminescência (QL) produzida por neutrófilos estimulados e das reações químicas envolvidas na produção de quimioluminescência dependente de luminol (QLlum)	59
Figura 19 - Fluxograma das principais etapas envolvidas no desenvolvimento do trabalho	66
Figura 20 - Diagrama esquemático do <i>spray dryer</i> utilizado	72
Figura 21 - Fotografia do liofilizador Thermo Fischer Scientific SNL 108B	73

Figura 22 -	Fluxograma das etapas da extração dos compostos ativos e os métodos químicos e biológicos de análise envolvidos na seleção da cultivar	74
Figura 23 -	Esquema do preparo da microplaca utilizada no teste de avaliação antimicrobiana dos extratos em estudo.....	102
Figura 24 -	Distribuição granulométrica obtida por tamisação expressa como porcentagem da fração acumulada de folhas secas e moídas de <i>Psidium guajava</i>	111
Figura 25 -	Gráfico de dispersão entre absorvância (nm) e concentração de quercetina ($\mu\text{g/mL}$), com coeficiente de determinação e reta estimada...	112
Figura 26 -	Gráfico de dispersão entre absorvância (nm) e concentração de pirogalol ($\mu\text{g/mL}$), com coeficiente de determinação e reta estimada.....	113
Figura 27 -	Perfis cromatográficos das soluções extrativas das cultivares obtidos a 300 nm	117
Figura 28 -	Fotografia dos extratos secos obtidos pelos processos <i>spray drying</i> e <i>freeze drying</i> em função das composições de secagem.....	121
Figura 29 -	Distribuição granulométrica acumulada dos extratos secos obtidos pelo processo de <i>spray drying</i>	132
Figura 30 -	Imagens obtidas por microscopia óptica dos extratos secos com aumento de 50x.....	135
Figura 31-	Fotomicrografias obtidas por MEV observadas em diferentes aumentos.....	138
Figura 32 -	Fotomicrografias obtidas por MEV observadas em diferentes aumentos para os adjuvantes secos isoladamente em <i>spray dryer</i>	140
Figura 33 -	Efeito da concentração de Trolox na curva de decaimento da fluorescência FL	148
Figura 34 -	Gráfico de dispersão entre Concentração Trolox e <i>AUC</i> net, com coeficiente de determinação e reta estimada.....	149
Figura 35 -	Gráfico de dispersão entre Sulfato Ferroso e Absorbância, com coeficiente de determinação e reta estimada.....	151
Figura 36 -	Monitoramento da umidade dos extratos secos (M A 80, MDE A 80, β CD 80 e PG LIO) durante o estudo de estabilidade acelerada.....	168
Figura 37 -	Difratogramas dos extratos de <i>Psidium guajava</i> secos no <i>spray dryer</i> e <i>freeze dryer</i> no tempo de armazenamento 0 e 180 dias	170
Figura 38 -	Difratogramas dos adjuvantes puros	171
Figura 39 -	Fotografia dos extratos secos obtidos pelos processos <i>spray drying</i> e <i>freeze drying</i> em função das composições de secagem.....	174
Figura 40 -	<i>Croma</i> para os extratos secos em <i>spray dryer</i> , extrato liofilizado (PG LIO) e extrato glicólico em estudo de estabilidade acelerada.....	177

Figura 41 -	Ângulo de <i>Hue</i> para os extratos secos em <i>spray dryer</i> , extrato liofilizado (PG LIO) e extrato glicólico em estudo de estabilidade acelerada.....	177
Figura 42 -	Monitoramento do teor de flavonoides totais dos extratos secos (<i>spray dryer</i> e liofilizador) e do extrato glicólico a 10% durante o estudo de estabilidade acelerada.....	178
Figura 43 -	Monitoramento do teor de polifenóis totais dos extratos secos (<i>spray dryer</i> e liofilizador) e do extrato glicólico a 10% durante o estudo de estabilidade acelerada.....	181
Figura 44 -	Monitoramento da atividade antioxidante dos extratos secos (<i>spray dryer</i> e liofilizador) através do método do radical DPPH expressa em % de Inibição durante o estudo de estabilidade acelerada.....	183
Figura 45 -	Monitoramento da atividade antioxidante do extrato glicólico a 10% através do método do radical DPPH expressa em % de inibição durante o estudo de estabilidade acelerada.....	185
Figura 46 -	Monitoramento do teor de flavonoides totais dos extratos secos (<i>spray dryer</i> e liofilizador) durante o estudo de estabilidade prolongada	186
Figura 47 -	Monitoramento do teor de polifenóis totais dos extratos secos (<i>spray dryer</i> e liofilizador) durante o estudo de estabilidade prolongada	188
Figura 48 -	Monitoramento do teor de taninos totais dos extratos secos (<i>spray dryer</i> e liofilizador) durante o estudo de estabilidade prolongada	189
Figura 49 -	Influência do tempo de armazenamento (1 ano) na umidade residual dos extratos secos em <i>spray dryer</i>	190
Figura 50 -	Monitoramento da % inibição medida pelo método do radical DPPH dos extratos secos (<i>spray dryer</i> e <i>freeze dryer</i>) durante o estudo de estabilidade prolongada.....	192

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de compostos isolados de <i>Psidium guajava</i> L.....	11
Tabela 2 - Estudos antibacterianos de folhas de <i>Psidium guajava</i>	12
Tabela 3 - Cultivares de <i>Psidium guajava</i> e dados da coleta	74
Tabela 4 - Local de coleta de <i>Psidium guajava</i> L.	75
Tabela 5 - Formulações utilizadas para os ensaios de secagem em <i>spray dryer</i>	86
Tabela 6 - Equações usadas na determinação do desempenho do <i>spray dryer</i>	87
Tabela 7 - Diâmetro médio, teor de extrativos e perda por dessecação das matérias-primas de <i>Psidium guajava</i>	110
Tabela 8 - Teores de flavonoides totais, polifenóis e taninos totais das matérias-primas de <i>Psidium guajava</i>	113
Tabela 9 - Caracterização física das soluções extrativas de <i>Psidium guajava</i>	115
Tabela 10 - Teores de flavonoides totais, polifenóis, taninos totais e atividade antioxidante das soluções extrativas de <i>Psidium guajava</i>	115
Tabela 11 - Caracterização físico-química da matéria-prima vegetal (Pedro Sato).....	118
Tabela 12 - Caracterização físico-química da solução extrativa (Pedro Sato).....	119
Tabela 13 - Caracterização físico-química do extrato concentrado de <i>Psidium guajava</i>	120
Tabela 14 - Resultados do desempenho do secador <i>spray dryer</i>	122
Tabela 15 - Caracterização físico-química dos extratos secos por <i>spray drying</i> de <i>Psidium guajava</i>	125
Tabela 16 - Teores de flavonoides totais, polifenóis e taninos totais dos extratos secos por liofilização.....	130
Tabela 17 - Tamanho médio de partículas dos extratos secos em <i>spray dryer</i> de <i>Psidium guajava</i>	134
Tabela 18 - Características farmacotécnicas dos extratos secos obtidos no <i>spray dryer</i>	136
Tabela 19 - Atividade antioxidante dos extratos secos em <i>spray dryer</i> e no liofilizador de <i>Psidium guajava</i> pelo método do DPPH [•]	142
Tabela 20 - Atividade antioxidante pelo método do DPPH [•] dos extratos secos de <i>Psidium guajava</i> obtidos por liofilização	144
Tabela 21 - Atividade antioxidante dos extratos secos avaliada pelo método ABTS ^{•+}	146

Tabela 22 -	Atividade antioxidante dos extratos avaliada pelo método ORAC.....	149
Tabela 23 -	Atividade antioxidante dos extratos avaliada pelo método FRAP.....	152
Tabela 24 -	Matrix de coeficiente de correlação de Pearson e valor p para a correlação entre a capacidade antioxidante avaliada pelos ensaios ABTS, DPPH, FRAP e ORAC e conteúdo de flavonoides, polifenóis e taninos totais dos extratos secos de <i>Psidium guajava</i>	154
Tabela 25 -	Efeito inibitório do extrato PG LIO e dos extratos secos de <i>Psidium guajava</i> sobre a produção de Ql_{lum} por neutrófilos estimulados com PMA.....	158
Tabela 26 -	Análise da citotoxicidade do extrato liofilizado de <i>Psidium guajava</i> (PG LIO) sobre os neutrófilos.....	160
Tabela 27 -	Análise da citotoxicidade dos extratos de <i>Psidium guajava</i> sobre os neutrófilos.....	161
Tabela 28 -	Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) de extratos de <i>Psidium guajava</i>	163
Tabela 29 -	Concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) de extratos de <i>Psidium guajava</i>	164
Tabela 30 -	Parâmetros de cor para os extratos secos em <i>spray dryer</i> , extrato liofilizado e extrato glicólico a 10%.....	174
Tabela 31 -	Parâmetros de cor para os extratos secos em <i>spray dryer</i> , extrato liofilizado e extrato glicólico a 10% em estudo de estabilidade acelerada.....	176

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
ABTS ⁺	radical catiônico de 2,2-Azinobis (3-etilbenzotiazolina 6-ácido sulfônico)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C*	<i>Croma</i>
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CI ₅₀	Concentração que inibe 50% da resposta biológica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Detector-Arranjo de Diodo
c.p.m.	Fótons contados por minuto (<i>counted photons per minute</i>)
DE	Equivalentes de Dextrose
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DPPH [•]	difenil-picrilhidrazil (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FH	Fator Hausner
FRAP	Poder Antioxidante de Redução do Ferro
FT	Flavonoides Totais
H°	Ângulo de Hue
IC	Índice de Carr
L*	Luminosidade
LDH	Lactato desidrogenase
m/v	massa/volume
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
OMS	Organização mundial de Saúde
ORAC	Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio
P _{atm}	Pressão de atomização
PBS	Solução salina tamponada com fosfato

PMA	Acetato de forbol miristato
PMNs	Leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos)
PT	Polifenóis Totais
QL	Quimioluminescência
QLlum	Quimioluminescência dependente de luminol
Rec	Recuperação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SD	<i>Spray drying</i>
TEAC	<i>Trolox Equivalents Antioxidant Capacity</i>
T _{ge}	Temperatura gás de entrada
TT	Taninos totais
UV/vis	Ultra violeta-visível
v/v	volume/volume
W _{susp}	Vazão de suspensão do extrato

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas	viii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	05
2.1 <i>Psidium guajava</i> L. – goiaba	06
2.1.1 Aspectos botânicos e agrônômicos	06
2.1.2 Aspectos fitoquímicos e farmacológicos	09
2.2 Aspectos envolvidos na padronização e estabilização de extratos vegetais.....	15
2.2.1 Métodos empregados na extração de princípios ativos	19
2.2.2 Secagem de extratos vegetais	21
2.2.3 Adjuvantes de secagem	25
2.3 Secagem por nebulização ou <i>spray drying</i>	31
2.4 Secagem por liofilização ou <i>freeze drying</i>	33
2.5 Estudos de estabilidade	34
2.5.1 Principais gerais	34
2.5.1.1 Estudos de estabilidade acelerada	35
2.5.1.2 Estudo de estabilidade de longa duração	36
2.5.1.3 Estudos de estabilidade de extratos de plantas medicinais	37
2.6 Atividade antioxidante de plantas medicinais	44
2.7 Métodos para avaliação da Atividade Antioxidante.....	45
2.7.1 Atividade sequestrante de radicais DPPH	46
2.7.2 ABTS ou TEAC	49
2.7.3 FRAP	51
2.7.4 ORAC	53
2.7.5 Ensaio da quimioluminescência dependente de luminol (QL _{lum}) usando neutrófilos humanos	56
2.7.5.1 Neutrófilos e seu papel na resposta imune	56
2.7.5.2 Quimioluminescência (QL)	58
2.8 Relevância do tema	60
3 OBJETIVO	62
3.1 Objetivo geral.....	63
3.2 Objetivos específicos.....	63

4 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
4.1 Principais etapas envolvidas na padronização de extratos vegetais	65
4.2 Materiais.....	69
4.2.1 Matéria-prima vegetal.....	69
4.2.2 Reagentes, soluções e substâncias de referência.....	69
4.2.3 Adjuvantes de secagem	70
4.2.4 Equipamentos utilizados	70
4.2.5 Secadores	72
4.2.5.1 <i>Spray dryer</i>	72
4.2.5.2 Liofilizador (<i>Freeze dryer</i>).....	72
4.3 Métodos Experimentais.....	73
4.3.1 Seleção e avaliação do material vegetal	73
4.3.2 Caracterização da matéria-prima vegetal	75
4.3.2.1 Distribuição granulométrica	75
4.3.2.2 Determinação do teor de extrativos.....	76
4.3.2.3 Determinação da perda por dessecação.....	76
4.3.2.4 Quantificação de flavonoides totais.....	76
4.3.2.5 Quantificação de polifenóis e taninos totais.....	77
4.3.3 Obtenção e caracterização físico-química das soluções extrativas de <i>P. guajava</i>	78
4.3.3.1 Determinação do teor de sólidos totais	79
4.3.3.2 Determinação da densidade relativa	79
4.3.3.3 Determinação da graduação alcoólica	79
4.3.3.4 Determinação do pH	80
4.3.3.5 Quantificação de flavonoides totais	80
4.3.3.6 Quantificação de polifenóis e taninos totais	80
4.3.3.7 Determinação da atividade antioxidante das soluções extrativas	81
4.3.3.8 Obtenção de <i>fingerprints</i> das soluções extrativas por CLAE	82
4.3.4 Obtenção do extrato concentrado de <i>P. guajava</i>	83
4.3.4.1 Caracterização do extrato concentrado	83
4.3.5 Obtenção do extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i>	84
4.3.5.1 Preparo do extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i>	84
4.3.5.2 Caracterização do extrato glicólico	84
4.3.6 Obtenção dos extratos secos de <i>Psidium guajava</i>	84
4.3.6.1 Procedimento de secagem por <i>spray dryer</i>	85
4.3.6.1.1 Avaliação do desempenho do secador <i>spray dryer</i>	86
4.3.6.2 Procedimento de secagem por liofilização	87
4.3.6.2.1 Obtenção do extrato liofilizado	87
4.3.7 Caracterização dos extratos secos de <i>Psidium guajava</i>	88

4.3.7.1 Determinação da perda por dessecação	88
4.3.7.2 Determinação da umidade residual por Karl Fischer	88
4.3.7.3 Determinação da atividade de água (A_a).....	88
4.3.7.4 Determinação da solubilidade	89
4.3.7.5 Determinação do teor de flavonoides totais.....	89
4.3.7.6 Determinação do teor de polifenóis e taninos totais.....	89
4.3.7.7 Determinação da distribuição granulométrica e tamanho médio das partículas.....	89
4.3.7.8 Determinação das propriedades de fluidez dos extratos secos	90
4.3.7.8.1 Determinação da densidade aparente e de compactação	90
4.3.7.8.2 Determinação do fator de Hausner e índice de compressibilidade	90
4.3.7.8.3 Determinação do ângulo de repouso	91
4.3.7.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	91
4.3.8 Avaliação da atividade biológica dos extratos de <i>Psidium guajava</i>	92
4.3.8.1 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de <i>Psidium</i> <i>guajava</i>	92
4.3.8.1.1 DPPH	92
4.3.8.1.2 ABTS	93
4.3.8.1.3 ORAC	94
4.3.8.1.4 FRAP	95
4.3.8.2 Ensaio em modelos celulares	95
4.3.8.2.1 Casuística – ensaios <i>ex vivo</i>	95
4.3.8.2.2 Obtenção dos leucócitos polimorfonucleares (PMNs).....	96
4.3.8.2.3 Efeito das amostras de extratos secos de <i>Psidium guajava</i> sobre o metabolismo oxidativo dos PMNs: ensaios de quimioluminescência (QL).....	96
4.3.8.2.4 Medida de QL_{lum} das amostras estudadas	97
4.3.8.2.5 Ensaio de toxicidade dos extratos de <i>Psidium guajava</i> sobre os neutrófilos	98
4.3.9 Avaliação da atividade antimicrobiana	99
4.3.10 Estudo de estabilidade dos extratos secos	104
4.3.10.1 Parâmetros monitorados no estudo de estabilidade	104
4.3.10.2 Estudo de estabilidade prolongada dos extratos secos de <i>Psidium</i> <i>guajava</i>	106
4.4 Tratamento dos resultados	107
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
5.1 Avaliação das quatro cultivares de <i>Psidium guajava</i>	109
5.1.1 Caracterização das matérias-primas vegetais de <i>Psidium guajava</i>	109
5.1.2 Caracterização das soluções extrativas de <i>Psidium guajava</i>	114

5.2 Caracterização da matéria-prima vegetal selecionada	118
5.2.1 Obtenção e caracterização da solução extrativa da cultivar Pedro Sato	119
5.2.2 Obtenção e caracterização do extrato concentrado da cultivar Pedro Sato...	120
5.3 Obtenção dos extratos secos por <i>spray drying</i> e por liofilização	120
5.3.1 Desempenho do secador <i>spray dryer</i>	122
5.3.2 Caracterização dos extratos secos de <i>Psidium guajava</i> em <i>spray dryer</i> e liofilizador	123
5.3.3 Distribuição granulométrica dos extratos secos em <i>spray dryer</i>	131
5.3.4 Avaliação das características farmacotécnicas dos extratos secos	135
5.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	137
5.4 Atividade antioxidante dos extratos secos por <i>spray drying</i> de <i>Psidium guajava</i> .	141
5.4.1 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos secos selecionados de <i>Psidium guajava</i>	145
5.4.1.1 ABTS	145
5.4.1.2 ORAC	147
5.4.1.3 FRAP	151
5.4.1.4 Avaliação da produção de ERO por quimioluminescência	156
5.4.1.4.1 Avaliação da toxicidade dos extratos secos e do extrato PG LIO de <i>Psidium guajava</i> sobre os neutrófilos	159
5.5 Atividade antimicrobiana dos extratos secos de <i>Psidium guajava</i>	162
5.6 Estudos de estabilidade dos extratos secos	165
5.6.1 Ganho de umidade	167
5.6.2 Difração de raios-X	169
5.6.3 Análise colorimétrica	173
5.6.4 Análise do teor de flavonoides totais	178
5.6.5 Análise do teor de polifenóis totais	180
5.6.6 Avaliação do potencial antioxidante dos extratos secos e glicólico no estudo de estabilidade acelerada	183
5.6.7 Estudo de estabilidade prolongada dos extratos secos em <i>spray dryer</i> e liofilizador armazenados em dessecador a temperatura ambiente	186
6 CONCLUSÕES.....	193
6.1 Caracterização das matérias-primas vegetais e seleção da cultivar para o estudo...	194
6.2 Estudo comparativo dos métodos de secagem mediante avaliação físico-química dos extratos secos	194
6.3 Estabilidade dos extratos secos e do extrato glicólico	196
6.4 Atividade antioxidante dos extratos secos	198
6.5 Atividade antimicrobiana dos extratos secos	200
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	201
ANEXOS.....	234

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial. Apesar de todos os avanços feitos pela indústria farmacêutica no desenvolvimento de medicamentos novos e altamente eficazes para o tratamento de uma ampla gama de doenças, tem havido um aumento no uso de medicamentos fitoterápicos inclusive nos países desenvolvidos (PHILLIPSON, 2007). Estima-se que 25 a 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivadas de produtos naturais (VEIGA-JUNIOR; MELLO, 2008).

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial, com destaque para as plantas superiores, que representam aproximadamente 24% da biodiversidade. Além do seu uso como matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos, as plantas são também utilizadas em práticas populares e tradicionais como remédios caseiros e comunitários, processo conhecido como medicina tradicional (BRASIL, 2006).

O uso popular de plantas medicinais contribui de forma relevante para a obtenção de informações terapêuticas importantes, que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal despertou o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares sobre a flora mundial (MACIEL; PINTO; VEIGA JR., 2002), em especial a flora brasileira (PINTO et al., 2002). Além da herança cultural e da riqueza molecular, outros fatores foram e são responsáveis pelo incremento na pesquisa sobre plantas medicinais, tais como: insatisfação com a eficácia, o custo elevado e os efeitos indesejáveis dos medicamentos alopáticos (CZEPULA, 2006).

De acordo com a legislação sanitária brasileira, os fitoterápicos são medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais e constituem um mercado em potencial expansão, portanto, deve-se conhecer a eficácia e os riscos de seu uso, assim como a reprodutibilidade e constância de sua qualidade (CARVALHO et al., 2008).

Neste aspecto, a RDC nº 14/2010 (BRASIL, 2010) define que produtos derivados de plantas medicinais (ex: extrato, tintura, alcoolatura) devem apresentar alguns aspectos básicos de qualidade, propondo desta forma a utilização de marcadores que podem ser um composto ou classe de compostos químicos (ex: alcaloides, flavonoides, ácidos graxos etc.) presentes na matéria-prima vegetal, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico, e que

deve ser utilizado como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico.

Atualmente, os medicamentos derivados de plantas medicinais estão largamente disponíveis no mercado sob formas fluídas tradicionais. No entanto, observa-se que a transformação de extratos vegetais em extratos secos vem sendo amplamente utilizada no desenvolvimento de fitoterápicos. Produtos na forma sólida possuem vantagens significativas em relação às formas líquidas convencionais, como maior concentração, estabilidade química, físico-química e microbiológica, facilidade de padronização, maior concentração de compostos ativos, facilidade de transporte, menor espaço para a armazenagem do produto e capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

No Brasil há uma predominância das formas farmacêuticas sólidas como cápsulas e comprimidos no registro de medicamentos fitoterápicos (CARVALHO et al., 2008). Entretanto, as condições de operação usadas na secagem e processamento térmico de bioprodutos como extratos secos e materiais vegetais podem ter um considerável impacto nas propriedades e custo do produto, gerando diferentes graus de perda de compostos ativos. Portanto, estudos dos efeitos do processo de secagem no desempenho do sistema e propriedades do produto durante a produção de extratos secos padronizados são importantes e plenamente justificados (SOUZA et al., 2008).

A planta *Psidium guajava*, comumente conhecida como goiabeira, tem sido muito utilizada na medicina popular em várias partes do mundo (BARBALHO et al., 2012). Extratos e metabólitos desta planta, particularmente os obtidos de folhas e frutos possuem atividades biológicas relevantes tais como antimicrobiana e antiespasmódica no tratamento da diarreia, um dos seus principais usos tradicionais. Outras atividades relatadas para esta espécie incluem atividade anti-inflamatória, anti-diabética, anti-tussígena e atividade antioxidante (GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008). Com base no exposto, esta espécie vegetal foi selecionada para o desenvolvimento do presente trabalho, pois além de suas importantes atividades farmacológicas, está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), o que confirma a sua potencialidade como planta medicinal, justificando a importância da investigação da sua viabilidade tecnológica.

Psidium guajava vem sendo extensivamente estudada em termos de atividade farmacológica de seus componentes majoritários tanto das folhas como de outras partes da planta (BARBALHO et al., 2012). No que diz respeito ao estudo das folhas foram utilizados

vários métodos de extração como infusão (CHEN, K.-C. et al., 2010; CHEN; YEN, 2007; PENG et al., 2011), maceração (KHAN et al., 2011; METWALLI et al., 2010; NAIR; CHANDA, 2007; RYU et al, 2012), soxhlet (CHOUDHURY; SHARAN; SINHA, 2012), além de diferentes métodos de secagem dos extratos obtidos, como a liofilização (CHEN; YEN, 2007; RYU et al., 2012). No entanto, considerando uma série de vantagens na utilização do *spray dryer* como processo de secagem de extratos, as quais incluem o controle da uniformidade da granulometria do produto, processo rápido e contínuo, aplicabilidade para produtos termossensíveis e baixos custos de processo (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010), estudos envolvendo extratos hidroalcolicos de folhas de *Psidium guajava* secos neste equipamento são inexistentes.

Com base nas informações apresentadas, o presente estudo objetiva a obtenção, padronização e avaliação da atividade biológica de extratos secos de *Psidium guajava* obtidos pela técnica de secagem por nebulização (*spray drying*). Os resultados deste estudo podem ampliar o conhecimento sobre extratos secos em *spray dryer* de plantas medicinais com características tecnológicas adequadas, os quais encontram emprego como produtos finais ou intermediários na produção de fitoterápicos.

2. Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

Apresenta-se a seguir uma revisão sobre a espécie vegetal utilizada neste trabalho, *Psidium guajava* L., os aspectos envolvidos na padronização e estabilização de extratos vegetais, processos de secagem de extratos vegetais e sobre atividade antioxidante e antimicrobiana de plantas medicinais.

2.1 *Psidium guajava* L. – goiaba

A planta *Psidium guajava* Linn., 1753 (Myrtaceae), conhecida popularmente como goiabeira, é uma árvore frutífera originada das América Central e do Sul e cultivada em todos os países de clima tropical (ALVES et al., 2006). É considerada a espécie do gênero *Psidium* mais distribuída e de grande importância econômica, devido as suas diversas formas de utilização, tanto na indústria alimentícia na forma de sucos, polpas, doces etc, como pelo consumo popular da fruta *in natura* (NATALE; PRADO, 2006).

Psidium guajava é conhecida no Brasil como goiaba, guayabo, guayabo blanco, araçá, araçá felpudo; na Colômbia, Costa Rica, Honduras e República Dominicana como guayaba; em Cuba como guayaba, guayabo, guayaba cotorrera, guayaba del Peru; em El Salvador como guayaba(o); na Guatemala como guayaba, Cak, Ch'amxuy, coloc, Pata, Posh; no México como guayaba colorada, guayaba china, guayaba de venado, guayaba peruana, guayaba perulera; na Nicarágua como guayaba, guayaba de gusano; no Panamá como guayabo agrio, guayaba, guayaba nulu (OKAMOTO; KATO; BACCHI, 2009; PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIÊNCIA Y TECNOLOGIA PARA EL DESARROLLO (CYTED), 1995).

No Brasil, os frutos maduros e folhas são usados como decocção para diarreia, problemas digestivos, problemas de pele e inflamação de garganta (HOLETZ et al., 2002).

2.1.1 Aspectos botânicos e agrônômicos

Psidium guajava (Figura 1) é uma planta de porte médio, tronco tortuoso, liso e descamante, de cor marrom esbranquiçado, mas sob condições de alta umidade cresce de 6-9 m de altura. As folhas são oblongo-elípticas e ovaladas, de 10-12 cm de comprimento, 5-7 cm

de largura, de cor verde e textura semelhante a couro. Têm ápice obtuso ou acuminado, base obtusa e margem inteira. A superfície superior é ligeiramente mais pálida na cor do que a superfície inferior. O pecíolo é curto (0,3-0,4 cm de comprimento e diâmetro de 0,2-0,3 cm), cor verde, apresentando um sulco na superfície superior e peludo. As flores são brancas, hermafroditas, isoladas ou em grupos de 2 ou 3, situando-se nas axilas das folhas e nas brotações de ramos maduros. O fruto é uma baga de muitas sementes, variando em tamanho de 2,5-10 cm de diâmetro. A textura da pele pode ser lisa ou áspera. A parede interior do carpelo é carnuda e de espessura variável e as sementes são incorporadas na polpa. O sabor e aroma variam amplamente entre as populações de mudas. A forma pode ser globosa, ovóide, alongada ou em forma de pêra. A cor da pele é amarela quando maduro, mas a polpa pode ser salmão, rosa, branco ou amarelo (METWALLY et al., 2011).

Considerada nativa do México, sua ocorrência se estende pela América do Sul, Europa, África e Ásia. Evidências arqueológicas apontam sua presença no Peru desde tempos pré-colombianos. Esta planta cresce em todas as áreas tropicais e subtropicais do mundo e se adapta a diferentes condições climáticas, mas prefere climas secos (GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008).

O Brasil é considerado um dos principais produtores mundiais de goiaba, tendo destaque a região sudeste onde o estado de São Paulo responde por 36% da produção nacional, seguido por Minas Gerais e Rio de Janeiro (OKAMOTO; KATO; BACCHI, 2009).

Existem diversos tipos de cultivares de goiaba que são desenvolvidas com interesse comercial. Algumas das cultivares mais representativas no Brasil incluem Paluma, Rica, Pedro Sato, Kumagai, Ogawa, Yamamoto e Século XXI (POMMER; MURAKAMI; WATLINGTON, 2006).

A cultivar Paluma é muito utilizada para renovação ou implantação de novos pomares, devido apresentar aptidão mista, ou seja, os frutos de melhor qualidade são destinados ao mercado de fruta *in natura* e o restante é destinado ao processamento, nas diferentes formas (sucos, doces, polpas). Os frutos possuem polpa vermelha, com poucas sementes, alta capacidade produtiva, com bom rendimento e alto teor de sólidos solúveis. A planta é vigorosa e proporciona boas respostas ao manejo de safra através da poda (RAMOS et al., 2011). É uma planta altamente produtiva (mais do que 50 toneladas/hectare), vigorosa e com boa tolerância a ferrugem (*Puccinia psidii* Wint.).

Figura 1 – *Psidium guajava*: (a): árvore; (b): tronco; (c,d): folha; (e): flores; (f): frutos
Fonte: Lorenzi (2008), Metwally et al. (2011), Stang (2007) e Stang (2008).

Pedro Sato é uma cultivar selecionada por produtores a partir de pomares constituídos por plantas propagadas por sementes, provavelmente de ‘Ogawa Vermelha N° 1’, no Rio de Janeiro, Brasil. Plantas vigorosas com produções relativamente altas; frutos levemente ovais, boa aparência (150 a 280 g), algumas vezes alcançando 400 g; casca bem

rugosa; polpa rosada, espessa e firme; sabor agradável e poucas sementes; na atualidade é a cultivar de casca rugosa mais plantada em São Paulo.

A cultivar Século XXI, lançada em 2003 foi obtida de cruzamento controlado entre Supreme-2 e Paluma (UNESP, Brasil), apresenta-se como uma planta muito produtiva com ciclo curto (130 dias do florescimento a colheita), frutos grandes (média de 200g) com polpa espessa (160 mm), rosea-avermelhada, ótimo sabor e com poucas e pequenas sementes (POMMER; MURAKAMI; WATLINGTON, 2006).

2.1.2 Aspectos fitoquímicos e farmacológicos

Os frutos são caracterizados por um baixo teor de carboidratos (13,2%), gorduras (0,53%), proteínas (0,88%) e por um alto conteúdo de água (84,9%). O ácido ascórbico é o constituinte principal da pele do fruto, sendo que na polpa varia desde 56 mg a 600 mg e pode variar entre 350 mg e 450 mg em frutos quase maduros (CHARLES, PHILIP; CARL, 2006). Entretanto, processamentos térmicos destroem cerca de 50% do ácido ascórbico. O odor forte do fruto é atribuído a compostos carbonílicos (DWECK, 2001).

Os estudos fitoquímicos das folhas mostram a predominância de taninos (5,5%), flavonoides calculados como quercetina (1%) e óleo essencial (0,2%, no mínimo). Os flavonoides derivados da quercetina encontrados na goiabeira evidenciaram atividades marcantes na inibição dos movimentos intestinais, diminuindo a permeabilidade capilar na cavidade abdominal. Os taninos e os óleos essenciais são responsáveis principalmente pela eficácia como agentes anti-inflamatórios e antimicrobianos, efetivos no tratamento da diarreia (OKAMOTO; KATO; BACCHI, 2009).

Segundo Alves et al. (2006), suas folhas apresentam a seguinte composição química: taninos (5-10%), óleo essencial rico em cariofileno, nerolidiol, β -bisaboleno, aromadendreno, p-selineno, α -pineno e 1,8-cineol; triterpenóides (ácido oleanólico, ursólico, catecólico, guaiavólico, maslínico) e β -citosterol. O caule possui taninos numa concentração de 12 a 30%.

No estudo de Vargas et al. (2006), foi verificado que em folhas maduras, as maiores concentrações de flavonoides foram encontradas no verão: miricetina (208,44 mg/kg), quercetina (2883,08 mg/kg), luteolina (51,22 mg/kg) e canferol (97,25 mg/kg). Flavonoides e

saponinas juntamente com ácido oleanólico foram isolados de folhas desta espécie (ARIMA; DANNO, 2002).

Furlan e Salatino (2006) também identificaram flavonoides em três variedades comerciais de *Psidium guajava*: Paluma, Pedro Sato e Sassaoca (produtoras de fruto de polpa vermelha). As folhas foram coletadas e submetidas à análise de flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) através de comparações com padrões de referência. As três variedades apresentaram perfis semelhantes, com presença de 14 picos, sendo a maioria correspondente aos derivados de quercetina.

De acordo com Lozoya et al. (2002), cápsulas de extrato das folhas de *Psidium guajava* L. padronizadas em quercetina e administradas por via oral em pacientes adultos com diarreia aguda resultaram na redução da dor abdominal nestes pacientes, confirmando o efeito anti-espasmódico.

A Tabela 1 apresenta alguns exemplos importantes de compostos isolados de *Psidium guajava* com atividade biológica relatada na literatura e suas respectivas estruturas químicas.

Tabela 1 – Exemplos de compostos isolados de *Psidium guajava* L.

Composto	Estrutura química	Atividade biológica	Referências
Ácido gálico		Efeitos cardioprotetores contra isquemia. Antioxidante.	Yamashiro et al. (2003)
Ácido protocatequínico		Antioxidante	Thaipong et al. (2005)
Quercetina		Efeito antidiarréia Efeitos antioxidante e espasmolítico	Zhang et al. (2003) Yamashiro et al. (2003)
Guaijaverin		Atividade antimicrobiana contra <i>Streptococcus mutans</i>	Prabu, Gnanamani e Sadulla (2006)
β-caroteno		Antioxidante	Palozza e Krinsky (1992)
Taninos		Agentes anti-inflamatórios e antimicrobianos	Metwally et al. (2011)

Fonte: Gutiérrez, Mitchel e Solis (2008) e Metwally et al. (2011).

Chah et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de folhas de goiaba através do método de difusão em agar. Os extratos foram analisados contra *Staphylococcus aureus* (4 cepas), *Escherichia coli* (2 cepas), *Pseudomonas aeruginosa* (1 cepa), *Proteus* spp. (3 cepas) e *Shigella* spp. (1 cepa), perfazendo um total de 11 microrganismos. Os autores relataram resultados promissores, pois os extratos de *Psidium guajava* mostraram atividade contra 9 dos microrganismos avaliados.

Segundo Qadan et al. (2005), extratos de folhas de goiaba têm potente atividade antimicrobiana contra *Propionibacterium acnes* e podem ser benéficos no tratamento da acne, tendo em vista que os extratos desta planta são conhecidos por terem atividade anti-inflamatória.

A Tabela 2 apresenta um resumo dos principais estudos encontrados na literatura que objetivam a avaliação da atividade antibacteriana de extratos obtidos com folhas de *Psidium guajava*.

Tabela 2 – Estudos antibacterianos de folhas de *Psidium guajava*.

Extrato	Microrganismo avaliado	Referências
Aquoso	<i>S. aureus</i> ; β -streptococcus grupo A <i>Salmonella paratyphi</i> <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Shigella flexneri</i> e <i>Shigella sonnei</i> , <i>Vibrio cholerae</i>	Jaiarj et al. (1999), Vieira et al. (2001), Lutterodt et al. (1999), Caceres et al. (1990), Etuk; Francis (2003)
Alcoólico	<i>Neurospora crassa</i>	Etuk; Francis (2003)
Etanol 50%	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> produtor de toxinas	Vieira et al. (2001) Jaiarj et al. (1999)
Metanólico	<i>S. aureus</i> ; β -streptococcus grupo A	Gonçalves et al. (2008) Nair; Chanda (2007)
Clorofórmico	<i>S. aureus</i> ; β -streptococcus grupo A	Jaiarj et al. (1999) Metwalli et al. (2010)
Acetônico	<i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i>	Vieira et al. (2001) Nair; Chanda (2007)

O estudo recente de Choudhury, Sharan e Sinha (2012) avaliou o extrato metanólico de folhas de *P. guajava* contra patógenos gastrointestinais clinicamente importantes como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Vibrio cholerae* e os resultados demonstraram que o extrato foi tóxico para todas as bactérias avaliadas.

Barbalho et al. (2012) apresentam uma importante revisão sobre as aplicações medicinais da planta *P. guajava* relatando que todas as partes da planta podem ser usadas para diferentes propostas tais como hepatoproteção, antioxidante, analgésica, anti-diarréia e antimicrobiana, entre outras.

Além da pronunciada atividade antibacteriana, estudos demonstram que extratos obtidos a partir de folhas de *P. guajava* possuem também alta atividade antifúngica (METWALLI et al., 2010; NAIR; CHANDA, 2007). Foi verificado que o extrato aquoso e o metanólico possuem atividade contra cepas de *Arthrimum sacchari* e *Chaetomium funicola* (SATO et al., 2000).

Além das atividades antimicrobianas, as folhas de goiaba apresentam acentuada atividade sequestrante de radicais livres através do método DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), atividade inibitória significativa da peroxidação lipídica e inibição da morte celular oxidativa induzida pelo H_2O_2 (METWALLY et al., 2011).

Qian e Nihorimbere (2004) estudaram extratos de folhas secas de *Psidium guajava* determinando o teor de fenóis totais e obtiveram um alto valor do conteúdo destes compostos ($575,3 \pm 15,5$ mg de Eq. ácido gálico/g peso seco de material) para o extrato etanólico, o que indica que as folhas são uma fonte potencial de antioxidantes naturais. Estas propriedades estão associadas com seus compostos fenólicos, tais como ácidos fenólicos e flavonoides.

De acordo com Witayapan, Songwut e Siriporn (2010), compostos fenólicos presentes nos extratos de folhas de goiaba podem apresentar atividade antioxidante através de ambos os mecanismos: sequestrante de radicais livres e do poder redutor.

Como extratos vegetais consistem em uma mistura de muitos tipos de compostos fenólicos, que têm capacidade antioxidante superior ou inferior, a detecção destes compostos é um trabalho complexo. Masuda et al. (2003) desenvolveram um método de detecção simples para compostos sequestrantes de radicais em extratos brutos de plantas com ação reconhecida como antioxidante. O método foi desenvolvido utilizando 1,1-difenil-2-picril (DPPH) como o reagente radical e requer o cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) para a detecção

dos componentes antioxidantes. O desaparecimento ou diminuição da intensidade do pico, o qual é induzido pela adição do DPPH, é monitorado por CLAE para detectar o composto sequestrante de radicais mais poderoso presente no extrato. As plantas avaliadas neste estudo foram *Psidium guajava*, *Citrus depressa* e *Hypericum chinense*. No extrato de *Psidium guajava* foi identificado o pico referente ao ácido elágico. A intensidade do pico em 36,8 minutos foi diminuída pela adição do DPPH (concentração final de radical DPPH adicionada de 1,5 mM) quando comparado com os dados originais.

No estudo de atividade antioxidante expressa por % de inibição utilizando o radical livre DPPH do extrato liofilizado das folhas de goiaba, o ácido ascórbico foi um antioxidante substancialmente mais forte (94,38%) do que os extratos (82,74% para o extrato etanólico e 75,13% para o extrato aquoso) na maior concentração (0,5 mg/mL) (QIAN; NIHORIMBERE, 2004). Estas propriedades antioxidantes estão associados com compostos fenólicos tais como ácido protocatequínico, o ácido ferúlico, quercetina, guavin B (THAIPONG et al., 2005), o ácido ascórbico, o ácido gálico e ácido cafeico (JIMENEZ et al., 2001).

Existem relatos de outros usos das folhas de goiaba. A infusão do extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* quando administrada intraperitonealmente em doses de 2 e 5 g/kg em ratos (Wistar) diminuiu a frequência de tosse induzida por aerossol de capsaicina em 35 e 54%, respectivamente, em comparação com o grupo controle (não recebeu o extrato das folhas de goiaba, como também a substância antitússígena de referência) durante 10 minutos ($p < 0,01$). Porém, a atividade antitússígena foi menos potente que a dose de 3 mg/kg de dextrometorfano, o qual diminuiu em 78% a frequência da tosse (JAIARJ et al., 1999).

P. guajava possui também atividade antiúlcera tendo efeito inibitório da secreção de ácido no modelo de úlcera gástrica induzida por aspirina mediada através de prostaglandinas (DAS; DUTTA; DEKA, 2009).

As folhas de goiaba são usadas como remédio popular para o tratamento do diabetes no Japão, na Ásia Oriental (NIEN-YUNG; KUANG-HSIUNG, 2004) e na África (OJEWOLE, 2005). O efeito da casca, folhas e fruto de *Psidium guajava* como agentes antidiabéticos foi estudado por vários autores (MUKHTAR et al., 2004; MUKHTAR et al., 2006; OH et al., 2005; OJEWOLE, 2005). No estudo de Cheng, Shen e Wu (2009) foram investigados o efeito hipoglicemiante do extrato de folhas de goiaba em hepatócitos clonados e isolados de fígado normal de ratos *Sprague-Dawley* além de identificar o composto ativo pelo respectivo efeito através do fracionamento do extrato. Os resultados mostraram que o extrato das frações de alta polaridade das folhas de goiaba aumentou a absorção de glicose de

hepatócitos clonados dos ratos. O flavonoide quercetina foi isolado e identificado como o principal composto ativo que pode desempenhar um papel importante no efeito anti-hiperglicêmico do extrato de folhas de goiaba, promovendo a absorção da glicose nas células do fígado.

Portanto, baseado nas diversas linhas de evidências científicas sobre as atividades biológicas desta planta associado a importância de se obter produtos secos de extratos de plantas com propriedades adequadas para possíveis formulações fitoterápicas, a espécie *Psidium guajava* foi selecionada para este estudo. É importante ressaltar que de todos os estudos encontrados na literatura com esta planta nenhum foi realizado visando a obtenção, padronização e avaliação da atividade biológica de extratos secos obtidos pelo método de secagem em *spray dryer*.

2.2 Aspectos envolvidos na padronização e estabilização de extratos vegetais

Existe uma grande preocupação com relação à qualidade das drogas e seus derivados quando se trata do uso de plantas medicinais na terapêutica, a qual tem início na identificação correta da espécie, etapa não menos importante do que o seu plantio, colheita e beneficiamento. Isto se aplica também no modo de preparo dos extratos vegetais e medicamentos. Diversos fatores influenciam a qualidade final da droga vegetal e dos seus derivados, tais como: variações climáticas, tipo de solo empregado no plantio, época da colheita, características genéticas da planta, condições de secagem, tempo de armazenamento, entre outros fatores (MICHELIN et al., 2010).

A transformação de uma planta num medicamento deve priorizar a preservação da integridade química dos princípios ativos e consequentemente, a ação farmacológica do vegetal, garantindo a constância da ação biológica desejada. Para atingir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer estudos prévios relativos aos aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, e de desenvolvimento de metodologias analíticas (KLEIN et al., 2009).

Entende-se por qualidade o conjunto de critérios que caracterizam tanto a matéria-prima quanto o produto final. A eficácia é dada pela comprovação, através de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, e efeitos biológicos. A segurança é determinada pelos ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos, bem como pela inexistência de

contaminantes nocivos à saúde (metais pesados, agrotóxicos, microrganismos e seus produtos de degradação) (KLEIN et al., 2009).

Plantas medicinais produzem diferentes metabólitos secundários (alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas, entre outros) e o fazem em diferentes proporções, dependendo do habitat, da pluviosidade, do oferecimento de luz às plantas, das características dos solos, enfim, das características edafo-climáticas, além do seu potencial genético. Alguns metabólitos secundários são característicos de uma determinada espécie vegetal, servindo como parâmetros para a sua caracterização e identificação (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

O desenvolvimento de um fitoterápico padronizado agrega um valor tecnológico no desenvolvimento da forma farmacêutica contendo plantas medicinais, ao contrário das formas farmacêuticas que contém apenas o material vegetal moído, além de garantir a qualidade e eficácia do medicamento. Para isto, inicialmente deve-se fazer um levantamento bibliográfico na literatura científica e popular enfocando a droga vegetal e suas propriedades químicas e farmacológicas. Através do levantamento bibliográfico pode-se selecionar uma espécie por meio de pesquisa quimiotaxonômica (onde aspectos morfológicos associados à identificação de grupos botânicos podem indicar a presença de determinados grupos químicos que tenham atividade farmacológica). Posteriormente, coleta-se um espécime da planta prepara-se uma exsicata e faz-se a identificação botânica e o registro em um herbário oficial (TOLEDO et al., 2003 *apud* KLEIN et al., 2009). Em paralelo, fazem-se os estudos fitoquímicos que compreendem as etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação de constituintes do vegetal, sobretudo aqueles originários do metabolismo secundário, responsáveis, ou não, pela ação biológica. O estabelecimento de marcadores químicos, que são substâncias químicas características de determinada espécie vegetal são indispensáveis ao planejamento e monitoramento das ações de transformação tecnológica, bem como aos estudos de estabilidade dos produtos intermediários e finais (SONAGLIO et al., 2007 *apud* KLEIN et al., 2009; TOLEDO et al., 2003).

A avaliação da atividade biológica constitui uma etapa importante no processo de produção de um fitoterápico. Esta avaliação inclui a investigação da atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas, frações obtidas ou extratos brutos da droga vegetal. A necessidade de constatar e verificar a atividade biológica de uma planta e dos produtos derivados pode ser abordada sob dois aspectos. O primeiro considera a necessidade de comprovação de uma determinada atividade farmacológica ou toxicológica já atribuída à planta pela medicina popular. O segundo aspecto é o de que esta etapa mostra-se

indispensável no estabelecimento de estratégias de desenvolvimento tecnológico, no qual a validação do processo tecnológico exige a conservação da composição química e, sobretudo, da atividade biológica a ser explorada.

Os métodos analíticos permitem a avaliação da qualidade do produto fitoterápico, garantindo, assim, a constância de ação terapêutica e a segurança de utilização (SONAGLIO et al., 2007 *apud* KLEIN et al., 2009; TOLEDO et al., 2003). Nesse sentido, se destaca a avaliação do teor de substância ou grupo de substâncias ativas e do perfil qualitativo dos constituintes químicos de interesse, presentes na matéria-prima vegetal, produtos intermediários e produto final, empregando-se testes espectrofotométricos, cromatográficos, físicos, físico-químicos ou químicos, os quais devem possuir especificidade, exatidão, precisão e tempo de rotina analítica, para que possam ser utilizados em estudos de estabilidade, permitindo, inclusive, a detecção de produtos oriundos da degradação de substâncias ativas e/ou de marcadores químicos (LOPES; BRUSCHI et al., 2009; LOPES; ROCHA et al., 2009; LOPES; SANCHES et al., 2009; PELOZO; CARDOSO; MELLO, 2008; TOLEDO et al., 2003 *apud* KLEIN et al., 2009).

Na produção de um fitoterápico, deve-se utilizar das monografias farmacopeicas, quando disponível, para matérias-primas e produto acabado, sendo necessário que se conduza os ensaios e se observe os limites de aceitação estabelecidos pelo compêndio. Quando não houver monografias disponíveis nas farmacopeias reconhecidas, outra possibilidade é a de se estabelecer os ensaios realizados em cada caso observando-se as exigências regulatórias. Muitas das espécies vegetais utilizadas atualmente na produção de fitoterápicos não possuem monografias e tal fato se agrava ainda mais ao se considerar que, para produtos finais, o número de monografias existentes é ainda muito limitado.

Baseado nisto, levando-se em conta as exigências da RDC nº 14/2010 (BRASIL, 2010a), a qual dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e da RDC nº 17/2010 (BRASIL, 2010b) que dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos, as especificações para matérias-primas vegetais e fitoterápicos devem incluir, ao menos, as seguintes informações, quando aplicáveis.

Para a droga vegetal: segundo a RDC nº 14/2010 é a planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada.

I – testes de autenticidade, caracterização organoléptica, identificação macroscópica e microscópica;

II – descrição da droga vegetal em farmacopeias reconhecidas pela ANVISA, ou, em sua ausência, publicação técnico-científica indexada ou laudo de identificação emitido por profissional habilitado;

III – testes de pureza e integridade incluindo:

- a) cinzas totais e/ou cinzas insolúveis em ácido clorídrico;
- b) umidade e/ou perda por dessecação;
- c) pesquisa de matérias estranhas;
- d) pesquisa de contaminantes microbiológicos;
- e) pesquisa de metais pesados;
- f) resíduos de pesticidas e fumigantes*; e
- g) radioatividade*;

IV – método de estabilização, quando empregado, secagem e conservação utilizados, com seus devidos controles, quando cabível;

V – método para eliminação de contaminantes, quando empregado, e a pesquisa de eventuais alterações;

VI – avaliação da ausência de aflatoxinas, a ser realizada quando citada em monografia específica em Farmacopeia reconhecida ou quando existir citação em literatura científica da necessidade dessa avaliação ou de contaminação da espécie por aflatoxinas;

VII – local de coleta;

VIII – perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica; e

IX – análise quantitativa do(s) marcador(es) ou controle biológico.

*A RDC nº 14/2010 não explicou a necessidade de realização de testes para avaliação de pesticidas e fumigantes e de radioatividade em materiais vegetais. No entanto, a RDC nº 17/2010 incluiu estes testes entre as informações mínimas a serem fornecidas pelo fabricante.

Para o derivado vegetal: de acordo com a RDC nº 14/2010 é o produto da extração da planta medicinal in natura ou da droga vegetal, podendo ocorrer na forma de extrato, tintura, alcoolatura, óleo fixo e volátil, cera, exsudato e outros.

I – solventes, excipientes e/ou veículos utilizados na extração do derivado;

II – relação aproximada droga vegetal:derivado vegetal;

III – testes de pureza e integridade incluindo:

- a) pesquisa de contaminantes microbiológicos;
- b) pesquisa de metais pesados; e
- c) resíduos de solventes (para extratos que não sejam obtidos por etanol e/ou água);

IV - método para eliminação de contaminantes, quando empregado, e a pesquisa de eventuais alterações;

V – caracterização físico-química do derivado vegetal incluindo:

- a) caracterização organoléptica, resíduo seco, pH, teor alcoólico e densidade (para extratos líquidos);
- b) umidade/perda por dessecação, solubilidade e densidade aparente para extratos secos;
- c) densidade, índice de refração, rotação óptica (para óleos essenciais);
- d) índice de acidez, de éster, de iodo (para óleos fixos);

VI - avaliação da ausência de aflatoxinas, a ser realizada quando citada em monografia específica em Farmacopeia reconhecida ou quando existir citação em literatura científica da necessidade dessa avaliação ou de contaminação da espécie por aflatoxinas;

VII – perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica; e

VII - análise quantitativa do(s) marcador(es) ou controle biológico.

O presente estudo foi desenvolvido considerando a necessidade de se desenvolver trabalhos com base na padronização e estabilização de extratos vegetais e do estabelecimento de protocolos de produção, controle de qualidade e avaliação da atividade biológica. Desta forma, os resultados obtidos contribuirão para a geração de conhecimentos sobre o desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos.

2.2.1 Métodos empregados na extração de princípios ativos

Vários pesquisadores têm estudado o processo de extração de princípios ativos aplicado a plantas medicinais. A finalidade destes estudos é o desenvolvimento de

metodologias adequadas para avaliar a influência dos parâmetros de extração de compostos ativos obtidos a partir de marcadores de fitomedicamentos (NORIEGA et al, 2012).

De acordo com o tipo do solvente utilizado e o método de extração, diferentes tipos de substâncias são extraídos e consequentemente a atividade biológica pode ser alterada (SOUZA; GEORGETTI et al., 2009).

A extração dos constituintes químicos de matérias-primas vegetais consiste em um processo onde ocorrem os seguintes fenômenos: contato do material vegetal com o solvente, quando há a hidratação do material, possibilitando a permeabilidade das paredes celulares; solubilização dos constituintes químicos da planta de maneira seletiva e transferência de massa dos constituintes químicos do material vegetal para o solvente por difusão ou processo osmótico (LIST; SCHMIDT, 1989).

Na escolha de um solvente, deve ser considerada a toxicidade e/ou os riscos que seu manuseio representa, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade e o custo do solvente, além da eficiência do processo extrativo.

Praticamente todos os constituintes de interesse para uma análise fitoquímica apresentam alguma solubilidade em misturas etanólicas ou metanólicas a 80%, de tal modo que estas são empregadas com frequência (SIMÕES et al., 2010).

Existem vários métodos de extração para a obtenção da solução extrativa. Entre os métodos extrativos encontram-se os métodos convencionais e clássicos como maceração estática, percolação e extração por Soxhlet os quais são recomendados pela Farmacopeia Brasileira (2010). Além destes, métodos extrativos mais modernos como maceração dinâmica (CORTÉS-ROJAS et al., 2012; LIANG; QIAN; YAO, 2005; OLIVEIRA; BOTT; SOUZA, 2006; SOUZA et al., 2008), extração assistida por ultrassom (NANTITANON; YOTSAWIMONWAT; OKONOGI, 2010; PÉREZ-SERRADILLA; PRIEGO-CAPOTE; LUQUE DE CASTRO, 2007), extração assistida por micro-ondas (FANG et al., 2009; PÉREZ-SERRADILLA; LUQUE DE CASTRO, 2011), extração com fluido super crítico (BISCAIA; FERREIRA, 2009), com fluido super crítico e dióxido de carbono (SC-CO₂) (BIMAKR, et al., 2012) extração assistida por infravermelho (CHEN, Y. et al., 2010) são eficazes tanto na redução do tempo de extração quanto no consumo de solventes.

Com relação ao método de extração, existem importantes aspectos a serem considerados como a agitação, a temperatura e o tempo necessário para garantir a extração dos compostos ativos de interesse.

A agitação pode abreviar de modo considerável a duração de um processo extrativo, tendo em vista que o processo de extração depende de fenômenos de difusão e que a renovação do solvente em contato com as substâncias a dissolver desempenha um papel importante na velocidade de dissolução. O aumento da temperatura possibilita o aumento da solubilidade de todas as substâncias, sendo assim, os métodos de extração a quente são mais rápidos do que aqueles realizados a temperatura ambiente. No entanto, o calor não pode ser empregado sempre, pois muitas substâncias são instáveis em altas temperaturas. Como a composição química das plantas é muito complexa, com frequência ocorre a extração simultânea de vários tipos de substâncias, com atividade farmacológica ou não e que podem ser desejadas ou não (SIMÕES et al., 2010).

Diante do exposto e baseado em trabalhos desenvolvidos no laboratório (CORTÉS-ROJAS et al., 2012; SOUZA; GEORGETTI et al., 2009), o método e a solução extrativa empregados neste estudo foi a maceração com aquecimento e agitação e etanol:água (70:30 v/v). Mistura etanol:água, quando usada como solvente extrator facilita a extração de substâncias polares e apolares (SOUZA et al., 2008). O etanol é utilizado na extração de agliconas, ceras, sapogeninas e sesquiterpenos. É miscível com água em todas as proporções. A água é um dos líquidos extratores mais importantes, sendo utilizada na extração de substâncias hidrofílicas, como aminoácidos, açúcares, alcaloides na forma de sal, heterosídeos flavonoídicos e mucilagens (SIMÕES et al., 2010).

Considerando a adequação tecnológica de solventes para a extração, a mistura hidroalcoólica cumpre o papel de ter a facilidade de sua eliminação da solução extrativa como também a reduzida toxicidade para o ser humano.

2.2.2 Secagem de extratos vegetais

Novas possibilidades tecnológicas para a obtenção de extratos secos de plantas medicinais têm estimulado a produção de fitoterápicos. Tendo em vista que a tendência das indústrias farmacêuticas brasileiras é a substituição de formas fluidas tradicionais pelo extrato na forma de pó, os extratos secos representam um campo em significativa expansão. Os extratos secos possuem várias vantagens como maior estabilidade física, química e microbiológica, além da possibilidade de padronização dos princípios ativos (OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009).

Estes atributos são, contudo, dependentes das fases de processamento durante a produção. A finalidade da secagem é concentrar os princípios ativos e aumentar a estabilidade do produto, permitindo períodos mais longos de armazenamento e facilitar o transporte com a redução do peso. No entanto, as condições de operação utilizadas na secagem e processamento térmico de bioprodutos têm efeitos sobre as propriedades físico-química e custos do produto (RAGHAVAN; ORSAT, 1998; SOUZA; OLIVEIRA, 2005).

As principais técnicas de secagem para a área farmacêutica empregadas na obtenção de extratos secos são a secagem por leito de jorro, a secagem por nebulização ou atomização (*spray drying*) e a secagem por liofilização ou *freeze-drying*. O *spray dryer* é frequentemente usado em processos industriais que envolvem a geração e secagem de gotículas líquidas.

A operação de secagem e o tipo de secador utilizado dependem de vários fatores, dentre os quais, das propriedades físicoquímicas da alimentação e do produto desejado, propriedades da misturas entre o gás de secagem e o vapor do solvente removido, da cinética de secagem do material, e das propriedades higroscópicas, representadas por suas isotermas de sorção. A cinética de secagem pode ser definida como a quantidade de umidade removida do material a ser seco em função do tempo e por unidade de área (OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009).

A cinética de secagem de gotículas que contêm componentes sólidos é normalmente dividida em duas fases de secagem. Na primeira etapa de secagem, a gota com excesso de líquido é submetida ao fluxo de gás de secagem (ar, nitrogênio etc), ganha calor sensível e começa a evaporar-se a partir da superfície. A evaporação do líquido resulta em encolhimento do diâmetro das gotículas e aumento simultâneo da concentração de sólidos nas proximidades da superfície da gota. Isto leva à precipitação da fração sólida na superfície das gotículas e, eventualmente, a superfície torna-se coberta por uma camada de componentes sólidos chamada crosta. Neste momento, a gota se transforma em uma partícula molhada e a segunda fase de secagem começa. Neste estágio, o processo de secagem é dificultado pela resistência adicional à transferência de massa por causa da camada de crosta. A segunda fase de secagem continua até que o conteúdo de umidade da partícula reduz ao valor de equilíbrio com o meio de secagem. Depois que o processo de secagem realmente termina, a temperatura da partícula se eleva a temperatura de equilíbrio, como mostrado na Figura 2.

Figura 2 - Típicas evoluções de temperatura de secagem de gotículas atomizadas em corrente gasosa aquecida. D_0 : diâmetro inicial; D_p : diâmetro da partícula; D_i : diâmetro interno
 Fonte: Mezhericher, Levy e Borde (2010).

Pode-se observar na Figura 2, que o intervalo entre os pontos 0 e 1 é correspondente ao aquecimento inicial das gotículas. O período entre os pontos 1 e 2 está relacionado ao período de evaporação das gotas, o intervalo entre os pontos 2 e 3 à segunda fase de secagem, e, finalmente, o período entre os pontos 3 e 4 designa o aquecimento da partícula até o equilíbrio com o agente secante circundante (MEZHERICHER; LEVY; BORDE, 2010).

A complexidade dos fenômenos que ocorrem durante a secagem, tem levado pesquisadores a proporem numerosas teorias e modelos empíricos visando à descrição do processo de secagem. Entretanto, na maioria das vezes é necessário recorrer à experimentação para a obtenção de informações relevantes sobre o efeito da secagem sobre as propriedades do produto (OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009).

A obtenção de um produto à base de plantas medicinais possui diferentes aspectos, dependendo se a substância ativa está na forma de droga vegetal ou como preparação derivada da droga vegetal. Tendo em vista que muitos fatores podem afetar a qualidade de produtos de plantas medicinais, incluindo clima, período de colheita e processamento pós-colheita, processos de padronização são requisitos básicos para garantir um nível consistente e adequado das substâncias ativas, garantindo a eficácia e qualidade do produto, visto que condições diferentes de processamento podem levar a produtos com qualidades diferentes

(BAUER, 1998; SOUZA; OLIVEIRA, 2006; SOUZA, 2007). Isto não é uma tarefa fácil devido a plantas e suas preparações serem (ao contrário de drogas sintéticas) misturas complexas de componentes com diferentes características físico-químicas (BAUER, 1998; RATES, 2001; SOUZA; OLIVEIRA, 2006).

Assim, o estudo e avaliação de processos de secagem visando à produção de extratos secos de plantas medicinais e aromáticas é um fascinante tema de pesquisa.

Oliveira, Bott e Souza (2006) utilizaram o leito de jorro e *spray dryer* para a produção de extratos padronizados de três plantas medicinais brasileiras: *Bauhinia forficata*, *Maytenus ilicifolia* e *Passiflora alata*. De acordo com estudos prévios dos autores, o adjuvante dióxido de silício coloidal foi adicionado aos extratos concentrados das plantas antes da secagem para melhorar o desempenho do processo. O produto final obtido pela secagem no leito de jorro apresentou maior concentração de marcadores químicos do que o *spray dryer* mesmo os dois processos operando a similar temperatura do gás de entrada. Os diâmetros médios das partículas dos extratos secos em leito de jorro (de 10,7 a 12,2 mm) foram aproximadamente 20% menor que o dos extratos secos em *spray dryer* (de 13,8 para 16,5 mm). Quanto à morfologia das partículas, aquelas formadas no leito de jorro foram irregulares e com forma de flocos, enquanto que, no *spray dryer* foram obtidas alta proporção de partículas arredondadas. Os resultados do estudo foram indicativos da viabilidade do leito de jorro para a produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais como um processo alternativo ao *spray dryer* (OLIVEIRA; BOTT; SOUZA, 2006).

Bott, Labuza e Oliveira (2010) realizaram uma pesquisa com extratos secos da planta *Passiflora alata* analisando a estabilidade em condições de *stress* dos extratos secos em leito de jorro e *spray dryer*. O adjuvante dióxido de silício coloidal foi adicionado ao extrato concentrado antes da secagem, a fim de reduzir a adesividade do produto durante a secagem. Observou-se que os extratos secos desta planta em *spray dryer* e leito de jorro foram muito higroscópicos. Os extratos secos de plantas medicinais são uma mistura muito complexa de substâncias químicas e cada uma provavelmente degrada a uma taxa diferente. O conhecimento completo da composição do produto durante o tempo de armazenamento e seu efeito sobre a atividade farmacológica dessas preparações é muito difícil. Portanto, testes de estabilidade de preparações de drogas vegetais devem incluir também outros ensaios para assegurar que em geral a estabilidade do produto seja mantida (BOTT; LABUZA; OLIVEIRA, 2010).

Osório, Forero e Carriazo (2011) estudaram a microencapsulação do extrato aquoso de frutos de goiaba pelo *spray dryer*. Foram utilizados como adjuvantes de secagem a maltodextrina, goma arábica e suas misturas. O uso de goma arábica melhorou a fluidez durante o processo de secagem, mas produziu um sabor residual indesejável e diminuiu a estabilidade térmica dos pós microencapsulados. A retenção de aromas voláteis da goiaba foi confirmada. As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram microcápsulas esféricas e análises térmicas mostraram uma maior estabilidade térmica dos pós com maltodextrina. Sendo assim, os autores concluíram que a microencapsulação é uma alternativa útil para preservar as propriedades sensoriais e biofuncionais da goiaba em produtos transformados.

Segundo Liu et al. (2011), o controle de qualidade é um problema na medicina tradicional chinesa. Sabe-se que as propriedades físicas e químicas de produtos são influenciadas por diferentes técnicas de secagem (FAUSTINO; BARROCA; GUINÉ, 2007). Os autores investigaram um método de secagem à vácuo de extratos de *Panax notoginseng* e compararam os resultados com outros métodos de secagem (liofilização ou *freeze drying*, outros métodos à vácuo e a secagem por nebulização ou *spray drying*). Os resultados mostraram que o processo de secagem à vácuo possui vantagens para extratos desta planta, como menor teor de umidade do produto final, menor tempo de secagem, e maior atividade sequestrante de radicais peróxido de hidrogênio.

Portanto, um método recomendável de secagem deve evitar alterações indesejáveis e manter a boa qualidade de produto seco (LIU et al., 2011).

2.2.3 Adjuvantes de secagem

A composição dos extratos vegetais é uma provável causadora de dificuldades durante o processo de secagem por *spray dryer*. Extratos de plantas contêm muitos compostos que demonstram alta adesividade sob as condições de secagem (por exemplo, açúcares de baixo peso molecular e ácidos orgânicos), o que tende a aumentar depósitos de materiais úmidos nas paredes da câmara do secador (SOUZA; OLIVEIRA, 2006). Portanto, geralmente são adicionadas substâncias (os adjuvantes ou carreadores de secagem), destinadas a alterar as propriedades físico-químicas da composição a ser seca, de forma a facilitar o processo de secagem (SOLLOHUB; CAL, 2010).

A adição de adjuvantes de secagem a solução extrativa que será submetida ao processo de secagem pode melhorar o desempenho do secador e as propriedades tecnológicas dos extratos secos de plantas (SOUZA; OLIVEIRA, 2006).

Na indústria farmacêutica, a seleção correta de adjuvantes de secagem é uma etapa importante para garantir a estabilidade e a qualidade do produto final, tendo em vista que os adjuvantes podem afetar fortemente a biodisponibilidade do produto. Para serem utilizados em produtos farmacêuticos, os adjuvantes devem ter inércia química, serem inócuos, seguros e ter estabilidade térmica (PIFFERI; RESTANI, 2003).

Maltodextrina, goma arábica, β -ciclodextrina e dióxido de silício coloidal, dentre outros, têm sido usados para melhorar os produtos de extratos de plantas secos em *spray dryer* (CORTÉS-ROJAS; OLIVEIRA, 2012; SOUZA 2007; SOUZA; OLIVEIRA, 2012).

Polímeros e gomas, adicionados aos extratos antes da atomização, aumentam a temperatura de transição vítrea, sendo muito úteis para fins de microencapsulação, com o objetivo de proteger compostos sensíveis contra condições adversas, aumentar a sua estabilidade ou mesmo promover liberação controlada (RÉ, 1998).

Os adjuvantes de secagem utilizados no presente estudo estão relacionados a seguir, sendo apresentadas informações relevantes sobre seus usos e propriedades físicas tais como: higroscopicidade, características de compressão, fluidez, estrutura molecular, solubilidade e toxicidade.

- Dióxido de silício coloidal

O dióxido de silício coloidal apresenta um tamanho de partícula pequeno e grande área de superfície específica. Estas características são exploradas para melhorar as propriedades de fluxo de pós em vários processos como compressão e enchimento de cápsulas (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Este excipiente tem sido amplamente empregado por apresentar inércia química, inocuidade, estabilidade térmica, e segurança, propriedades necessárias de um legítimo excipiente farmacêutico (SOUZA; OLIVEIRA, 2006).

Cortés-Rojas e Oliveira (2012) investigaram os efeitos de diferentes métodos de secagem e adjuvantes de secagem no desempenho do sistema e nas propriedades físico-químicas de extratos hidroalcolicos de *Bidens pilosa*. Os adjuvantes utilizados foram dióxido de silício coloidal (Aerosil®), β -ciclodextrina, maltodextrina e celulose microcristalina. A

composição de secagem contendo Aerosil mostrou melhores propriedades de fluxo em comparação com as outras composições.

Na literatura encontram-se vários trabalhos utilizando dióxido de silício coloidal na secagem de extratos vegetais (BOTT; LABUZA; OLIVEIRA, 2010; GEORGETTI et al., 2008; SOUZA; DONIDA et al., 2009; SOUZA; GEORGETTI et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2005).

Embora este tipo de adjuvante de secagem tenha sido sugerido para produzir extratos secos de planta através do *spray dryer*, a seleção das condições de operação do secador e a concentração de adjuvante para a produção de pós não pode ser transferida diretamente de outros sistemas de planta/adjuvante (GALLO et al., 2011).

O excipiente dióxido de silício coloidal, Aerosil[®] 200 (Degussa Brasil Ltda) (Figura 3) é amplamente usado em produtos farmacêuticos tópicos e orais devido a sua ausência de toxicidade. Entretanto, é necessário cuidado ao manipulá-lo. Por ser um pó fino, sua inalação pode causar irritação no trato respiratório (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

Figura 3 – Estrutura molecular do dióxido de silício coloidal
Fonte: Rowe, Sheskey e Owen (2006).

- *Celulose microcristalina*

A celulose microcristalina (ex. MC-102, Microcel, Blanver Farmoquímica Ltda) (Figura 4) é obtida da despolimerização da celulose, sendo um pó branco, inodoro, insípido, composto de partículas porosas. É comercialmente disponível em diferentes tamanhos de partículas e grau de umidade que apresentam diferentes propriedades e aplicações. É amplamente usada em formulações farmacêuticas orais, como na formulação de comprimidos (ABUSHAMMALA; HASHAIKEH; COONEY, 2012; CORTÉS-ROJAS; OLIVEIRA, 2012; KAMEL et al., 2008) e produtos alimentícios.

Figura 4 – Estrutura molecular da celulose microcristalina
Fonte: Rowe, Sheskey e Owen (2006).

- Maltodextrina

A maltodextrina (CORTÉS-ROJAS; OLIVEIRA, 2012; COSTA-SILVA et al., 2010; MOREIRA et al., 2009) e goma arábica são muito utilizadas na secagem de sucos de frutas (TONON et al., 2009) resultando em pós com baixo conteúdo de umidade, valores de atividade de água (A_w), bem como boa solubilidade e pequena higroscopicidade. A maltodextrina é um polímero de glicose com pesos moleculares variados obtidos a partir da hidrólise ácida ou enzimática do amido (Figura 5). Diferentes classes de maltodextrina estão disponíveis no mercado para aplicações farmacêuticas e alimentícias. Estas classes têm diferentes propriedades físicas tal como solubilidade e viscosidade dependendo do seu valor de dextrose equivalente (DE) que é a medida da extensão da hidrólise do polímero de amido. A solubilidade, higroscopicidade, sabor doce e compressibilidade da maltodextrina aumentam com o aumento da DE.

Figura 5 – Estrutura molecular da unidade de maltodextrina
Fonte: Cacareto et al. (2010).

- Goma arábica

A goma arábica (Encapsia – Colloides Natural do Brasil) (NADEEM; TORUN; ÖZDEMİR, 2011; PARAMITA et al., 2010;) é um heteropolissacarídeo complexo com estrutura muito ramificada (Figura 6) obtido da seiva da árvore do gênero *Acácia* com várias espécies distribuídas nas regiões de clima tropical e subtropical. É um material praticamente inodoro, insípido, solúvel em água, atóxico e fracamente ácido. Dentre suas principais vantagens, destacam-se sua habilidade emulsificante e a boa retenção de compostos voláteis nos produtos secos por *spray drying* (TONON, 2009). A goma arábica é amplamente utilizada, isoladamente ou em misturas com maltodextrina na encapsulação de óleos essenciais (FERNANDES, 2008; FERNANDES; CANDIDO; OLIVEIRA, 2012; REINER; REINECCIUS; PEPPARD, 2010).

Figura 6 – Estrutura molecular da goma arábica (*Acacia senegal*). A = arabinosil; círculos preenchidos = 3-galactose; círculos vazios = 6-galactose (galactose ou ácido glucurônico ou grupo final); R₁ = raminose-ácido glucurônico; R₂ = galactose-3arabibose; R₃ = arabinose-3arabinose-3arabinose

Fonte: Stephen (1995).

- Ciclodextrinas

A β -ciclodextrina, amplamente utilizada (Figura 7) é um oligossacarídeo cristalino cíclico obtido da modificação do amido pela ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase. Atua como agente solubilizante e estabilizante.

Existem vários tipos de ciclodextrinas (CD) como α CD, β CD, γ CD e derivados como hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) e sulfobutileter- β -ciclodextrina (SBE β CD), as quais diferem umas das outras pelas unidades de glicose. CD são oligossacarídeos cíclicos derivados de amido contendo seis (α CD), sete (β CD), oito (γ CD), ou mais unidades (α -1,4)

ligadas a α -D-glicopirranose (LARSEN, 2002). Devido à conformação das cadeias das unidades de glicopirranose, as CD tomam a forma de um cone truncado ao invés de um cilindro perfeito (BONE, 2006; HAKKARAINEN et al., 2005).

CD são úteis farmacêuticamente porque podem interagir com as moléculas da droga para formar complexos de inclusão. Esta formação de um complexo de inclusão, frequentemente possui uma interação de 1:1, embora complexos de maior ordem sejam muitas vezes vistos ou postulados (STELLA; HE, 2008). As propriedades complexantes são capazes de promoverem o aumento da solubilidade, dissolução e biodisponibilidade de fármacos poucos solúveis (CORTÉS-ROJAS; OLIVEIRA, 2012; NADEEM; TORUN; ÖZDEMİR, 2011). Portanto, formando o complexo, as propriedades físico-químicas e biológicas de fármacos podem ser alteradas podendo ser uma vantagem (STELLA; HE, 2008).

Figura 7 – Estrutura molecular da β -ciclodextrina com 7 unidades de glicose
Fonte: Rowe, Sheskey e Owen (2006).

- Amidos modificados

Amidos modificados são usados em muitos alimentos e cosméticos como emulsionantes e estabilizadores (ANWAR; KUNZ, 2011; NAIR; YAMARIK; ANDERSEN, 2002).

O excipiente amido alumínio octenilsuccinato, cuja fórmula molecular é $C_{21}H_{44}O_3$ (Dry Flo PC - National Starch Food Innovation), é um amido natural hidrofobicamente modificado, derivado do amido de milho. Pó de partículas finas, uniformes e fluidas, na pele atua como talco, de modo que absorve a umidade excessiva. Reduz a viscosidade e adesividade, suaviza e seca a pele. É hidrofóbico e confere ao produto seco um bom índice de fluidez.

2.3 Secagem por nebulização ou *spray drying*

Na seleção do processo de secagem existem fatores de grande importância como o custo do produto a ser processado, propriedades físicas e químicas, sensibilidade térmica, forma de utilização do produto etc. Uma seleção mais rigorosa fundamenta-se também no conhecimento da cinética de secagem do material, propriedades de equilíbrio, propriedades do agente de secagem (em geral ar), propriedades físicas e químicas iniciais e do produto seco, entre outras (OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009).

Por definição, a secagem por nebulização ou atomização ou *spray drying* é a transformação de um material a partir de um estado líquido para uma forma particulada seca por nebulização da suspensão de alimentação no meio do gás quente de secagem. A produção de partículas secas a partir de um líquido de alimentação em uma única etapa de processamento faz com que a secagem por nebulização seja um processo único e importante.

O delineamento de um processo de secagem por nebulização inclui a otimização das condições de operação que aumentam a recuperação do produto e gera um produto com uma especificação de qualidade predefinida (OLIVEIRA; BOTT; SOUZA, 2006). Dentre as vantagens desta técnica, encontram-se as possibilidades de alimentação direta e contínua de materiais líquidos, aplicação em escala de poucas gramas até várias toneladas por hora, obtenção de produto na forma de pó, modulação das propriedades físico-químicas dos materiais particulados obtidos (MASTERS, 1991).

O gás geralmente utilizado é o ar, ou mais raramente um gás inerte como o nitrogênio. O material de alimentação inicial no nebulizador pode ser uma solução, uma emulsão ou uma suspensão. A secagem por nebulização produz, dependendo do material de alimentação de partida e das condições de operação, um pó muito fino (10-50 μm) ou partículas de tamanho grande (2-3 mm) (GHARSALLAOUI et al., 2007).

O tempo de permanência reduzido dentro do secador, da ordem de alguns segundos, possibilita o uso deste sistema para secagem e encapsulamento de materiais sensíveis ao calor, tais como aqueles de origem biológica e alguns sistemas de liberação de fármacos (RATTES; OLIVEIRA, 2007; BRAGA; OLIVEIRA, 2007; RÉ, 2006). Dentre estes materiais pode-se citar o leite, sucos de frutas, extratos vegetais (TONON et al., 2009; COUTO et al., 2011; SOUZA; OLIVEIRA, 2006; SOUZA et al., 2009; BOTT; LABUZA; OLIVEIRA, 2010; CORTÉS-ROJAS; OLIVEIRA, 2012), enzimas (COSTA-SILVA et al., 2010; COSTA-SILVA et al., 2011), proteínas, aromas e óleos essenciais (FERNANDES et al., 2008;

BRINGAS-LANTIGUA et al., 2011) e alimentos e probióticos (MENSHUTINA et al., 2010; KOÇ et al., 2011; PU; BANKSTON; SATHIVEL, 2011; NAYAK; RASTOGI, 2010).

As principais variáveis de operação da câmara de secagem são a vazão, temperatura e umidade do ar de secagem, e forma de escoamento entre o gás de secagem e materiais atomizados (concorrente, contra-corrente ou escoamento misto). A Figura 8 apresenta configurações típicas de secadores por nebulização com escoamentos concorrente e contracorrente.

Figura 8- Exemplos de configurações típicas de secadores por nebulização com escoamentos concorrente e contracorrente. a) Concorrente com disco rotativo; b) Contracorrente com disco rotativo; c) Contracorrente com bico nebulizador (torre); d) Concorrente com bico nebulizador (torre)
Fonte: Oliveira, Freitas e Freire (2009).

As combinações destes sistemas de secagem e condições operacionais fornecem uma ampla gama de propriedades às partículas do produto seco. Com relação às condições operacionais, há um grande número de variáveis independentes que podem ser alteradas no processo. Dentre elas podem-se citar as propriedades da alimentação que incluem teor de sólidos, densidade, viscosidade, tensão superficial, adição de aditivos com múltiplos propósitos; o tipo de atomizador que pode ser de pressão, duplo fluido, pneumáticos e rotativos e a operação do atomizador que abrange: pressão e vazão do ar e de líquido para atomizadores pneumáticos, pressão e vazão do líquido para atomizadores de pressão, vazão do líquido e velocidade de rotação para o disco rotativo (OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009).

A secagem em spray drying de extratos de plantas medicinais, a fim de obter compostos ativos fitofarmacêuticos de alto valor agregado é uma área de pesquisa relevante, com muitos artigos publicados recentemente focando diferentes espécies vegetais (TONON; BRABET; HUBINGER, 2008; SOUZA; GEORGETTI et al., 2009; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; OSORIO; FORERO; CARRIAZO, 2011; BERTÉ et al., 2011; GALLO et al., 2011; BAKOWSKA-BARCZAKA; KOLODZIEJCZYK, 2011; CORTÉS-ROJAS; OLIVEIRA, 2012). Outros estudos apresentam uma avaliação de processos de secagem e efeitos de parâmetros do processo nas propriedades e estabilidade do produto (BOTT; LABUZA; OLIVEIRA, 2010; COSTA-SILVA et al., 2010; KOÇ et al., 2011; PARAMITA et al., 2010).

2.4 Secagem por liofilização ou *freeze drying*

A liofilização ou secagem por congelamento é a técnica mais utilizada na indústria farmacêutica para secagem em pequena escala. Dentre suas vantagens, a principal é a que as amostras não são submetidas em momento algum do processo a altas temperaturas. Isto possibilita a secagem de materiais termosensíveis, dentre eles produtos da biotecnologia como as enzimas, proteínas, fungos e bactérias, ou produtos farmacêuticos como extratos de plantas medicinais, antibióticos, vacinas e soros. Outras vantagens incluem a redução de reações de degradação físicas e químicas, como denaturação de proteínas, oxidações, hidrólises, reações enzimáticas e perdas de compostos voláteis (OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009).

Também chamada de criodesidratação, é um tipo especial de desidratação por sublimação ou transformação direta do gelo do material em vapor d'água, sem passar pelo estado de água líquida. Contudo, a velocidade de desidratação é lenta, e os custos do equipamento e da operação (baixas temperatura e vácuo) são elevados (PEREDA et al., 2005). Entretanto, as vantagens da liofilização, especialmente no que se refere à preservação de propriedades físicas, químicas ou biológicas dos materiais, parecem superar as desvantagens do longo tempo de processo e do alto custo em um ramo industrial em que escalas de produção são, na maioria das vezes, pequenas e em que os valores agregados dos produtos são muito altos (OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009).

Em geral, a liofilização forma produtos na forma cristalina, a qualidade do pó obtido não é muito satisfatória para extratos que são muito higroscópicos, sendo assim, algumas vezes é necessário o uso de aditivos como os crioprotetores. Soares e Silva et al. (2012)

utilizaram os adjuvantes Aerosil® e maltodextrina na avaliação de dois processos de secagem na preparação de extrato seco de *Mikania glomerata* (guaco), a secagem por atomização (*spray dryer*) e liofilização, com o objetivo de identificar o melhor processo para produzir um extrato seco com um nível elevado de cumarina. Baseado nos resultados obtidos, o processo de secagem por liofilização foi o melhor para obtenção dos extratos secos de guaco com altos níveis de cumarina.

Secagem de plantas é uma técnica muito útil para padronizar a quantidade de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante dos extratos. Hossain e colaboradores (2010) avaliaram os efeitos de métodos de secagem na capacidade antioxidante de seis plantas da família *Lamiaceae*. A secagem à vácuo no forno a 70 °C foi a que resultou no produto com maior conteúdo de fenólicos totais durante 60 dias de estocagem de duas amostras analisadas.

Ao escolher métodos adequados de secagem de materiais específicos, devem-se considerar todos os fatores relevantes, tais como a capacidade de produção, o capital e o custo operacional, forma do produto e o tempo de secagem (LIU et al., 2011).

2.5 Estudos de estabilidade

2.5.1 Princípios gerais

O objetivo dos estudos de estabilidade é demonstrar como a qualidade de uma substância ou produto varia com o tempo sob a influência de uma variedade de fatores ambientais tais como temperatura, umidade e luz, como também estabelecer um período de re-teste para a substância ou uma vida de prateleira para o produto e as condições de conservação recomendadas [ICH Q1A (R2), 2003] (EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA), 2003).

Para a realização do estudo de estabilidade, um dos fatores importantes a serem considerados são as zonas climáticas. Devido à grande variabilidade climática, o mundo foi subdividido em zonas com diferentes especificações de temperatura e umidade, para possibilitar a comercialização dos produtos em outras zonas climáticas (BOTT; OLIVEIRA, 2007). O Brasil, de zona climática IV (quente e úmido), segue a RE nº 1/2005 da ANVISA para o procedimento dos ensaios de estabilidade (BRASIL, 2005).

Conforme a RE nº 1/2005, a estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais citados anteriormente, e de outros relacionados ao próprio produto como

propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem. Assim, os testes de estabilidade cumprem a função de prever, determinar ou acompanhar o seu prazo de validade (BRASIL, 2005).

A Farmacopeia Americana (2006) estabelece que a estabilidade de um produto é o tempo no qual as propriedades e características que esse produto possuía no momento da sua produção são mantidas, dentro de limites especificados durante seu período de estocagem e uso.

De acordo com a Farmacopeia Americana, cinco tipos de estabilidade são descritas:

- *Estabilidade química*: o ingrediente ativo mantém a sua potência e integridade química dentro dos limites especificados.
- *Estabilidade física*: as propriedades físicas originais são mantidas, incluindo a aparência, uniformidade, dissolução e a capacidade de ressuspensão.
- *Estabilidade microbiológica*: a esterilidade ou a resistência ao crescimento de microrganismos é mantida de acordo com o requerimento específico. Os agentes antimicrobianos presentes retêm sua efetividade dentro dos limites especificados.
- *Estabilidade terapêutica*: os efeitos terapêuticos permanecem inalterados.
- *Estabilidade toxicológica*: não há aumento significativo da toxicidade.

Para prever a degradação de drogas nas condições requeridas de estocagem são utilizados métodos para acelerar sua decomposição usando temperaturas elevadas. Embora estes procedimentos não substituam os testes em longo prazo, proporcionam um ganho de tempo considerável durante o processo de desenvolvimento do produto (FLORENCE; ATTWOOD, 2003). Para a determinação do prazo de validade de produtos farmacêuticos preconiza-se a condução dos estudos de estabilidade que serão descritos a seguir (estudo de estabilidade acelerada e de longa duração).

2.5.1.1 Estudos de estabilidade acelerada

Os testes de estabilidade acelerada são amplamente utilizados para a previsão da estabilidade e qualidade na armazenagem. No caso da indústria de alimentos, farmacêutica e de bioprodutos, os produtos são avaliados em altas temperaturas. Os resultados são em

seguida extrapolados para armazenamento em condições normais. Muitos desses produtos existem como sólidos amorfos e são, portanto, termodinamicamente instáveis. Assim, durante o teste acelerado, repentinas mudanças físicas e/ou químicas (hidrólise, oxidação, entre outros processos) podem ocorrer dentro de tais produtos, o que pode tornar a extrapolação dos resultados ilusória (FRANKS, 1994).

Para este estudo as amostras devem ser acondicionadas em embalagem primária, ou seja, aquela que está em contato direto com o produto, o qual pode ser a matéria-prima, produto semi-elaborado ou o produto acabado e permanecer em câmara climática com temperatura de $40 \pm 2^\circ \text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de umidade relativa (UR) por um período de 6 meses.

Este estudo é projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento, com o propósito de monitorar reações de degradação e prever o prazo de validade em condições normais de armazenagem. As análises deverão ser realizadas no tempo inicial (T0) e após 3 e 6 meses de estudo. Para fins de prazo de validade provisório de 24 meses será aprovado o relatório de estabilidade acelerado ou de longa duração de 12 meses que apresentar variação menor ou igual a 5,0% do valor de análise da liberação do lote, mantidas as demais especificações. Caso as variações de doseamento estejam entre 5,1% e 10,0% no estudo de estabilidade acelerado, o prazo de validade provisório será reduzido à metade, ou seja, será de 12 meses (BRASIL, 2005).

2.5.1.2 Estudo de estabilidade de longa duração

Este estudo é recomendado para se verificar a manutenção das propriedades físicas, químicas e microbiológicas do produto até o prazo de estabilidade estipulado ou em tempo de análise superior a validade. As amostras devem ser acondicionadas em embalagem primária e permanecer em câmara climática com temperatura de $30 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade relativa de $75 \pm 5\%$ por um período, no mínimo, referente ao prazo de validade do produto. As análises deverão ser realizadas no tempo inicial (T0) e após 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses de estudo. Para o período de 24 meses a queda de teor não deverá ser maior que 15% do teor inicial como também, as demais características físico-químicas e microbiológicas devem ser preservadas (BRASIL, 2005).

2.5.1.3 Estudos de estabilidade de extratos de plantas medicinais

A análise dos metabólitos secundários em plantas é um desafio devido à sua diversidade química, abundância geralmente baixa e variabilidade, mesmo dentro da mesma espécie. Estima-se que 100.000-200.000 metabólitos ocorram no reino vegetal e, considerando o fato de que muitas preparações de plantas medicinais contêm não um, mas vários medicamentos de plantas, apenas métodos seletivos e sensíveis são adequados para o controle da sua composição e da qualidade (STEINMANN; GANZERA, 2011).

Tendo em vista que todo o conteúdo vegetal é considerado como substância ativa, o controle de qualidade de produtos derivados de plantas medicinais é bastante complexo, excetuando-se as plantas nas quais a substância ativa já é amplamente conhecida e sua eficácia já está estabelecida. Para conseguir um maior número de informações, vários métodos devem ser usados para que diferentes grupos de componentes possam ser avaliados.

Análises semi-quantitativas são comumente usadas para que a estabilidade do material possa ser demonstrada. Portanto, utilizando-se de marcadores que possam ser quantificados, tanto a produção como a composição dos produtos de plantas medicinais podem ser devidamente controlados (KOLL et al., 2003).

Segundo Busse (2000), o teste de estabilidade não pode ser reduzido à análise de apenas um marcador, mas também deve ser garantido que não ocorram mudanças significativas no padrão e na concentração de outras substâncias que também possam ser importantes para a atividade farmacológica. Sendo assim, a estabilidade, padronização e controle de qualidade para fitoterápicos são viáveis, mas a execução de tais parâmetros é complexa (SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010).

A estabilidade dos extratos derivados de plantas é essencial para assegurar a qualidade, segurança e eficácia do produto acabado no mercado. Esses produtos podem conter milhares de compostos diferentes, para a maioria dos quais a atividade terapêutica não foi estudada. Isso faz com que a avaliação da estabilidade e a determinação do prazo de validade do produto seja um desafio (GAFNER; BERGERON, 2005).

Na Europa, preparações à base de plantas são vendidas como fitoterápicos. Em 2006 a União Europeia introduziu uma nova legislação para controlar estes produtos. As orientações para este controle estão descritas no documento European Medicines Agency (EMA) "*Note for Guidance on Quality of Herbal Medicinal Products*". Este documento declara que a

preparação de drogas à base de plantas na sua totalidade é considerada como a substância ativa e que a mera medida da estabilidade dos constituintes com atividade terapêutica conhecida é considerada insuficiente. Para compostos com atividade terapêutica conhecida, a variação de conteúdo durante o prazo de validade não deve exceder $\pm 5\%$ do valor inicial do ensaio, considerando que para preparações onde os ativos são desconhecidos, uma variação no conteúdo de $\pm 10\%$, durante o prazo de validade pode ser aceita (EMEA, 2006).

De acordo com Gafner e Bergeron (2005), muitos fatores como por exemplo, pH, luz e temperatura podem influenciar a reatividade de uma substância. Na maioria dos casos, a reação que ocorre pode ser de hidrólise ou oxidação. A estabilidade frente ao pH depende fortemente dos compostos presentes no extrato da planta. Em muitos casos de fitoquímicos, as moléculas de interesse foram mais estáveis em pH ácido (pH 3 a 5). Isto pode ser devido ao fato de que os marcadores químicos analisados foram compostos fenólicos, o que está de acordo com resultados de Baugh e Ignelzi (2000) que observaram um aumento na degradação oxidativa de compostos fenólicos como quinonas e nitrocompostos em pH básico. Compostos fenólicos são facilmente oxidáveis, seja por enzimas vegetais específicas, por influência de metais (ex: ferro e manganês), luz, calor, ou em meio alcalino (SIMÕES et al., 2010).

A estabilidade de isoflavonas, compostos estrogênicos comumente encontrados em plantas foram estudadas por Ungar, Osundahunsi e Shimoni (2003). Os autores avaliaram a estabilidade térmica da genisteína e daidzeína (principais isoflavonas encontradas na soja), a cinética de suas reações de degradação, o efeito do pH na estabilidade (pH 7 e 9) e a atividade antioxidante de produtos de reação. A taxa de degradação de genisteína e daidzeína foi maior em pH 9 do que em pH 7. Em solução alcalina, a concentração de genisteína foi reduzida para 60%. Em pH neutro, a daidzeína foi menos estável que genisteína e sua concentração diminuiu para 40% quando comparada a 22% de degradação para genisteína. A atividade antioxidante das soluções de daidzeína mostrou apenas uma moderada diminuição, enquanto que soluções de genisteína em pH 9 perderam seu potencial antioxidante.

A cinética das reações redox é acelerada quando há uma elevação da temperatura, o que foi confirmado para vitaminas que, acima de 25 °C, um aumento de 5 °C dobra a taxa de perda de atividade (GAFNER; BERGERON, 2005).

A estabilidade do ácido *trans*-rosmarínico (*trans*-RA, um importante composto fenólico com propriedades antioxidante, anti-inflamatória, anti-bacterianas e anti-virais) exposto a diferentes condições de *stress* (luz do dia, diferentes solventes, altas temperaturas e umidade) foi investigada por Razborsek (2011). *Trans*-RA manteve-se estável por até seis

meses em todas as condições avaliadas. Para estudos de fotoestabilidade, amostras foram expostas à luz do dia, temperatura ambiente, por 5 h, 24 h, 4 dias e 30 dias. Outras amostras foram estocadas em refrigerador a -18 °C, por 5 h, 24 h, 4 dias e 30 dias ao abrigo da luz. Para estudos de estabilidade térmica, uma parte das amostras foi colocada em estufa de ar quente a 70 °C por 2 horas. A isomerização de *trans*-RA a *cis*-RA foi dependente do solvente, da temperatura e do tempo de análise. Em geral, temperaturas mais elevadas e tempos mais longos levaram a maior isomerização. Portanto, *trans*-RA deve ser tratado com cautela quando se considera a iluminação, uso de solventes práticos orgânicos, e temperaturas mais elevadas. Tempo de análises mais longo também deve ser evitado, para minimizar a isomerização.

A influência do calor em combinação com umidade na estabilidade dos extratos vegetais tem sido avaliada em uma grande variedade de estudos como parte de um Protocolo de teste de estabilidade.

Bott, Labuza e Oliveira (2010) realizaram um teste de estabilidade de extratos de *Passiflora alata* (maracujá) secos em *spray dryer* e leite de jorro sob condições de *stress* no armazenamento. As amostras dos extratos secos foram estocadas por 28 dias a duas temperaturas diferentes (34 e 45 °C) e a duas umidades relativas diferentes (52 e 63% UR para 34 °C; 52 e 60% UR para 45 °C). O flavonoide vitexina foi o composto marcador de referência, sendo analisado durante o período de armazenamento. Foi determinado o prazo de validade para a perda de 10% de vitexina, considerado uma estimativa do prazo de validade, como usado nos Estados Unidos para fármacos e que também pode ser aplicado aos suplementos dietéticos e para extratos vegetais. Os resultados mostraram que quanto mais alto o valor de UR, mais alto foi a degradação de vitexina, porém, para as condições de temperatura analisadas, os resultados mostraram pequena dependência desta variável na taxa de degradação do composto monitorado, a vitexina.

Os extratos secos de plantas medicinais são misturas complexas de substâncias químicas e cada uma provavelmente sofre degradação a diferentes taxas. O conhecimento completo da composição do produto durante o tempo de armazenamento e seu efeito sobre a atividade farmacológica dessas preparações é muito difícil. Portanto, o teste de estabilidade de preparações a base de plantas devem incluir também outros testes para assegurar que a estabilidade e a eficácia do produto seja mantida (BOTT; LABUZA; OLIVEIRA, 2010).

Várias técnicas têm sido empregadas em associação visando estabelecer protocolos para o estudo de estabilidade de produtos alimentícios e derivados de plantas medicinais,

dentre as quais pode-se citar a difração de raios-X, atividade de água, infra-vermelho, análises colorimétricas, isotermas de adsorção de água.

No presente trabalho serão abordadas as técnicas de difração de raios-X e determinação da atividade de água, visto que são técnicas usadas para a avaliação dos produtos secos obtidos de extratos de plantas.

-Difração de raios-X

No campo das ciências farmacêuticas, a difração de raios-X tem sido amplamente empregada para análise do grau de cristalinidade (conteúdo amorfo), como também para a determinação da composição polimórfica (TIWARI; CHAWLA; BANSAL, 2007).

O grau de cristalinidade é um fator fundamental que pode influenciar muitas propriedades físicas dos pós secos em *spray dryer* como, porosidade, solubilidade, pegajosidade e propriedades de fluxo (CHIOU; LANGRISH; BRAHAM, 2008). A cristalinidade dos pós secos no *spray dryer* está fortemente relacionada com as condições de secagem, em especial a temperatura do ar de entrada (TONELI et al., 2010).

A difração de raios-X de substâncias cristalinas é de grande interesse analítico, uma vez que não existem dois compostos diferentes capazes de formar cristais com forma espacial totalmente semelhante. O padrão (*fingerprint*) da amostra consiste numa série de picos detectados em diferentes ângulos (BRITAIN et al., 1991).

Nos sólidos amorfos, a ampla intensidade em todos os ângulos significa que as moléculas são aleatoriamente orientadas e difratam os raios-X em todas as direções, dando o padrão típico amorfo de “halo” (LABUZA; LABUZA, 2004).

Produtos secos em *spray dryer* comumente são altamente amorfos, devido a esses materiais serem misturas freqüentemente complexas (LANGRISH; WANG, 2009). Sólidos amorfos são, em geral, mais solúveis e menos estáveis do que seus cristais correspondentes (YU, 2001).

A compreensão da natureza polimorfa de um ativo ou excipiente é de fundamental importância para o delineamento das formulações farmacêuticas. O ativo pode sofrer alterações da forma cristalina durante processos como, por exemplo, secagem do granulado, moagem ou compactação. A mudança da forma cristalina pode acarretar alterações na temperatura de fusão, densidade, solubilidade, estabilidade física ou química, dissolução e

biodisponibilidade de um ativo e de sua formulação (CLAS; DALTON; HANCOCK, 1999; YOSHIHASHI et al., 2000). Por isso, é importante a caracterização por técnicas diversas tais como, análise térmica, determinações do tamanho da partícula e da área superficial, espectrométricas (UV e IV), difração de raios-X, e outras (NERY et al., 2008).

Poucos exemplos de estudos envolvendo técnicas de cristalografia para caracterizar misturas complexas a partir de fontes naturais podem ser encontrados na literatura.

Usando técnicas de difração de raios-X de pós (DRX), é possível comprovar a qualidade de um fitoterápico comparando o perfil de difração do pó da preparação de vegetais com o perfil de difração do ativo ou do composto marcador. Para tal, é importante conhecer a estrutura cristalina do composto ativo por DRX ou pelo menos conhecer seu perfil de difração de pó experimental certificado anteriormente realizada em um composto ativo puro e cristalino. Ambas as situações seriam apropriadas para corresponder ao *fingerprint* por DRX de produtos totais. Igualmente, um perfil DRX certificado dos medicamentos fitoterápicos poderia ser usado de forma comparativa para analisar amostras comerciais (MARTINS et al., 2011).

-Atividade de água (A_a)

A atividade de água é um dos fatores mais importantes que influenciam significativamente o tempo de prateleira dos produtos em pó. Quanto maior a atividade de água nos produtos, mais curto é o tempo de prateleira devido a água livre para degradações bioquímicas (KHA; NGUYEN; ROACH, 2010), refletindo as interações da água com os outros constituintes do produto (OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009).

É um critério comumente utilizado para segurança e qualidade de alimentos. Em geral, a ocorrência de reações de degradação e crescimento de microrganismos, como fungos e bactérias, são drasticamente reduzidos abaixo de um determinado valor de atividade de água. A atividade de água é altamente relacionada com a temperatura de secagem devido a alterações na ligação de água, dissociação, e solubilidade dos compostos. O valor de atividade de água abaixo do limite de segurança de 0,5 é desejado para evitar o crescimento microbiano (ARAÚJO; TEIXEIRA; FREITAS, 2010).

De acordo com Rahman (2009) existe uma atividade de água crítica abaixo da qual microrganismos não podem crescer, esse valor é de 0,6. Grande parte das bactérias

patogênicas não pode crescer abaixo de uma atividade de água de 0,85; enquanto a maioria das leveduras e bolores são mais tolerantes a atividade de água reduzida. Entretanto, nenhum crescimento geralmente ocorre abaixo de uma atividade de água de aproximadamente 0,6 (Figura 9).

Figura 9 – Diagrama de atividade de água descrevendo os efeitos no crescimento microbiano e taxas de reação

Fonte: Fontana (1998).

O diagrama apresentado na Figura 9 apresenta as tendências de crescimento microbiano e reações bioquímicas influenciadas pela atividade de água.

Valores de A_a entre 0 e 0,2 favorecem a oxidação lipídica. Reações de escurecimento, como também atividade enzimática acontecem no intervalo de A_a de 0,2 a 0,7. A_a na faixa de 0,6 a 1,0 favorece o crescimento de bolores, leveduras e bactérias (FONTANA, 1998).

Vários autores têm estudado o efeito da atividade de água ou do conteúdo de água na estabilidade de produtos, como também quanto às reações de degradação que ocorrem no tempo de armazenamento.

A natureza altamente higroscópica dos extratos à base de plantas pode ser atribuída aos seus compostos hidrofílicos (CHU; CHOW, 2000). A sorção de umidade pode exercer efeitos significativos sobre as propriedades físico-químicas e tecnológicas, bem como sobre

os parâmetros farmacêuticos dos extratos. Assim, é um problema incorporar extratos de plantas medicinais em formas de dosagem orais sólidas seguras, eficazes e estáveis (por exemplo, comprimidos, grânulos, cápsulas, *pellets*). Chen, H. et al. (2010) avaliaram uma tecnologia de granulação e de revestimento para melhorar a impermeabilização dos produtos obtidos derivados de extratos de plantas. O método estudado para isto foi o de extrusão-esferonização, o qual forneceu uma excelente forma esférica aos *pellets* obtendo-se melhores condições para revestimento além do efeito antiumidade.

Tonon et al. (2009) realizaram um estudo de estabilidade para o suco de açaí em pó produzido por *spray drying* usando diferentes adjuvantes de secagem como maltodextrina 10 DE e maltodextrina 20 DE, goma arábica e amido de tapioca. Tanto a atividade de água como a temperatura de transição vítrea foram usadas para determinar as condições críticas para o armazenamento, visando condições em que o material não é suscetível a alterações como colapso, aderência e endurecimento. Os pós produzidos com amido de tapioca mostraram a adsorção de água mais baixa, seguida do que foi produzido com maltodextrina 10DE, enquanto as amostras produzidas com maltodextrina 20DE e goma arábica foram as mais higroscópicas. Quando os pós foram armazenados em umidades relativas de 43% ou inferior, as partículas mantiveram-se com fluxo livre, para todos os adjuvantes utilizados. Em 53% de umidade relativa, as partículas apresentaram um início de aglomeração e alterações nas propriedades de fluidez dos pós foram observadas. Com A_w acima de 0,69, as partículas produzidas com maltodextrina e goma arábica mostraram a formação de blocos duros e escuros, resultantes da compactação (ou formação de *caking*).

O efeito da atividade de água nos índices de degradação da antocianina e de escurecimento não enzimático em suco de *blackberry* aquecido a altas temperaturas foi determinado por Jiménez et al. (2012). Amostras de suco tendo a mesma concentração de antocianinas (51 ± 4 mg/100 g em base seca) foram colocadas em três condições de atividade de água (0,34, 0,76 e 0,95) e aquecidas em um reator hermeticamente fechado sob condições não-isotérmicas (100 a 140 ° C). Os resultados mostram que a redução na atividade de água teve um efeito negativo sobre a estabilidade das antocianinas no suco de *blackberry* em altas temperaturas.

2.6 Atividade antioxidante de plantas medicinais

Processos oxidativos são parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo humano e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos, como também danos ao DNA. Consequentemente estão relacionados a várias patologias, tais como diabetes, câncer, artrite reumatóide, algumas doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, como mal de Alzheimer e Parkinson, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Antioxidantes são substâncias que, em baixas concentrações, impedem ou retardam a oxidação de biomoléculas facilmente oxidáveis, como lipídios, proteínas e DNA (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

O uso de plantas como alimentos e remédios desde os tempos antigos é parcialmente atribuído a eficácia biológica de metabólitos secundários que possuem atividades antioxidantes, tais como compostos fenólicos, vitaminas C e E e carotenoides (ROBARDS et al., 1999).

Plantas que contêm compostos ativos, especialmente fenólicos e polifenólicos, têm um interesse aumentado no seu potencial para atuar como antioxidantes naturais. Compostos fenólicos constituem um grupo grande e heterogêneo de metabólitos secundários de plantas derivados da fenilalanina ou tirosina e extensivamente distribuídos no reino vegetal (SHAHIDI; NACZK, 2006).

Estes compostos atuam neutralizando e sequestrando radicais livres e também quelando metais de transição. Os compostos intermediários formados pela ação dos antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis devido à distribuição de carga em todo o sistema do anel aromático. A capacidade antioxidante destes compostos é atribuída ao poder redutor dos grupos hidroxil aromáticos, os quais reduzem os radicais livres reativos (SAITO et al., 2008).

Devido aos benefícios dos antioxidantes, alimentos e produtos farmacêuticos são normalmente complementados com antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxianisol

(BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ). No entanto, os antioxidantes naturais oriundos de produtos vegetais podem ser mais eficazes em reduzir níveis de espécies reativas de oxigênio comparados aos antioxidantes sintéticos devido às ações sinérgicas de uma vasta gama de biomoléculas como vitaminas C e E, compostos fenólicos, carotenoides, terpenoides e fitomicronutrientes (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008; PODSEDEK, 2007). Além disso, a ingestão de antioxidantes sintéticos pode causar genotoxicidade e carcinogenicidade em concentrações elevadas ou devido ao consumo prolongado (OLIVEIRA et al., 2009; PRASAD et al., 2009). No entanto, segundo Becker, Nissen e Skibsted (2004) e Shen, Hong-Fang e Hong-Yu (2007) os efeitos saudáveis atribuídos aos antioxidantes em muitos estudos são baseados principalmente em ensaios *in vitro* que não refletem necessariamente os mecanismos fisiológicos humanos *in vivo*. Estas controvérsias sobre a eficácia dos antioxidantes têm estimulado pesquisas em estudos *in vivo*, relativas à sua biodisponibilidade para fazer a ligação com as observações *in vitro*.

2.7 Métodos para avaliação da atividade antioxidante

Os testes *in vitro* de avaliação da atividade antioxidante têm se tornado importantes ferramentas que auxiliam na busca por substâncias bioativas, bem como na seleção de matéria-prima para estudo.

Para medir a capacidade antioxidante de alimentos, extratos vegetais e amostras biológicas tem sido propostos vários ensaios. O conceito de capacidade antioxidante é originado da química sendo depois adaptado para biologia, medicina, epidemiologia e nutrição (CAO; PRIOR, 1998; FLOEGEL et al., 2010). Este conceito descreve a habilidade de moléculas redox para sequestrar radicais livres em alimentos e sistemas biológicos como também considera os efeitos aditivos e sinérgicos de todos os antioxidantes ao invés de cada ação do antioxidante individual sendo portanto, útil para estudar os potenciais benefícios de antioxidantes à saúde (PUCHAU et al., 2010).

Não existe nenhum método que reúna todos os critérios necessários para a avaliação da atividade antioxidante de uma amostra e talvez seja quase impossível avaliar esta atividade por um único método sendo desejável a combinação de vários, considerando-se que os antioxidantes podem exercer sua ação mediante diferentes mecanismos. Além disso, em uma mesma amostra pode haver misturas de diferentes antioxidantes com variados mecanismos de ação, ocorrendo reações sinérgicas e faz-se necessário a diversificação das análises para poder

avaliar os possíveis mecanismos de ação de todas as substâncias antioxidantes presentes na amostra (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2007).

Muitos ensaios empregam o mesmo princípio onde um radical colorido sintético ou um composto ativo redox é gerado e a habilidade de uma amostra para sequestrar o radical ou para reduzir o composto ativo redox é monitorada por espectrofotometria, utilizando um padrão apropriado para quantificar a capacidade antioxidante, como exemplo, Trolox ou vitamina C. Além disso, os métodos antioxidantes podem ser classificados em dois tipos de ensaio: baseado na transferência de elétrons e envolve a redução de um oxidante colorido, como por exemplo nos ensaios ABTS, DPPH e FRAP e o ensaio que envolve a transferência de um átomo de hidrogênio como o ensaio ORAC. Neste ensaio, antioxidantes e substrato competem por radicais peróxil gerados termicamente (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010).

A seguir estão descritos alguns dos principais métodos para a determinação da atividade antioxidante, indicando o tipo de reação quando conhecida.

2.7.1 Atividade sequestrante de radicais DPPH

O ensaio da atividade sequestrante do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) foi primeiramente descrito por Blois (1958) e foi posteriormente modificado por inúmeros pesquisadores. É um dos ensaios para antioxidantes mais usados para amostras de plantas (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011). O radical livre DPPH é muito estável devido à deslocalização de um elétron livre ao longo de toda a molécula. Reage com compostos que podem doar átomos de hidrogênio e tem um máximo de absorção UV/vis em 515 nm (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

O método baseia-se na redução do radical DPPH (roxo) na sua hidrazina (amarelo) correspondente (Figura 10), através da sua reação com doadores de hidrogênio (RH), ou mesmo outros radicais ($A^{\bullet}$) (Figura 11). O mecanismo de reação química do ensaio DPPH é baseado principalmente nas reações de transferência de um elétron e a abstração do átomo de hidrogênio é uma reação marginal (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Figura 10 – Estabilização do radical livre DPPH

Fonte: Rufino et al. (2007a).

Figura 11 – Possíveis reações com o radical DPPH.

Sharma e Bhat (2009) destacaram a ampla faixa de concentração de DPPH (22,5-250 μM), tempo de incubação, solvente de reação e pH utilizados por diferentes laboratórios como fontes de variação nos resultados. Com base nos dados da pesquisa, os autores recomendaram a utilização de solução DPPH (50 μM) em metanol ou metanol tamponado, dependendo da solubilidade do composto sob investigação. Um antioxidante padrão, como o butil-hidroxitolueno (BHT) é usado como um controle positivo e uma mistura aquosa de reação contendo metanol a 50% ao invés da solução da amostra é usada como um controle negativo.

A redução do radical à sua hidrazina correspondente se traduz no decréscimo na absorvância determinado espectrofotometricamente de 515-528 nm (SANCHEZ-MORENO, 2002).

Geralmente, os resultados são expressos como concentração eficiente (CE_{50}) ou inibitória (CI_{50}). O valor de CI_{50} é a quantidade de antioxidante necessária para reduzir 50% da concentração inicial do radical DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995). A porcentagem de inibição e CI_{50} são frequentemente usadas como parâmetros para caracterizar a atividade sequestrante de radicais (ROGINSKY; LISSI, 2005). Quanto mais baixo o valor de CI_{50} mais alta é a eficiência sequestrante de radicais.

Existem inúmeros trabalhos na literatura que avaliam a capacidade antioxidante de extratos de plantas através do método do radical DPPH.

Ling et al. (2010) selecionaram onze plantas da Malásia devido ao seu uso na medicina tradicional que incluem *Artocarpus champeden*, *Azadirachta indica*, *Fragaria xananassa*, *Garcinia mangostana*, *Lawsonia inermis*, *Mangifera indica*, *Nephelium lappaceum*, *Nephelium mutobile*, *Peltophorum pterocarpum*, *Psidium guajava* e *Syzygium aqueum*. O objetivo do estudo foi avaliar a capacidade sequestrante de radicais livres (DPPH e ABTS), inibição na atividade de peroxidação lipídica e conteúdo fenólico dos extratos aquosos e etanólicos das plantas. Todos os extratos etanólicos mostraram um maior conteúdo de compostos fenólicos em comparação com os extratos aquosos correspondentes. Isso corrobora as conclusões relatadas por outros pesquisadores (JACOPIC; VEBERIC; STAMPAR, 2009). A ordem de atividade dos extratos etanólicos das plantas por métodos diferentes de ensaio mostrou uma tendência muito semelhante entre os extratos de *Garcinia mangostana*, *Nephelium lappaceum* (casca), *Mangifera indica* e *Psidium guajava*. Os extratos aquosos, por outro lado, não apresentaram atividade antioxidante significativa.

Gülçin (2012) apresenta uma ampla revisão sobre os principais métodos comumente utilizados para a determinação da atividade antioxidante de componentes nos gêneros alimentícios e bebidas. Além disso, são apresentados algumas bases cinéticas e químicas e os detalhes técnicos dos métodos utilizados. Com relação ao método do radical DPPH, o autor relata que, por ser considerado um método espectrofotométrico fácil e útil é aplicado à medição e triagem da capacidade sequestrante do radical de compostos puros (GULCIN et al., 2004; GÜLÇİN; ELMASTAS; ABOUL-ENEIN, 2007; GÜLÇİN; TEL; KIRECCI, 2008), constituintes de alimentos (AK; GÜLÇİN, 2008; GÜLÇİN et al., 2006; GULCIN et al., 2012), extratos de plantas (BUYUKOKUROGLU; GÜLÇİN, 2009; ELMASTAS et al., 2006; SERBETC TOHMA; GÜLÇİN, 2010) e ainda para compostos sintetizados (BALAYDIN et al., 2010; TALAZ et al., 2009).

O desenvolvimento de novas tecnologias para obter extratos secos padronizados de plantas e alimentos ricos em antioxidantes naturais é um tema relevante de pesquisa, visto que existe atualmente uma forte tendência em substituir os antioxidantes sintéticos por substâncias naturais (SOUZA; GEORGETTI et al., 2009). Neste sentido, vários trabalhos avaliaram a atividade antioxidante de extratos secos em *spray dryer* devido a sua capacidade de gerar um produto com especificações precisas de qualidade em operação contínua.

Georgetti et al. (2008) avaliaram os efeitos da secagem no *spray dryer* nas propriedades químicas e biológicas do extrato seco de soja. O conteúdo de polifenóis do extrato concentrado de soja (ECS) e do extrato seco de soja (ESS) foi determinado pelo

método de Folin–Ciocalteu. A avaliação da atividade antioxidante do ECS e ESS foi investigada pelo método do radical DPPH. Os resultados indicaram que a temperatura do gás de entrada mostrou efeito significativo sobre os polifenóis totais e proteínas dos extratos secos, mas a atividade antioxidante dos extratos secos foi significativa.

De acordo com Souza et al. (2009), extratos secos de *Bauhinia forficata* obtidos em dois secadores distintos como leito de jorro e *spray dryer* apresentaram atividade antioxidante similar em ambos os modelos experimentais. Os produtos obtidos foram de alta qualidade em termos de propriedades físicas e químicas. As propriedades antioxidantes dos extratos secos foram estimadas pelos ensaios do radical DPPH e inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe^{+2} confirmando seu potencial antioxidante.

Couto et al. (2012) realizaram um estudo para elucidar os efeitos de condições de processamento nas propriedades do produto durante a produção de extratos secos padronizados de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae) obtidos em *spray dryer*. A atividade antioxidante *in vitro* dos extratos secos obtidos foi avaliada através do método do radical DPPH. Os resultados mostraram que a concentração final de 125 $\mu\text{g/mL}$ no meio foi capaz de inibir aproximadamente 90% da atividade sequestrante do radical.

2.7.2 ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ou TEAC (Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox)

O método do sequestro do radical ABTS foi desenvolvido por Rice-Evans e Miller (1994) e posteriormente foi modificado por Re et al. (1999). Envolve o uso de um radical pré-formado ABTS e é amplamente utilizado para medir a capacidade sequestrante total do radical.

Este método gera um cromóforo verde/azulado ABTS^{++} através da reação do ABTS e persulfato de potássio. Junto com o método do DPPH, o método do sequestro de radical ABTS é um dos ensaios de antioxidante mais extensivamente usados para amostras de planta.

O cátion radical ABTS é gerado pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio (Figura 12). A reação ocorre na ausência de luz, durante 12 a 16 horas e começa imediatamente apesar da energia de ativação requerida ser muito baixa e além disso, não alcança um máximo de absorvância até o tempo de 6 horas. O ABTS reage estequiometricamente a uma relação 1:0,5 com o persulfato de potássio (HENRIQUES;

ALIAGA; LISE, 2002). A redução do radical ABTS na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio é medida por espectrofotometria a 734 nm.

Figura 12 – Estabilização do radical ABTS^{++} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio

Fonte: Rufino et al. (2007b).

Este ensaio de descoloração mede a capacidade antioxidante total de ambos compostos lipofílicos e hidrofílicos. O efeito da concentração de antioxidante e a duração da inibição da absorção do cátion radical são considerados quando a atividade antioxidante é determinada. Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E, é usado como controle positivo. A atividade é expressa em termos da capacidade antioxidante equivalente Trolox do extrato (TEAC/mg) (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011).

Alguns resultados com frutas tropicais são descritos na literatura utilizando este método, como por exemplo, os trabalhos realizados por Kuskoski et al. (2005) e Alves et al. (2008) que trabalharam com o fruto acerola e obtiveram resultados de 67,6 mg Trolox/100 g e 1315 mg Trolox/100 g de matéria-prima fresca, respectivamente. Essa grande variação pode ocorrer em função da matéria-prima, do preparo da amostra, como também do tipo de solvente empregado.

No recente estudo de Gouveia, Gonçalves e Castilho (2013) foi relatado, pela primeira vez, a elevada capacidade antioxidante associada à caracterização da composição fenólica de flores de *Andryala glandulosa*. Esta planta é um pequeno arbusto que cresce nas montanhas da ilha da Madeira e suas inflorescências (capítulos) são usadas tradicionalmente para o tratamento de edemas e em preparações dermo-cosméticos caseiras. A capacidade sequestrante de radical do extrato etanólico das flores de *A. glandulosa* foi determinada por dois ensaios: métodos DPPH e ABTS. Os resultados mostraram valores de DPPH ($1271 \pm 10,5 \mu\text{mol eq. Trolox}/100 \text{ g planta seca}$) e ABTS ($10.049 \pm 139 \mu\text{mol eq. Trolox}/100 \text{ g planta seca}$).

Trolox/100 g planta seca). Os autores consideram esta diferença nos resultados sendo devido a diferenças na sensibilidade dos métodos, visto que o ensaio ABTS mede a atividade antioxidante de antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos.

Chen e Yen (2007) avaliaram a atividade antioxidante e os efeitos sequestrantes de radicais livres do extrato aquoso liofilizado de folhas e de frutos secos de várias cultivares de goiaba. Foram utilizados três radicais livres para investigar a potencial atividade sequestrante de radicais livres de extratos de goiaba: radical ABTS, ânion superóxido e radicais peróxido. Os extratos de folhas de quatro cultivares de goiaba expressaram acima de 95% de atividade sequestrante a uma concentração de 20 µg/mL. Em todas as amostras, os extratos derivados de frutos secos de goiaba mostraram habilidade sequestrante de radicais mais fraca nos radicais ABTS (aproximadamente 20% de atividade sequestrante a concentração de 20 µg/mL).

2.7.3 FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)

O ensaio Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP) foi inicialmente descrito por Benzie e Strain (1996) para medir o poder redutor no plasma e, posteriormente, adaptado e modificado por numerosos pesquisadores para avaliar o poder antioxidante de extratos de plantas em sua habilidade de reduzir Fe^{3+} para Fe^{2+} .

O ensaio baseia-se em reações de transferência de elétrons, em que um sal férrico, Ferricianeto de potássio é usado como um oxidante. O mecanismo de reação envolve a redução do complexo férrico 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) para a forma ferrosa colorida.

O potencial de redução (potencial redox) do sal Fe (III) é cerca de 0,70 volts (V) e o ensaio é realizado sob condições ácidas (pH 3,6) (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Esta reação produz uma mudança na sua coloração que é monitorada medindo sua absorvância a 595 nm após 30 minutos (PULIDO et al., 2000). A absorvância alcançada em um ponto fixo é interpolada em uma curva analítica e os resultados são expressos em µM sulfato ferroso/g (RUFINO et al., 2006a).

Uma grande vantagem do ensaio FRAP é sua simplicidade, velocidade e robustez (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). O ensaio FRAP baseia-se na hipótese de que a reação redox procede rapidamente e é completa dentro de 4 min, mas isso não é sempre verdadeiro, pois

alguns compostos fenólicos reagem mais lentamente e requerem um tempo de reação mais longo (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). O ensaio é válido para quantificar as amostras com antioxidantes hidrofílicos ou lipofílicos.

Uma limitação do ensaio FRAP é que qualquer composto com um potencial redox inferior a 0,70 V pode reduzir o ferro, embora este não seja o comportamento de um antioxidante *in vivo*. Antioxidantes de proteínas e tiol, como a glutatona não podem ser medidos pelo ensaio FRAP. Além disso, o ensaio é realizado em pH não fisiológico (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008).

A Figura 13 mostra a reação que ocorre no método FRAP para a determinação da atividade antioxidante.

Figura 13 – Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+}
Fonte: Rufino et al. (2006).

Na literatura encontram-se alguns resultados para este método utilizando o sulfato ferroso e o Trolox como padrão. Segundo Alves et al. (2008) os resultados de frutos de acerola foram de 495 mg/100g utilizando o sulfato ferroso como padrão.

Thaipong et al. (2006) avaliaram a atividade antioxidante em polpa de goiaba utilizando o Trolox como padrão e encontraram os valores de 15,5 a 33,3 $\mu\text{M/g}$ na polpa.

Bursal e Gulçin (2011) determinaram a potência antioxidante e conteúdo total de fenólicos e flavonoides da fruta kiwi (*Actinidia deliciosa*) *in vitro*, analisando a atividade sequestrante de radical do extrato aquoso liofilizado de kiwi (ELK) pelos métodos ABTS, DPPH, N, N-dimetil-p-fenilenodiamina (DMPD) e radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), bem

como o poder redutor total pelos ensaios FRAP e CUPRAC e a atividade quelante de metais. O poder redutor férrico do ELK aumentou com o aumento da concentração, semelhante ao observado para os antioxidantes padrão (α -tocoferol e trolox). No entanto, essas diferenças foram encontradas como insignificantes ($p > 0,05$). O poder redutor do ELK e antioxidantes padrão diminuiu na seguinte ordem: α -tocoferol > trolox > ELK com amostra de 30 $\mu\text{g/mL}$.

2.7.4 ORAC (Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio)

O método Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC) mede a capacidade de captura do radical peroxil, gerado a partir de uma molécula orgânica 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) diidroclorido (AAPH). Os radicais atacam a molécula de fluoresceína que, oxidada já não emite fluorescência, produzindo, portanto um decréscimo na mesma (longitude de onda de excitação a 493 nm e de emissão a 515 nm). Na presença dos antioxidantes, a reação do radical peroxil com a fluoresceína fará com que esta mantenha a mesma emissão de fluorescência. Dessa forma, pode-se comparar o decréscimo da fluorescência produzida na presença e na ausência de um antioxidante (RUFINO, 2008) como mostra a Figura 14.

Figura 14 - Exemplo de um processo da oxidação da fluoresceína na presença de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) diidroclorido (AAPH)

Fonte: Rufino (2008).

No ensaio ORAC a eficácia de um antioxidante é avaliada a partir da área sob a curva (*AUC*) da intensidade de fluorescência versus tempo, sugerindo que uma estequiometria de reação de radicais peroxil com um composto definido pode ser avaliada como também a estimativa da capacidade antioxidante total de uma amostra. As vantagens potenciais do teste ORAC sobre outros métodos incluem o uso de radical peroxil como reagente com potencial redox e mecanismo de reação (ou seja, átomo de hidrogênio versus transferência de elétrons) semelhante aos oxidantes fisiológicos e o uso de um pH fisiológico onde os antioxidantes reagem com um estado geral de carga e protonação semelhante ao do organismo humano. Este ensaio pode ser mais geralmente aplicado para indicar o potencial de oxidação total de uma mistura mais complexa de antioxidantes, tal como em alimentos ou extratos vegetais (BISBY; BROOKE; NAVARATNAM, 2008).

O antioxidante padrão utilizado é o Trolox e os resultados se expressam em equivalente de Trolox (número de μ moles de Trolox que produz a mesma atividade de 1 mg de amostra).

O ensaio ORAC usando fluoresceína pode medir a atividade antioxidante dos compostos hidrofílicos e lipofílicos de uma dada amostra (WU et al., 2004).

Até o momento, é o único método que conduz a reação de radicais livres até o término e usa a técnica de área sob a curva (*AUC*) para quantificação, combinando, assim, tanto o percentual de inibição e a duração do tempo de inibição da ação do radical livre pelo antioxidante em uma única medição enquanto os demais métodos usam uma porcentagem de inibição a um tempo fixo. O ensaio ORAC tem sido amplamente utilizado em muitos estudos recentes com plantas (CÁDIZ-GURREA et al., 2013; IBARRA et al., 2010; KATIKI et al., 2013; KRATCHANOVA et al., 2010; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; SALVADOR et al., 2011).

Os princípios do ensaio estão mostrados na Figura 15.

Figura 15 – Princípio do ensaio ORAC usando a sonda fluorescente

Fonte: Singh e Singh (2008).

Onde:

- AUC = área sob a curva (propriedade analítica monitorada ao longo do tempo);
 $OH^{\cdot}$ = íon hidróxido;
 $ONOO^{\cdot}$ = Peroxinitrito.

Existem vários trabalhos na literatura com este método utilizando o Trolox como padrão. No estudo realizado por Thaipong et al. (2006) com a polpa de alguns genótipos de goiaba foram encontrados resultados variando de 18,2 a 25,5 μM Trolox/g de matéria fresca.

Hossain et al. (2010) investigaram as mudanças no conteúdo de compostos fenólicos, teor de ácido rosmarínico e capacidade antioxidante de seis plantas (Lamiaceae) incluindo alecrim, orégano, manjerona, sálvia, manjerição e tomilho. As análises foram realizadas após três processos de secagem (ar, liofilização e secagem em estufa à vácuo) e estocagem por 60 dias a -20°C sendo que as amostras secas foram comparadas com amostras frescas. A capacidade antioxidante foi avaliada pelos métodos FRAP e ORAC. O ensaio altamente sensível ORAC mostrou diferença significativa entre estufa de secagem à vácuo e liofilização.

Existem poucas informações na literatura sobre estudos da capacidade antioxidante envolvendo extratos de plantas secos em *spray dryer* através dos ensaios FRAP e ORAC. Portanto é plenamente justificável a obtenção desses dados para a ampliação do conhecimento da influência do processo de secagem nas atividades biológicas de extratos secos vegetais.

2.7.5 Ensaio da quimioluminescência dependente de luminol (QL_{lum}) usando neutrófilos humanos

2.7.5.1 Neutrófilos e seu papel na resposta imune

Os neutrófilos, também conhecidos como leucócitos polimorfonucleares (PMN), são o tipo mais comum de células brancas do sangue, que compreende cerca de 50-70% de todas os PMN. Os neutrófilos são normalmente encontrados circulando na corrente sanguínea (tempo de vida circulante de aproximadamente 7h) e podem migrar através de tecidos (2-3 dias). Estas células dedicam seu tempo de vida curto para vigilância e constituem a primeira linha de defesa do sistema imune inato (FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009; QUINN; GAUSS, 2004).

Morfologicamente, são distinguidos das demais células sanguíneas por possuírem um núcleo multi-lobulado e grânulos em abundância no citoplasma (Figura 16), os quais contêm diferentes grupos de moléculas citotóxicas, tais como proteases, responsáveis pela degradação do patógeno para a defesa do hospedeiro (MAYER-SCHOL et al., 2004; ZYCHLINSKY; WEINRAUCH; WEISS, 2003).

Figura 16 – Neutrófilo maduro
Fonte: Barbara (2004).

Os PMN utilizam um extraordinário aparato de armas microbidas independente e dependente de oxigênio para destruir e remover agentes infecciosos. Mecanismos dependentes de oxigênio envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que pode ser microbida, e mecanismos independentes de oxigênio incluem a maioria das outras funções dos neutrófilos, tais como quimiotaxia, fagocitose, desgranulação e liberação de enzimas líticas e peptídeos bactericidas (WITKO-SARSAT et al., 2000).

A produção de ERO através do metabolismo oxidativo pode ser desencadeada quando as células fagocíticas são expostas a alguns estímulos, como o agente promotor de tumores forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), o potente peptídeo quimiotático fMLP (“n-Formil-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine”), ácido araquidônico (AA), concanavalina A, ionóforos, complexos imunes e ainda partículas antigênicas (zimosan, látex) opsonizadas com anticorpos e componentes do sistema complemento (BROWN, 1995). A estimulação celular ocorre via diferentes receptores de membrana, e a ativação de cada tipo de receptor desencadeia uma via de sinalização intracelular distinta, ativando os diferentes mecanismos efetores. Estas vias de sinalização são potenciais alvos terapêuticos para a regulação da produção de moléculas citotóxicas liberadas pelos neutrófilos (CATHCART, 2003). O estímulo sintético PMA ativa a transdução de sinal nos neutrófilos sem a necessidade de um receptor de membrana (THELEN et al., 1993). Por se tratar de um análogo do diacilglicerol (DAG), ativa diretamente a proteína quinase C (Figura 17) (EDWARDS, 1996).

Figura 17 – Esquema simplificado de algumas vias de sinalização ativadas em neutrófilos estimulados com PMA, que culminam na produção de ERO. Abreviaturas: DAG: diacilglicerol; ERO: espécies reativas de oxigênio; MPO: mieloperoxidase; PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato
Fonte: adaptado de Caldefie-Chézet et al. (2004).

2.7.5.2 Quimioluminescência (QL)

Allen, Stjernholm e Steele (1972) demonstraram que os neutrófilos possuem a capacidade de produzir quimioluminescência durante a fagocitose, o que posteriormente foi associado ao “burst oxidativo”. Este processo é caracterizado pela “explosão” do consumo de oxigênio durante a fagocitose. Marcadores luminescentes (sondas) são utilizados para aumentar a quantidade de luz emitida durante a produção de EROs. Estas sondas são substâncias orgânicas que servem de substrato para reações redox e que geram intermediários eletronicamente excitados que, ao retornarem ao estado basal emitem fótons sendo que estes podem ser quantificados por quimioluminescência (LI; ZHU; TRUSH, 1999).

A quimioluminescência (QL) tem sido amplamente utilizada como um método sensível e preciso para a avaliação da capacidade dos neutrófilos para a produção de espécies reativas (WARDMAN, 2007). Essa emissão de luz pode ser marcadamente amplificada por sondas de quimioluminescência, como luminol ou lucigenina (GINSBURG et al., 1993) dentre outras. O Luminol detecta a somatória de diversos metabólitos intracelulares produzidos da ação da mieloperoxidase (DAHLGREN; STENDAHL, 1983) (Figura 18).

Freitas, Lima e Fernandes (2009) apresentaram uma interessante revisão onde foi feita uma avaliação crítica das abordagens mais comuns para identificar e quantificar as espécies reativas formadas durante o "burst" oxidativo dos neutrófilos. Os mecanismos de detecção e desempenho, bem como vantagens e limitações das diferentes metodologias são analisadas, enfocando o uso de sondas fluorimétricas, quemiluminométricas e colorimétricas.

Vários autores investigaram o efeito de extratos de plantas ou de compostos isolados de plantas sobre o “burst” oxidativo de leucócitos polimorfonucleares humanos usando diferentes estímulos.

Koko et al. (2008) estudaram a atividade imunomodulatória de extratos etanólicos de 23 plantas medicinais, comumente usadas em remédios populares do Sudão contra doenças infecciosas. Foi utilizado o ensaio de quimioluminescência baseado em lucigenina/luminol usando células polimorfonucleares e mononucleares e diferentes estímulos, zimosan-A opsonizado e PMA. Com o uso de PMA e da sonda luminol, uma potente atividade inibitória foi observada com extratos de frutos e casca de *Acacia nilotica* (84 e 75,6% respectivamente) à concentração de 6,25 µg/mL. Foi constatado que o PMA foi um forte estimulador dos PMN em comparação com o zimosan.

Figura 18 – Representação simplificada do mecanismo proposto para descrever a origem e a regulação da quimioluminescência (QL) produzida por neutrófilos estimulados e das reações químicas envolvidas na produção de quimioluminescência dependente de luminol (QLlum)
 Fonte: adaptação dos mecanismos descritos por Cheung, Archibald e Robinson (1983).

Mahomoodally et al. (2012) avaliaram as propriedades imunomodulatórias e citotóxicas *in vitro* de seis plantas medicinais tropicais nomeadas *Antidesma madagascariense* (Euphorbiaceae), *Erythroxylum macrocarpum* (Erythroxylaceae), *Faujasia flexuosa* (Asteraceae), *Pittosporum senacia* (Pittosporaceae), *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) e *Ocimum tenuiflorum* (Lamiaceae). Os extratos metanólicos e aquosos foram analisados quanto a inibição do “burst” oxidativo usando a técnica de quimioluminescência induzida pelo luminol e lucigenina e os macrófagos humanos foram estimulados com PMA e zimosan. Os resultados preliminares de triagem mostraram que apenas três dos seis extratos aquosos e metanólicos apresentaram atividade inibitória significativa nas concentrações avaliadas (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$). Além disso, o extrato metanólico apresentou melhor atividade em todas as concentrações avaliadas. Os extratos avaliados mostraram inibição dose-dependente da quimioluminescência e não apresentaram efeito tóxico sobre as células.

2.8 Relevância do tema

Políticas governamentais vêm sendo implantadas para fortalecer os programas de fitoterapia no Brasil. Em 2008 foi elaborado a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) que é constituída de espécies vegetais com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse ao SUS. A espécie *Psidium guajava* está inserida nesta relação, pois devido ao seu uso popular como agente antidiarreico (sua ação mais disseminada) possui várias atividades biológicas comprovadas cientificamente como antimicrobiana, anti-inflamatória, hipoglicemiante e antioxidante, entre outras.

Neste contexto, a padronização de extratos vegetais é um importante aspecto a ser considerado quando se objetiva a implantação de uma espécie medicinal como possível medicamento fitoterápico. A RDC nº 14 de 31 de março de 2010, estabelece os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos os quais incluem a reprodutibilidade e constância da qualidade de um fitoterápico.

Atualmente, a indústria farmacêutica dá prioridade aos extratos secos em seu processo produtivo devido a sua maior estabilidade, concentração dos princípios ativos e facilidade de padronização, fatores estes que aumentam o valor agregado do produto.

Este trabalho está inserido na linha de pesquisa do LAPROFAR-FCFRP/USP onde se objetiva o desenvolvimento e padronização de extratos secos obtidos a partir de plantas medicinais e aromáticas e avaliação de suas propriedades biológicas, bem como a definição de estudos de estabilidade visando o estabelecimento do prazo de validade para os produtos obtidos.

Nas páginas seguintes serão descritas todas as etapas envolvidas na obtenção e padronização de extratos secos de *Psidium guajava*, planta medicinal selecionada para o desenvolvimento deste trabalho devido ao seu elevado conteúdo de compostos com atividade antioxidante que são o foco principal da atividade biológica desta espécie avaliado neste trabalho.

Na etapa de desenvolvimento tecnológico dos extratos secos de *P. guajava* será abordado a influência de adjuvantes de secagem (amidos modificados, β -ciclodextrina, dióxido de silício coloidal, entre outros) nas propriedades físico-químicas e biológicas dos extratos padronizados obtidos. Para a obtenção dos produtos secos serão avaliados dois equipamentos de secagem, o *spray drying* (secagem por atomização) e o *freeze drying*

(liofilização). Selecionaram-se estes dois secadores devido ao distinto mecanismo de secagem envolvido em ambos os processos, sendo que o *spray drying* utiliza temperaturas elevadas para a promoção da secagem enquanto que no *freeze drying*, a secagem é mediada pela sublimação do solvente utilizando-se baixas temperaturas e pressão reduzida.

Inúmeras metodologias analíticas serão abordadas visando à caracterização físico-química dos extratos secos padronizados obtidos e seleção das amostras promissoras, as quais serão empregadas para os ensaios de atividade biológica. Neste trabalho, diversos métodos para a determinação da atividade antioxidante são empregados com o objetivo de uma caracterização mais aprofundada do perfil antioxidante dos extratos de *P. guajava* utilizando-se protocolos com mecanismos de ação diferenciados e desta forma correlacionar os resultados obtidos nestes ensaios com os principais compostos ativos presentes na espécie vegetal *P. guajava*. Também serão apresentados os resultados do estudo de estabilidade e a determinação do prazo de validade dos extratos secos obtidos.

3. Objetivo

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo principal obter, proceder à caracterização físico-química, padronizar e avaliar quanto à atividade biológica os produtos microparticulados obtidos a partir de soluções extrativas de *Psidium guajava* L. utilizando-se o processo *spray drying*.

3.2 Objetivos específicos

Para atingir estes objetivos propostos foram desenvolvidas as seguintes etapas:

- Operações de extração de compostos bioativos presentes no material vegetal;
- Seleção da cultivar a ser empregada no estudo;
- Obtenção de produtos microparticulados a partir de solução extrativa da espécie vegetal selecionada, utilizando-se o processo *spray drying*;
- Seleção de adjuvantes tecnológicos;
- Caracterização físico-química dos extratos secos obtidos;
- Quantificação de polifenóis totais, taninos totais e flavonoides totais na matéria-prima vegetal, extratos líquidos e produtos secos;
- Avaliação da estabilidade dos extratos secos;
- Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos produtos secos obtidos.

4. Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os materiais e os métodos utilizados no desenvolvimento do trabalho. Inicialmente, uma breve descrição das etapas envolvidas na padronização de extratos secos de plantas medicinais é apresentada visando destacar os “pontos chave” do processo e facilitar o entendimento do trabalho realizado.

4.1 Principais etapas envolvidas na padronização de extratos vegetais

A produção de extratos secos padronizados deve respeitar uma sequência de procedimentos essenciais para a obtenção de um produto com as especificações desejadas, quanto aos critérios de qualidade, segurança e eficácia exigidos para produtos fitoterápicos (SOUZA, 2007).

Este trabalho investiga de forma geral todas as etapas relacionadas à produção e caracterização de extratos secos padronizados de *Psidium guajava* obtidos pelos processos *spray drying* e *freeze drying*. Pretende-se com este trabalho obter um protocolo para produção e avaliação físico-química e biológica de produtos microparticulados obtidos a partir de soluções extrativas de *P. guajava* através do monitoramento de todas as etapas envolvidas no desenvolvimento de um extrato seco padronizado.

A Figura 19 apresenta um fluxograma descrevendo resumidamente todas as etapas envolvidas no desenvolvimento de um extrato seco e as principais análises que devem ser realizadas.

Figura 19 – Fluxograma das principais etapas envolvidas no desenvolvimento do trabalho.

A primeira parte deste trabalho constituiu-se da coleta e seleção da matéria-prima vegetal a ser utilizada. Folhas frescas de quatro tipos de cultivares de *Psidium guajava* foram coletadas e secas em estufa de circulação, e moídas em moinho de facas para a obtenção de um pó com granulometria desejada. O pó seco das folhas foi chamado de matéria-prima vegetal e foi caracterizado através da determinação do tamanho de partículas (peneiramento), do teor de extrativos, do teor de umidade e do teor de compostos ativos (seção 4.3.2).

Após obtenção e caracterização físico-química, a matéria-prima vegetal (4 cultivares) foi utilizada para a obtenção dos extratos hidroalcoólicos (seção 4.3.3), os quais foram avaliados quanto ao teor de sólidos e quanto ao teor de compostos ativos.

Mediante os resultados obtidos foi selecionada a cultivar Pedro Sato que apresentou os melhores teores de compostos ativos e capacidade antioxidante mais pronunciada.

Foi realizada nova coleta das folhas desta cultivar. O material botânico foi identificado e depositado no herbário da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) com a excicata nº UALF-01505. Este material vegetal foi utilizado nas etapas posteriores do trabalho.

Após a secagem e moagem, a matéria-prima foi caracterizada quanto à distribuição granulométrica, teor de extrativos, perda por dessecação e teores de compostos ativos (seção 4.3.2).

O próximo passo foi a obtenção da solução extrativa com as folhas secas e moídas (seção 4.3.3), a qual foi avaliada quanto ao teor de sólidos, densidade relativa, pH, teor de compostos ativos e quanto à sua atividade antioxidante pelo método do radical DPPH.

Posteriormente, foi realizada a etapa de concentração da solução extrativa que visa o aumento do teor de sólidos para a viabilidade do processo de secagem. O produto obtido na etapa de concentração foi chamado de extrato concentrado. Este extrato foi caracterizado quanto ao teor de sólidos, densidade relativa, graduação alcoólica, pH e teor de compostos ativos. Além disso, foi feita a avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH.

O extrato concentrado foi separado em duas partes, sendo uma para a secagem no liofilizador e a outra para o preparo das suspensões de secagem, as quais foram adicionados adjuvantes de secagem e posteriormente submetidas ao processo de secagem por *spray dryer*, obtendo desta forma, os extratos secos de *P. guajava*.

Os extratos secos foram caracterizados quanto aos teores de compostos ativos, solubilidade, umidade residual, perda por dessecação, atividade de água, distribuição

granulométrica e tamanho das partículas. As propriedades farmacotécnicas como, densidade aparente e de compactação, Fator de Hausner e índice de compressibilidade e ângulo de repouso também foram determinadas.

Após a análise dos resultados obtidos para todos os extratos secos foram selecionados três extratos secos promissores para a finalização do trabalho. Com estes extratos foram realizados os ensaios de atividade antimicrobiana e antioxidante (por vários métodos como: ABTS, DPPH, FRAP, ORAC e quimioluminescência utilizando a sonda luminol), como também foram obtidas as micrografias por microscopia eletrônica de varredura e espectros de difração de raios-X.

Após a caracterização, os extratos secos selecionados foram armazenados em câmara climática (40 ± 2 °C; 75 ± 5 % UR) por 180 dias. Durante o armazenamento foram realizadas análises periódicas dos teores de compostos ativos e da atividade antioxidante através do método do radical DPPH.

Paralelamente ao estudo de estabilidade dos extratos secos foi conduzido um estudo com um extrato glicólico a 10% de *Psidium guajava*. O extrato glicólico foi caracterizado quanto ao teor de flavonoides totais, polifenóis e taninos totais e avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH.

A proposta para avaliação de um extrato glicólico de *P. guajava* partiu da observação de que a grande maioria dos extratos vegetais comercializados para indústrias e farmácias de manipulação é apresentada na forma de extrato glicólico. Desta forma, produziu-se um extrato glicólico que foi caracterizado e submetido aos estudos de estabilidade visando comparar sua estabilidade frente à dos extratos secos desenvolvidos neste trabalho. Também será utilizado em posteriores estudos de desenvolvimento de formulações tópicas contendo ativos de *P. guajava*, sendo um parâmetro de comparação para as formulações obtidas com o extrato seco otimizado.

4.2 Materiais

4.2.1 Matéria-prima vegetal

O primeiro passo para o desenvolvimento deste trabalho foi a seleção e obtenção da matéria-prima vegetal a ser utilizada. Folhas frescas de quatro tipos de cultivares de *Psidium guajava* foram coletadas, estabilizadas e posteriormente utilizadas para os ensaios de avaliação e seleção do material vegetal a ser utilizado nas etapas posteriores do trabalho.

As cultivares Paluma, Pedro Sato e Século XXI foram coletadas no município de Lavras (MG), na fazenda e indústria Casa da Goiaba. A cultivar, Santana da Vargem foi coletada na cidade de Santana da Vargem localizada a 63 km de Lavras (MG).

4.2.2 Reagentes, soluções e substâncias de referência

- ABTS (Sigma-Aldrich Chemical Co);
- Ácido fosfomolibídico (Vetec química fina);
- Álcool etílico absoluto (Labsynth);
- Azul de Tripan (Sigma-Aldrich Chemical Co);
- Carbonato de sódio anidro (Labsynth);
- Cloreto de alumínio (Labsynth);
- Dimetilsulfóxido (DMSO – Merck);
- DPPH (Sigma-Aldrich Chemical Co);
- Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich Chemical Co);
- Kit LDH Liquiform (Labtest Diagnostic);
- Líquido de Turk (violeta de gensiana 1% em solução de ácido acético 1%);
- Luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinodiona, Sigma-Aldrich Chemical Co);
- Meios de cultura: agar BHI (Brain Heart Infusion) e agar Sabouraud;
- Metanol grau HPLC (Sigma-Aldrich Chemical Co e JT Baker);
- Solução de Alséver (tampão citrato com azida sódica pH 6,1);
- Solução fisiológica (NaCl 0,15 mol/L);
- Solução de gelatina (Difco) 2,5% em NaCl 0,15 mol/L;
- Solução de Hanks pH 7,2 (PAUL, 1970);
- Solução de NH₄Cl 0,83% pH 7,2;

- Substâncias padrão: quercetina (Sigma-Aldrich Chemical Co), Trolox (Sigma-Aldrich Chemical Co);
- Triton x-100 (Sigma-Aldrich Chemical Co), e
- Tungstato de sódio (Vetec química fina).

4.2.3 Adjuvantes de secagem

Para a etapa de desidratação dos extratos vegetais foram utilizados os seguintes adjuvantes:

- Amido modificado (Dry Flo – National Starch Food Innovation);
- β -ciclodextrina (Roquette[®]);
- Celulose microcristalina (MC 102 – Microcel, Blanver Farmoquímica Ltda);
- Dióxido de silício coloidal (Aerosil[®] 200 - Degussa Brasil Ltda);
- Goma arábica (Encapsia – Colloides Naturel do Brasil), e
- Maltodextrina DE 10 (MOR-REX 1910 – Corn Products do Brasil).

4.2.4 Equipamentos utilizados

Os seguintes equipamentos foram utilizados no desenvolvimento deste trabalho:

- Agitador de peneiras (Bertel) com jogo de tamises;
- Agitador magnético multiprovas (Marte mod. Mag-Multi);
- Agitador magnético (Nova Ética mod. 119);
- Agitador mecânico (Fisatom Mod. 713Dmod) ;
- Alcoômetro (Incoterm);
- Balanças analíticas e semi-analíticas (Marte e Mettler Toledo);
- Balança determinadora de umidade (Sartorius, mod. MA 35);
- Banho-maria Fisaton (mod. 550);
- Banho de ultrassom Odontobrás (mod. 802);
- Bomba à vácuo (Prismatec - mod. 131);

- Bomba peristáltica COLE-PARMER (mod. 7553-75);
- Câmara climática Nova Ética (mod. 420CLD-300) com sistema de registro de dados via *software* para monitoramento de temperatura e umidade;
- Centrífuga Eppendorf (mod. 5810R Eppendorf Instruments INC);
- Colorímetro HunterLab ColorQuest XE;
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu Prominence CBM-20, equipado com detector espectrofotométrico de arranjo de diodo SPD-M20A, bombas LC-6AD, injetor de amostra SIL-10AF e *software* LC *solution*, versão 1.24 SP1. Coluna cromatográfica C18 (250 mm x 4,6 mm d. i. Shimadzu Shim-pack CLC (M) com tamanho de partícula de 5 μ m);
- Espectrofotômetro UV-Vis HP 8453 operando o *software* HP *Chem-Station*;
- Estufa de secagem e esterilização (Fanem, mod. 315 SE);
- Evaporador rotativo (Fisatom, mod. 802);
- Filtros;
- Homogeneizador de alta rotação ultra-turrax (IKA mod. T18 basic – 6000 a 24000 rpm/min);
- Liofilizador (SNL 108 B – Thermo Fischer Scientific);
- Luminômetro EG&G (Berthold, mod. Auto Lumat LB 953);
- Medidor de atividade de água (AquaLab 4TEV, Decagon Devices);
- Microscópio óptico Olympus (mod. BX60MIV operando o *software* Image Pro-Plus[®], versão 7.0);
- pH-metro Micronal (mod. B474);
- picnômetro;
- Tanque extrator de aço inox (altura: 34 cm, diâmetro: 22 cm), capacidade total de 12 litros;
- Titulador Karl Fischer (Titrino plus 870 Methrohm).

Outros equipamentos necessários para o desenvolvimento do trabalho.

4.2.5 Secadores

A obtenção dos extratos secos foi conduzida em dois tipos de secadores que apresentam distintos mecanismos de secagem: secador por atomização (*spray dryer*) e o liofilizador (*freeze dryer*).

4.2.5.1 *Spray dryer*

Para este trabalho utilizou-se o *spray dryer* modelo SD-05, fabricado pela Lab-Plant, Reino Unido. A câmara de secagem possui diâmetro de 215 mm e altura de 500 mm. Os principais componentes do sistema são o sistema de alimentação da suspensão de secagem, composto por uma bomba peristáltica (COLE-PARMER, modelo 7553-75), um atomizador tipo duplo fluido à ar comprimido e um compressor de ar; sistema de alimentação do ar de secagem, constituído por um soprador de ar e filtro de ar; sistema de controle de temperatura do gás de secagem e sistema coletor de amostra (ciclone) (Figura 20).

Figura 20 – Diagrama esquemático do *spray dryer* utilizado
Fonte: Souza et al. (2008).

4.2.5.2 Liofilizador (*Freeze dryer*)

Utilizou-se um liofilizador modelo SNL 108B da Thermo Fischer Scientific (Figura 21) contendo unidade liofilizadora (Micromodulyo 1,5 L), condensador em aço inoxidável;

compressor de 1/4 hp e potência de 0,30 kw; bomba de ultra-vácuo, frascos para liofilização e válvulas independentes.

Comparativamente, a liofilização pode apresentar produtos secos com alta qualidade, apesar do elevado custo da produção limitar sua ampla aplicação.

Este sistema foi utilizado visando à comparação entre os produtos obtidos pelos diferentes processos de secagem (operação em altas temperaturas no *spray dryer* e temperaturas reduzidas no liofilizador). Com isto pode-se discutir se o método de secagem foi apropriado para se obter um produto dentro dos padrões de qualidade exigidos para extratos secos de plantas medicinais.

Figura 21 – Fotografia do liofilizador Thermo Fischer Scientific SNL 108B.

4.3 Métodos experimentais

4.3.1 Seleção e avaliação do material vegetal

Na primeira etapa deste trabalho foram coletadas folhas maduras, sem sinais de injúria de quatro tipos de cultivares de *Psidium guajava*. As informações sobre as matérias-primas estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Cultivares de *Psidium guajava* e dados da coleta.

Cultivar	Local de coleta	Coordenadas (GPS)*	Data da coleta	Horário da coleta (h)
Pedro Sato	Lavras - MG	ELEV. 888 m S. 21°13' 32.7" HO. 44° 59' 06.0"	19/04/2010	11:05
Paluma	Lavras – MG	ELEV. 890 m S. 21° 13' 31.6" HO. 44° 59' 04.6"	19/04/2010	11:15
Século XXI	Lavras – MG	ELEV. 870 m S. 21° 13' 26.1" HO. 44° 59' 05.8"	19/04/2010	11:30
Santana da Vargem	Santana da Vargem – MG	ELEV. 824 m S. 21° 14' 37.6" HO. 45° 30' 37.3"	19/04/2010	13:00

* Coordenadas obtidas com o auxílio de GPS modelo eTrex Vista HCx, Garmin.

Com o objetivo de selecionar a cultivar com maiores teores dos compostos ativos de interesse presentes na espécie *Psidium guajava* foram realizadas as etapas descritas no fluxograma apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Fluxograma das etapas da extração dos compostos ativos e os métodos químicos e biológicos de análise envolvidos na seleção da cultivar.

Após uma análise comparativa dos resultados das quatro cultivares selecionou-se a cultivar Pedro Sato para o prosseguimento do trabalho.

A nova coleta das folhas da cultivar selecionada foi realizada em fevereiro de 2011 e as informações sobre a coleta estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Local de coleta de *Psidium guajava* L.

Cultivar	Local da coleta	Coordenadas (GPS)*	Data da coleta	Horário da coleta (h)
Pedro Sato	Lavras (MG), fazenda e indústria Casa da Goiaba	ELEV. 883 m S. 21°13' 32.9" HO. 44° 59' 05.6"	21/02/2011	11:30

* Coordenadas obtidas com o auxílio de GPS modelo eTrex Vista HCx, Garmin.

O material botânico foi identificado pelo Prof. Dr. Marcelo Polo e depositado no Herbário da Universidade Federal de Alfenas (Unidade I) com a exsicata nº UALF-01505. Este material vegetal foi utilizado nas etapas posteriores do trabalho.

As folhas de *Psidium guajava* foram separadas e dispostas em camadas finas e submetidas à secagem em estufa de ar circulante à temperatura de 45 °C, até a estabilização do peso.

O material seco foi pulverizado em moinho de facas MARCONI modelo MA 680, utilizando malha 20 (833 µm). O pó obtido foi armazenado em frasco âmbar hermeticamente fechado.

4.3.2 Caracterização da matéria-prima vegetal

A matéria-prima vegetal seca e moída foi caracterizada quanto à sua distribuição granulométrica, teor de extrativos, perda por dessecação e teores de flavonoides totais, polifenóis e taninos totais. Os métodos utilizados estão descritos a seguir.

4.3.2.1 Distribuição granulométrica

Uma amostra de 100,0 g da matéria-prima vegetal foi submetida à passagem através de tamises previamente pesados com abertura de malha de 0,800 a 0,071 mm, em agitador de

peneiras Bertel[®]. Após 15 minutos de agitação, as frações remanescentes sobre cada tamis foram pesadas. O resultado foi determinado de acordo com a classificação adotada pela Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA..., 2010).

4.3.2.2 Determinação do teor de extrativos

Amostras de 1 g de matéria-prima vegetal em base seca foram pesadas e aquecidas a fervura com 100,0 mL de solvente (água ou etanol 70%) durante 10 minutos. Após resfriamento, o peso inicial foi reconstituído com solvente adequado. A solução obtida foi filtrada desprezando-se os 20,0 mL iniciais. Alíquotas de 20,0 g do filtrado foram pesadas e colocadas em placas de Petri previamente pesadas e mantidas em estufa a 105 °C até atingirem massa constante (durante 24 horas) segundo procedimento apresentado por Souza (2007). O teor de extrativos foi calculado pela média de três determinações.

4.3.2.3 Determinação da perda por dessecação

A determinação da perda por dessecação foi realizada pelo método gravimétrico segundo procedimento descrito por Souza (2007). Amostras de 2 g de material vegetal foram pesadas em placas de Petri previamente pesadas e armazenadas em estufa a 105 °C, até obtenção de massa constante. Os resultados foram expressos em porcentagem, através da média de três determinações.

4.3.2.4 Quantificação de flavonoides totais

Para a quantificação do teor de flavonoides totais seguiu-se o método descrito e validado por Bott (2008). O conteúdo de flavonoides totais (FT) foi avaliado por espectrometria (UV/vis) usando uma massa de amostra pré definida após reação da amostra com o reagente cloreto de alumínio (AlCl_3), sendo o comprimento de onda deslocado para 425 nm, com um tempo de reação de 30 minutos.

Em um balão de fundo chato de 250 mL foi adicionado 2 g da matéria-prima vegetal moída e 30 mL de etanol 40% (v/v). O balão ficou em refluxo em manta de aquecimento por 15 minutos. O conteúdo foi filtrado utilizando filtro de algodão. A extração foi repetida por mais duas vezes com volume de 30 mL de etanol 40% (v/v) juntamente com o algodão utilizado para a filtração. Após o término do processo de extração por refluxo, o filtrado foi

recolhido em um balão de 100 mL e o volume completado com etanol 40% (v/v). Retirou-se 10 mL deste balão transferindo este conteúdo para um balão de 100 mL onde o volume foi novamente completado com etanol 40% (v/v). Transferiu-se 10 mL desta solução para quatro balões de 25 mL identificados como branco e amostras 1, 2 e 3. O balão correspondente ao branco foi apenas completado o volume com etanol 40% (v/v). Nos balões das amostras foram adicionados 2 mL de solução de AlCl_3 0,5% (p/v) e posteriormente o volume foi completado com etanol 40% (v/v). As amostras permaneceram em repouso, ao abrigo da luz por 30 minutos e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 425 nm.

O teor de flavonoides totais foi expresso como mg quercetina/g de extrato ou por grama de matéria-prima vegetal utilizando a equação da curva analítica: $\text{Abs}_{425\text{nm}} = 0,0618 * C_{\text{quercetina } \mu\text{g./mL}} - 0,014$ ($R^2 = 0,9973$). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

4.3.2.5 Quantificação de polifenóis e taninos totais

O uso popular das folhas de goiaba é predominantemente na forma de chá, a qual é uma solução aquosa. Portanto, para fins de comparação entre a solução extrativa aquosa e hidroalcoólica (70% v/v) foram realizados ambos os processos de extração utilizando água e solução hidroalcoólica para a quantificação de compostos fenólicos.

Assim, para esta avaliação foi usado o método de Folin-Denis que consiste na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngico pelos compostos fenólicos em meio básico produzindo uma coloração azul intensa a qual é mensurada por espectrofotometria em comprimento de onda de 750 nm com um tempo de reação de 2 minutos (BOTT, 2008).

Em um balão de fundo chato de 250 mL foi adicionado 0,75 g da matéria-prima vegetal moída e 100 mL de água. Para se obter a solução extrativa hidroalcoólica, em outro balão de 250 mL, a matéria-prima vegetal (0,75 g) foi adicionada a 100 mL de etanol 70% (v/v).

A mistura foi mantida em refluxo por 30 minutos em manta de aquecimento e em seguida foi resfriada em água corrente. O conteúdo foi transferido para um balão de 250 mL e o volume completado com água purificada ou solução etanólica 70%, v/v (solução mãe). Em seguida filtrou-se a solução desprezando-se os primeiros 20 mL.

Para a análise de polifenóis totais foram retirados 5 mL do filtrado e transferidos para um balão de 25 mL completando em seguida o volume do balão com água purificada. Posteriormente, foi transferido 1 mL desta solução para um tubo de ensaio âmbar onde foram adicionados na sequência, 1 mL de reagente de Folin-Denis e 8 mL de solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3). Após 2 minutos de reação procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 750 nm.

Para a análise de taninos totais foi adicionado 0,3 g de caseína a 20 mL da solução mãe. A suspensão ficou em agitação por 1 hora e após este procedimento foi filtrada. Transferiu-se 5 mL do filtrado para um balão de 25 mL sendo o volume completado com água destilada. Em seguida, 1 mL desta solução foi transferido para um tubo de ensaio âmbar onde foram adicionados na sequência, 1 mL de reagente de Folin-Denis e 8 mL de solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3). Após 2 minutos de reação procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 750 nm. O branco utilizado para ambas as quantificações foi água purificada. A concentração de taninos totais foi determinada pela diferença entre a concentração de polifenóis da amostra antes da precipitação com caseína e após a precipitação.

Cada ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico por grama de extrato ou por grama de matéria-prima vegetal utilizando a curva analítica: $\text{Abs}_{750\text{nm}} = 0,1442 \cdot C_{\text{pirogalo}} \mu\text{g/mL} - 0,0644$ ($R^2 = 0,9962$).

4.3.3 Obtenção e caracterização físico-química das soluções extrativas de *P. guajava*

As folhas secas e moídas foram submetidas à extração pelo processo de maceração dinâmica, usando etanol 70% (v/v) como solução extrativa, à proporção de 1:10 (p/v) planta/solvente e temperatura de extração de 50 °C, por 60 minutos. Para isso, utilizou-se um sistema de extração composto por um agitador mecânico, um extrator encamisado e um banho de aquecimento com temperatura controlada.

Os extratos foram filtrados sob vácuo em papel de filtro, mantidos em frascos âmbar ao abrigo da luz e armazenados a 4 °C para posteriores análises.

As soluções extrativas obtidas foram caracterizadas quanto ao teor de sólidos, densidade, graduação alcoólica, pH, teor de flavonoides totais, polifenóis e taninos totais e atividade antioxidante através do método DPPH segundo as metodologias descritas a seguir.

4.3.3.1 Determinação do teor de sólidos totais

O teor de sólidos (% g/g) foi determinado por gravimetria através do método da estufa, que consiste em pesar uma placa de Petri vazia e depois pesar a mesma placa contendo uma determinada massa de solução extrativa. A seguir colocou-se a placa na estufa a 105 °C até massa constante. O teor de sólidos foi calculado através da porcentagem de massa restante na placa de Petri. Os resultados foram expressos pela média de três determinações (SOUZA, 2007).

4.3.3.2 Determinação da densidade relativa

A densidade foi determinada pelo método do picnômetro, comparando-se com o peso específico da água destilada a 25 °C. A massa de água destilada e a massa da solução extrativa foram determinadas subtraindo o peso do picnômetro. Os resultados foram expressos pela média de três determinações (FARMACOPEIA..., 2010). A densidade da amostra é calculada através da Equação 1:

$$\rho = \frac{m_{se}}{m_{\text{água}}} \times \rho_{\text{água}}^{25\text{ }^{\circ}\text{C}} \quad (1)$$

Onde:

ρ = densidade da solução extrativa (g/cm³);
 m_{se} = massa da solução extrativa contida no picnômetro (g);
 $m_{\text{água}}$ = massa de água destilada contida no picnômetro (g).

4.3.3.3 Determinação da graduação alcoólica

A graduação alcoólica da solução extrativa foi determinada por alcoometria (FARMACOPEIA..., 2010). A amostra foi colocada em uma proveta de dimensões tais que permitissem ao alcoômetro flutuar livremente, sem tocar nas paredes ou no fundo evitando a formação de bolhas. O alcoômetro rigorosamente limpo foi imerso na amostra. Atingida a posição de equilíbrio, verificou-se o ponto de afloramento da haste, observando tangencialmente ao nível do líquido, ou seja, na parte inferior do menisco. O número correspondente ao ponto de afloramento indica em centésimos e em volume, o teor do líquido

em álcool absoluto. É necessário fazer correções sobre a indicação do instrumento em função da temperatura. Os resultados são expressos em grau Gay-Lussac ($^{\circ}$ GL = % v): quantidade em mililitros de álcool absoluto contido em 100 mililitros de mistura hidroalcoólica (INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL), 1985).

4.3.3.4 Determinação do pH

Para a avaliação do pH das soluções extrativas utilizou-se o aparelho Micronal B 474, aferido com soluções tampão de referência, pH 4,0 e 7,0. Os resultados foram expressos pela média de três determinações (FARMACOPEIA..., 2010).

4.3.3.5 Quantificação de flavonoides totais

A determinação de flavonoides totais para a solução extrativa foi realizada de acordo com a metodologia descrita em 4.3.2.4 utilizando para a análise a massa do extrato correspondente a 500 mg de sólidos. Esta massa da solução extrativa foi diluída em 80 mL de etanol 40% (v/v) e mantida sob agitação por 12 minutos. A amostra foi transferida para um balão volumétrico e o volume foi completado para 100 mL com etanol 40% (v/v). A solução foi filtrada e os primeiros 30 mL filtrados foram descartados. 10 mL desta solução foram diluídos em 100 mL de etanol 40% (Solução A). 10 mL desta solução foram transferidos para um balão de 25 mL e foram adicionados 2,0 mL de solução de cloreto de alumínio 0,5% (p/v) e o volume completado para 25 mL com etanol 40% (v/v). O branco foi preparado apenas com 10 mL da solução A diluídos para 25 mL com etanol 40% (v/v). Após 30 minutos a temperatura ambiente a absorvância foi medida em comprimento de onda de 425 nm.

4.3.3.6 Quantificação de polifenóis e taninos totais

A determinação de polifenóis e taninos totais para a solução extrativa foi realizada de acordo com a metodologia descrita em 4.3.2.5 utilizando para a análise a massa da solução extrativa correspondente a 100 mg de sólidos. Para esta determinação, a massa da solução extrativa foi diluída em 100 mL de água destilada. Esta solução foi filtrada sendo que os primeiros 20 mL do filtrado foram descartados. A solução filtrada foi chamada de solução mãe. Para a determinação de polifenóis totais, 5,0 mL da solução mãe foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume completado com água destilada. 1,0 mL

desta solução foram colocados em tubo de ensaio âmbar, sendo adicionados 1,0 mL do reagente de Folin-Denis e posteriormente 8,0 mL de uma solução saturada de carbonato de sódio. A absorvância da solução foi medida em espectrofotômetro em 750 nm exatamente 2 minutos após a adição da base. O branco foi constituído de água destilada.

Para a determinação da fração não tanante, 20,0 mL da solução mãe foram transferidos para um bequer contendo 0,3 g de caseína. A suspensão foi mantida em agitação por 60 minutos. Após agitação a suspensão foi mantida em repouso para que houvesse a precipitação do complexo formado caseína-tanino e posteriormente filtrada em papel de filtro. 5,0 mL do filtrado foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume completado com água destilada. 1,0 mL desta solução, 1,0 mL do reagente de Folin-Denis e 8,0 mL da solução saturada de carbonato de sódio foram transferidos para tubo âmbar. A absorvância da solução foi medida em espectrofotômetro em 750 nm exatamente 2 minutos após a adição da base e foi utilizada água como branco (BOTT, 2008).

4.3.3.7 Determinação da atividade antioxidante das soluções extrativas

Para a avaliação da atividade antioxidante (AA) utilizou-se a determinação da atividade seqüestradora de radicais livres usando o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (GEORGETTI et al., 2006). O DPPH é um radical livre estável que reage com outros compostos, os quais são capazes de doar um íon hidrogênio. Assim, a habilidade de doar hidrogênio das soluções extrativas, do extrato concentrado e dos extratos secos por *spray dryer* de *Psidium guajava* ao DPPH• foi determinada pela mudança de absorvância medida em 517 nm conforme o método descrito por Blois (1958). Aos tubos de reação adicionou-se alíquotas de diluições apropriadas das soluções dos extratos em diferentes concentrações (2,26; 4,53; 5,66; 6,79 e 9,05 µg/mL) contendo 1 mL de tampão acetato 0,1 M (pH = 5,5), 1 mL de etanol e 0,5 mL de 250 µM DPPH• em etanol absoluto. O branco foi preparado com a mistura de 0,5 mL do tampão e 1 mL de etanol absoluto. A mudança na absorvância foi medida após 20 minutos de reação, à temperatura ambiente em espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm. A solução do radical DPPH 250 µM no meio reacional foi empregada como controle positivo. Os ensaios foram realizados em triplicata. O parâmetro concentração inibitória (CI₅₀) (µg/mL), o qual reflete a concentração de extrato capaz de reduzir 50% do radical DPPH presente no meio, foi calculado para as amostras. Os resultados

foram expressos em valor médio (desvio padrão), obtidos em triplicatas. A porcentagem de DPPH reduzido foi calculada segundo a Equação 2:

$$\text{DPPH reduzido (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}}}{\text{Abs}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

Abs = Absorvância

Os resultados foram analisados como auxílio do *software* Prisma® versão 4.0 (GraphPad).

4.3.3.8 Obtenção de *fingerprints* das soluções extrativas por CLAE

Foi realizada a adaptação de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) descrito por Ferrandino e Guidoni (2010) visando à obtenção de *fingerprints* das soluções extrativas. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu CBM-20, equipado com detector espectrofotométrico de arranjo de diodo SPD-M20A, bombas LC-6AD, injetor de amostra SIL-10 AF e *software* LC *solution*, versão 1.24 SP1. Utilizou-se uma coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm d. i.) Shimadzu Shim-pack CLC (M), com tamanho de partícula de 5 µm. A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C. Foram injetados 20 µL das soluções extrativas, em triplicata e a vazão utilizada foi de 1,0 mL/min. A primeira avaliação dos perfis cromatográficos das cultivares de *Psidium guajava* foi realizada empregando-se gradiente exploratório linear com variação do solvente orgânico (B) na faixa de composição de 5-100% em 75 minutos. A fase móvel foi constituída por água acidificada (ácido fórmico) 0,1% (A) e metanol 100% (B). A detecção foi monitorada em vários comprimentos de onda e os selecionados para o estudo foram 254, 280, 300 e 360 nm. Com este procedimento, buscou-se obter um *fingerprint* das soluções extrativas e posteriormente um marcador químico da *Psidium guajava*.

4.3.4 Obtenção do extrato concentrado de *Psidium guajava*

Após a seleção da cultivar Pedro Sato para a continuação do estudo foi realizada nova extração para obtenção de um volume maior de solução extrativa.

As folhas secas e moídas foram submetidas à extração pelo processo de maceração dinâmica, usando etanol 70% (v/v) como solução extrativa, à proporção de 1:10 (p/v) planta/solvente e temperatura de extração de 50 °C, por 60 minutos. Para isto, adicionou-se 8 litros de etanol 70% (v/v) em reator de inox e a temperatura foi ajustada para 50 °C. Quando a temperatura foi atingida a matéria-prima vegetal em pó foi adicionada ao solvente sob agitação. Após a agitação (200 rpm) por 60 minutos, o extrato foi filtrado sob vácuo em papel de filtro.

A solução extrativa obtida foi caracterizada quanto ao teor de sólidos totais (seção 4.3.3.1), densidade relativa (seção 4.3.3.2), grau alcoólico (seção 4.3.3.3), pH (seção 4.3.3.4), flavonoides totais (seção 4.3.3.5), polifenóis e taninos totais (seção 4.3.3.6) e atividade antioxidante pelo método do radical DPPH (seção 4.3.3.7).

O extrato concentrado foi preparado com base no teor de sólidos obtido na etapa de extração, tendo como objetivo elevar o teor de sólidos para no mínimo 10%, para que a secagem pudesse ser mais efetiva. A concentração foi realizada em evaporador rotativo Fisatom, modelo 802, com temperatura não excedendo 50 °C e pressão reduzida de 600 mmHg. O extrato foi reduzido a uma massa correspondente a 3 vezes sua massa inicial.

Posteriormente o extrato concentrado foi submetido aos ensaios de secagem no liofilizador e à adição dos adjuvantes tecnológicos para secagem no *spray dryer*.

4.3.4.1 Caracterização do extrato concentrado

O extrato concentrado foi analisado quanto ao teor de sólidos totais (seção 4.3.3.1), densidade relativa (seção 4.3.3.2), graduação alcoólica (seção 4.3.3.3), pH (seção 4.3.3.4), teor de flavonoides totais (seção 4.3.3.5), teor de polifenóis e taninos totais (seção 4.3.3.6) e determinação da atividade antioxidante através do método DPPH[•] (seção 4.3.3.7).

4.3.5 Obtenção do extrato glicólico de *Psidium guajava*

Visando estudos posteriores de desenvolvimento de formulações de uso tópico contendo os compostos ativos de *P. guajava* preparou-se o extrato glicólico desta planta. Este extrato também foi empregado no estudo de padronização dos extratos secos como um extrato padrão, visto que, o extrato glicólico, é uma forma comercialmente disponível para indústrias e farmácias de manipulação de inúmeros extratos vegetais comumente utilizados em formulações cosméticas. Além disso, o extrato glicólico foi submetido aos estudos de estabilidade e os resultados obtidos confrontados com os resultados obtidos para os extratos secos desenvolvidos neste trabalho.

4.3.5.1 Preparo do extrato glicólico de *Psidium guajava*

Para o preparo do extrato glicólico de *Psidium guajava*, a solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo a temperatura de 50° C e pressão reduzida de 700 mmHg até a secura. Após este procedimento, o resíduo foi ressuspendido com propilenoglicol até a concentração final de sólidos de 10% (p/v).

4.3.5.2 Caracterização do extrato glicólico

O extrato glicólico foi caracterizado quanto ao teor de flavonoides totais (seção 4.3.3.5), polifenóis e taninos totais (seção 4.3.3.6) e avaliado quanto a atividade antioxidante pelo método DPPH[•] (seção 4.3.3.7).

4.3.6 Obtenção dos extratos secos de *Psidium guajava*

Adjuvantes de secagem como amidos de milho, mandioca e arroz, amidos modificados, maltodextrinas, coloidal dióxido de silício, goma acácia (goma arábica), ciclodextrinas e xaropes de milho sólidos são frequentemente utilizados com o objetivo de minimizar as perdas de compostos bioativos (atuando como agente de encapsulamento) e para melhorar ou modificar as propriedades físicas e químicas do produto. Os adjuvantes de secagem podem ser usados isolados ou em associações, sendo a composição ideal estabelecida para cada situação específica (OLIVEIRA et al., 2010).

No presente estudo, o extrato concentrado foi acrescido dos adjuvantes de secagem nas proporções de 40 e 80 % sobre o teor de sólidos e submetidos à secagem em *spray dryer* e em *freeze drying*.

Foram avaliados vários adjuvantes amplamente utilizados na secagem de produtos alimentícios e medicinais de acordo com estudos publicados na literatura e trabalhos anteriores do Laboratório de P & D em Processos Farmacêuticos da FCFRP/USP (LAPROFAR).

Assim, os adjuvantes selecionados para este estudo foram: dióxido de silício coloidal (Aerosil), celulose microcristalina (Microcel), amido modificado (Dry Flo), maltodextrina (Mor Rex 1910), goma arábica (Encapsia) e β -ciclodextrina (kleptose).

4.3.6.1 Procedimento de secagem por *spray dryer*

A etapa de secagem foi realizada visando à obtenção de extratos secos de *Psidium guajava*. A seleção das condições operacionais empregadas no processo de secagem foi baseada em estudos anteriores desenvolvidos no LAPROFAR (CORTÉS-ROJAS et al., 2012; GUEDES; SOUZA; OLIVEIRA, 2009; SOUZA, 2003). Os parâmetros operacionais do secador foram fixados em:

Temperatura de entrada do ar de secagem (T_{ge})	=	150 °C
Pressão do ar de atomização (P_{atm})	=	1,5 bar
Vazão do ar de atomização (W_{atm})	=	15 lpm
Vazão de alimentação do extrato (W_{susp})	=	4 g/min
Vazão do ar de secagem (W_g)	=	60 m ³ /h

O aquecimento do ar de secagem é o primeiro passo no início da operação de secagem. Ao ser atingida a temperatura desejada teve início a alimentação de água na vazão pré-estabelecida. A temperatura de saída do ar de secagem foi monitorada por aproximadamente 15 minutos, até que a condição permanecesse estável.

Quando esta condição foi atingida, a alimentação da composição de secagem se iniciou, sendo a temperatura de saída do ar monitorada a cada 5 minutos. Durante a realização

dos ensaios de secagem foram monitoradas a temperatura ambiente e umidade relativa do ar (%) utilizando o termo-higrômetro digital Minipa MTH – 1361.

Os extratos secos (ES) obtidos foram identificados segundo códigos que se baseiam no nome do adjuvante de secagem e as respectivas proporções utilizadas estão descritas na Tabela 5. Após sua preparação, os extratos secos obtidos foram armazenados em frascos de vidro âmbar e posteriormente caracterizados.

Tabela 5 - Formulações utilizadas para os ensaios de secagem em *spray dryer*.

Código formulação	Adjuvante 1	Proporção adjuvante 1 (%)	Adjuvante 2	Proporção adjuvante 2 (%)	Adjuvante 3	Proporção adjuvante 3 (%)
A 40	Aerosil	40	-	-	-	-
A 80		80	-	-	-	-
Cmic A 40	Celulose MC-102	35	Aerosil	5	-	-
Cmic A 80		70	Aerosil	10	-	-
M A 40	Maltodextrina DE10	35	Aerosil	5	-	-
M A 80		70	Aerosil	10	-	-
DFA 40	Dry Flo	35	Aerosil	5	-	-
DFA 80		70	Aerosil	10	-	-
MDEA 40	Maltodextrina DE10	25	Encapsia	10	Aerosil	5
MDEA 80		50	Encapsia	20	Aerosil	10
β CD 80	β -ciclodextrina	80	-	-	-	-

4.3.6.1.1 Avaliação do desempenho do secador *spray dryer*

O desempenho do processo de secagem foi avaliado pela determinação dos parâmetros: recuperação do produto (R) e eficiência térmica do secador (η) definida como a taxa de calor usada na evaporação pelo calor total fornecido ao secador (GOULA; ADAMOPOULOS, 2004; SOUZA et al., 2008). As equações utilizadas para determinar estes parâmetros estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Equações usadas na determinação do desempenho do *spray dryer*.

Parâmetro	Equação	Unidade	Eq.
Recuperação do produto (R)	$R = \frac{Mc.(1-X_p)}{W_s.C_s.\theta} \times 100$	% (g/g)	(3)
Eficiência térmica (η)	$\eta = \frac{(T_{ge} - T_{gs})}{(T_{ge} - T_{amb})} \times 100$	(-)	(4)

Mc: massa coletada (g); Xp: umidade (g); Ws: vazão de alimentação (g/min); Cs: teor de sólidos da composição de secagem (g/g); θ : tempo de processo (min); T_{ge}: temperatura do gás de entrada; T_{gs}: temperatura do gás de saída; T_{amb}: temperatura ambiente determinada durante o processo de secagem.

4.3.6.2 Procedimento de secagem por liofilização

As formulações de secagem apresentadas na Tabela 5 também foram utilizadas para a secagem por *freeze drying* sendo os códigos das amostras alterados pelo acréscimo da letra L.

4.3.6.2.1 Obtenção do extrato liofilizado

Para a obtenção do extrato seco no liofilizador, a solução extrativa obtida foi submetida à desalcoolização e concentração em evaporador rotativo (seção 4.3.4) sendo o extrato concentrado obtido submetido à liofilização.

Em tubos cônicos de 15 mL foram distribuídos 5 mL do extrato concentrado que a seguir foram congelados a -20 °C por 48 h. Em seguida foram levados ao *freezer* a -80 °C por 4 h e transferidos para o liofilizador Thermo Fischer Scientific SNL 108B, temperatura de condensação de -40 °C por 48 h. O extrato liofilizado, sem a adição de adjuvantes de secagem foi nomeado de PG LIO foi acondicionado em frasco de vidro âmbar e mantido em dessecador sob vácuo, do qual foram retiradas as amostras para os ensaios biológicos e de quantificação dos compostos de interesse. As formulações apresentadas na Tabela 5 seguiram o mesmo procedimento de obtenção e armazenamento.

4.3.7 Caracterização dos extratos secos de *Psidium guajava*

Os extratos secos obtidos pelos métodos de secagem por *spray drying* e *freeze drying* foram caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas: perda por dessecação, umidade residual, atividade de água, solubilidade, teor de flavonoides totais, polifenóis totais e taninos totais, distribuição granulométrica e tamanho médio das partículas, propriedades de fluidez dos extratos secos (*spray drying*) como fator de Hausner (FH) e índice de compressibilidade ou Índice de Carr (IC). A morfologia das partículas dos extratos secos selecionados (MA 80, MDEA 80 e β CD 80) foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os métodos empregados para estas determinações estão descritos a seguir.

4.3.7.1 Determinação da perda por dessecação

A determinação da perda por dessecação dos extratos secos foi realizada de acordo com a metodologia descrita em 4.3.2.3 utilizando para a análise 400 mg do extrato seco. As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em porcentagem.

4.3.7.2 Determinação da umidade residual por Karl Fischer

A umidade residual foi determinada pelo método direto, baseado na reação quantitativa da água com solução volumétrica conhecida como reagente de Karl Fischer, utilizando o equipamento Titrino plus 870 Methrom (FARMACOPEIA..., 2010). Foram utilizadas amostras de aproximadamente 100 mg de extrato seco para cada determinação. As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em média (desvio padrão).

4.3.7.3 Determinação da atividade de água (A_a)

A atividade de água (A_a) dos extratos secos foi determinada em triplicata no equipamento Aqua Lab 4 TEV (Decagon, Devices) à temperatura de 25 °C, utilizando o sensor de ponto de orvalho. Este parâmetro está relacionado à umidade do pó e possibilita determinar a quantidade de água livre disponível para o crescimento microbiano e para reatividade química e enzimática.

4.3.7.4 Determinação da solubilidade

A solubilidade dos extratos secos foi determinada segundo Cano-Chauca et al., (2005) com algumas modificações. O método consiste na adição de 100 mg de amostra a um recipiente fechado contendo 10 mL de água destilada. A mistura foi agitada por 10 minutos em agitador magnético e transferida para tubo Falcon para ser centrifugada por cinco minutos (2330 xg). Alíquotas de 2,5 mL do sobrenadante foram retiradas e colocadas em placas de Petri previamente pesadas e levadas à estufa a 105 °C, por cinco horas sendo feita nova pesagem após este período. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de solubilidade.

4.3.7.5 Determinação do teor de flavonoides totais

A determinação de flavonoides totais para os extratos secos foi realizada de acordo com a metodologia descrita em 4.3.3.5 utilizando para a análise uma massa de 500 mg de sólidos do extrato (descontando o adjuvante de secagem).

4.3.7.6 Determinação do teor de polifenóis e taninos totais

A determinação de polifenóis e taninos totais para os extratos secos foi realizada de acordo com a metodologia descrita em 4.3.3.6 utilizando para a análise a massa de 100 mg de sólidos do extrato (descontando o adjuvante de secagem).

4.3.7.7 Determinação da distribuição granulométrica e tamanho médio das partículas

Para a determinação do tamanho médio das partículas e sua distribuição granulométrica foi empregado o método de microscopia óptica com análise de imagem.

A distribuição granulométrica dos extratos secos foi determinada dispersando-se uma amostra do pó em uma lâmina de vidro e obtendo-se imagens com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus[®] – mod. BX60MIV). As fotos obtidas foram analisadas por um sistema de análise de imagens (Image Pro-Plus[®], 7.0) utilizando na contagem das partículas o diâmetro médio que se refere ao comprimento médio dos diâmetros medidos em intervalos de dois graus e passando através do centro da partícula. O procedimento foi repetido até se obter

uma contagem de pelo menos 1000 partículas. A análise foi realizada para todos os extratos secos obtidos segundo procedimento apresentado por Souza (2007).

4.3.7.8 Determinação das propriedades de fluidez dos extratos secos

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

4.3.7.8.1 Determinação da densidade aparente e de compactação

Um grama de cada um dos extratos secos foi pesado, separadamente, e transferido para proveta de 10 mL para medida do volume ocupado pelo pó e determinação de sua densidade aparente. Para a determinação da densidade de compactação, a amostra do extrato seco acondicionada na proveta foi submetida a 1250 quedas em superfície lisa e altura de 3 mm (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995). Os resultados foram expressos pela média (desvio padrão) de três determinações.

4.3.7.8.2 Determinação do fator de Hausner e índice de compressibilidade

O Fator de Hausner (FH) foi determinado através do quociente entre a densidade de compactação e densidade aparente dos extratos secos (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995), conforme a Equação 5. O índice de compressibilidade (IC) foi determinado segundo Equação 6.

$$FH = \frac{\rho_c}{\rho_a} \quad (5)$$

$$IC = \frac{(\rho_c - \rho_a)}{\rho_c} \times 100 \quad (6)$$

Onde: ρ_c é a densidade de compactação (g/cm^3) e ρ_a é a densidade aparente (g/cm^3).

4.3.7.8.3 Determinação do ângulo de repouso

O ângulo de repouso tem sido utilizado como um método indireto de quantificar a escoabilidade de um pó em função da sua relação com a coesão entre as partículas. Foi utilizado para esta determinação o método do funil onde cinco gramas da amostra foram colocadas no funil de alumínio e depois se deixou cair sobre uma folha de papel. A altura e o diâmetro do cone formado foram medidos com o auxílio de um paquímetro sendo calculado o valor médio de três determinações (AULTON, 2005). O ângulo de repouso é determinado pela Equação 7:

$$\operatorname{tg} \alpha = h/r \quad (7)$$

Onde: h é a altura e r o raio da base do cone.

4.3.7.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A forma e características superficiais das amostras de extratos secos foram analisadas através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) empregando-se o microscópio eletrônico de varredura (Zeiss mod. EVO 50) com atmosfera de vácuo de 10^{-5} torr. As amostras foram colocadas sobre um porta-amostras de alumínio cobertos com fita adesiva de carbono de dupla face. Em seguida, as amostras foram introduzidas no pulverizador de ouro (Bal – Tec mod. SCD – 050 Sputter Coater) para o recobrimento com um filme de ouro (120 segundos, vácuo 2.10^{-2} mbar, corrente 40 mA). As micrografias foram geradas no modo topográfico a 20 kV (detector de elétrons secundário) com aumentos de 500 x, 1.00 kx, 2.00 kx, 3.00 kx e 10.00 kx.

Após as primeiras análises dos extratos secos obtidos em *spray dryer* selecionou-se três amostras que apresentaram resultados mais promissores com relação aos teores dos compostos ativos como, flavonoides totais, polifenóis e taninos totais. Os extratos secos selecionados, o extrato concentrado e o extrato liofilizado (PG LIO) foram avaliados quanto à capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana (métodos descritos nas seções 4.3.8.1 e 4.3.9).

4.3.8 Avaliação da atividade biológica dos extratos de *Psidium guajava*

Gutiérrez, Mitchell e Solis (2008) apresentaram uma extensa revisão sobre os usos tradicionais, fitoquímica e atividades biológicas de *Psidium guajava*. Neste trabalho foi dada ênfase as atividades antioxidante e antimicrobiana da planta.

Os extratos secos por *spray drying* foram inicialmente avaliados quanto à atividade antioxidante pelo método do radical DPPH. Após a seleção dos extratos secos com melhores teores de compostos ativos, foram realizados os demais ensaios de atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

Nenhum ensaio isoladamente irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Vários ensaios químicos *in vitro* foram desenvolvidos para medir a capacidade antioxidante de produtos vegetais. Um grande número destes ensaios depende da geração de radicais livres. Como observado por Huang, Ou e Prior (2005) um exame dos vários ensaios de antioxidante é necessário para o desenvolvimento de métodos padrão que são amplamente aplicáveis por pesquisadores e na indústria. No entanto, devido à natureza complexa dos sistemas biológicos, não há nenhum método único universal para medir a capacidade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Portanto, foram utilizados vários ensaios para se estimar a capacidade antioxidante dos extratos concentrado, liofilizado e secos em *spray dryer* de *Psidium guajava* de uma forma mais abrangente.

4.3.8.1 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Psidium guajava*

4.3.8.1.1 DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos (concentrado, liofilizado e extratos secos em *spray dryer*) foi realizada inicialmente pelo método do radical DPPH (GEORGETTI et al., 2006). Para as análises foram preparadas soluções com o extrato concentrado (33,6 mg/mL de sólidos), liofilizado (39,4 mg/mL de sólidos) e extratos secos em *spray dryer* (60,5 mg/mL de sólidos) diluídas em etanol 70% (v/v). De cada solução mãe foram preparadas novas soluções nas concentrações de 1,40; 2,81; 5,61; 7,01; 8,42 e 11,22 µg/mL (extrato concentrado); 1,42; 2,84; 5,69; 7,11; 8,53 e 11,38 µg/mL (extrato liofilizado), 1,84; 3,68; 7,36; 9,20; 11,04 e 14,73 µg/mL (extrato seco em *spray dryer* a 40% de adjuvantes) e 2,37;

4,73; 9,47; 11,83; 14,20 e 18,93 $\mu\text{g/mL}$ (extrato seco em *spray dryer* a 80% de adjuvantes). A descrição do método encontra-se na seção 4.3.3.7.

4.3.8.1.2 ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ou TEAC (Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox)

O método do cátion radical ABTS foi realizado de acordo com Ré et al. (1999) com algumas modificações. O $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi gerado pela reação de 5 mL de uma solução 7 mM (192 mg/50 mL) de ABTS e 88 μL de uma solução 140 mM (378,4 mg/10 mL) de persulfato de potássio a temperatura ambiente durante 16 horas ao abrigo da luz. A solução de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi diluída com etanol absoluto até uma absorvância de $0,700 \pm 0,05$, medida a 734 nm. Os extratos foram apropriadamente diluídos com etanol absoluto nas concentrações de 0,60; 1,20; 1,50; 1,80 e 2,40 mg/mL (solução extrativa); 0,71; 1,42; 1,78 e 2,14 mg/mL (extrato concentrado); 4,03; 8,06; 10,08; 12,10 e 16,13 mg/mL (extratos secos em *spray dryer* a 80% de adjuvantes) e 2,62; 5,25; 6,56; 7,88 e 10,50 mg/mL (extrato liofilizado PG LIO) e posteriormente transferidos 10 μL de cada concentração para tubos de ensaio com 3 mL do radical ABTS (RUFINO et al., 2007b). A absorvância da reação foi determinada a 734 nm após 6 minutos, usando o espectrofotômetro UV/vis HP 8453. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

A avaliação da atividade antioxidante utilizando o radical ABTS normalmente é expressa como valor TEAC (Atividade Antioxidante Total equivalente ao Trolox), que é definida como a concentração de Trolox que apresenta o mesmo percentual de inibição que uma concentração de 1 mM do composto de referência.

Construiu-se uma curva analítica com Trolox a partir de soluções com concentrações de 0 a 2000 μM . O tubo branco constituiu-se de etanol absoluto.

A porcentagem de inibição do radical ABTS foi calculada e ajustada em função da concentração de Trolox por regressão linear. A absorvância da solução oxidada resultante foi comparada com as soluções do padrão. Os resultados foram expressos com base em TEAC.

4.3.8.1.3 ORAC (Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio)

O método ORAC foi realizado conforme descrito por Chisté et al. (2011), com modificações. Para a realização do ensaio foi utilizado um espectrofotômetro leitor de fluorescência em microplacas Molecular Devices SpectraMax M3. Foram utilizadas microplacas escuras contendo 96 orifícios sendo que o comprimento de onda de excitação e emissão foi de 485 e 528 nm, respectivamente. Alíquotas de 30 µL do padrão, controle ou amostra foram pipetadas em cada poço da microplaca, logo após foram acrescentados 60 µL da solução de fluoresceína 508,2 nM, preparada a partir da solução estoque 4,1 mM. Em seguida, foram acrescentados 110 µL da solução de 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) diidroclorido (AAPH) 76 mM. Ambas as soluções foram preparadas em tampão fosfato de potássio 75 mM (pH 7,4) que também foi utilizado como branco na análise. A reação foi incubada a 37 °C e a leitura da fluorescência realizada no leitor de microplacas a cada minuto, durante 2 horas. A partir dos valores obtidos foi calculada a área sob a curva de fluorescência *versus* tempo. O padrão Trolox, nas concentrações de 12,5 a 400 µM, foi utilizado para a construção da curva analítica por meio das Equações 8 e 9:

$$AUC = 1 + \left(\frac{f_1 + f_2 + f_3 + \dots + f_i}{f_0} \right) \quad (8)$$

Onde *AUC* é a área sob a curva, *f*₀ é a fluorescência relativa ao tempo 0 e *f*_i, a fluorescência relativa ao tempo *i* (tempo de inibição). A *AUC* net foi calculada pela subtração da *AUC* do controle (*AUC* ct) do valor da *AUC* da amostra ou padrão (*AUC* am ou *AUC* pd), de acordo com a Equação 9:

$$AUC_{net} = AUC_{am \text{ ou } pd} - AUC_{ct} \quad (9)$$

Os valores de *AUC* net (*x*), obtidos na Equação 9 foram plotados com os valores das concentrações (*y*) do trolox e, com o ajuste da curva, os resultados foram expressos em µM de Trolox Equivalente (TE)/mg de amostra.

4.3.8.1.4 FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)

O ensaio FRAP foi determinado através do método inicialmente proposto por Benzie e Stain (1996) com algumas modificações (RUFINO et al., 2006). Todas as soluções foram preparadas no dia da análise. A curva analítica foi preparada usando várias concentrações (250 a 1500 μM) de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Em ambiente escuro, 90 μL de cada diluição das amostras e 270 μL de água deionizada foram adicionados a 2,7 mL do reagente FRAP. Este reagente é obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL da solução de 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM devendo ser usado imediatamente após seu preparo. A mistura de reação foi homogeneizada em agitador de tubos e mantida em banho-maria a 37° C por 30 minutos. A absorvância das amostras foi medida a 595 nm no espectrofotômetro (Shimadzu UVmini 1240) usando o reagente FRAP como branco. A capacidade redutora dos extratos analisados foi calculada com referência à solução padrão de Fe^{2+} . Os valores de FRAP foram expressos como $\mu\text{M Fe}^{2+}$ /mg de amostra. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

4.3.8.2 Ensaio em modelos celulares

A atividade antioxidante de extratos concentrado, PG LIO e de três extratos acrescidos de adjuvantes (MA 80, MDEA 80 e βCD 80) foi avaliada pelo ensaio da quimioluminescência dependente de luminol (QL_{lum}) produzida por neutrófilos humanos estimulados com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). Além disso, foi verificado o efeito tóxico dos extratos sobre os neutrófilos. Os ensaios de atividade antioxidante e toxicidade dos extratos em modelos celulares foram realizados no Laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP, Departamento de Física e Química sob a supervisão da Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim.

4.3.8.2.1 Casuística - ensaios *ex vivo*

-Sujeitos da pesquisa

Os sujeitos utilizados neste trabalho consistiram de cerca de 10 voluntários saudáveis, de ambos os sexos, na faixa etária de 20 a 40 anos, que não estavam fazendo uso de qualquer tipo de medicamento há pelo menos uma semana em relação à data em que participaram da pesquisa. Foi feita a coleta de sangue periférico, o qual foi utilizado para o isolamento de

neutrófilos. Os voluntários foram conscientizados dos objetivos do trabalho e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto contendo as descrições dos experimentos foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com humanos da FCFRP-USP, tendo sido aprovado e registrado como Of. CEP/FCFRP nº 108/2011 (ANEXOS A e B).

4.3.8.2.2 Obtenção de leucócitos polimorfonucleares (PMNs)

O sangue foi colhido de voluntários saudáveis, seguindo os procedimentos éticos, de acordo com a resolução 196/96.

Vinte mililitros de sangue humano foram coletados através de punção venosa com sistema à vácuo. Posteriormente a coleta, este sangue foi transferido para um tubo cônico contendo anticoagulante Alséver pH 6,1 (v/v).

A técnica empregada para separação das células foi o método de Henson (1971) modificado por Lucisano e Mantovani (1984). O sangue colhido foi centrifugado a 1250xg por 10 minutos a 4 °C e o plasma removido. O sedimento obtido foi suspenso com solução de gelatina a 2,5% (p/v) em solução fisiológica na proporção de duas vezes o volume de células e deixado em repouso por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, o sobrenadante contendo os PMN foi centrifugado a 974xg por 10 minutos a fim de se remover a gelatina. Para eliminar as hemácias presentes na solução foi utilizado um tratamento com cloreto de amônio 0,83% (p/v), pH 7,2, por 5 minutos a 37 °C. Após este período foi realizada a centrifugação a 974xg por 10 minutos. As células foram posteriormente lavadas com solução fisiológica e centrifugadas a 974xg por 10 minutos. Os PMN foram suspensos em 1 mL de solução de Hanks contendo 0,1% de gelatina. A viabilidade celular foi verificada por exclusão com corante Azul de Tripan e a quantificação realizada através de contagem em câmara de Neubauer. O número de células foi acertado para 2×10^6 células/mL.

4.3.8.2.3 Efeito das amostras de extratos secos de *Psidium guajava* sobre o metabolismo oxidativo dos PMN: ensaios de quimioluminescência (QL)

Para a realização dos ensaios de QL foi, primeiramente, realizada uma triagem a fim de se determinar as concentrações dos extratos a serem utilizados nos experimentos de maneira que o cálculo do CI_{50} (concentração de extrato capaz de inibir em 50% a emissão de QL) fosse possível. Assim, foram estabelecidas cinco concentrações dos diferentes extratos,

cujas atividades apresentaram pelo menos dois valores acima e dois valores abaixo de 50% de inibição da QL.

As amostras de cada extrato de *Psidium guajava*, foram inicialmente preparadas em Dimetilsulfóxido (DMSO) e depois diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) de modo que a concentração de DMSO não ficasse acima de 1%, a qual pode interferir com os resultados obtidos nos ensaios de QL (KAHLER, 2000).

As soluções diluídas em PBS foram utilizadas nos ensaios de QL de maneira que as concentrações finais dos extratos fossem de 50, 25, 5, 2,5 e 1,25 µg/mL e a concentração final de DMSO de 0,1%.

Para a amplificação da resposta da medida de QL foram utilizadas soluções de luminol. A adição da sonda ao meio reacional (volume final de 0,5 mL) resultou em uma concentração final de $2,8 \times 10^{-4}$ mol/L.

4.3.8.2.4 Medida de QL_{lum} das amostras estudadas

Aos tubos de reação foram adicionados: a suspensão de PMN (1×10^6 células/mL), solução de Hanks (espontâneo: apenas células e sonda, ausência de atividade antioxidante) ou DMSO na concentração final de 0,1% (controle) ou os extratos avaliados (concentrações finais que variaram de 50 a 1,25 µg/mL) e a sonda luminol (concentração final de $2,8 \times 10^{-4}$ mol/L). Após a incubação por 2 minutos a 37 °C foi adicionado em cada tubo o estímulo forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). Durante o tempo de incubação do estímulo PMA com os neutrófilos (20 minutos a 37 °C) a produção de QL foi acompanhada e registrada em um luminômetro (Auto Lumat LB 953 EG & G BERTHOLD). A QL foi medida em contagem de fótons por minuto (cpm) em função do tempo. Os ensaios foram realizados em triplicata. Como um padrão de inibição da QL, utilizou-se a quercetina, uma vez que se trata de uma substância (flavonoide) com comprovada atividade antioxidante.

Através das curvas de QL_{lum} em função do tempo foram calculados os valores da área integrada de 0 a 20 minutos. Tais valores foram utilizados para determinar a porcentagem de inibição promovida pelas diferentes concentrações das amostras analisadas em relação aos respectivos controles, através das Equações 10 e 11:

$$\%R = (AS/AC) \times 100 \quad (10)$$

$$\%I = 100 - \%R \quad (11)$$

Onde:

AS = área integrada da amostra analisada (extratos);

AC = área integrada do controle (DMSO a 0,1%);

% R = porcentagem de resposta;

% I = porcentagem de inibição.

Os diferentes extratos e o padrão de quercetina foram avaliados em cinco concentrações para a determinação dos valores de CI_{50}^{QL} , o qual foi calculado através da utilização de regressão não linear. Os valores de CI_{50}^{QL} foram expressos como média (desvio padrão) e foram utilizados como parâmetro para comparação da atividade antioxidante entre os diferentes extratos e o padrão quercetina.

A atividade antioxidante dos extratos e da quercetina foi avaliada em três experimentos independentes, com medidas em duplicata.

4.3.8.2.5 Ensaio de toxicidade dos extratos de *Psidium guajava* sobre os neutrófilos

A avaliação da toxicidade dos extratos concentrado, extrato liofilizado (PG LIO) e três extratos acrescidos de adjuvantes (MA 80, MDEA 80 e β CD 80) foi realizada com o intuito de verificar se as atividades apresentadas nos ensaios de QL eram relacionadas a efeitos tóxicos destas amostras sobre os PMN.

Para se obter estes resultados foram utilizados dois ensaios, o de exclusão ao corante Azul de Tripan e o ensaio cinético *in vitro* para determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada pelos neutrófilos, seguindo-se as condições experimentais padronizadas por Kabeya (2002).

Alíquotas da suspensão de neutrófilos (1×10^6 células/mL) foram incubadas por 20 minutos a 37 °C na presença de solução Hanks (controle negativo); ou de Triton X-100 (0,2%) (controle positivo); ou DMSO (controle do solvente - 0,1%); ou das amostras avaliadas, nas concentrações de 5 e 50 µg/mL dissolvidas em DMSO. O volume final de reação foi de um mililitro.

Os tubos de reação foram centrifugados a 755xg por 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e mantidos em banho de gelo para a determinação da atividade da LDH.

Os sedimentos das células foram suspensos em solução de Hanks contendo 0,1% de gelatina. Uma alíquota dessa suspensão foi misturada com igual volume de Azul de Tripán, preparado a 0,1% em NaCl 0,15 M e transferida para câmara de Neubauer. A porcentagem de células viáveis foi determinada a partir da contagem de 200 células em microscópio óptico.

A atividade da enzima LDH de cada amostra foi determinada utilizando-se o Kit LDH Liquiform (LABTEST DIAGNÓSTICA). Esta enzima catalisa a conversão do piruvato a lactato na presença do NADH. Adicionou-se uma alíquota de 100 µL do sobrenadante a 1 mL do reagente de trabalho (piruvato + NADH + tampão específico) pré-aquecido a 37 °C. A absorvância em 340 nm foi medida durante 3 minutos a 37 °C em espectrofotômetro DU-70 (Beckman, Fullerton, CA, USA). A toxicidade foi avaliada em cinco experimentos independentes, com medidas em duplicata. O valor da atividade da LDH nas amostras foi calculado de acordo com a Equação 12 fornecida pelo fabricante do Kit LDH Liquiform.

$$A = [(A_i - A_f)/2] \times 1,746 \quad (12)$$

Onde:

- A = atividade de LDH na amostra, em U/mL;
- A_i = absorbância inicial (1 minuto) em 340 nm;
- A_f = absorbância final (3 minutos) em 340 nm;
- 1,746 = fator de cálculo estipulado pelo fabricante do Kit, para 100 µL da amostra.

4.3.9 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os ensaios para determinação da atividade antimicrobiana dos extratos concentrado, extrato liofilizado (PG LIO) e três extratos acrescidos de adjuvantes (MA 80, MDEA 80 e βCD 80) foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL – MG, Instituto de Ciências Biomédicas, sob a supervisão da Profa. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias utilizando a metodologia de microdiluição em caldo.

- Microrganismos avaliados

As amostras microbianas de bactérias e leveduras utilizadas na avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em estudo pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL-MG. As amostras de bactérias e leveduras são linhagens padrões da *American Type Culture Collection* (ATCC). *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027); *Candida albicans* (ATCC 10231); *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida glabrata* (ATCC 90030).

As amostras de bactérias foram mantidas em Agar BHI e os fungos, em Agar Sabouraud a 8°C, até o momento de realização dos testes.

- Preparo dos inóculos bacterianos

Para o preparo do inóculo, as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram ativadas com caldo BHI e incubadas a 35°C por 18 horas. Para o isolamento das colônias jovens, uma alíquota de cada cultura ativada foi transferida para meio com Agar Mueller Hinton, pelo menos duas vezes para assegurar pureza e viabilidade das culturas jovens e incubada a 35°C por aproximadamente 24 horas. Após o período de incubação foram selecionadas 3 a 4 colônias transferindo-as para um tubo estéril contendo 5 mL de solução de NaCl a 0,9% (m/v). A turvação da suspensão celular foi comparada com a turvação 0,5 da escala de MacFarland e ajustada em câmara de Neubauer a uma concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ células/mL. Os inóculos bacterianos foram diluídos 1:100 em meio caldo Mueller Hinton para se obter a concentração de trabalho de $1,5 \times 10^6$ células/mL.

- Preparo dos inóculos de fungos leveduriformes

Para o preparo do inóculo foram utilizadas linhagens de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*. Os fungos leveduriformes foram semeados em meio Agar Sabouraud Dextrosado, pelo menos duas vezes para assegurar pureza e viabilidade das culturas jovens e incubados a 37°C por 48 horas. Após incubação transferiram-se 4 a 5 colônias de levedura com alça estéril para um tubo estéril contendo salina. A turvação da suspensão celular foi comparada com a turvação 0,5 da escala de MacFarland e ajustada por contagem celular em câmara de

Neubauer correspondendo a uma concentração aproximada de $5,0 \times 10^6$ células/mL. Os inóculos foram diluídos 1:10 em meio caldo RPMI 1640 obtendo-se a concentração de trabalho de $5,0 \times 10^5$ células/mL.

- Preparo das diluições dos extratos

Preparou-se uma solução estoque inicial, na concentração de 5 mg/mL, de cada extrato a ser avaliado. Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e homogeneizados em “vórtex” até dissolução completa. Em seguida, as soluções em DMSO foram diluídas 100x no meio de cultura utilizado no ensaio, reduzindo a concentração final do solvente para 1%. O DMSO, nesta concentração foi utilizado no ensaio como controle da diluição.

Os extratos secos e os adjuvantes utilizados na secagem em *spray dryer* foram avaliados em concentrações de 1000; 500; 250, 125, 100, 80, 40, 20, 10 e 5 µg/mL.

- Avaliação da sensibilidade bacteriana e fúngica por microdiluição em caldo

O método utilizado para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos foi o teste de microdiluição em caldo. Foi adotada a metodologia proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para teste de microdiluição em caldo para bactérias conforme documento M7A6 (CLSI, 2003) e para leveduras conforme documento M27A3 (CLSI, 2008).

Para a realização desta metodologia foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato que são compostas por colunas numeradas de 1 a 12 e fileiras de A a H (Figura 23).

Figura 23 - Esquema do preparo da microplaca utilizada no teste de avaliação antimicrobiana dos extratos em estudo.

O meio de cultura caldo Mueller Hinton acrescido de DMSO nas mesmas concentrações finais propostas para os extratos foram utilizados como controle negativo. As drogas padrões utilizadas como controle positivo no teste foram o antifúngico Fluconazol (nas concentrações em µg/mL: 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125) e o antibiótico Cloranfenicol (nas concentrações em µg/mL: 125; 62,5; 31,2; 15,6; 3,9; 1,95; 0,975; 0,487; 0,122; 0,06). Os ensaios foram realizados em duplicata.

No ensaio de avaliação da sensibilidade antibacteriana e antifúngica foi utilizado o meio de cultura caldo Mueller Hinton 2x concentrado.

- Avaliação da sensibilidade bacteriana

Em ambiente asséptico, foram distribuídos 100 µL do meio de cultura caldo Mueller Hinton em todos os poços da microplaca de 96 poços. Em seguida, foram distribuídos 100 µL das diluições dos extratos nas filas de A a G e colunas de 2 a 11 com auxílio de pipetador

multicanal. Na fila H, foram acrescentados 100 µL das diluições do antimicrobiano cloranfenicol (em µg/mL: 125; 62,5; 31,2; 15,6; 3,9; 1,95; 0,975; 0,487; 0,122; 0,06).

Logo após, 100 µL da suspensão bacteriana foram distribuídos em todos os poços, das colunas de 2 a 12. Na coluna 1, foram acrescentados mais 100 µL de meio de cultura; esta coluna contém apenas meio de cultura e é considerada o branco do teste, ou seja, é destinada para o controle de esterilidade do meio. A última coluna, apenas com meio e microrganismo foi destinada para controle de crescimento microbiano. As placas foram seladas com filme PVC, tampadas e incubadas a 37 °C (Figura 23).

- Avaliação da sensibilidade fúngica

Foram distribuídos 100 µL do meio de cultura caldo Mueller Hinton em todos os 96 poços da microplaca. Em seguida, foram distribuídos 100 µL das diluições dos extratos nas colunas de 2 a 11 e filas de A a F com auxílio de pipetador multicanal. Na fila G, foram acrescentados 100 µL das diluições do antifúngico Fluconazol (nas concentrações em µg/mL: 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125).

Após, 100 µL da suspensão de leveduras foram distribuídos em todos os poços, das colunas de 2 a 12. Na coluna 1, foram acrescentados mais 100 µL de meio de cultura; esta coluna contém apenas meio de cultura e é considerada o branco do teste, ou seja, é destinada para o controle de esterilidade do meio. A última coluna, com meio e microrganismo, foi o controle de crescimento microbiano. As placas foram seladas com filme PVC, tampadas e incubadas a 37 °C (Figura 23).

- Leitura e interpretação dos resultados

A leitura das placas foi feita verificando a concentração inibitória mínima, ou seja, determinando a concentração das amostras capaz de inibir 50% (CIM₅₀) (ação bacteriostática/fungistática) e 100% (CIM₁₀₀) (ação bactericida/fungicida) do crescimento microbiano. A leitura foi realizada após 24 horas para as bactérias e leveduras a 530 nm em leitor espectrofotométrico de microplacas (Anthos Zenyth, 200 rt). A confirmação das ações bacteriostática/fungistática e das ações bactericida/fungicida das diluições dos extratos foi realizada através do plaqueamento da diluição específica correspondente a CIM₅₀ e CIM₁₀₀ e

das diluições imediatamente superior e inferior a estas em meio de cultura Agar Mueller Hinton para as bactérias e meio Agar Sabouraud para os fungos. Os testes foram realizados em duplicata.

4.3.10 Estudo de estabilidade dos extratos secos de *P. guajava*

Segundo a RDC 14/10, para se obter o registro de medicamentos fitoterápicos, deve ser enviada à ANVISA cópia dos resultados e da avaliação do teste de estabilidade na embalagem primária de comercialização seguindo o "Guia para a realização de estudos de estabilidade de medicamentos" publicado pela ANVISA na RE 01, de 29 de julho de 2005. Dentro deste contexto, realizou-se um estudo de estabilidade dos extratos secos selecionados obtidos em *spray dryer* e *freeze dryer* (extrato liofilizado PG LIO) a partir da solução extrativa de *P. guajava*. Também foi realizado um estudo de estabilidade comparativo entre o extrato glicólico e extratos secos em *spray dryer* e *freeze drying*.

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

As amostras foram submetidas às condições de estabilidade preconizadas pela RE 01/05 (BRASIL, 2005): $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR (estudo acelerado) para o extrato liofilizado (PG LIO), extratos secos selecionados (*spray dryer*) e extrato glicólico e $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR (estudo de longa duração) para todos os extratos secos pelo processo *spray drying*.

As análises foram realizadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 180 dias (estudo acelerado) e nos tempos 0 e 1 ano (estudo de longa duração).

4.3.10.1 Parâmetros monitorados no estudo de estabilidade

A cada tempo de amostragem para os extratos secos em *spray dryer* e *freeze dryer* (PG LIO) foram retiradas as embalagens (sachês laminados) e as amostras foram analisadas quanto ao teor de flavonoides totais, polifenóis totais, potencial antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH, análise de cor (estudo de estabilidade acelerada) e difração de raios-X (nos tempos 0 e 180 dias de armazenamento a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Para as amostras de extrato glicólico foram retirados os frascos âmbar e as amostras foram analisadas quanto ao teor de flavonoides totais, polifenóis totais, colorimetria e potencial antioxidante pelo método de seqüestro do radical DPPH. Os métodos empregados estão descritos a seguir.

- Determinação do teor de flavonoides totais

A dosagem dos flavonoides totais para os extratos secos e extrato glicólico foi realizada de acordo com o método descrito na seção 4.3.3.5 utilizando para a análise uma massa de 500 mg de sólidos do extrato (descontando o adjuvante de secagem para os extratos secos).

- Determinação do teor de polifenóis totais

A dosagem dos polifenóis totais os extratos secos e extrato glicólico foi realizada de acordo com o método descrito na seção 4.3.3.6 utilizando para a análise a massa de 100 mg de sólidos do extrato (descontando o adjuvante de secagem para os extratos secos).

- Potencial antioxidante pelo método de seqüestro do radical DPPH

Para o monitoramento do potencial antioxidante durante o estudo de estabilidade foi realizada a análise através do método do radical DPPH de acordo com o método descrito na seção 4.3.3.7.

Para as análises foram preparadas soluções com o extrato liofilizado PG LIO (39,4 mg/mL de sólidos), extratos secos em *spray dryer* (60,5 mg/mL de sólidos) e extrato glicólico a 10% (336 µL/mL) diluídas em etanol 70% (v/v). De cada solução mãe foram preparadas novas soluções nas concentrações de 1,42; 2,84; 5,69; 7,11; 8,53 e 11,38 µg/mL (extrato liofilizado), 2,37; 4,73; 9,47; 11,83; 14,20 e 18,93 µg/mL (extrato seco em *spray dryer* a 80% de adjuvantes) e 1,19; 2,38; 4,75; 5,94; 7,13 e 9,51 µg/mL (extrato glicólico a 10%).

- Análise colorimétrica

Esta análise foi realizada de acordo com metodologia descrita por Zampiér (2012) utilizando o colorímetro Color Quest XE (Hunter Lab, Riston, Virgínia, EUA) em modo transmitância (TTRAN), com ângulo de 10° e iluminante D65. As amostras (de extratos secos

em *spray dryer*, extrato liofilizado, PG LIO, e do extrato glicólico) diluídas em água, colocadas em uma cubeta de quartzo foram submetidas à leitura no colorímetro e os resultados foram expressos em termos da luminosidade, L^* , sendo $L^* = 0$ (preto) e $L^* = 100$ (branco) e dos parâmetros de cromaticidade definidos por a^* ($+a^*$ = vermelho e $-a^*$ = verde) e b^* ($+b^*$ = amarelo e $-b^*$ = azul). Estes parâmetros foram utilizados para calcular o ângulo de tom, também denominado ângulo Hue (H°) e o croma (C^*), segundo as Equações 13 e 14.

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (13)$$

$$H^\circ = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (14)$$

- Difração de raios-X

A análise de difração de raios-X tem a finalidade de determinar a cristalinidade dos extratos secos. Para isto, amostras dos extratos secos foram colocadas em um suporte para amostras pulverulentas e a superfície fechada por uma lâmina de vidro. As medidas foram obtidas por um difratômetro de raios-X marca RIGAKU TOTAFLEX, modelo RU-200B, com câmara de difração multi-propósito em radiação de $\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$, voltagem de 50 kV e corrente de 100 mA. As amostras foram examinadas em ângulos de 10 a 40° em 2θ , com incremento de 0,02 °/s (1,2 °/min) (BOTT, 2008). As análises foram realizadas para os tempos de armazenamento de T0 e T180 dias.

4.3.10.2 Estudo de estabilidade prolongada dos extratos secos de *Psidium guajava*

As amostras de todos os extratos secos em *spray dryer* obtidos a partir da solução extrativa foram armazenadas em dessecador, em atmosfera de vácuo e a temperatura ambiente por 12 meses. Os teores de flavonoides totais e polifenóis totais foram determinados segundo as metodologias apresentadas nas seções 4.3.3.5 e 4.3.3.6, respectivamente nos tempos 0 e 12 meses. A avaliação do potencial antioxidante pelo método do DPPH• foi realizada também nos tempos 0 e 12 meses de acordo com a metodologia apresentada na seção 4.3.3.7.

4.4 Tratamento dos resultados

Os dados experimentais foram processados e analisados de forma descritiva com o auxílio do *software* SAS versão 9.0 (SAS/STAT User's Guide, 2002). Foi empregado também o teste de Kruskal Wallis (HOLLANDER; WOLFE, 1999; PAGANO; GAUVREAU, 2004), seguido pelo pós teste de Dunn para evidenciar diferença estatística entre os grupos e adotou-se um nível de significância de 5%. Os resultados foram obtidos com o auxílio do *software* R 2.14.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011), utilizando a biblioteca de funções PGIRMESS.

Para comparar os tempos T0 e T1 ano no estudo de estabilidade prolongada e os resultados do estudo de estabilidade acelerada utilizou-se o modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos) (SCHALL, 1991).

Para comparar as amostras nos ensaios de quimioluminescência e citotoxicidade utilizou-se a análise de variância (ANOVA) (MONTGOMERY, 2000). Esta metodologia baseia-se em particionar a variância total de uma determinada resposta (variável dependente) em duas partes: a primeira devida ao modelo de regressão (no caso, entre grupos) e a segunda devida aos resíduos (erros) (dentro dos grupos). Quanto maior for a primeira em relação à segunda, maior é a evidência da diferença entre as médias dos grupos. Esse modelo tem como pressuposto que seus resíduos tenham distribuição normal com média 0 e variância constante. Para obter as comparações entre as médias das amostras, usou-se pós teste de Duncan.

Para as análises de correlações entre os ensaios antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, ORAC) e conteúdo de flavonoides totais, polifenóis e taninos totais foi proposto o coeficiente de correlação de Pearson (r) utilizando o *software* SAS versão 9.0 (SAS/STAT User's Guide, 2002).

Os ensaios com células foram analisados com o GraphPad Prism *Software* (version 3.0 for Windows, GraphPad *Software* Inc, San Diego, CA, USA). As análises estatísticas destes dados foram realizadas através de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.

5. Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção estão apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, apresenta-se os resultados da avaliação das quatro cultivares de *Psidium guajava* objetivando a seleção da cultivar que apresentar os resultados mais promissores com relação aos teores de compostos ativos.

Posteriormente serão apresentados os resultados experimentais relacionados a cultivar selecionada para o estudo da sua viabilidade tecnológica e os estudos de secagem em *spray dryer* e *freeze dryer*, caracterização dos produtos obtidos, ensaios de atividade biológica (antioxidante e antimicrobiana), além dos estudos de estabilidade.

5.1 Avaliação das quatro cultivares de *Psidium guajava*

5.1.1 Caracterização das matérias-primas vegetais de *Psidium guajava*

Inicialmente foram coletadas folhas de quatro cultivares de *Psidium guajava* com o objetivo de selecionar a cultivar que apresentasse os melhores resultados quanto aos teores de compostos de interesse, os compostos polifenólicos. A exsicata para a identificação botânica foi preparada apenas para a cultivar selecionada para o estudo. Foram coletadas apenas as folhas, evitando-se colher partes do vegetal afetadas por doenças, parasitas e também materiais estranhos, tais como partes da planta que não fossem de interesse para a investigação. Foi registrado o local, a hora e a data da coleta, já que o meio ambiente, a hora do dia e a época do ano exercem grande influência sobre a produção e o acúmulo dos metabólitos vegetais (SIMÕES et al., 2010). As informações a esse respeito são encontradas na seção 4.3.1. Além disso, a coleta foi realizada longe do período de adubação e de pulverização de agrotóxicos, fatores importantes em áreas de cultivo agrícola intensivo e que podem influenciar os resultados experimentais.

A moagem tem por finalidade reduzir, mecanicamente, o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões, preparando-o, assim, para a próxima etapa, a extração. O grau de divisão do material irá influenciar diretamente a eficiência da extração (SIMÕES et al., 2010). As matérias-primas após secagem e moagem foram submetidas a peneiramento em agitador de peneiras para a determinação da distribuição granulométrica. A Tabela 7 apresenta os resultados para a caracterização das plantas utilizadas neste estudo.

Tabela 7 – Diâmetro médio, teor de extrativos e perda por dessecação das matérias-primas de *Psidium guajava*.

Cultivar	dp* (μm)	TE (%)		Pd (%)
		H ₂ O	EtOH [•]	
Pa	304,53 (115,60)	27,25 (0,58)	40,09 (0,58)	4,54 (0,06)
PS	279,72 (113,90)	26,70 (1,06)	39,63 (0,29)	4,22 (0,21)
S. XXI	281,10 (113,82)	27,45 (0,00)	40,75 (0,76)	4,38 (0,09)
SV	278,01 (113,33)	21,48 (0,87)	33,63 (1,25)	5,02 (0,37)

Pa: Paluma; PS: Pedro Sato; S. XXI: Século XXI; SV: Santana da Vargem.

dp: diâmetro das partículas; TE: teor de extrativos; Pd: perda por dessecação

*Desvio relativo à faixa de distribuição de tamanho é não ao tamanho médio.

•: Etanol 70% (v/v).

Os valores estão representados como média (desvio padrão).

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostram resultados semelhantes quanto ao diâmetro médio das partículas (dp), teores de extrativos (TE), e perda por dessecação (Pd), para as matérias primas avaliadas, com exceção da amostra de Santana da Vargem (SV), que apresentou valores de teor de extrativos ligeiramente inferiores.

De acordo com a classificação da Farmacopeia Brasileira (2010) as matérias-primas vegetais encontram-se classificadas entre pó moderadamente grosso e grosso.

A Figura 24 apresenta o gráfico representativo da distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal selecionada para o estudo (P. Sato).

Figura 24 – Distribuição granulométrica obtida por tamisação expressa como porcentagem da fração acumulada de folhas secas e moídas de *Psidium guajava*.

Uma vez que as plantas possuem uma mistura complexa de compostos com diferentes polaridades, solventes diferentes são frequentemente utilizados para o isolamento dos mesmos (GONG et al., 2012). Baseado em relatos da literatura do uso popular do chá (extrato aquoso) de folhas de goiaba (ANAS et al., 2008; CHEN; YEN, 2007; OJEWOLE, 2006; ROY, 2006) foram realizadas as análises de teor de extrativos, polifenóis e taninos totais em água e solução EtOH:H₂O 70% (v/v) para se comparar os dois sistemas solventes.

O teor de extrativos da matéria-prima vegetal é um parâmetro empregado na avaliação da eficiência do processo extrativo. Os resultados obtidos deste estudo mostraram que a solução hidroalcoólica (EtOH:H₂O 70%, v/v) foi mais eficiente no processo extrativo. O alto valor observado reflete a alta concentração de sólidos solúveis presentes nas matérias-primas vegetais extraídos por este sistema solvente.

Este resultado foi compatível com estudo de Gong et al. (2012). Os autores investigaram diferentes solventes de extração que resultaram em significantes alterações no conteúdo de fenólicos totais, teor de flavonoides totais e atividade antioxidante ($p < 0,05$) de calêndula. Neste estudo, o extrato hidroetanólico (Etanol: água 7:3, v/v) apresentou o maior teor de fenólicos totais e flavonoides, equivalentes de ácido gálico 62,36 mg Eq. AG/g e 97,00 mg rutina Eq./g, respectivamente.

A umidade do material vegetal é um importante parâmetro tendo em vista que teores elevados de água favorecem o crescimento microbiano, a proliferação de insetos, reações de

hidrólise e conseqüente degradação de constituintes do material vegetal. Os resultados de perda por dessecação das matérias-primas vegetais apresentados na Tabela 7 foram obtidos pelo método gravimétrico (seção 4.3.2.3). Os valores obtidos variaram de 4,22 a 5,02%, portanto dentro dos limites preconizados pela literatura que é de até 14% (LIST; SCHIMIDT, 1989).

Os mais importantes grupos de substâncias no material vegetal são: ceras e terpenoides (baixa polaridade); lipídeos, compostos fenólicos e alcaloides (baixa a média polaridade) e glicosídeos polares, alcaloides polares, sacarídeos, peptídeos e proteínas (polaridade alta) (ROMANIK et al., 2007). O termo “compostos fenólicos de plantas” abrange fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos hidrolisáveis e condensados, lignanas e ligninas (STALIKAS, 2007). Estes compostos ocorrem como uma mistura complexa de substâncias com uma ampla faixa de polaridade e hidrofobicidade.

Flavonoides são constituintes que podem ser considerados como marcadores quimiotaxonômicos em plantas devido a sua grande diversidade estrutural, como também são quimicamente estáveis (STALIKAS, 2007). O conteúdo de flavonoides, polifenóis e taninos totais das matérias-primas vegetais coletadas foram analisados segundo os procedimentos indicados nas seções 4.3.2.4 e 4.3.2.5 respectivamente. O teor de flavonoides foi calculado utilizando-se as equações da curva analítica apresentada na Figura 25.

Figura 25 – Gráfico de dispersão entre a absorvância (nm) e concentração de quercetina (µg/mL), com coeficiente de determinação e reta estimada.

Para a quantificação dos polifenóis totais, a curva analítica foi construída utilizando pirogalol como padrão de referência (Figura 26).

Figura 26 – Gráfico de dispersão entre a absorvância (nm) e concentração de pirogalol (µg/mL), com coeficiente de determinação e reta estimada.

A Tabela 8 apresenta os resultados experimentais dos teores de flavonoides totais (FT), polifenóis totais (PT) e taninos totais (TT) das matérias-primas estudadas.

Tabela 8 – Teores de flavonoides totais, polifenóis e taninos totais das matérias-primas de *Psidium guajava*.

Cultivar	FT (% m/m)	PT (% m/m)		TT (% m/m)	
		H ₂ O	EtOH*	H ₂ O	EtOH*
Pa	0,60 (0,02)	7,75 (0,05)	9,72 (0,22)	3,35 (0,31)	1,97 (0,43)
PS	0,55 (0,00)	7,60 (0,22)	9,90 (0,13)	3,77 (0,25)	2,67 (0,30)
S. XXI	0,65 (0,01)	7,51 (0,11)	9,87 (0,28)	5,33 (0,16)	1,72 (0,47)
SV	0,58 (0,04)	6,88 (0,34)	8,25 (0,02)	3,68 (0,25)	1,62 (0,14)

Pa: Paluma; PS: Pedro Sato; S. XXI: Século XXI; SV: Santana da Vargem.

FT: flavonoides totais; PT: polifenóis totais; TT: taninos totais;

*: Etanol 70% (v/v).

Os valores estão representados como média (desvio padrão).

Quanto aos teores de polifenóis e taninos totais, a extração em água apresentou menores valores para os polifenóis, porém para os taninos totais estes resultados foram maiores (3,35 a 5,33% m/m base úmida). Estes resultados estão de acordo com o estudo de Ling et al. (2010) que mostraram que os extratos etanólicos de plantas da Malásia, dentre as quais *Psidium guajava*, apresentaram maior conteúdo de compostos fenólicos comparados aos extratos aquosos correspondentes.

Vários autores têm recomendado o uso de misturas de solventes no processo de extração de taninos (SIMÕES et al., 2010). A água como solvente de extração para a planta *Psidium guajava* mostrou ser mais efetiva para a extração de taninos o que pode justificar o seu uso popular na forma de chá.

Como o etanol é mais volátil e tem um ponto de ebulição mais baixo que a água, apresenta uma tendência maior para ser retirado dos extratos hidroalcoólicos durante a concentração em relação à água, levando a uma redução do teor de álcool no extrato concentrado (OLIVEIRA; BOTT; SOUZA, 2006).

Assim, etanol e água (70:30 v/v) foram usados como solventes nos processos posteriores de extração para facilitar a extração de substâncias polares e apolares. As condições de extração foram selecionadas a partir de trabalhos anteriores, desenvolvidos pelo grupo do LAPROFAR (CORTÉZ-ROJAS et al., 2012; SOUZA, 2007; BOTT, 2008; SOUZA; OLIVEIRA, 2006).

5.1.2 Caracterização das soluções extrativas de *Psidium guajava*

As soluções extrativas obtidas segundo o procedimento 4.3.3 foram caracterizadas quanto ao teor de sólidos (seção 4.3.3.1), densidade (seção 4.3.3.2), pH (seção 4.3.3.4), teor de flavonoides totais (seção 4.3.3.5), polifenóis e taninos totais (seção 4.3.3.6), e atividade antioxidante pelo método do radical DPPH (seção 4.3.3.7). Os resultados experimentais estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Caracterização física das soluções extrativas de *Psidium guajava*.

Cultivar	Cs (%)	ρ (g/cm ³)	pH (-)
Pa	3,14 (0,06)	0,891 (0,00)	6,19 (0,06)
PS	3,19 (0,03)	0,891 (0,00)	5,90 (0,03)
S. XXI	3,25 (0,10)	0,892 (0,00)	5,90 (0,02)
SV	2,68 (0,16)	0,891 (0,00)	6,27 (0,01)

Pa: Paluma; PS: Pedro Sato; S. XXI: Século XXI; SV: Santana da Vargem;
Cs: concentração de sólidos; ρ : densidade.
Os valores estão representados como média (desvio padrão).

A caracterização físico-química dos extratos apresentou perfis semelhantes com relação ao teor de sólidos (Cs), à densidade (ρ), pH, flavonoides totais (FT), polifenóis (PT) e taninos totais (TT) das quatro cultivares analisadas.

Tabela 10 – Teores de flavonoides totais, polifenóis, taninos totais e atividade antioxidante das soluções extrativas de *Psidium guajava*.

Cultivar	FT (mg/g)	PT (% m/m)	TT (% m/m)	DPPH* (μ g/mL)
Pa	0,78 (0,01)	0,83 (0,00)	0,42 (0,01)	4,36 (0,10)
PS	0,74 (0,00)	0,79 (0,00)	0,42 (0,01)	2,91 (0,27)
S. XXI	0,84 (0,00)	0,86 (0,01)	0,46 (0,01)	2,90 (0,13)
SV	0,65 (0,00)	0,68 (0,02)	0,38 (0,01)	3,49 (0,13)

Pa: Paluma; PS: Pedro Sato; S. XXI: Século XXI; SV: Santana da Vargem;
FT: flavonoides totais; PT: polifenóis totais;
*Atividade antioxidante pelo método do DPPH• expressa em CI₅₀.
Os valores estão representados como média (desvio padrão).

O parâmetro CI₅₀ (concentração necessária do antioxidante para reduzir 50% do radical DPPH) foi usado para interpretar os dados experimentais do ensaio de avaliação da atividade antioxidante. Este parâmetro é amplamente utilizado para medir o poder antioxidante (QIAN; NIHORIMBERE, 2004). Os diferentes resultados obtidos provavelmente são devido à presença de diferentes compostos antioxidantes em diferentes concentrações. A quercetina, um antioxidante natural foi usado como padrão de referência e

mostrou uma capacidade redutora concentração-dependente apresentando um CI_{50} de 0,96 (0,01) $\mu\text{g/mL}$. Em comparação a quercetina, as cultivares Pedro Sato e Século XXI foram as que apresentaram valores de CI_{50} mais expressivos, uma vez que quanto menor o valor de CI_{50} , maior a atividade antioxidante da amostra.

No presente estudo foram obtidos valores menores de CI_{50} do que os reportados por Vyas et al. (2010) que também investigaram a atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos (1:1) de folhas de *Psidium guajava* pelo método sequestrante de radical livre DPPH. Os valores de CI_{50} encontrados foram de $45,5 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ e do padrão utilizado, o ácido ascórbico, $25,8 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$. Assim, os autores concluíram que as folhas de *P. guajava* possuem atividade antioxidante moderada comparado como padrão ácido ascórbico.

Treze plantas selecionadas pelo seu uso na medicina tradicional da Malásia, dentre elas, *Psidium guajava*, foram investigadas quanto à capacidade antioxidante e citotóxica (LING et al., 2010). A atividade antioxidante do extrato etanólico de *P. guajava* apresentou o valor de 180 $\mu\text{g/mL}$, valor bem mais alto que os reportados neste trabalho.

Dados de eficácia e segurança de várias plantas medicinais ainda são insuficientes para dar suporte ao seu uso, por vezes devido à falta de metodologias adequadas de avaliação dessas plantas. Com relação à composição, muitas vezes não se tem estabelecido o princípio ativo ou tóxico, sua concentração e ação farmacológica (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010). É importante salientar que, a busca por marcadores baseia-se na suposição de que qualquer planta possui um ou vários constituintes responsáveis por sua atividade e que, em tese, substituiriam o uso da planta na sua totalidade. Entretanto, existem vários exemplos de que a bioatividade pode ser o resultado do sinergismo entre os constituintes de uma determinada planta. Foram relatados casos de constituintes tidos como ativos que, quando isolados, mostraram-se tóxicos ou ineficazes para uso humano (SPRINGFIELD; EAGLES; SCOTT, 2005).

Técnicas cromatográficas e analíticas que permitem a separação e o isolamento de substâncias de um extrato vegetal tornam-se necessárias tanto para o conhecimento da composição química, do princípio ativo e/ou do composto tóxico de uma planta, como também para a determinação de um composto ou grupo de compostos, que sirvam como marcadores daquela espécie, para controle qualitativo e quantitativo da droga, possibilitando a padronização do material vegetal e produtos relacionados. Utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por exemplo, para traçar o perfil de uma planta pode-se obter a identificação de marcadores e também de outros compostos, o que

propicia uma caracterização completa da planta ou do produto analisado além de permitir a distinção de espécies próximas (LIU et al., 2007).

Liang, Qian e Yao (2005), identificaram sete compostos fenólicos (ácido procatequínico, clorogênico, ácido cafeico, canferol, ácido ferúlico, ácido gálico e quercetina) no extrato etanólico de folhas de *Psidium guajava* por CLAE e CLAE acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS) sem a necessidade de isolar compostos individuais.

A Figura 27 (27a a 27d) apresenta os perfis cromatográficos para as quatro cultivares de *Psidium guajava* estudadas, obtidos de acordo com metodologia apresentada em 4.3.3.8. Comparando-se os cromatogramas obtidos para as cultivares de *Psidium guajava*, não foram observadas diferenças significativas entre o perfil cromatográfico das amostras, mostrando um padrão similar de compostos (Figura 27).

Analisando-se os resultados experimentais obtidos em conjunto, selecionou-se a cultivar Pedro Sato para prosseguimento do estudo, considerando os teores de flavonoides totais (0,74 mg/g), polifenóis (0,79 % m/m) e taninos totais (0,42% m/m) e a atividade antioxidante expressa pelo CI_{50} de $2,91 \pm 0,27 \mu\text{g/mL}$; associada à quantidade de unidades plantadas na fazenda/indústria Casa da Goiaba (Lavras-MG) o que facilita sua obtenção para estudos posteriores.

Figura 27 – Perfis cromatográficos das soluções extrativas das cultivares obtidos a 300 nm, (a) Paluma; (b) Pedro Sato; (c) Século XXI; (d) Santana da Vargem. Coluna Shimadzu Shim-pack CLC (M) (250 x 4.6 mm i.d.; 5 μm).

5.2 Caracterização da matéria-prima vegetal selecionada

A Tabela 11 apresenta os resultados da caracterização físico-química da matéria-prima vegetal da cultivar Pedro Sato.

Tabela 11 - Caracterização físico-química da matéria-prima vegetal (Pedro Sato).

dp* (μm)	P_d (%)	TE (%)	FT (% m/m)	PT (% m/m)	TT (% m/m)
286,55 (117,18)	4,36 (0,15)	39,70 (1,9)	0,59 (0,00)	9,95 (0,18)	3,17 (0,26)

dp: diâmetro médio das partículas (desvio da distribuição granulométrica); TE: teor de extrativos; P_d: perda por dessecação; FT: flavonoides totais; PT: polifenóis totais; TT: taninos totais.

*Desvio relativo à faixa de distribuição de tamanho é não ao tamanho médio de partícula.

Os valores estão representados como média (desvio padrão).

De acordo com os resultados obtidos da caracterização da matéria-prima vegetal, os parâmetros avaliados, diâmetro médio das partículas (dp), perda por dessecação (P_d), teor de extrativos (TE), teor de flavonoides totais (FT) e de polifenóis e taninos totais (PT e TT) apresentaram perfil semelhante em relação ao estudo anterior, quando da seleção da cultivar (Tabelas 7 e 8).

Uma das variáveis que influenciam o processo de extração é o tamanho de partícula o qual está relacionado diretamente com a área superficial e, portanto com o grau de interação da partícula com o solvente extrator. Neste trabalho foi utilizado o método de tamisação para determinar o tamanho de partícula. O diâmetro médio para o material vegetal foi de 286,5 μm , o qual, segundo a Farmacopeia Brasileira (2010) é classificado como moderadamente grosso.

A perda por dessecação da matéria-prima vegetal é um parâmetro importante no caso da conservação do produto com conseqüente manutenção da qualidade. Quanto menor esse valor, menor a possibilidade de crescimento de microrganismos (bacteriano e fúngico) e atividade enzimática. O resultado da perda por dessecação apresentado na Tabela 10 encontra-se abaixo do limite máximo recomendado de 14 % (LIST; SCHIMIDT, 1989).

O resultado do teor de extrativos confirmou a eficiência do processo extrativo o que pode ser observado comparando os resultados das Tabelas 7 e 10. Estes resultados estão refletidos nos teores de flavonoides totais (FT), polifenóis e taninos totais (PT e TT) os quais

foram muito próximos dos obtidos na primeira avaliação das cultivares de *Psidium guajava* (dados apresentados na Tabela 11).

5.2.1 Obtenção e caracterização da solução extrativa da cultivar Pedro Sato

Preparou-se um novo lote de extrato com a cultivar selecionada, Pedro Sato. O material seco e moído foi submetido à extração pelo processo de maceração com aquecimento e agitação constante, usando etanol 70% (v/v) como solução extrativa, proporção massa de planta/solvente de 1:10 (p/v) e temperatura de extração de 50 °C, durante 60 minutos.

A solução extrativa obtida foi filtrada sob vácuo e mantida em frasco âmbar ao abrigo da luz e armazenada a 4 °C. A solução extrativa foi caracterizada quanto ao teor de sólidos (Cs), densidade (ρ), pH, grau alcoólico, teor de flavonoides totais (FT), polifenóis totais (PT), taninos totais (TT) e atividade antioxidante (AA) pelo método do DPPH• (Tabela 12), de acordo com os métodos já descritos.

Tabela 12 – Caracterização físico-química da solução extrativa (Pedro Sato).

Cs (%)	ρ (g/cm ³)	pH (-)	Grau alcoólico (°GL)	FT (mg/g)	PT (% m/m)	TT (% m/m)	DPPH* (µg/mL)
3,30 (0,14)	0,895 (0,00)	5,94 (0,02)	70	0,77 (0,01)	0,86 (0,03)	0,37 (0,02)	3,94 (0,10)

Cs: concentração de sólidos; ρ : densidade; FT: flavonoides totais; PT: polifenóis totais; TT: taninos totais;
 *Atividade antioxidante pelo método DPPH• expressa por CI₅₀.
 Os valores estão representados como média (desvio padrão).

Os resultados da caracterização físico-química da solução extrativa obtida do novo lote da cultivar Pedro Sato mostraram valores semelhantes aqueles obtidos anteriormente. Comparando o valor do teor de sólidos (Tabela 12) com o resultado apresentado na Tabela 9 pode-se observar que o segundo lote de solução extrativa apresentou teor de sólidos um pouco superior. Também observa-se pequenas variações nos resultados de densidade, pH, flavonoides totais, polifenóis e taninos totais e da atividade antioxidante expressa pelo CI₅₀, o que de certa forma é esperado quando se trabalha com produtos biológicos.

5.2.2 Obtenção e caracterização do extrato concentrado da cultivar Pedro Sato

O extrato obtido foi concentrado até o teor de sólidos de 10,7% para ser submetido à operação de secagem. O extrato concentrado foi analisado quanto a Cs, ρ , pH, grau alcoólico, teores de flavonoides totais (FT), polifenóis (PT), taninos totais (TT) e atividade antioxidante (AA) pelo método do radical DPPH. Os resultados da caracterização do extrato concentrado estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Caracterização físico-química do extrato concentrado de *Psidium guajava*.

Cs (%)	ρ (g/cm ³)	pH (-)	Grau alcoólico (°GL)	FT (mg/g)	PT (% m/m)	TT (% m/m)	DPPH* (µg/mL)
10,7 (0,12)	0,93 (0,00)	4,90 (0,07)	0	2,41 (0,01)	2,48 (0,07)	1,35 (0,10)	3,34 (0,11)

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

*Atividade antioxidante pelo método do DPPH• expressa em CI₅₀.

Os valores estão representados como média (desvio padrão).

De acordo com a proporção da concentração extrativa pode-se observar nas Tabelas 12 e 13 que não houve alterações significativas nos teores dos compostos ativos e da atividade antioxidante avaliada pelo método do radical DPPH.

5.3 Obtenção dos extratos secos por *spray drying* e por liofilização

Para a produção de extratos secos padronizados com características físico-químicas e tecnológicas adequadas faz-se necessário o emprego de adjuvantes de secagem que têm a função de proteger os princípios ativos da degradação, melhorar sua estabilidade e também são responsáveis por melhores rendimentos do produto. Adjuvantes comumente utilizados em processos de secagem utilizando o *spray dryer* incluem carboidratos, gomas, derivados semi-sintéticos de celulose e polímeros sintéticos (KHA; NGUYEN; ROACH, 2010). Cada adjuvante de secagem possui vantagens e desvantagens com relação a suas propriedades, custo, como também a eficiência de encapsulação (objetivando minimizar a perda de compostos ativos). Além disso, os adjuvantes são adicionados as composições de secagem para melhorar ou modificar as propriedades físicas e químicas do produto (SOUZA, et al., 2007).

Dependendo do adjuvante usado pode-se aumentar a taxa de solubilidade/dissolução do produto e controlar modificações organolépticas (CHIOU; LANGRISH, 2007). Neste trabalho foram avaliados alguns adjuvantes de secagem amplamente utilizados na obtenção de extratos secos (Aerosil[®], Celulose microcristalina MC 102, Maltodextrina DE 10, Dry Flo PC, Encapsia (goma arábica) e β -ciclodextrina). Estes adjuvantes foram utilizados puros ou em mistura, nas proporções de 40 e 80% calculados sobre o teor de sólidos do extrato concentrado.

As formulações de secagem foram descritas na seção 4.3.6.1. As formulações compostas por extrato concentrado e adjuvantes foram submetidas à secagem por *spray drying* e por *freeze drying* (liofilização). O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos mecanismos de secagem característicos de cada secador sobre as propriedades físico-químicas e atividade biológica dos extratos produzidos. A Figura 28 mostra os extratos secos obtidos em *spray dryer* e no *freeze dryer*.

Figura 28 - Fotografia dos extratos secos obtidos pelos processos *spray drying* e *freeze drying* em função das composições de secagem. Composição A 40 - *spray drying* (a); A 80 - *spray drying* (b); Cmic A 40 - *spray drying* (c); Cmic A 80 - *spray drying* (d); MA 40 - *spray drying* (e); MA 80 - *spray drying* (f); Dry Flo A 40 - *spray drying* (g); Dry Flo A 80 - *spray drying* (h); MDE A 40 - *spray drying* (i); MDE A 80 - *spray drying* (j); β CD 80 - *spray drying* (k); Extrato liofilizado PG LIO - *freeze drying* (l).

5.3.1 Desempenho do secador *spray dryer*

O desempenho do *spray dryer* foi avaliado por dois parâmetros, recuperação do produto (R) e eficiência térmica (η).

Os resultados obtidos quanto ao desempenho do secador estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados do desempenho do secador *spray dryer*.

ES	W_{real} (g/min)	T_{gs} (°C)	$T_{\text{amb.}}$ (°C)	UR (%)	R (%)	η (%)
A 40	5,40	102,3	25,8	71,5	64,02	38,4
A 80	5,15	101,5	26,3	71,5	62,92	39,2
Cmic A 40	3,77	111,0	26,5	64,4	54,13	31,6
Cmic A 80	4,25	109,0	26,2	53,0	64,68	33,1
M A 40	4,16	109,0	27,8	42,6	46,92	33,6
M A 80	4,16	109,0	28,9	42,1	51,38	33,9
Dry Flo A 40	4,33	106,5	27,3	57,2	55,16	35,5
Dry Flo A 80	4,31	106,0	27,7	53,1	56,06	36,0
MDE A 40	4,75	104,0	20,8	44,4	58,90	35,6
MDE A 80	4,70	100,0	21,2	46,6	59,63	38,8
β CD 80	3,92	102,0	20,2	58,1	61,48	37,0

W_{real} : vazão real de alimentação; T_{gs} : temperatura de saída do gás; $T_{\text{amb.}}$: temperatura ambiente; UR: umidade relativa; R: % de recuperação do produto; η : eficiência térmica.

Em relação à recuperação dos produtos, pode-se observar que maiores valores de recuperação foram alcançados com as composições contendo aerosil a 40 e a 80%, celulose microcristalina:Aerosil[®] 80, e para a β CD 80. Cortés-Rojas e Oliveira (2012) reportaram resultados de 86% de recuperação durante a secagem em *spray dryer* de extrato de *Bidens pilosa* adicionados de Aerosil[®]:celulose microcristalina. Dentre os fatores responsáveis pela melhor performance observada pelos adjuvantes aerosil a 40 e a 80%, celulose microcristalina:Aerosil[®] 80, e β CD 80, destacam-se a possível redução da adesividade das partículas ao equipamento de secagem, e maior tamanho da partícula gerada quando empregou-se a celulose microcristalina, o que aumentaria a eficiência de coleta do pó pelo

ciclone. Cano-Chauca et al. (2005) também empregaram celulose microcristalina como adjuvante na secagem de suco de manga por *spray drying*.

A secagem dos extratos de *Passiflora alata*, *Bauhinia forficata* e *Maytenus ilicifolia* utilizando como adjuvante o dióxido de silício coloidal apresentaram rendimentos de 68,8%, 65,0% e 62,9%, respectivamente (BOTT, 2008), resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo.

Tonon, Brabet e Hubinger (2008) analisaram a influência das condições de secagem no *spray dryer* nas propriedades físico-químicas de pós de açaí. Os autores avaliaram a influência da temperatura de entrada do gás de secagem, da vazão de alimentação e da concentração do adjuvante (maltodextrina) no rendimento do processo de secagem, sendo obtidos valores da recuperação do produto de 34 a 55 %.

Pode ser observado na Tabela 14 que os valores de eficiência térmica no processo de *spray drying* foram muito semelhantes entre as diferentes proporções do mesmo adjuvante, tendo em vista que as condições de secagem foram similares. A eficiência térmica depende da temperatura de entrada e de saída do gás de secagem e da temperatura ambiente e representa a razão entre o calor utilizado na secagem pelo calor total disponível. A temperatura de saída do gás depende da temperatura de entrada e quantidade de líquido alimentada ao sistema. Como todos estes parâmetros foram fixados, os resultados de eficiência térmica não apresentaram variações significantes.

Cortés-Rojas e Oliveira (2012) mantiveram a temperatura de entrada do gás de secagem a 150 °C e também constataram que não houve variação significativa na eficiência térmica na secagem de composições de extratos de *Bidens pilosa* contendo Aerosil®, β -ciclodextrina, Aerosil®:celulose microcristalina e maltodextrina:Aerosil®.

5.3.2 Caracterização dos extratos secos de *Psidium guajava* em *spray dryer* e liofilizador

Os extratos secos obtidos por *spray drying* foram avaliados quanto à perda por dessecação (P_d), teor de umidade (U_{KF}), atividade de água (A_a), solubilidade (% Solub.), teor de flavonoides totais (FT), polifenóis (PT) e taninos totais (TT) e atividade antioxidante pelo método do radical DPPH. A realização destes ensaios teve como objetivo realizar uma avaliação preliminar da influência do processo de secagem e dos diferentes adjuvantes

visando selecionar os extratos secos com melhores características físico-químicas a serem posteriormente avaliados em maior profundidade.

Os resultados da caracterização físico-química dos extratos secos obtidos em *spray dryer* para as diferentes formulações estão apresentados na Tabela 15.

A perda por dessecação é uma propriedade importante dos extratos secos, sendo um indicador da eficiência de secagem. No entanto, uma vez que produtos de plantas são uma mistura complexa de substâncias químicas, muitas outras substâncias voláteis, além da água podem estar presentes no produto seco. Portanto, a perda por dessecação inclui as perdas de água e outros compostos voláteis presentes nas amostras. Este parâmetro tem um considerável efeito sobre a estabilidade química e microbiológica, bem como as propriedades físicas do produto, tais como propriedades de fluxo e a distribuição de tamanho das partículas (SOUZA et al., 2008).

A Farmacopeia Americana (2007) recomenda um limite máximo da perda por dessecação para pós farmacêuticos, incluindo extratos secos de plantas medicinais da ordem de 5% (p/p). Como podem ser observados na Tabela 15, todos os extratos secos apresentaram valores de perda por dessecação ou umidade residual (Karl Fischer) dentro da faixa recomendada. Os resultados obtidos no presente estudo foram bem diferentes dos resultados obtidos por Souza et al. (2008). Os autores avaliaram extratos secos da planta medicinal *Rosmarinus officinalis* em *spray dryer* e leite de jorro utilizando o dióxido de silício coloidal e maltodextrina DE 14 como adjuvantes de secagem. Os resultados obtidos da perda por dessecação ficaram próximos de 8%. No entanto, deve-se considerar que a planta medicinal estudada pelos autores, *R. officinalis*, se trata de uma planta aromática que apresenta grande concentração de compostos voláteis.

O teor de umidade em um extrato seco pode ser avaliado através de vários métodos como método gravimétrico (dessecação) ou método volumétrico (Karl Fischer). No presente trabalho a porcentagem de umidade total foi avaliada por titulação empregando o reagente de Karl Fischer. A umidade presente em um produto seco pode ligada.

Tabela 15 - Caracterização físico-química dos extratos secos por *spray drying* de *Psidium guajava*.

ES	P _d (bs) (%)	U _{KF} (%)	Aa (-)	Solub. (%)	FT (Quercetina _{mg} /g _{extrato})	PT (% m/m g.pó)	TT (% m/m g.pó)
A 40	1,50 (0,24)	2,89 (0,06)	0,2504 (0,02)	64,09 (2,34)	15,53 (0,20)	16,01 (0,23)	8,44 (0,22)
A 80	1,50 (0,27)	2,86 (0,06)	0,2578 (0,04)	48,88 (7,90)	11,96 (0,11)	12,80 (0,14)	6,74 (0,19)
Cmic A 40	0,74 (0,36)	2,39 (0,09)	0,1534 (0,02)	53,13 (0,10)	15,82 (0,08)	12,80 (0,18)	9,00 (0,24)
Cmic A 80	1,40 (0,72)	2,62 (0,24)	0,1502 (0,02)	35,25 (2,13)	11,63 (0,14)	10,35 (0,14)	7,67 (0,16)
M A 40	2,26 (0,25)	3,59 (0,30)	0,1775 (0,01)	87,74 (1,85)	16,56 (0,41)	18,09 (0,16)	10,21 (0,25)
M A 80	1,67 (0,58)	4,34 (0,18)	0,1621 (0,03)	94,44 (1,92)	12,33 (0,13)	13,27 (0,12)	9,18 (0,08)
Dry Flo A 40	1,66 (0,52)	4,46 (0,30)	0,1255 (0,01)	68,67 (4,13)	15,16 (0,21)	16,84 (0,19)	10,01 (0,17)
Dry Flo A 80	1,13 (0,10)	4,73 (0,17)	0,0966 (0,01)	55,43 (5,00)	11,89 (0,01)	12,70 (0,07)	7,74 (0,08)
MDE A 40	3,84 (0,81)	5,02 (0,13)	0,1789 (0,01)	82,21 (3,22)	16,47 (0,17) ^c	14,73 (0,21)	9,32 (0,04)
MDE A 80	2,28 (0,26)	5,82 (0,36)	0,1886 (0,03)	87,73 (5,70)	12,85 (0,07)	11,22 (0,17)	9,05 (0,23)
βCD 80	4,22 (0,56)	3,93 (0,05)	0,1797 (0,03)	83,40 (1,59)	12,15 (0,09)	10,71 (0,34)	7,89 (0,42)
EC	-	-	-	-	22,58 (0,10)	23,21 (0,72)	12,61 (0,92)

ES: extrato seco; EC: extrato concentrado; P_d(bs): perda por dessecação, base seca; U_{KF}: umidade por Karl Fischer; Aa: atividade de água; Solub. (%): porcentagem de solubilidade; FT: flavonoides totais; PT: polifenóis totais; TT: taninos totais.
Os valores estão representados como média (desvio padrão).

A Tabela 15, mostra que a umidade total de todos os extratos secos permaneceu abaixo de 6%. Os extratos secos que apresentaram maiores valores de umidade foram os obtidos com maltodextrina, goma arábica (Encapsia) e dióxido de silício coloidal (Aerosil®). A goma arábica possui um grande número de ramificações com grupos hidrofílicos e assim, pode facilmente adsorver umidade (TONON et al., 2009). As composições contendo somente maltodextrina:Aerosil® apresentaram valores menores de umidade quando comparadas as composições contendo maltodextrina:goma arábica:Aerosil®, pois a maltodextrina 10 DE é menos hidrolizada mostrando menos grupos hidrofílicos e assim, adsorve menos água (TONON et al., 2009).

A atividade de água do produto, relaciona-se com o teor de água livre, que em tese está disponível para reações de degradação do produto. Por outro lado, o teor de umidade representa a composição de água no sistema (FAZAELI et al., 2012). A água pura apresenta atividade igual a 1,0. A atividade de água, pode variar de 0 a 1 sendo que, quanto maior for este valor, maior será a quantidade de água disponível tanto para reações físicas e químicas, e crescimento microbiano. Este parâmetro possui relação com a temperatura de secagem devido às mudanças que esta pode ocasionar na dissociação e solubilidade dos compostos (KEEY, 1992). Tendo em vista que a temperatura de secagem manteve-se constante para todos os experimentos, diferenças na atividade de água relacionam-se com a composição das formulações de secagem. A atividade de água dos produtos obtidos no presente estudo variaram de 0,09 a 0,25, valores favoráveis à manutenção da estabilidade do produto, visto que atividades de água inferior a 0,5 inibe o crescimento microbiano (OLIVEIRA et al., 2010).

Na Tabela 15 observa-se que o extrato contendo apenas Aerosil® apresentou a maior atividade de água, visto que este adjuvante pode absorver grandes quantidades de água sem sofrer mudança para o estado líquido (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006). No trabalho de Cortés-Rojas e Oliveira (2012) foi observado o valor de atividade de água de 0,19 para a composição contendo apenas Aerosil® durante a secagem de extrato de *Bidens pilosa* em *spray dryer*. Os autores também reportam resultados diferentes do presente trabalho quanto à atividade de água da composição contendo maltodextrina:Aerosil® (0,31).

Resultados de atividade de água na faixa de 0,15 a 0,32 durante a secagem de suco de amora preta em *spray dryer* utilizando-se como adjuvantes maltodextrina com variados graus de dextrose equivalente (DE 6, DE 9 e DE 20) e goma arábica, em diferentes condições de secagem foram reportados por Fazaeli et al. (2012).

Diferenças nos resultados obtidos por diferentes autores são esperadas, visto que as propriedades do produto dependem das propriedades da alimentação e condições de secagem.

Em relação à solubilidade em água dos extratos secos, verificou-se que as formulações contendo Maltodextrina:Aerosil[®], Maltodextrina:Encapsia:Aerosil[®] e β -ciclodextrina, nas concentrações de 80% proporcionaram uma maior solubilidade aos extratos secos apresentando diferença estatística apenas entre as formulações Cmic A 80 e M A 80 ($p < 0,05$). Os resultados aqui encontrados para a solubilidade corroboram a elevada solubilidade em água destes adjuvantes (CANO-CHAUCA et al., 2005; SAHIN-NADEEM; TORUN; OZDEMIR, 2011). Maltodextrinas, derivados de amido modificado solúvel, são utilizadas isoladamente ou em combinação com outros materiais em alimentos e processamento de drogas de extratos vegetais, aditivos aromáticos, carotenóides e vitaminas (BAE; LEE, 2008). Apresentam baixo custo e, além disso, são muito utilizadas na secagem por *spray dryer* devido a suas propriedades físicas, como alta solubilidade em água o que leva a uma menor viscosidade da solução de secagem (CANO-CHAUCA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2010).

As ciclodextrinas são úteis farmaceuticamente devido a sua interação com outras moléculas formando complexos de inclusão. Na formação do complexo, as propriedades físico-químicas e biológicas dos materiais encapsulados podem ser alteradas, tais como aumento da solubilidade e estabilidade física e química (STELLA; HE, 2008). Foi observado no presente trabalho que a β -ciclodextrina favoreceu a solubilidade do extrato quando comparada com as formulações contendo apenas Aerosil[®], celulose microcristalina:Aerosil[®] e Dry Flo:Aerosil[®].

O dióxido de silício coloidal propicia aos produtos da secagem melhores características de fluidez, além de ser antiaglomerante. Seu mecanismo de ação mais provável é a formação de uma monocamada em torno das partículas do extrato da planta, que pode manter as partículas distantes, reduzindo ao mínimo as forças de adesão de van der Waals entre elas. Este material apresenta inércia química, inocuidade, estabilidade térmica e segurança (SOUZA et al., 2009).

Cortés-Rojas e Oliveira (2012) relataram bons resultados de solubilidade em água dos extratos secos em *spray dryer* da planta *Bidens pilosa* utilizando a mistura de maltodextrina DE 10 e Aerosil[®] (72,1% de solubilidade). Além disso, obtiveram resultados semelhantes ao presente trabalho quando utilizaram a mistura de celulose microcristalina e Aerosil[®] que apresentou o resultado mais baixo de solubilidade (40,6% de solubilidade). Resultados

similares foram obtidos por Cano-Chauca et al. (2005) trabalhando com extratos secos de suco de manga em *spray dryer*. Com o aumento da concentração de celulose adicionada nas composições de secagem observou-se a diminuição da solubilidade. Em contrapartida, quando os autores utilizaram maltodextrina e goma arábica como adjuvantes de secagem observaram uma solubilidade em torno de 95%. A análise de solubilidade em água também foi realizada para o extrato PG LIO, obtendo-se um valor de 73,54 (4,12) %. Este resultado mostra que a solubilidade do extrato foi melhorada com a adição dos adjuvantes como maltodextrina, goma arábica (Encapsia) e β -ciclodextrina.

A qualidade dos extratos secos obtidos também foi avaliada pela quantificação de marcadores químicos (flavonoides totais, polifenóis e taninos totais) por espectrofotometria.

Comparando os teores de flavonoides totais dos extratos secos, observa-se que nas concentrações de 40% de adjuvantes, o teor destes compostos foi maior, como esperado. A explicação para este resultado muito provavelmente relaciona-se à concentração de adjuvantes (efeito de diluição dos extratos). Os resultados, entretanto, não evidenciam variações significativas devido à operação de secagem, indicando que os parâmetros de secagem escolhidos e os adjuvantes utilizados mostraram-se eficientes na proteção dos flavonoides. Resultados semelhantes para o teor de flavonoides de extratos secos de *Bidens pilosa* em *spray dryer* foram reportados por Cortés-Rojas e Oliveira (2012). Os autores utilizaram os adjuvantes maltodextrina DE 10 e celulose microcristalina juntamente com Aerosil[®], em diferentes proporções, além de β -ciclodextrina e Aerosil[®] ambos nas concentrações de 100% em relação ao teor de sólidos. As condições de operação do secador foram similares às utilizadas nessa tese.

Com relação aos compostos fenólicos analisados, não ocorreu degradação significativa dos mesmos principalmente em relação às formulações M A 40 e MA 80, MDE A 40 e MDE A 80. A formulação β CD 80 apresentou uma pequena taxa de degradação em relação ao conteúdo de flavonoides totais (3%). Resultados diferentes foram obtidos por Souza et al. (2008) que, utilizando o dióxido de silício coloidal e maltodextrina como adjuvantes na secagem de extratos de *Rosmarinus officinalis* observaram elevada degradação tanto para flavonoides totais (13,1 a 49,9%) como para fenólicos totais (45 a 53%). Os autores relatam que esta degradação pode estar associada à ocorrência de reações oxidativas, decomposição de compostos termolábeis ou mesmo perdas de substâncias voláteis induzidas pelo calor.

Georgetti et al. (2008) também avaliou os teores de flavonoides totais, polifenóis totais e atividade antioxidante (método do radical DPPH) de extratos de soja secos em *spray dryer*. Os parâmetros escolhidos para a secagem foram temperatura de entrada do ar de secagem (T_{ge}) de 150 °C, vazão de alimentação do extrato (W_{susp}) de 4,0 g/min e vazão do ar de atomização 15 lpm. Os autores observaram uma diminuição tanto nos teores dos marcadores escolhidos, como na atividade antioxidante após a secagem do extrato de soja. Esta redução dos teores foi menor quando se utilizou o dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem.

O comportamento do produto durante a secagem sofre influencia do equipamento utilizado. De acordo com Oliveira, Bott e Souza (2006), estes comportamentos estão relacionados ao mecanismo de secagem envolvido em cada processo.

A temperatura e o tempo de secagem podem afetar a atividade e estabilidade de compostos bioativos devido à degradação enzimática e química, perdas por volatilização e/ou decomposição térmica (DORTA; LOBO; GONZÁLEZ, 2012).

A fim de se comparar os dois distintos processos de secagem, *spray drying* (atomização) e liofilização (*freeze-drying*), foram realizadas as quantificações dos teores de flavonoides, polifenóis e taninos totais dos extratos secos obtidos por ambos os métodos. Os resultados experimentais estão mostrados na Tabela 16, sendo acrescentada a letra L aos códigos do extrato obtidos por liofilização.

Comparando-se os valores do teor de flavonoides totais dos extratos obtidos por liofilização e por *spray drying*, observa-se que os extratos secos apresentam comportamentos semelhantes. Com relação ao teor de flavonoides totais, apenas os extratos secos por *spray dryer* Cmic A 80 e Dry Flo A 80 apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) comparados ao extrato liofilizado (PG LIO). Quanto aos polifenóis totais, os extratos secos por *spray dryer* Cmic A 80 e β CD 80 apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) comparados ao extrato PG LIO. Finalmente, quanto ao teor de taninos totais, somente o extrato seco por *spray dryer* A 80 apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) comparado ao extrato PG LIO.

Tabela 16 – Teores de flavonoides, polifenóis e taninos totais dos extratos secos por liofilização.

ES	FT (Quercetina _{mg} /g _{extrato})	PT (% m/m g.pó)	TT (% m/m g.pó)
A 40 L	16,38 (0,01)	16,01 (0,06)	8,42 (0,12)
A 80 L	12,64 (0,07)	12,50 (0,13)	5,83 (0,23)
Cmic A 40 L	17,14 (0,02)	20,02 (0,16)	10,30 (0,24)
Cmic A 80 L	15,02 (0,09)	16,88 (0,13)	13,67 (0,14)
M A 40 L	14,96 (0,08)	17,56 (0,14)	9,98 (0,20)
M A 80 L	12,30 (0,17)	13,27 (0,15)	7,47 (0,22)
Dry Flo A 40 L	15,21 (0,05)	13,06 (0,11)	9,30 (0,10)
Dry Flo A 80 L	12,20 (0,02)	10,34 (0,12)	7,14 (0,13)
MDE A 40 L	15,42 (0,10)	12,26 (0,19)	9,40 (0,28)
MDE A 80 L	12,77 (0,10)	10,16 (0,02)	7,36 (0,07)
PG LIO	22,35 (0,11)	24,47 (0,23)	12,78 (0,17)

ES: extrato seco; FT: flavonoides totais; PT: polifenóis totais; TT: taninos totais.
Os valores estão representados como média (desvio padrão).

Chan et al. (2009) avaliaram os efeitos de diferentes métodos de secagem nas propriedades antioxidantes de folhas de gengibre. Os resultados mostraram que a liofilização foi superior a outros métodos de secagem para preservar as propriedades antioxidantes da planta. Os outros métodos empregados (micro-ondas, estufa e secagem ao sol) resultaram na diminuição do teor de compostos fenólicos. Entretanto, devido ao alto custo operacional, a liofilização pode ser aplicada na produção de chás especiais de alta qualidade a partir folhas de gengibre.

No presente trabalho, observando-se os resultados dos compostos fenólicos avaliados, pode-se inferir que os métodos de secagem utilizados não influem de forma significativa nas propriedades químicas dos extratos secos de *Psidium guajava*, apesar dos diferentes mecanismos de secagem.

5.3.3 Distribuição granulométrica dos extratos secos em *spray dryer*

O tamanho de partícula é um importante parâmetro a ser analisado, pois está diretamente relacionado à solubilidade e fluidez do produto, propriedades importantes para aplicações industriais. A distribuição granulométrica dos produtos secos foi obtida segundo procedimento descrito em 4.3.7.7. A partir de imagens obtidas em microscópio óptico e utilizando-se o *software* analisador de imagens (Image Pro-Plus[®], 7.0) foi possível determinar o diâmetro médio e a distribuição granulométrica dos produtos obtidos em diferentes condições experimentais. A Figura 29 corresponde às curvas de distribuição de tamanho de partículas obtidas para os pós produzidos com os adjuvantes de secagem. Os gráficos da distribuição granulométrica mostram que os extratos secos obtidos são compostos de partículas polidispersas.

De todas as formulações avaliadas, os menores tamanhos de partículas foram obtidos com o adjuvante Aerosil[®], uma sílica submicroscópica com tamanho de partícula que varia de 7 a 16 nm (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Os extratos secos obtidos com Aerosil[®] apresentam uma ampla distribuição em que, mais de 90% das partículas apresentam tamanho inferior a 15 µm como mostrado na Figura 29 (a). Resultados similares foram obtidos por Cortés-Rojas e Oliveira (2012), que obtiveram partículas com tamanho médio da ordem de 7 µm.

De acordo com a Figura 29 (b), pode-se observar que os extratos secos contendo maltodextrina:Aerosil[®] apresentaram uma distribuição mais uniforme. O tamanho das partículas das duas concentrações de adjuvantes utilizadas (40 e 80%) variou de 13 a 16 µm.

Souza et al. (2008) investigaram o potencial do *spray dryer* para a obtenção de extratos secos de *Rosmarinus officinalis*. Os autores os adjuvantes dióxido de silício coloidal e maltodextrina e obtiveram partículas com diâmetros que variaram de 9 a 13 µm, empregando o mesmo secador empregado nessa tese. De acordo com os autores, o comportamento dos pós produzidos pode estar associado às propriedades físicas e químicas da solução de alimentação no secador, às condições de atomização e também às perdas dos finos pelo ciclone. Em outro estudo, Souza et al. (2009) obtiveram extratos secos de *Bauhinia forficata* em *spray dryer* utilizando o dióxido de silício coloidal na mesma temperatura do ar de secagem do presente estudo (150 °C), sendo obtidas partículas polidispersas com tamanho variando de 0 a 30 µm e um tamanho médio de 14 µm.

Figura 29 – Distribuição granulométrica acumulada dos extratos secos obtidos pelo processo de *spray drying*: (a): A 40 e A 80; (b): M A 40 e M A 80; (c): Cmic A 40 e Cmic A 80; (d): MDE A 40 e MDE A 80; (e): Dry Flo A 40 e Dry Flo A 80; (f): β CD 80.

A distribuição granulométrica dos extratos obtidos com mistura de celulose microcristalina:Aerosil® evidencia um comportamento bem diferente, com distribuição granulométrica polidispersa, apresentando partículas com tamanhos de 15 a 40 μm (Figura 29 (c)). A ampla distribuição de tamanho obtida com esta composição muito provavelmente relaciona-se com a diferença no tamanho de partículas dos adjuvantes empregados. A celulose microcristalina possui o tamanho típico variando de 20 a 200 μm (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009), sendo que a celulose microcristalina utilizada no presente trabalho apresenta tamanho máximo inferior a 70 μm .

A Figura 29 (d) mostra os resultados da distribuição granulométrica dos extratos secos contendo maltodextrina:goma arábica (Encapsia):Aerosil®. Pode ser notado que os extratos secos apresentaram uma distribuição uniforme com tamanhos de partículas de 12 a 13 μm em média. Pode-se observar que as diferentes concentrações dos adjuvantes não afetaram o comportamento dos extratos secos no processo de secagem. No estudo de Silva (2012) no qual foi avaliado o produto seco obtido em *spray dryer* do despulpamento de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando a goma arábica como adjuvante, as partículas obtidas apresentaram diâmetros médios que variaram de 31 a 45 μm .

A secagem em *spray dryer* de extratos de *Dalbergia ecastaphyllum* (ZAMPIÉR, 2012), a temperatura do ar de secagem de 140 °C e utilizando maltodextrina DE 10 e Aerosil® como adjuvantes produziu partículas com tamanho entre 6 e 8 μm , valores bem inferiores aos obtidos com os extratos secos de *P. guajava*.

As partículas produzidas com misturas de Dry Flo:Aerosil® (Figura 29 e) apresentaram uma distribuição uniforme com tamanhos de partículas inferiores a 15 μm . As formulações contendo diferentes concentrações de adjuvantes também não foram afetadas pelo processo de secagem.

O extrato seco contendo β -ciclodextrina apresentou também uma ampla distribuição de tamanho. Entretanto, aproximadamente 80% das partículas apresentaram tamanhos inferiores a 20 μm (Figura 29 f). O valor encontrado do tamanho das partículas está de acordo com Zampiér (2012) que obteve partículas com tamanho entre 6 e 13 μm na secagem em *spray dryer* de extratos de *Dalbergia ecastaphyllum* e de própolis vermelha. A distribuição do tamanho de partícula da β -ciclodextrina varia de 7 a 45 μm (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009) o que está de acordo com o tamanho das partículas obtidas no presente estudo.

A Tabela 17 apresenta os valores dos diâmetros médios obtidos para todos os extratos secos obtidos. Os resultados variaram de 8,71 a 37,47 μm , o que está dentro da faixa esperada para produtos atomizados, que é de 5 a 150 μm (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

A análise dos resultados obtidos para a distribuição granulométrica e tamanho médio de partículas comprova que o tipo de adjuvante de secagem empregado foi o fator que mais influenciou nos resultados, como esperado, visto que cada adjuvante de secagem possui propriedades distintas como tamanho de partícula, porosidade entre outras que consequentemente influem nas características do produto obtido.

Tabela 17 – Tamanho médio de partículas dos extratos secos em *spray dryer* de *Psidium guajava*.

Extrato seco	d_p (μm)*	Desvio
A 40	10,41	7,55
A 80	9,24	6,91
Cmic A 40	15,08	13,87
Cmic A 80	37,47	35,32
MA 40	16,15	15,27
MA 80	13,30	11,99
Dry Flo A 40	8,71	6,73
Dry Flo A 80	12,11	9,63
MDE A 40	13,56	12,68
MDE A 80	12,14	12,65
β CD 80	15,80	16,39

* d_p : diâmetro médio das partículas (desvio da faixa de distribuição granulométrica).

A Figura 30 mostra as imagens dos extratos secos obtidas por microscopia óptica, onde se pode observar que a composição contendo celulose microcristalina (c; d) apresentam partículas alargadas de maior dimensão (evidenciadas na imagem d). As características deste adjuvante (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009) pode explicar a distribuição irregular mostrada na Figura 29 (c). Pode-se observar ainda o tamanho reduzido das partículas produzidas com Aerosil® (a; b).

Figura 30 - Imagens obtidas por microscopia óptica dos extratos secos com aumento de 50x. Composições: A 40 (a); A 80 (b); Cmic A 40 (c); Cmic A 80 (d); M A 40 (e); M A 80 (f); MDE A 40 (g); MDE A 80 (h); Dry Flo A 40 (i); Dry Flo A 80 (j); β CD 80 (k).

5.3.4 Avaliação das características farmacotécnicas dos extratos secos

O índice de Carr (IC), assim como o fator de Hausner (FH), são parâmetros que permitem avaliar as características de fluidez e de compressibilidade de pós. Hausner relacionou a densidade bruta e a densidade compactada com a fricção entre as partículas e com isso, podem-se estimar as propriedades dos pós. Assim, determinou que pós com baixa fricção, como por exemplo, pós com tamanhos elevados de partículas, apresentam uma relação inferior a 1,2 e pós coesivos com fluxo restrito apresentam valor superior a 1,6

(AULTON, 2005). A Tabela 18 apresenta os resultados das características farmacotécnicas dos extratos secos.

Tabela 18 – Características farmacotécnicas dos extratos secos obtidos no *spray dryer*.

ES	ρ_b (g/cm ³)	ρ_c (g/cm ³)	FH (-)	IC (-)	θ (°)
A 40	0,327 (0,01)	0,429 (0,03)	1,31 (0,07)	23,47 (4,17)	48 (0,87)
A 80	0,280 (0,00)	0,377 (0,01)	1,35 (0,03)	25,70 (1,83)	52 (1,27)
Cmic A 40	0,246 (0,01)	0,313 (0,00)	1,27 (0,04)	21,27 (2,20)	44 (0,73)
Cmic A 80	0,312 (0,01)	0,393 (0,01)	1,26 (0,05)	20,58 (3,17)	42 (1,08)
M A 40	0,142 (0,00)	0,198 (0,00)	1,40 (0,08)	28,21 (4,06)	38 (0,93)
M A 80	0,158 (0,00)	0,215 (0,00)	1,36 (0,01)	26,55 (0,73)	37 (2,63)
Dry Flo A 40	0,209 (0,00)	0,262 (0,00)	1,25 (0,05)	20,19 (3,25)	41 (0,56)
Dry Flo A 80	0,291 (0,01)	0,362 (0,01)	1,25 (0,04)	19,77 (2,31)	36 (1,22)
MDE A 40	0,170 (0,00)	0,219 (0,00)	1,29 (0,03)	22,32 (2,03)	36 (3,48)
MDE A 80	0,197 (0,00)	0,242 (0,00)	1,23 (0,01)	18,70 (0,91)	34 (1,27)
β CD 80	0,188 (0,00)	0,231 (0,00)	1,23 (0,00)	18,52 (0,00)	42 (3,42)

ρ_b : densidade bruta; ρ_c : densidade de compactação; FH: Fator de Hausner; IC: índice de compressibilidade; θ : ângulo de repouso.

Os valores estão representados como média (desvio padrão).

Observa-se na Tabela 18 que todos os extratos secos obtidos não são considerados coesivos ou de fluxo restrito, porém suas características de fluidez podem ser consideradas medianas. Valores baixos de IC e FH são característicos de pós com maior estabilidade de empacotamento, o que contribui para maiores ângulos de repouso.

Em relação ao IC, materiais com índice entre 5 e 15% são considerados de fluidez excelente, de 12 a 16% fluxo bom, de 18 a 21% escassa, de 22 a 35% fluxo fraco, de 35 a 38% muito fraco e maior que 40% extremamente fraco (AULTON, 2005). Dessa forma, os extratos secos obtidos neste trabalho estão classificados como fluxo escasso a fraco, resultado comumente observado em produtos secos em *spray dryer*.

Estudos realizados com extratos secos de *Dalbergia ecastaphyllum* (ZAMPIÉR, 2012) mostraram resultados muito diferentes dos obtidos neste trabalho. Os valores de FH ficaram na faixa de 1,57 até 2,13 e os valores de IC variaram de 36,36 a 53,06, sendo, portanto considerados de fluidez ruim. Resultados semelhantes foram reportados por Cortés-Rojas e Oliveira (2012) que obtiveram valores de FH entre 1,55 e 1,63, sendo o menor valor

correspondente a composição contendo maltodextrina:Aerosil[®]. Pode-se observar na Tabela 18 que o extrato contendo esta composição apresentou um valor próximo (1,36 a 1,40) de FH.

Nesse trabalho, os menores valores de FH e IC foram apresentados pela composição contendo β -ciclodextrina, resultados diferentes dos apresentados em Cortés-Rojas e Oliveira (2012), que observaram que a composição contendo β -ciclodextrina apresentou a mais baixa fluidez (FH = 1,58 e IC = 36,8).

O ângulo de repouso depende da fricção e adesão do pó. Baseado nisto, foi proposta a seguinte classificação de pós: muito coesivo ($55^\circ < \theta < 70^\circ$), coesivo ($45^\circ < \theta < 55^\circ$), baixa fluidez ($38^\circ < \theta < 45^\circ$), média fluidez ($30^\circ < \theta < 38^\circ$) e alta fluidez ($25^\circ < \theta < 30^\circ$) (AVALI; CAUSSAT, 2005). Observa-se que os pós que apresentaram características de média fluidez foram M A 40 e M A 80, Dry Flo A 80, MDE A 40 e MDE A 80.

Tendo em vista que o dióxido de silício coloidal é um excipiente lubrificante amplamente usado em formulações farmacêuticas, a sua associação com maltodextrina favoreceu a fluidez dos extratos secos. Araújo, Teixeira e Freitas (2010) utilizando somente dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem obtiveram pós com ângulos de repouso que variaram de 52 a 55 °, o que indica a condição de pós coesivos.

O conjunto dos resultados obtidos neste trabalho e por diversos autores comprovam que a composição de secagem exerce significativa influência sobre as propriedades físicas e químicas do produto seco obtido, justificando a necessidade de estudos experimentais.

5.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 31 mostra as fotomicrografias do extrato seco no liofilizador (PG LIO) e dos extratos secos selecionados de *Psidium guajava* obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com aumentos de 500 x, 1.00 kx, 2.00 kx, 3.00 kx e 10.00 kx. As partículas apresentaram o perfil característico de produtos atomizados: partículas esféricas, de vários tamanhos e aglomeradas, com características superficiais dependentes dos adjuvantes utilizados.

Figura 31 – Fotomicrografias obtidas por MEV observadas em diferentes aumentos (500 x, 1.00 kx, 2.00 kx, 3.00 kx e 10.00 kx) para os extratos secos no *spray dryer* contendo misturas de adjuvantes: maltodextrina:Aerosil® (M A 80); maltodextrina:Encapsia:Aerosil® (MDE A 80); β-ciclodextrina (βCD 80) e extrato seco no liofilizador (PG LIO).

Os extratos secos obtidos com mistura de maltodextrina:dióxido de silício coloidal (M A 80) apresentaram-se na forma de partículas com características arredondadas, com baixa rugosidade superficial. Georgetti et al. (2008) promoveram a secagem de extrato de soja utilizando maltodextrina, dióxido de silício coloidal e amido como adjuvantes de secagem obtendo partículas irregulares que tenderam a aglomeração. No estudo de Tonon, Brabet e Hubinger (2008) utilizando maltodextrina DE 10 como adjuvante de secagem do suco de açaí em *spray dryer* foram observadas diferentes formas de partículas. Os autores avaliaram a secagem em três temperaturas: 138, 170 e 202 °C. As partículas obtidas a 170 °C apresentaram forma semelhante as do presente estudo, onde se utilizou temperatura de 150 °C. Segundo os autores, quando a temperatura do ar de entrada é mais baixa, a maioria das partículas pode apresentar superfície enrugada. Com o aumento da temperatura de secagem, um maior número de partículas com superfície lisa é formada. Temperaturas mais elevadas causam mais rápida evaporação da água e levam a formação de uma crosta lisa e dura.

Segundo Allamilla-Beltrán et al. (2005), as diferenças morfológicas entre pós obtidos em temperaturas diferentes também podem ser decorrentes das características físicas da crosta, que pode ser flexível e colapsada (quando as temperaturas baixas e intermediárias são utilizadas) ou rígida e porosa quando são temperaturas mais elevadas.

Osorio, Forero e Carriazo (2011) encapsularam em *spray dryer* o extrato aquoso de frutos de goiaba utilizando maltodextrina, goma arábica puras ou em misturas. A temperatura do ar de secagem foi de 200 °C e as partículas obtidas com maltodextrina:goma arábica como adjuvantes apresentaram formas mais regulares e esféricas do que as contendo apenas maltodextrina. Isto indica o efeito favorável da goma arábica na formação das microcápsulas, mas no geral, as fotomicrografias revelaram a produção bem sucedida de microcápsulas esféricas tanto com maltodextrina, como com a mistura de maltodextrina:goma arábica.

Por outro lado, observa-se que as partículas do extrato seco no liofilizador (PG LIO) apresentaram tamanhos bastante variados, com aspecto de lascas, bem diferentes das partículas arredondadas características do processo de secagem em *spray dryer*, confirmando a importancia do processo de secagem nas características morfológicas das partículas geradas.

A Figura 32 apresenta fotomicrografias dos adjuvantes puros secos em *spray dryer* para efeito de comparação.

Figura 32 – Fotomicrografias obtidas por MEV observadas em diferentes aumentos (2.00 K x e 3.00 K x) para os adjuvantes secos isoladamente em *spray dryer*.

Com relação às partículas obtidas na secagem em *spray dryer* dos adjuvantes tecnológicos (Figura 32) pode-se observar que as partículas apresentaram formas esféricas, na maioria com superfícies lisas, mas também várias com aspecto corrugado, comportamento similar aos apresentados pelos extratos secos contendo os mesmos adjuvantes (Figura 31).

Fernandes (2008) mostrou que a β -ciclodextrina “in natura” apresenta-se na forma de cristais quando analisada antes da secagem. A fotomicrografia deste adjuvante (β CD NAT) confirma esta proposição, mostrando a diferença das partículas formadas após passagem pelo processo *spray dryer* (β CD SD), onde a morfologia das partículas passa da forma de lascas irregulares para formas esféricas (Figura 32).

5.4 Atividade antioxidante dos extratos secos por *spray drying* de *Psidium guajava*

O presente estudo foi dividido em duas partes: (i) avaliação das quatro cultivares de *Psidium guajava* para a seleção da cultivar a ser empregada nos estudos posteriores e (ii) após a seleção da cultivar, Pedro Sato, foram realizados todos os ensaios de caracterização da matéria-prima vegetal, solução extrativa até a obtenção dos extratos secos em *spray dryer* e liofilizador. Estes extratos secos foram devidamente avaliados quanto às características físico-químicas e a avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH foi realizada como última etapa deste processo. Os resultados obtidos desta avaliação permitiram selecionar alguns extratos secos baseado nos teores de compostos de interesse para o estudo mais aprofundado que inclui a avaliação da atividade antioxidante por outros métodos, indiretos ou diretos (ABTS, FRAP, ORAC e QL_{lum}), avaliação da atividade antimicrobiana e estudos de estabilidade.

A Tabela 19 apresenta os resultados da atividade antioxidante avaliada pelo método do DPPH[•] dos extratos secos por *spray drying*, do extrato concentrado, do PG LIO e das substâncias padrão (quercetina e ácido gálico). A quercetina e o ácido gálico foram utilizadas como antioxidantes de referência com a proposta de comparar as atividades antioxidantes dos extratos secos, do extrato concentrado e do extrato liofilizado com um padrão de atividade antioxidante conhecido. Os resultados foram expressos em % de inibição do DPPH[•] e como CI_{50} (concentração necessária para sequestrar 50% do radical DPPH). Quanto maior a capacidade sequestrante de radicais livres, menor é o valor da CI_{50} .

A porcentagem de inibição máxima do DPPH[•] foi de 88 % para os extratos secos e o valor de CI_{50} ficou entre 6,16 a 10,31 $\mu\text{g/mL}$. Em relação às substâncias de referência utilizadas, ambas antioxidantes naturais e de cinética rápida, pode-se observar que a quercetina (0,96 $\mu\text{g/mL}$) apresentou o CI_{50} menor do que o CI_{50} do ácido gálico (1,05 $\mu\text{g/mL}$), provavelmente por possuir 5 grupos hidroxílicos (o ácido gálico possui 4 grupos hidroxílicos). A quercetina apresenta um caráter lipofílico e o ácido gálico, caráter hidrofílico (ALVES et al., 2010), o que possibilita comparar o comportamento do método frente a compostos de natureza diferentes. Além disso, a atividade antioxidante superior dos padrões quercetina e ácido gálico com relação à atividade antioxidante dos extratos secos é esperada, tendo em vista que são substâncias puras.

Tabela 19- Atividade antioxidante dos extratos secos em *spray dryer* e no liofilizador de *Psidium guajava* pelo método do DPPH*.

Secador	ES	DPPH	
		% Inibição	CI ₅₀ (µg/mL)
<i>Spray dryer</i>	A 40	84,10 (0,82)	6,16 (0,41)
	A 80	81,63 (0,61)	8,16 (0,48)
	Cmic A 40	84,71 (0,89)	7,29 (0,11)
	Cmic A 80	87,48 (0,48)	10,31 (0,21)
	M A 40	88,33 (0,73)	6,36 (0,02)
	M A 80	88,54 (0,51)	8,11 (0,05)
	Dry Flo A 40	86,57 (0,54)	6,29 (0,16)
	Dry Flo A 80	85,88 (1,22)	7,39 (0,09)
	MDE A 40	86,25 (0,50)	6,56 (0,17)
	MDE A 80	85,89 (0,90)	9,76 (0,21)
	βCD 80	86,09 (0,84)	7,96 (0,18)
	EC	88,48 (0,28)	3,45 (0,05)
Padrões	PG LIO	84,14 (1,18)	4,04 (0,14)
	Quercetina	86,20 (0,90)	0,96 (0,01)
	Ácido gálico	81,60 (0,76)	1,05 (0,02)

Os valores estão representados como média (desvio padrão).

A análise estatística dos resultados demonstra a existência de diferença estatística ($p < 0,05$) entre a amostra A 40 com A 80, Cmic A 80, Dry Flo A 40, MDE A 40, M A 40 e M A 80; a amostra A 80 com Cmic A 40 e Cmic A 80, Dry Flo A 40 e Dry Flo A 80, MDE A 40 e MDE A 80, M A 40 e M A 80 e βCD 80; βCD 80 com M A 40 e M A 80; Cmic A 40 com Cmic A 80, M A 40 e M A 80; Dry Flo A 80 com M A 40 e M A 80; MDE A 40 com M A 80; MDE A 80 com M A 40 e M A 80.

Com relação aos processos de secagem utilizados, o extrato seco no liofilizador (PG LIO) apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) apenas entre A 80, Cmic A 80, Dry Flo A 40, M A 40 e M A 80. Quanto ao extrato concentrado, as amostras que apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) foram A 40, A 80, βCD 80, C mic A 40 e Dry Flo A 80. O extrato PG LIO apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) comparativamente ao extrato concentrado. No

entanto, esta diferença não é tão expressiva, uma vez que a análise é realizada com base nos sólidos presentes no extrato concentrado, igualando assim os teores de ativos de ambas as amostras.

Quanto ao parâmetro CI_{50} poucas amostras não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$) dentre as quais, A 40 com Dry Flo A 40 e M A 40; A 80 com β CD 80 e M A 80; β CD 80 com M A 80; Cmic A 40 com Dry Flo A 80; Dry Flo A 40 com MDE A 40 e M A 40; MDE A 40 com M A 40.

Georgetti et al. (2008) avaliaram a atividade antioxidante de extratos de soja secos em *spray dryer* utilizando dióxido de silício coloidal e maltodextrina como adjuvantes de secagem. Os resultados obtidos da porcentagem de inibição do DPPH foram diferentes dos apresentados no presente trabalho. Os extratos secos apresentaram em torno de 50 % de porcentagem de inibição máxima do DPPH.

Couto et al. (2012) avaliaram a influência das condições de secagem, sem adicionar adjuvantes, no conteúdo de marcadores químicos e na atividade antioxidante *in vitro* (método do radical DPPH) de extratos de *Rosmarinus officinalis*. Os extratos secos da planta apresentaram o valor de CI_{50} na faixa de 17,6 a 24,4 μ g/mL, o qual indica que alguma atividade é perdida durante o processo de secagem no *spray dryer*.

A Tabela 20 apresenta os resultados da atividade antioxidante avaliada pelo método do DPPH* dos extratos com adjuvantes secos por liofilização (*freeze drying*).

Os resultados sugerem que os processos de secagem utilizados (*spray dryer* e *liofilizador*), não causam alteração significativa na atividade antioxidante dos extratos secos produzidos. Com relação à porcentagem de inibição, comparando-se os dois processos de secagem, as amostras que apresentaram evidência de diferença estatística ($p<0,05$) foram L (liofilizado) A 40 com A 40 SD (*spray dryer*), L A 80 com A 80 SD, L Dry Flo A 40 com Dry Flo A 40 SD, L Cmic A 40 com Cmic A 40 SD, L Cmic A 80 com Cmic A 80 SD e L MDE A 80 L com MDE A 80 SD.

Quanto aos resultados obtidos de CI_{50} , houve diferença estatística ($p<0,05$) entre as amostras L A 40 com A 40 SD, L A 80 com A 80 SD, L Cmic A 40 com Cmic A 40 SD, L Cmic A 80 com Cmic A 80 SD, L MDE A 80 com MDE A 80 SD e L M A 80 com M A 80 SD.

Tabela 20 – Atividade antioxidante pelo método do DPPH* dos extratos secos de *Psidium guajava* obtidos por liofilização.

Secador	ES	DPPH	
		% Inibição	CI ₅₀ (µg/mL)
<i>Freeze dryer</i>	L A 40	85,77 (0,56)	5,60 (0,09)
	L A 80	84,99 (0,49)	7,60 (0,15)
	L Cmic A 40	89,99 (1,11)	4,87 (0,18)
	L Cmic A 80	89,60 (0,10)	6,08 (0,16)
	L M A 40	89,18 (0,55)	6,25 (0,12)
	L M A 80	89,13 (0,89)	7,58 (0,13)
	L Dry Flo A 40	88,91 (0,59)	6,17 (0,18)
	L Dry Flo A 80	85,56 (1,23)	7,55 (0,24)
	L MDE A 40	87,31 (0,39)	6,49 (0,15)
	L MDE A 80	87,33 (0,69)	7,86 (0,16)
	EC	88,48 (0,28)	3,45 (0,05)
Padrões	Quercetina	86,20 (0,90)	0,96 (0,01)
	Ácido gálico	81,60 (0,76)	1,05 (0,02)

Os valores estão representados como média (desvio padrão).

Dentre os adjuvantes avaliados, os que se mostraram mais promissores foram a maltodextrina, a goma arábica (Encapsia) e a β -ciclodextrina. Para as amostras selecionadas avaliou-se a solubilidade, taxa de degradação dos compostos fenólicos e propriedade antioxidante avaliada pelo método do radical DPPH após a secagem no *spray dryer*. As amostras de extratos secos contendo maltodextrina como adjuvante apresentaram alta solubilidade, também favorecida pela adição da goma arábica (Tabela 15). A maltodextrina é um polímero de cadeia linear de glicose com ampla aplicabilidade na indústria de alimentos e farmacêutica por ser de baixo custo, quase insípido e não cristalino (CACARETO et al., 2010).

A β -ciclodextrina tem a habilidade para formar complexos de inclusão com compostos lipofílicos permitindo o aumento da solubilidade e da biodisponibilidade. Sendo assim, é interessante avaliá-la apesar do custo mais elevado.

Quanto ao conteúdo de fenólicos, não houve degradação dos mesmos após a secagem. Somente a formulação β CD 80 apresentou uma pequena taxa de degradação em relação ao conteúdo de flavonoides totais e polifenóis totais.

Assim, foram selecionados para o prosseguimento do trabalho os extratos secos por *spray dryer*, M A 80, MDE A 80 e β CD 80. As amostras selecionadas foram novamente produzidas em maior quantidade e submetidas às seguintes análises: morfologia, estudos de estabilidade (abrangendo análise colorimétrica e difração de raios-X), atividade antioxidante avaliada por várias metodologias (além do método do radical DPPH) e avaliação da atividade antimicrobiana.

5.4.1 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos secos selecionados

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências. Atualmente, recomenda-se a utilização de duas ou mais técnicas devido às diferenças entre as capacidades sequestrantes dos vários radicais.

Desta forma, foram realizados três experimentos *in vitro* (livre de células) e um experimento em meio celular para estimar a capacidade antioxidante dos extratos secos selecionados. Para avaliar a manutenção da atividade antioxidante após o processo de secagem foram realizados ensaios com o extrato concentrado. Além disso, também foi avaliado o extrato liofilizado para se verificar a influência do processo de secagem na atividade antioxidante do extrato.

5.4.1.1 Ensaio ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ou TEAC

Quando o Trolox (análogo solúvel em água da vitamina E) é usado como padrão, o método é chamado TEAC (Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox). O radical catiônico ABTS^{•+} é gerado em solução aquosa ou em solução orgânica utilizando-se enzimas ou quimicamente, a partir do cromógeno ABTS que é solúvel em água e quimicamente estável. O ABTS^{•+} possui coloração verde/azulada e é aplicável tanto para compostos antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos (KIM et al., 2002). É um método rápido e de fácil execução que pode ser estudado sobre uma ampla faixa de valores de pH. Uma limitação do método é que o intervalo de tempo de reação deve ser cuidadosamente monitorado (SINGH;

SINGH, 2008). O ensaio de descolorização utilizando o radical livre verde/azulado ABTS^{•+} é uma ferramenta muito útil na imediata avaliação da atividade antioxidante tanto de compostos químicos individuais quanto de extratos complexos (CHEN; YEN, 2007).

De acordo com Ré et al. (1999) o radical ABTS gerado por ação do persulfato de potássio apresenta como máximos de comprimento de onda 645, 734 e 815 nm sendo comumente empregado na análise antioxidante a 734 nm. Neste estudo, o radical foi gerado com persulfato de potássio, o comprimento de onda utilizado para avaliar as amostras foi de 734 nm e o tempo de reação de 6 minutos, segundo procedimento descrito em 4.3.8.1.2. Os resultados obtidos neste ensaio estão demonstrados na Tabela 21.

Tabela 21 – Atividade antioxidante dos extratos secos avaliada pelo método ABTS^{•+}.

Amostras	ABTS ^{•+} (μ moles Trolox/g _{extrato})
EC	392,69 (84,61)
MA 80	3125,13 (173,44)
MDEA 80	3406,00 (113,68)
β CD 80	3357,99 (301,50)
PG LIO	3241,86 (132,02)

EC: extrato concentrado; PG LIO: extrato liofilizado (sem adjuvantes)
Valores expressos em média (desvio padrão), n=3.

Os resultados demonstram que, de um modo geral os extratos secos em *spray dryer* mostraram atividade antioxidante semelhante quando comparados ao extrato concentrado. Isto indica que, a operação de secagem não causou perdas significativas na atividade antioxidante dos extratos analisados, considerando-se que condições similares de secagem foram utilizadas, variando-se apenas a composição das formulações. Com relação ao PG LIO, extrato seco no liofilizador, pode-se verificar que o processo de liofilização não alterou a atividade antioxidante do extrato. Como comparação, Cortés-Rojas (2011) avaliou a atividade antioxidante pelo método do ABTS de extratos de *Bidens pilosa* utilizando Aerosil[®] em experimentos de secagem no *spray dryer* e obteve valores variando na faixa de 421,39 (21,47) a 527,81 (8,09) μ M Trolox/g_{extrato} indicando um potencial antioxidante aproximadamente seis vezes inferior ao apresentado no presente estudo.

Chen e Yen (2007) avaliaram a atividade antioxidante e os efeitos sequestrantes de radicais livres de extratos de frutos e folhas de goiaba pelo método do ABTS. Os autores observaram que os extratos do fruto da goiaba apresentaram atividade sequestrante de radicais ABTS^{•+} mais fraca que o extrato de folhas da goiaba. Foi relatado ainda, que o extrato de folhas de três cultivares de goiaba apresentaram 95% de atividade sequestrante de radicais ABTS^{•+}.

O método ABTS é amplamente utilizado para avaliação da atividade antioxidante de frutos. No estudo recente de Pereira et al. (2012) foi avaliado o potencial antioxidante de frutos de três espécies de plantas da família Myrtaceae por dois métodos: ABTS e DPPH. Pelo método do ABTS, o fruto guabiroba apresentou o mais alto potencial antioxidante (507,49 µM Trolox/g).

5.4.1.2 ORAC (Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio)

O ensaio ORAC é considerado um dos mais importantes na avaliação da atividade antioxidante de frutos e vegetais, pois utiliza uma fonte radical relevante biologicamente, o radical peroxil, sendo o único método que combina o tempo e o grau de inibição em uma única quantificação (PRIOR et al., 2003). Uma vantagem do método é que as medidas de fluorescência não sofrem interferência de pigmentos coloridos presentes na amostra (CAO; PRIOR, 1999). O efeito protetor de uma amostra contendo antioxidante é mensurado pelo cálculo da área sob a curva de decaimento da fluorescência da amostra comparando-se com a área de uma amostra “branco” (sem antioxidante presente).

Neste ensaio, o antioxidante padrão utilizado foi o Trolox, e os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox (número de µmoles de Trolox que produz a mesma atividade de 1 grama ou mg da amostra) segundo o procedimento descrito na seção 4.2.6.1.

A curva analítica foi construída com Trolox nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 e 400 µM. A Figura 33 ilustra a curva de decaimento da fluorescência (FL) na presença de Trolox e 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) diidrocloreto (AAPH).

Figura 33 – Efeito da concentração de Trolox na curva de decaimento da fluorescência FL.

O ensaio ORAC, conforme descrito anteriormente estima o potencial antioxidante da amostra em estudo da área sob a curva plotada de fluorescência versus tempo. Para o análogo da vitamina E solúvel em água (Trolox), as curvas ORAC mostram uma fase *lag* distinta durante a qual essencialmente nenhum consumo do indicador fluoresceína ocorre. Isto persiste até que o Trolox seja consumido e a fluoresceína é então rapidamente oxidada. A duração da fase *lag* e a área total sob a curva são proporcionais à concentração de Trolox (BISBY; BROOKE; NAVARATNAM, 2008).

Os valores finais de ORAC foram calculados utilizando a equação de regressão entre a concentração de Trolox e a net área sob a curva de decaimento da fluorescência (Figura 34) e foram expressos como $\mu\text{M}/\text{mg}_{\text{material seco}}$.

Figura 34 - Gráfico de dispersão entre Concentração Trolox e AUC net, com coeficiente de determinação e reta estimada.

A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos para esta determinação. Pode-se observar que não houve diferenças significativas entre as amostras de extratos secos em *spray dryer*, o que indica que os adjuvantes utilizados não alteraram os resultados do ensaio. Por outro lado, pode-se notar que com os extratos secos liofilizados apresentaram valores superiores de ORAC, o que se deve à ausência de adjuvantes na amostra liofilizada.

Tabela 22 – Atividade antioxidante dos extratos avaliada pelo método ORAC.

Amostras	ORAC (µM equivalentes Trolox/g)
MA 80*	1820 (20)
MDE A 80*	1900 (40)
β-CD 80*	2020 (120)
EC ^a	1330 (90)
PG LIO ^b	2860 (210)

*Valores expressos como µM equivalentes Trolox/g pó.

^aValores expressos como µM equivalentes Trolox /g pó.

^bValores expressos como µM equivalentes Trolox /g liofilizado.

Valores expressos em média (desvio padrão), n=3

Resultados inferiores aos obtidos no presente estudo (736,40 a 1662,24 μM equivalentes Trolox/g de pó) foram apresentados por Silva (2012), para a atividade antioxidante (método ORAC) do extrato de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) seco em *spray dryer* utilizando goma arábica como adjuvante de secagem.

Tonon (2009) avaliou a atividade anti-radical livre de amostras de suco de açaí atomizados em *spray dryer* com diferentes agentes carreadores como, maltodextrina DE 10, maltodextrina DE 20, goma arábica e fécula de mandioca através dos métodos ORAC e DPPH. Os valores obtidos pelo método ORAC variaram de 2321,75 (com fécula de mandioca) a 2408,87 (com goma arábica) μM equivalentes Trolox/g de pó suco.

Silva et al. (2011), avaliando a atividade antioxidante em ensaios *in vitro* e em meio celular de própolis do Uruguai, obtiveram resultados de ORAC na faixa de 1,8 a 9,0 μM equivalentes Trolox/mg própolis, portanto de mesma ordem de grandeza dos obtidos no presente estudo.

Thaipong et al. (2006) realizaram um estudo de comparação entre vários métodos de avaliação da atividade antioxidante utilizando extratos (metanol e diclorometano) de frutos de goiaba. O ensaio ORAC foi empregado somente para o extrato metanólico e os resultados obtidos foram na faixa de 18,2 a 25,5 μM equivalentes Trolox/g de material fresco, portanto inferiores aos obtidos neste estudo.

A literatura reporta vários trabalhos sobre a utilização do ensaio ORAC na avaliação da capacidade antioxidante em frutos e vegetais (FLOEGEL et al., 2011; KRATCHANOVA et al., 2010; LI et al., 2012; MA et al., 2011), na padronização de extratos de plantas e alimentos (NINFALI; GENNARI; BIAGIOTTI, 2009; WOJEIKOWSKI et al., 2007) para comparar a capacidade antioxidante de compostos fenólicos padrões (TABART et al., 2009) para medir a influência de diferentes métodos de secagem de extratos de plantas na sua capacidade antioxidante (HOSSAIN et al., 2010) para avaliar a capacidade antioxidante de extratos de mel na inibição do dano oxidativo na membrana de eritrócitos humanos (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2012). No entanto, nas buscas realizadas não foram encontrados resultados para avaliação da atividade antioxidante pelo método ORAC de extratos secos em *spray dryer* de folhas de *Psidium guajava*, o que evidencia a relevância desse trabalho.

5.4.1.3 FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)

O ensaio FRAP considera os antioxidantes contidos nas amostras como redutores em uma reação colorimétrica relacionada ao potencial redox, e o valor de FRAP reflete o poder redutor dos antioxidantes. O procedimento é relativamente simples, sensível, barato e fácil para padronizar.

Este ensaio mede diretamente a habilidade do antioxidante para reduzir o complexo tripiridiltiazina férrico (Fe^{+3} – TPTZ) a complexo colorido ferroso (Fe^{+2} – TPTZ) em pH baixo (3,6). Os potenciais antioxidantes de diferentes amostras foram estimados a partir de sua capacidade de reduzir o complexo Fe^{+3} – TPTZ para o Fe^{+2} – TPTZ conforme procedimento descrito na seção 4.2.6.1.

Os resultados do método FRAP são expressos em μM sulfato ferroso/g. Alguns autores expressam seus resultados em μM Trolox/g ou μM Trolox/L (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2007). A curva analítica foi construída com sulfato ferroso nas concentrações de 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 μM como mostra a Figura 35. A partir da equação da reta foi calculada a concentração equivalente de sulfato ferroso (PULIDO et al., 2000).

Figura 35 - Gráfico de dispersão entre Sulfato Ferroso e Absorvância, com coeficiente de determinação e reta estimada.

A habilidade redutora do ferro dos extratos secos em *spray dryer* analisados por este método (Tabela 23) não apresentou diferenças significativas entre as determinações. O

comportamento dos extratos foi semelhante aos analisados pelo método ORAC. O maior valor de atividade antioxidante foi exibido pelo extrato concentrado, seguido pelo produto liofilizado, o que se deve primeiramente à ausência de adjuvante de secagem nas amostras. O extrato liofilizado mostrou uma pequena diminuição do valor de FRAP em relação ao extrato concentrado. As diferenças entre os valores de FRAP apresentadas se devem mais ao efeito da diluição do produto causada pela adição de excipientes, do que aos processos de secagem empregados.

Tabela 23 – Atividade antioxidante dos extratos avaliada pelo método FRAP.

Amostras	FRAP (μM Equivalentes Sulfato ferroso/g de pó)
MA 80*	4310 (330)
MDE A 80*	4210 (190)
β -CD 80*	4540 (190)
EC ^a	8947 (180)
PG LIO ^b	7450 (160)

*Valores expressos como $\mu\text{M/g}$ pó.

^aValores expressos como $\mu\text{M/g}$ pó da folha.

^bValores expressos como $\mu\text{M/g}$ liofilizado.

Valores expressos em média (desvio padrão), n=3.

Vários trabalhos relatam o estudo da atividade antioxidante em vegetais e frutos utilizando o método FRAP (BURSAL; GULÇIN, 2011; LI et al., 2012). Essa metodologia é comumente usada para a análise da atividade antioxidante tanto de compostos puros quanto de extratos de planta (XU et al., 2009).

Thaipong et al. (2006) avaliaram a atividade antioxidante de extratos metanólicos de frutos de goiaba pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC. Os resultados de FRAP variaram na faixa de 15,5 a 33,3 μM Trolox/g material fresco.

Extratos aquosos de frutos de oito genótipos de manga foram avaliados quanto ao potencial antioxidante através de vários métodos, dentre os quais, o FRAP (MA et al., 2011). Neste ensaio, a habilidade dos extratos de manga para reduzir Fe^{+3} para Fe^{+2} variou de $910,421 \pm 123,407$ a $6.769,478 \pm 241,990$ μM Trolox/100 g material fresco.

O método FRAP pode ser aplicado tanto para estudos de atividade antioxidante em extratos de alimentos como frutos e vegetais, como também para o estudo da eficiência

antioxidante de substâncias puras, como citado anteriormente, com resultados comparáveis àqueles obtidos com metodologias mais complexas (RUFINO et al., 2006).

ABTS, DPPH, FRAP e ORAC são os métodos mais amplamente utilizados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro*. É recomendado que pelo menos dois (ou todos) destes ensaios sejam realizados para fornecer uma análise mais abrangente da capacidade antioxidante total, sendo que a potência, limitações e aplicabilidade de cada tipo de ensaio são levadas em consideração (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008). Devido às múltiplas características de reação e mecanismos envolvidos, um ensaio apenas não refletirá precisamente todos os antioxidantes em uma mistura ou sistema complexo. Assim, para elucidar um perfil completo da capacidade antioxidante, diferentes ensaios podem ser necessários (MA et al., 2011).

Entretanto, os resultados devem ser interpretados com cautela. Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), 2010) estes ensaios são baseados em mecanismos que usam diferentes fontes de radical ou oxidante e, portanto, geram valores distintos e não podem ser comparados diretamente. A comparação fica restrita as mesmas condições de avaliação dos testes, como por exemplo, o solvente de extração usado (PÉREZ-JIMENEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

Os diferentes resultados de atividade antioxidante obtidos dos ensaios no presente trabalho podem refletir uma diferença relativa na capacidade dos compostos antioxidantes nos extratos para extinguir os radicais peroxil em meio aquoso como no ensaio ORAC, para reduzir o ABTS e ferro férrico em sistemas *in vitro*. Os métodos ABTS e FRAP podem ser usados para determinar a capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos.

Com relação ao método DPPH, ensaio de fácil execução, sensível e econômico para avaliar a capacidade sequestrante de antioxidantes de extratos de frutos e vegetais, o radical é estável e não necessita ser gerado como em outros ensaios de atividade sequestrante. Os resultados obtidos com este método são altamente reproduzíveis e podem ser comparados a outros métodos tais como o ABTS (SINGH; SINGH, 2008). Uma limitação do método DPPH é que o radical somente é solúvel em solventes orgânicos, assim, o método possui maior aplicação a sistemas hidrofóbicos (KIM et al., 2002). Além disso, a acessibilidade estérica é o fator determinante da reação, portanto, moléculas pequenas com melhor acesso ao sítio do radical podem apresentar uma maior atividade quando comparada às moléculas maiores (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

O método ORAC usando a fluoresceína como sonda (ORAC_{FL}) não pode ser considerado como um ensaio de atividade antioxidante total, visto que é realizado em solução aquosa. Portanto, mede principalmente a atividade antioxidante hidrofílica contra radicais peroxil (SINGH; SINGH, 2008).

Os resultados do presente estudo baseado na avaliação da atividade antioxidante dos extratos secos em *spray dryer* e do extrato liofilizado através dos métodos *in vitro*, livre de células sugerem que os extratos etanólicos de folhas de *Psidium guajava* secos tanto no *spray dryer* como no liofilizador possuem alta atividade antioxidante demonstrada no método do radical ABTS. Com base nos resultados experimentais foi construída a Tabela 24 apresentando a correlação entre os ensaios ABTS, DPPH, FRAP e ORAC e os compostos fenólicos presentes no extrato de *P. guajava* mediante coeficiente de correlação de Pearson.

Tabela 24 – Matrix de coeficiente de correlação de Pearson e valor p para a correlação entre a capacidade antioxidante avaliada pelos ensaios ABTS, DPPH, FRAP e ORAC e conteúdo de flavonoides, polifenóis e taninos totais dos extratos secos de *Psidium guajava*.

Coeficiente de Correlação de Pearson, n= 15								
	valor p							
	ABTS	DPPH*	DPPH_CI ₅₀	FRAP	FT	ORAC	PT	TT
ABTS	1,000	-0,149	-0,019	-0,181	0,065	-0,210	0,062	-0,331
valor p		0,600	0,950	0,517	0,820	0,460	0,825	0,229
DPPH*		1,000	-0,682	0,364	0,667	0,192	0,580	0,642
valor p			0,005	0,182	0,007	0,492	0,023	0,010
DPPH_CI ₅₀			1,000	-0,244	-0,976	-0,071	-0,980	-0,662
valor p				0,380	<0,0001	0,801	<0,0001	0,007
FRAP				1,000	0,290	0,965	0,286	0,785
valor p					0,295	<0,0001	0,301	0,000
FT					1,000	0,128	0,947	0,612
valor p						0,645	<0,000	0,015
ORAC						1,000	0,124	0,663
valor p							0,659	0,007
PT							1,000	0,684
valor p								0,005
TT								1,00
valor p								

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico; DPPH*: Avaliação da % Inibição pelo método do DPPH; DPPH_CI: Avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH expressa pelo CI (concentração do antioxidante que inibe 50% do radical; FRAP: Poder Antioxidante de Redução do Ferro; FT: flavonoides totais; ORAC: Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio; PT: polifenóis totais; TT: taninos totais.

No estudo da correlação entre as variáveis (ensaio ABTS, DPPH, FRAP, flavonoides totais, ORAC, polifenóis e taninos totais) utilizou-se coeficiente de correlação de Pearson (r), que quantifica a associação entre duas variáveis quantitativas. Este coeficiente varia entre os valores -1 e 1. O valor 0 (zero) significa que não há relação linear, o valor 1 indica uma relação linear perfeita e o valor -1 também indica uma relação linear perfeita mas inversa, ou seja quando uma das variáveis aumenta a outra diminui. Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis.

Pode ser observado na Tabela 24 que a porcentagem de inibição avaliada pelo método do DPPH apresentou relação inversa com a atividade antioxidante expressa pelo CI_{50} , o que está de acordo com os dados experimentais, ou seja, quanto maior a porcentagem de inibição, menor o CI_{50} (concentração do antioxidante necessária para inibir 50% da atividade estudada). Em relação aos flavonoides e taninos totais, foi verificado uma correlação positiva ($\sim r = 0,6$) com a porcentagem de inibição avaliada pelo método do DPPH, o que sugere a relação dos compostos (FT e TT) com a atividade antioxidante avaliada por este método.

A atividade antioxidante avaliada pelo método DPPH e expressa pelo CI_{50} apresentou forte correlação negativa com FT, PT, sendo que, com TT esta relação foi um pouco menor. Isto indica que quando os valores de CI_{50} são menores (maior atividade antioxidante), os valores dos compostos FT e PT são maiores.

Quanto aos métodos empregados para a avaliação da atividade antioxidante foi observado uma forte correlação positiva ($r = 0,965$) entre os ensaios FRAP e ORAC. Além disso, o método FRAP apresentou uma boa correlação com os taninos totais.

Quanto aos compostos avaliados neste trabalho, os flavonoides totais apresentaram forte correlação positiva com os polifenóis totais ($r = 0,947$), o que sugere o envolvimento destes compostos nas atividades farmacológicas da planta *P. guajava*. Gulati, Harding e Palombo (2012) avaliaram o potencial terapêutico na hiperglicemia e diabetes tipo 2 e a atividade antioxidante do extrato etanólico de 12 plantas medicinais da Austrália e Índia através dos métodos ABTS, DPPH e FRAP. O conteúdo de flavonoides totais e polifenóis totais também foi determinado e os autores relataram que o coeficiente de correlação de Pearson entre estes compostos foi 0,796.

O método ORAC apresentou uma boa correlação com os taninos totais ($r = 0,663$), sugerindo o provável envolvimento destes compostos no ensaio em questão.

Finalmente, pode-se observar que os compostos PT e TT apresentaram uma boa correlação ($r = 0,684$).

O envolvimento dos compostos fenólicos, os quais compreendem uma grande diversidade de compostos, na maioria dos ensaios antioxidantes realizados neste trabalho, reforçam o fato de que estes compostos desempenham a função de antioxidantes através de diferentes mecanismos tais como inativação de espécies radicalares, inativação de espécies reativas de oxigênio e seqüestro de radicais livres (PHILIP JACOB; MADHUMITHA; MARY SARAL, 2011).

Blasa et al. (2011) relataram que valores de ORAC de alimentos medidos *in vitro* possuem um fraco relacionamento com a situação *in vivo*. Portanto, ensaios antioxidantes baseados em células têm sido sugeridos e desenvolvidos para triagem de alimentos e fitoquímicos. Além disso, existe um interesse aumentado em compostos de origem natural de plantas medicinais, aromáticas e outras plantas com propriedades antioxidantes a fim de encontrar novas fontes de compostos que inativem radicais livres gerados por rotas metabólicas dentro de células e tecidos corporais (BRAGA et al., 2009).

Na próxima seção serão apresentados os resultados do ensaio de quimioluminescência para a avaliação da capacidade dos extratos secos selecionados de *P. guajava* em inibir a quimioluminescência gerada em um sistema celular.

5.4.1.4 Avaliação da produção de ERO por quimioluminescência

Devido à sua sensibilidade e reprodutibilidade, ensaios baseados na QL têm sido amplamente utilizados para o monitoramento de espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas por enzimas, células e tecidos (GRAEL et al., 2010).

Os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) são fagócitos altamente especializados do sistema imune nato de humanos sendo, portanto, de grande importância na proteção do organismo frente a agentes patogênicos como fungos e bactérias (NAGATOMI, 2006). Além do papel fundamental dos neutrófilos na defesa contra microrganismos, o recrutamento e ativação aumentados destas células estão implicados na patogênese de doenças inflamatórias e autoimunes (JANCAR; CRESPO, 2005). O fato das ERO produzidas pelos PMNs desempenharem um papel importante na fisiopatologia de várias doenças tem levado a uma

busca contínua para novos agentes antioxidantes naturais e sintéticos que sejam capazes de modular o processo oxidativo (BRAGA et al., 2009).

Dentro deste contexto, estudos com produtos naturais buscando identificar substâncias com efeitos sobre o metabolismo oxidativo de PMNs têm recebido grande destaque nos últimos anos (AMARAL et al., 2009; PAULA et al., 2009; SIMÕES-AMBROSIO et al., 2010; ZHENG-FANG et al., 2011; ZERAIK et al., 2011; SUZUKI et al., 2012).

A QL é um importante método para estudar a produção de espécies reativas de oxigênio, em tempo real, por neutrófilos ativados. Para amplificar esta QL, são utilizadas sondas quimioluminescentes (KOPPRASCH et al., 2003).

No presente trabalho foi avaliado o efeito dos extratos secos selecionados (M A 80, MDE A 80 e β CD 80 obtidos por *spray dryer*), do extrato liofilizado PG LIO (*freeze dryer*) e do extrato concentrado de folhas de *Psidium guajava* sobre o metabolismo oxidativo de PMNs estimulados com PMA, o qual é um estímulo solúvel sintético que atravessa a membrana plasmática e ativa o sistema que desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio.

Para esta avaliação foi utilizado o método de quimioluminescência (QL) utilizando a sonda luminol, a qual é capaz de reagir com todas as ERO. Nesta reação, a sonda é oxidada a um íon aminoftalato eletronicamente excitado, que retorna a um estado basal emitindo fóton (ALLEN; LOOSE, 1976). A molécula de luminol é capaz de difundir através de membranas biológicas devido ao seu tamanho reduzido (177,2 daltons) e à sua estrutura química lipofílica detectando ERO produzidas intra e extracelularmente (KOPPRASCH et al., 2003).

A Tabela 25 apresenta os resultados do ensaio de quimioluminescência ampliada pelo luminol (QL_{lum}) em meio celular para avaliar os efeitos antioxidante e sequestrante de ERO dos extratos de *P. guajava*.

Tabela 25 - Efeito inibitório do extrato PG LIO e dos extratos secos de *Psidium guajava* sobre a produção de Ql_{lum} por neutrófilos estimulados com PMA.

Concentração *	Porcentagem de inibição (%) **				
	EC	PG LIO	MA 80	MDEA 80	β CD 80
1,25	20,17 (10,10)	23,32 (5,99)	26,46 (1,56)	26,36 (4,73)	27,98 (4,92)
2,5	30,65 (5,20)	38,32 (6,39)	32,0 (6,79)	37,54 (7,89)	34,6 (8,60)
5,0	46,88 (5,89)	47,65 (10,13)	51,52 (8,68)	50,72 (9,63)	47,62 (9,11)
25,0	71,67 (3,34)	80,57 (7,86)	77,4 (8,55)	77,27 (8,40)	77,29 (10,0)
50,0	84,85 (3,18)	87,92 (3,95)	87,56 (5,99)	88,76 (5,56)	88,6 (7,95)
CI ₅₀	6,03 (1,77) ^a	6,39 (2,78) ^a	5,54 (2,24) ^a	5,42 (2,85) ^a	6,50 (3,60) ^a
n	3	3	3	3	3
Quercetina CI ₅₀	1,67 (1,57)				

* Concentração (μ g/mL) final de amostra avaliada;

** Porcentagem de inibição da Ql_{lum} produzida por neutrófilos estimulados com PMA.

Os valores são expressos como média (desvio padrão).

^a Pós teste de Duncan, letras iguais na mesma linha indicam que não houve evidência de diferença estatística.

CI₅₀: concentração da amostra que promove inibição de 50% da quimioluminescência.

n: número de experimentos independentes realizados em duplicata.

Observou-se que os extratos secos em *spray dryer*, nas condições avaliadas, apresentaram um comportamento semelhante ao extrato concentrado, CI₅₀ = 6,03 (1,77) e ao PG LIO, CI₅₀ = 6,39 (2,78), o que pode ser observado pelo parâmetro CI₅₀ (concentração do extrato que inibe 50% da QL). As amostras avaliadas não apresentaram evidência de diferença estatística. Foi verificado que todos os extratos estudados inibiram a Ql_{lum} de forma dependente da concentração. Importante ressaltar que os extratos estudados não absorveram a luz na mesma faixa de comprimento de onda de emissão da sonda quimioluminescente, o que poderia inviabilizar o método de análise. Neste ensaio, a quercetina, conhecida como antioxidante natural foi usada como controle positivo com valor de CI₅₀ de 1,67 (1,57).

Paula et al. (2009) investigaram a modulação do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos pelo extrato hidroalcoólico de frutos de *Tamarindus indica* L., uma planta rica em polifenóis. Os autores relataram que a produção de ERO estimulada por vários estímulos, entre eles o PMA utilizando a sonda luminol para ampliar a quimioluminescência foi inibida pelo extrato hidroalcoólico de maneira concentração dependente. Foi observado que o extrato

foi efetivo inibidor da função dos neutrófilos estimulados com PMA [CI_{50} ($\mu\text{g}/10^6$ células) = 115,7 (9,7)].

Simões-Ambrósio et al. (2010) verificaram a influência da sazonalidade no efeito inibitório do extrato etanólico (70:30) de própolis verde no metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho pelo método da quimioluminescência utilizando a sonda luminol e obtiveram resultados expressivos (CI_{50} de 3,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no mês de maio, a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no mês de dezembro), porém com variação significativa durante o estudo.

Em outro estudo utilizando o método da quimioluminescência foi investigado a atividade inibitória contra o “burst” respiratório de neutrófilos estimulados com PMA de dois compostos com atividade anti-inflamatória isolados do extrato etanólico 60% (v/v) da planta *Liriope spicata*. Os compostos, nomeados 1 e 2, mostraram significativa atividade inibitória do “burst” respiratório de neutrófilos com CI_{50} de 4,15 (0,07) μM e 5,96 (0,37) μM , respectivamente (ZHENG-FANG et al., 2011).

5.4.1.4.1 Avaliação da toxicidade dos extratos secos e do extrato PG LIO de *Psidium guajava* sobre os neutrófilos

A fim de avaliar se o efeito modulador do extrato bruto (concentrado e liofilizado) de *P. guajava* sobre os neutrófilos está relacionado com a morte das células, foram realizados dois ensaios de citotoxicidade: exclusão ao corante azul de Tripan e de determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH). Inicialmente, os extratos foram avaliados quanto à sua toxicidade frente aos neutrófilos nas concentrações de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, foi realizado o mesmo ensaio com os extratos secos selecionados na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O extrato PG LIO e o extrato concentrado não foram tóxicos nas concentrações avaliadas para os neutrófilos nos dois ensaios, como mostra a Tabela 26. No ensaio de exclusão ao corante Azul de Tripan as células, na presença do extrato, obtiveram viabilidades superiores a 87% e no ensaio de determinação da atividade da enzima LDH a porcentagem de liberação da enzima em relação ao controle positivo (Triton X-100) foi baixa, quando comparadas com os valores do controle negativo, células sem tratamento e o controle do solvente.

Tabela 26 - Análise da citotoxicidade do extrato liofilizado de *Psidium guajava* (PG LIO) sobre os neutrófilos.

Amostras	Células viáveis (%) ^(c) Azul de Tripán	Atividade da LDH ^(d) (U/mL)	LDH liberada ^(e) (% controle positivo)
Controle positivo ^(a)	--	0,1800 (0,03)	100
Controle negativo ^(b)	96,5 (1,41)	0,0064 (0,01)	3,53 (3,65)
Controle DMSO (0,2%)	97,25 (1,77)	0,0022 (0,001)	1,19 (0,35)
EC 5 µg/mL	92,50 (2,12)	0,0051 (0,00)	2,81 (0,20)
EC 50 µg/mL	94,00 (2,83)	0,0137 (0,02)	7,58 (8,76)
PG LIO 5 µg/mL	96,75 (1,06)	0,0096 (0,01)	5,33 (6,84)
PG LIO 50 µg/mL	87,75 (0,35)	0,0074 (0,001)	4,08 (0,35)

EC: extrato concentrado; PG LIO: extrato liofilizado;

Os valores estão representados como média (desvio padrão);

(a) 1×10^6 neutrófilos/mL lisados com Triton X-100 0,2%;

(b) 1×10^6 neutrófilos/mL incubados com Hanks;

(c) % de células viáveis, determinada por meio do ensaio de exclusão ao corante Azul de Tripán, baseado na contagem de 200 células;

(d) Atividade da enzima LDH, avaliada utilizando-se o kit LDH Liquiform (Labtest Diagnóstica);

(e) Valores de porcentagem de LDH liberada, calculados em relação ao controle positivo.

Após verificar o potencial antioxidante dos extratos (concentrado e liofilizado), os extratos secos selecionados (*spray drying* e *freeze drying*) também foram avaliados quanto à citotoxicidade sobre os PMNs. Os resultados do teste de citotoxicidade sobre os neutrófilos dos extratos secos estão demonstrados na Tabela 27.

Os ensaios de toxicidade celular com os extratos secos (*spray drying*) de *P. guajava* revelaram que a atividade inibitória da QL não foi mediada pela toxicidade direta das amostras sobre as células, visto que tais ensaios demonstram não haver diferença estatística na variabilidade das células tratadas com os extratos secos na concentração de 50 µg/mL, quando comparados aos controles.

Resultados semelhantes foram relatados por Figueiredo (2010) quando analisou a toxicidade celular do extrato bruto de *Baccharis dracunculifolia* sobre neutrófilos na mesma concentração (50 µg/mL) dos extratos secos avaliados no presente trabalho.

Tabela 27- Análise da citotoxicidade dos extratos de *Psidium guajava* sobre os neutrófilos.

Amostras	Células viáveis (%) ^(c) Azul de Tripán	Atividade da LDH ^(d) (U/mL)	LDH liberada ^(e) (controle positivo)
Controle positivo ^(*)	-	0,1823 (0,02)	100
Controle negativo ^(**)	94,5 (2,83)	0,0281 (0,00)	15,39 (1,51)
Controle DMSO (0,2%)	95,2 (1,77)	0,0212 (0,01)	11,60 (2,52)
M A 80 50 µg/mL	95,0 (0,71) ^a	0,0262 (0,00)	14,37 (2,33)
MDE A 80 50 µg/mL	93,7 (1,77) ^a	0,0238 (0,01)	13,06 (3,49)
βCD 80 50 µg/mL	93,5 (4,24) ^a	0,0123 (0,01)	6,75 (3,34)

Os valores estão representados como média (desvio padrão).

(*) 1 x 10⁶ neutrófilos/mL lisados com Triton X-100 0,2%;

(**) 1 x 10⁶ neutrófilos/mL incubados com Hanks;

^a Pós teste de Duncan, letras iguais na mesma coluna indicam que não houve evidência de diferença estatística;

(c) % de células viáveis, determinada por meio do ensaio de exclusão ao corante Azul de Tripán, baseado na contagem de 200 células;

(d) Atividade da enzima LDH, avaliada utilizando-se o kit LDH Liquiform (Labtest Diagnóstica);

(e) Valores de porcentagem de LDH liberada, calculados em relação ao controle positivo.

É importante ressaltar que não há até o presente momento, relatos de estudos avaliando o efeito de extratos de folhas de *P. guajava* secos em *spray dryer* sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos, mostrando a relevância de se investigar este efeito visando o emprego destes extratos como intermediários em formulações farmacêuticas.

Mediante os resultados obtidos no presente ensaio, pode-se sugerir que, nas condições avaliadas, a atividade antioxidante apresentada pelos extratos secos de *P. guajava* pode estar relacionada à capacidade das amostras de capturar os radicais livres formados no meio reacional (*scavenger*). Como as amostras não se tratam de substâncias isoladas e sim de misturas complexas de diferentes compostos, pode haver várias substâncias atuando de diferentes maneiras sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

Barbalho et al. (2012) relataram em um trabalho recente de revisão, estudos sobre compostos químicos e seus efeitos farmacológicos de *Psidium guajava*, dentre os quais muitos têm efeitos benéficos à saúde humana. Muitos estudos farmacológicos demonstram o potencial desta planta como antioxidante, hepatoprotetora, cardioativa e especialmente antimicrobiana, entre outros (GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008).

As doenças infecciosas representam uma causa importante de mortalidade entre a população em geral, particularmente em países em desenvolvimento (FERNANDES JÚNIOR; SILVA, 2010) e, além disso, outro fator importante que justifica a busca por novos agentes antimicrobianos é o aumento da resistência a vários fármacos desenvolvida pelos patógenos humanos (HOFLING et al., 2010). Portanto, como a planta *P. guajava* é amplamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de diarreia, gastroenteritis e estomatites foi avaliado o efeito do extrato etanólico (secos no *spray dryer* e *freeze dryer*) das folhas desta planta em diferentes microrganismos.

5.5 Atividade antimicrobiana dos extratos secos de *Psidium guajava*

A atividade antimicrobiana dos extratos secos obtidos em *spray dryer* (M A 80, MDE A 80 e β CD 80), por liofilização (PG LIO) e do extrato concentrado de *P. guajava* foi investigada contra bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) e Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), como também contra leveduras (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida glabrata* ATCC 90030) pela técnica de microdiluição em caldo segundo o método descrito na seção 4.3.9. Os extratos secos e o extrato concentrado foram avaliados em concentrações de 1000; 500; 250; 125; 100; 80; 40; 20; 10 e 5 $\mu\text{g/mL}$. Os adjuvantes utilizados na secagem em *spray dryer* foram avaliados isoladamente nas mesmas concentrações dos extratos. Os padrões utilizados como controle positivo no ensaio foram o antifúngico Fluconazol (nas concentrações em $\mu\text{g/mL}$: 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125) e o antibiótico Cloranfenicol (nas concentrações em $\mu\text{g/mL}$: 125; 62,5; 31,2; 15,6; 3,9; 1,95; 0,975; 0,487; 0,122; 0,06). Os resultados do teste de susceptibilidade antibacteriano estão mostrados na Tabela 28.

Na investigação da atividade antibacteriana, os resultados de CIM mais relevantes foram os obtidos contra a bactéria *S. aureus* com os resultados variando de 100 a 250 $\mu\text{g/mL}$.

Segundo Holetz et al. (2002), extratos que mostram valores de CIM menores que 100 $\mu\text{g/mL}$, a atividade antimicrobiana é considerada boa; de 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$ a atividade antimicrobiana é moderada; de 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ a atividade antimicrobiana é fraca. Acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ o extrato é considerado inativo. Os autores avaliaram extratos hidroalcoólicos de 13 plantas contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e algumas leveduras. O extrato de *Psidium guajava* foi avaliado e mostrou moderada atividade contra *S. aureus* (CIM = 250 $\mu\text{g/mL}$) e *E. coli* (CIM = 500 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 28 - Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) de extratos de *Psidium guajava*.

Amostras	CIM (CBM) $\mu\text{g/mL}$		
	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)
Cloranfenicol	0,975	0,975	31,2
PG LIO	250	-	1000
MA 80	100	-	1000
MDEA 80	250 (500)	1000	1000
β CD 80	125 (1000*)	1000	1000
EC	100 (1000*)	250	500
Adjuvantes	-	-	-

PG LIO: extrato liofilizado; EC: extrato concentrado;

-: amostra não apresentou atividade inibitória do crescimento do microrganismo nas concentrações avaliadas;

* a concentração na qual se observa a redução de crescimento já é a concentração bactericida;

** Adjuvantes de secagem: maltodextrina, Aerosil®, goma arábica e β -ciclodextrina.

A literatura reporta vários estudos sobre a investigação da atividade antimicrobiana de extratos aquosos ou constituídos de diferentes solventes (BIRDI et al., 2010; MOURA-COSTA et al., 2012; JABERIAN; PIRI; NAZARI, 2013; PICCIRILLO et al., 2013) de plantas utilizando o método de microdiluição em caldo.

Com relação à *P. guajava*, Betoni et al. (2006) avaliaram extratos metanólicos de folhas desta planta contra *S. aureus* apresentando o resultado de CIM = 560 $\mu\text{g/mL}$. Por outro lado, Sanches et al. (2005) apresentou resultados semelhantes aos do presente trabalho quando avaliou a atividade de extratos etanólicos (70:30) de folhas de *P. guajava* contra *S. aureus* (CIM = 125 $\mu\text{g/mL}$ e CBM = 250 $\mu\text{g/mL}$) através do método de microdiluição em caldo. No entanto, o extrato não foi ativo contra *E. coli* e *P. aeruginosa*.

No presente estudo, o extrato concentrado apresentou uma moderada atividade contra *E. coli* (CIM = 250 $\mu\text{g/mL}$) e *P. aeruginosa* (CIM = 500 $\mu\text{g/mL}$), mas os extratos secos (*spray*

dryer e *freeze dryer*) não apresentaram atividade contra as bactérias Gram negativas. Isto pode ser explicado pela diferença da membrana externa destas bactérias, visto que apresentam uma barreira para penetração de várias moléculas antibióticas, como também seu espaço periplasmático contém enzimas, as quais são capazes de inativar moléculas oriundas do exterior da célula bacteriana, como antibióticos (DUFFY; POWER, 2001). Os adjuvantes empregados para a secagem podem ter contribuído para a inatividade do extrato frente a estas bactérias. Os resultados do teste de atividade antifúngica estão apresentados na Tabela 29.

Os resultados demonstram que, entre os extratos secos avaliados, todos apresentaram boa atividade antimicrobiana, segundo os critérios adotados por Holetz et al. (2002) contra a levedura *C. glabrata*. Contra as demais leveduras, os extratos secos foram inativos. O extrato concentrado apresentou uma atividade antimicrobiana considerada boa contra *C. glabrata* e *C. krusei* e moderada contra *C. albicans*.

Tabela 29 - Concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) de extratos de *Psidium guajava*.

Amostras	CIM (CFM) µg/mL		
	<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	<i>C. glabrata</i> (ATCC 90030)	<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)
Fluconazol	1	8	32
PG LIO	-	100	1000
MA 80	-	100 (1000)	100
MDEA 80	-	80	-
BCD 80	1000 (1000*)	80 (1000*)	1000
EC	250 (500)	80 (250)	100 (250)
Adjuvantes**	-	-	-

PG LIO: extrato liofilizado; EC: extrato concentrado;

-: amostra não apresentou atividade inibitória do crescimento do microrganismo nas concentrações avaliadas;

* a concentração na qual se observa a redução de crescimento já é a concentração fungicida;

** Adjuvantes de secagem: maltodextrina, Aerosil®, goma arábica e β-ciclodextrina.

Holetz et al. (2002) avaliou a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *P. guajava* contra leveduras (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) usando a técnica de microdiluição. O extrato de *P. guajava* mostrou boa atividade contra todas as leveduras avaliadas (CIM = 15,6 a 125 µg/mL).

Em outro estudo envolvendo avaliação de atividade antifúngica pelo método de microdiluição em caldo de vários extratos vegetais contra leveduras do gênero *Candida* foram obtidos resultados muito diferentes. Cortés-Rojas (2011) avaliou extratos secos em *spray dryer* da planta *Bidens pilosa* utilizando os adjuvantes de secagem maltodextrina, goma arábica e Aerosil® contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Os extratos secos foram inativos contra todas as leveduras apresentando CIM em torno de 3000 µg/mL contra *C. tropicalis*. O extrato liofilizado de *Bidens pilosa* também foi inativo contra todas as leveduras avaliadas. Interessante no estudo de Cortés-Rojas é que somente o composto isolado (poliacetileno 2) foi ativo contra todas as leveduras estudadas (CIM de 36 a 73 µg/mL). Isto evidencia que o entendimento do mecanismo de sinergismo é fundamental para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para tratar doenças utilizando plantas medicinais (BETONI et al., 2006).

As diversas espécies de *Candida* apresentam variado grau de suscetibilidade aos agentes antifúngicos (YANG et al., 2005). Além disso, as células fúngicas e humanas apresentam muitas semelhanças, como a utilização de enzimas similares e compartilhamento de vias de metabolismo intermediário. Portanto, a tarefa de encontrar alvos que ofereçam a seletividade requerida para obter-se um antifúngico seguro é um grande desafio (LACAZ, 2002).

Os resultados obtidos do ensaio de atividade antimicrobiana dos extratos secos de *P. guajava* mostraram uma boa correlação entre os dados experimentais dos extratos frente aos patógenos mais comuns e os usos relatados desta planta na medicina popular contra doenças infecciosas.

5.6 Estudos de estabilidade dos extratos secos

A avaliação da estabilidade acelerada dos extratos secos selecionados (M A 80, MDE A 80, βCD 80 e PG LIO) e extrato glicólico a 10% foi realizada em câmara climática a 40 ± 2 °C e umidade relativa de $75 \pm 5\%$. Este teste foi escolhido devido a ser preconizado como parte importante para o desenvolvimento de produtos. Além disso, foi realizado o estudo de

longa duração dos extratos secos em *spray dryer* avaliado a temperatura ambiente por 12 meses.

Durante o armazenamento, as propriedades adequadas do produto e condições de armazenamento devem ser asseguradas a fim de reduzir a ocorrência de reações físicas e químicas, absorção de água e o crescimento de microrganismos, como bactérias, bolores e leveduras. Alterações de qualidade em função do tempo de fitoterápicos em diferentes condições de estocagem, especialmente a temperatura, a umidade relativa do ar e oxigênio, podem ser avaliadas através de testes de estabilidade permitindo estabelecer condições de armazenamento adequadas, como também a vida de prateleira do produto (VEIT, 2002).

Geralmente, a degradação de uma droga incluída em uma forma farmacêutica sólida é muito lenta, especialmente quando no estado cristalino. Desta forma, é usual escolher condições forçadas de armazenamento usando temperaturas e umidades mais altas, a fim de acelerar a previsão de estabilidade (GIL-ALEGRE et al., 2001).

Segundo a RE 01/05, os dados obtidos durante o estudo de estabilidade acelerado e de longa duração podem ser utilizados para avaliar os efeitos físicos e químicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de condições adversas que possam ocorrer durante o transporte.

Nessa seção são apresentados os resultados do estudo de estabilidade dos extratos secos selecionados e do extrato glicólico a 10% armazenados por 180 dias em câmara climática a temperatura de 40 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR. Além do acompanhamento da umidade incorporada pelos extratos, também foram realizadas análises de difração de raios-X, análise colorimétrica, monitoramento da degradação dos princípios ativos vegetais e da atividade antioxidante pelo método do DPPH[•]. Essas análises podem fornecer um panorama do processo de degradação dos extratos secos em *spray dryer* da planta *Psidium guajava*.

Os extratos secos e o extrato glicólico a 10% foram armazenados em câmara climática imediatamente após a preparação. Amostras dos pós foram armazenadas em sachês laminados e a amostra líquida em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca, sendo que os tempos de amostragem das análises foram: tempo 30 (T30), 60 (T60), 90 (T90) e 180 (T180) dias. Amostras originais dos extratos secos e glicólico a 10% foram retiradas no início do estudo (tempo 0), sendo utilizadas como controle para comparação da absorção da umidade, variação dos teores de princípios ativos e variação da atividade antioxidante. Para comparar os tempos do estudo de estabilidade acelerada utilizou-se o modelo de regressão linear com efeitos

mistos (efeitos aleatórios e fixos). Os modelos lineares de efeitos mistos são utilizados na análise de dados em que as respostas estão agrupadas (medidas repetidas para um mesmo indivíduo) e a suposição de independência entre as observações num mesmo grupo não é adequada (SCHALL, 1991). Tal modelo, tem como pressuposto, que o resíduo obtido através da diferença entre os valores preditos pelo modelo e os valores observados tenha distribuição normal com média 0 e variância constante.

Para facilitar a compreensão do estudo realizado, os resultados da avaliação da estabilidade foram separados em seções de acordo com as diferentes técnicas empregadas na análise.

5.6.1 Ganho da umidade

A umidade residual dos extratos secos é de fundamental importância para sua estabilidade e contribui diretamente para a degradação química. Em razão disso, o ganho de umidade dos extratos secos foi acompanhado durante o período de armazenamento de 90 dias, sendo monitorada a cada 30 dias através da pesagem dos sachês. Para o cálculo do ganho da umidade foi utilizada a relação entre massa final (peso do sachê mais o peso da amostra no tempo da análise) menos a massa inicial (peso inicial do sachê mais o peso da amostra no tempo inicial da análise). Os resultados obtidos relativos à estabilidade acelerada dos extratos secos podem ser visualizados na Figura 36.

Figura 36 – Monitoramento da umidade dos extratos secos (M A 80, MDE A 80, β CD 80 e PG LIO) durante o estudo de estabilidade acelerada ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR).

Pode-se observar na Figura 36 que não houve variação no ganho de umidade em função do período de armazenamento para cada amostra analisada. No geral, pode-se concluir que as embalagens utilizadas no presente trabalho não apresentaram permeabilidade à absorção de água.

Com relação aos diferentes processos de secagem pode-se observar que as amostras β CD 80 e MDE A 80 não apresentaram evidência de diferença estatística ($p>0,05$) comparadas ao extrato liofilizado (PG LIO) em todos os tempos avaliados. Apenas a amostra M A 80 apresentou diferença estatística ($p<0,05$) comparada ao PGLIO nos tempos avaliados.

Por outro lado, comparando os extratos secos obtidos em *spray dryer*, a amostra β CD 80 apresentou diferença estatística ($p<0,05$) comparada às amostras M A 80 e MDE A 80. Entre as amostras M A 80 e MDE A 80 não houve diferença estatística ($p>0,05$). Resultados semelhantes foram relatados por Zampiér (2012), onde as embalagens utilizadas também não promoveram aumento significativo da umidade dos extratos secos de *D. ecastaphyllum*.

A influência da umidade na degradação do composto marcador vitexina em extratos de *P. alata* secos em *spray dryer* foi avaliado por Bott, Labuza e Oliveira (2010). Os autores relataram que o uso de embalagens com baixa permeabilidade à água e temperaturas de estocagem mais baixas aumentaria significativamente a estabilidade do produto (> 2 anos).

5.6.2 Difração de raios-X

Análises de difração de raios-X são de grande importância para se determinar o estado cristalino ou amorfo de um pó, o qual é fundamental para a estabilidade do produto.

As condições de secagem influenciam o grau de cristalinidade que está relacionado a várias propriedades físicas dos extratos secos tais como, porosidade, aderência, solubilidade e fluidez (TONELI et al., 2010). Os resultados são apresentados como difratogramas, onde os picos, detectados em diferentes ângulos, apresentam diferentes intensidades relativas (CANO-CHAUCA et al., 2005). A ampla intensidade dos ângulos significa que as moléculas nos sólidos amorfos estão aleatoriamente orientadas e difratam os raios-X em todas as direções resultando no típico padrão amorfo de “halo”, o qual tem sido relatado por outros autores (BOTT; LABUZA; OLIVEIRA, 2010). Por outro lado, os sólidos cristalinos apresentam picos agudos e definidos visto que as moléculas se apresentam em estado de elevada ordenação (CANO-CHAUCA et al., 2005). Os sólidos amorfos são geralmente mais solúveis e menos estáveis que seus cristais correspondentes (YU, 2001).

O objetivo desses ensaios foi verificar se ocorreram transformações físicas, como por exemplo, mudança do grau de cristalinidade durante o período de armazenamento dos extratos secos. Foram realizadas as análises de difração de raios-X para os extratos secos selecionados (M A 80, MDE A 80, β CD 80 e PG LIO) para o estudo de estabilidade acelerado, nos tempos zero (na preparação dos extratos) e no tempo 180 dias de armazenamento em câmara climática. Os difratogramas dos extratos secos estão apresentados na Figura 37.

Figura 37 – Difratomogramas dos extratos de *Psidium guajava* secos no *spray dryer* e *freeze dryer* no tempo de armazenamento 0 e 180 dias (MA 80: Maltodextrina:Aerosil; MDEA 80: Maltodextrina:Encapsia:Aerosil; βCD 80: β-ciclodextrina; PG LIO: extrato liofilizado).

Também foram realizadas as análises de difração de raios-X para os adjuvantes puros. A Figura 38 exhibe os difratogramas dos adjuvantes puros.

Figura 38 – Difratomogramas dos adjuvantes puros (MA SD: Maltodextrina:Aerosil[®] seco em *spray dryer*; MDEA SD: Maltodextrina:Encapsia:Aerosil[®] seco em *spray dryer*; β CD SD: β -ciclodextrina seco em *spray dryer*; β CD NAT: β -ciclodextrina in natura).

Os perfis observados inicialmente (T0) para as composições contendo maltodextrina:Aerosil[®] e maltodextrina:Encapsia:Aerosil[®] são característicos de substâncias amorfas. Comparando as amostras de extrato seco em *spray dryer* no tempo 0 com as amostras dos adjuvantes puros secos em *spray dryer*, pode-se observar que os difratogramas são semelhantes indicando que os adjuvantes mantiveram suas estruturas amorfas após a secagem com o extrato de *Psidium guajava*. No estado amorfo, as moléculas estão dispersas em um estado desordenado mostrando picos grandes, indefinidos e com ruído abundante (CANO-CHAUCA et al., 2005).

Quando foi utilizado a composição com β CD 80, o extrato seco apresentou características semi-cristalinas. A β -ciclodextrina é um sólido cristalino (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006) como pode ser observado na Figura 38, entretanto seu estado pode ser alterado por vários fatores. Resultados similares foram relatados por Zampiér (2012) que também observou a formação de pó cristalino quando foi utilizado o adjuvante β CD na secagem de extratos de *Dalbergia ecastaphyllum* no *spray dryer*.

A formação de pós amorfos com picos muito semelhantes aos observados no presente trabalho foi observada no estudo de Cortés-Rojas (2011) que utilizou a mistura de maltodextrina:Aerosil® na secagem de extratos de *Bidens pilosa* em *spray dryer*. A semelhança do difratograma também foi observada quando se utilizou o adjuvante β CD apresentando picos característicos de pó cristalino.

Com relação ao extrato seco no liofilizador (PG LIO), o aparecimento de picos, em torno de 15 °, indica a cristalização de alguns dos elementos presentes no extrato seco. Zampiér (2012) apresentou no seu estudo o difratograma relacionado ao extrato liofilizado da planta *D. ecastaphyllum* mostrando características de pó totalmente amorfo. Os resultados aqui mostrados confirmam que o estado cristalino ou amorfo dos extratos secos é altamente dependente das características dos adjuvantes utilizados nas composições e da composição do extrato propriamente dita.

Da mesma forma, Bott (2008) utilizando o dióxido de silício coloidal como adjuvante para a secagem no *spray drying* de *Bauhinia forficata*, *Maytenus ilicifolia* e *Passiflora alata* observou a formação de pós amorfos, mas com picos indicando cristalização para *B. forficata* e *M. ilicifolia*. Segundo o autor, a cristalização interfere na estabilidade e escoabilidade do pó.

Analisando os difratogramas obtidos após 180 dias de armazenamento na câmara climática (40 °C e 75% UR), pode-se notar que não houve diferença significativa nos perfis dos picos. A composição contendo maltodextrina:Aerosil® apresentou picos em torno de 15 °, o que pode indicar cristalização.

O extrato liofilizado (PG LIO) praticamente manteve suas características após 180 dias de armazenamento na câmara climática (40 °C e 75% UR) apresentando o mesmo pico em torno de 15 °.

De acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que o estado cristalino ou amorfo dos extratos secos é fortemente dependente das características dos adjuvantes utilizados nas composições de secagem.

5.6.3 Análise colorimétrica

A decomposição de um composto sensível à umidade, luz ou oxigênio pode ser manifestada por uma mudança de cor. Por outro lado, a descoloração não significa necessariamente a degradação do ingrediente ativo. Alguns produtos mostram uma descoloração sem qualquer perda de atividade. Isto simplesmente pode resultar dos excipientes ou da interação entre o princípio ativo ou suas impurezas com os excipientes. No entanto, sob o ponto de vista de qualidade é um requisito importante farmacêuticamente que os produtos permaneçam com a mesma coloração durante o armazenamento (BERBERICH et al, 2002).

No presente trabalho foi utilizado o sistema CIE $L^* a^* b^*$ (CIELAB) que se baseia na teoria das cores opostas com três dimensões: verde/vermelho, azul/amarelo e preto/branco. Vários trabalhos na área alimentícia utilizam o sistema CIELAB para avaliação da estabilidade de extratos secos obtidos a partir de extratos de fruta (VALDUGA et al., 2008; TONON, 2009; KHA; NGUYEN; ROACH, 2010; SILVA, 2012; SOLVAL et al., 2012).

O sistema CIELAB determina parâmetros de cor e iluminação que se localizam dentro de uma área de cor definida por três eixos perpendiculares: a luminosidade (L^*), a^* índice de saturação vermelho, b^* índice de saturação amarelo e tonalidade (*hue*).

A luminosidade (L^*) é atribuída a uma determinada cor, onde o zero representa a cor preta e o 100 a cor branca, o que indica maior ou menor grau de luz refletida.

Com relação aos índices de saturação, valores positivos de a^* representam a cor vermelha e os valores negativos, a cor verde. Para b^* , valores positivos representam a cor amarela e negativos a cor azul (TASCA, 2007). O valor de *hue*, varia de 0° (cor vermelha), 90° (cor amarela), 180° (cor verde) e 270° (cor azul). *Croma* indica a intensidade da cor ou saturação, sendo que correlaciona os valores de a^* e b^* (KHA; NGUYEN; ROACH, 2010).

A Tabela 30 apresenta os resultados da análise colorimétrica para os extratos secos (*spray dryer*) selecionados e o extrato liofilizado (PG LIO) no tempo inicial (T0) do estudo de estabilidade acelerado.

Tabela 30 – Parâmetros de cor para os extratos secos em *spray dryer*, extrato liofilizado e extrato glicólico a 10%.

Amostras - T0	L*	a*	b*
MA 80	86,62 (0,03)	-1,58 (0,01)	30,97 (0,04)
MDEA 80	87,11 (0,00)	-1,32 (0,01)	29,43 (0,01)
β CD 80	88,40 (0,00)	-0,92 (0,01)	28,02 (0,00)
PG LIO	84,60 (0,01)	1,60 (0,00)	36,13 (0,00)
EG	93,74 (0,01)	-1,36 (0,01)	10,11 (0,01)

T0: tempo zero, amostra referência analisada após a secagem. EG: medida logo após a preparação do extrato.

Os resultados apresentados na Tabela 30 mostram valores de a^* negativos e b^* positivos confirmam que a cor dos extratos encontra-se na região demarcada pelo verde e amarelo segundo a escala de cor definida pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE). Para o extrato liofilizado, valores de a^* e b^* positivos indicam que o extrato encontra-se na região demarcada pelo vermelho e amarelo. Além disso, pode ser observado que não existem grandes diferenças quanto ao *Croma* e o ângulo de *Hue* com relação às composições de secagem. Entretanto, com relação ao extrato liofilizado (PG LIO), estes valores apresentaram variação significativa. Este resultado pode ser atribuído ao efeito da cor dos adjuvantes. Conforme a Figura 39 pode ser observado a diferença de cor entre os extratos secos em *spray dryer* e no *freeze dryer*.

Figura 39 – Fotografia dos extratos secos obtidos pelos processos *spray drying* e *freeze drying* em função das composições de secagem. Composição M A 80 - *spray drying* (a); Composição MDE A 80 - *spray drying* (b); Composição β CD 80 - *spray drying* (c); Extrato liofilizado PG LIO - *freeze drying* (d).

Os parâmetros L^* , a^* e b^* dos extratos secos (*spray dryer*), do extrato PG LIO e do extrato glicólico avaliados no estudo de estabilidade acelerado estão apresentados na Tabela 31.

Comparando os valores de L^* nos tempos T30, T60, T90 e T180 dias, pode ser observado que não houve variação, o que indica que não houve escurecimento dos extratos secos durante o período de avaliação. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de estabilidade de Zampiér (2012) onde não houve variação nos valores de L^* comparando os valores de T0 e T 90 dias. Por outro lado, os valores de a^* aumentaram no tempo de 180 dias de permanência na câmara climática, o que explica a intensificação da cor verde neste período de avaliação. Os valores de b^* não sofreram variação no decorrer da avaliação da estabilidade.

Os resultados para os valores de *Croma* e Ângulo de *Hue* estão apresentados nas Figuras 40 e 41, respectivamente.

Os extratos secos, o extrato liofilizado (PG LIO) e o extrato glicólico apresentaram valores de *Hue* sem variação durante todo o período do estudo. Isto pode significar que não houve degradação dos compostos dos extratos durante o período da análise colorimétrica.

Tabela 31 – Parâmetros de cor para os extratos secos em *spray dryer*, extrato liofilizado e extrato glicólico a 10% em estudo de estabilidade acelerada.

Amostras	L*				a*				b*			
	T30	T60	T90	T180	T30	T60	T90	T180	T30	T60	T90	T180
MA 80	85,01 (0,01)	85,99 (0,63)	84,60 (0,05)	83,75 (0,01)	-1,16 (0,01)	-1,36 (0,13)	-1,17 (0,02)	-0,17 (0,00)	32,38 (0,00)	31,66 (0,29)	30,60 (0,01)	30,81 (0,00)
MDEA 80	85,40 (0,06)	87,54 (0,01)	88,08 (0,06)	88,03 (0,00)	-1,00 (0,01)	-1,13 (0,01)	-1,43 (0,03)	-0,54 (0,01)	29,9 (0,00)	28,67 (0,00)	28,35 (0,36)	27,97 (0,01)
βCD 80	88,24 (0,00)	87,85 (0,56)	88,09 (0,01)	87,20 (0,00)	-0,92 (0,00)	-0,77 (0,04)	-0,74 (0,00)	-0,39 (0,01)	28,31 (0,01)	28,03 (0,01)	27,91 (0,01)	28,58 (0,00)
PG LIO	81,42 (0,04)	84,55 (0,01)	81,72 (0,57)	81,32 (0,01)	2,11 (0,01)	1,50 (0,01)	2,38 (0,16)	2,66 (0,00)	38,98 (0,01)	37,76 (0,01)	38,22 (0,27)	38,16 (0,01)
EG	92,80 (0,01)	90,76 (0,01)	92,03 (0,01)	91,56 (0,00)	-1,18 (0,00)	-0,48 (0,01)	-0,76 (0,01)	-0,54 (0,00)	11,94 (0,00)	13,53 (0,01)	12,93 (0,01)	15,97 (0,00)

T30: tempo 30 dias; T60: tempo 60 dias; T90: tempo 90 dias; T180: tempo 180 dias.

Figura 40 - Croma para os extratos secos em *spray dryer*, extrato liofilizado (PG LIO) e extrato glicólico em estudo de estabilidade acelerada (40 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR).

Figura 41 - Ângulo de *Hue* para os extratos secos em *spray dryer*, extrato liofilizado (PG LIO) e extrato glicólico em estudo de estabilidade acelerada (40 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR).

5.6.4 Análise do teor de flavonoides totais

A quantificação do teor de flavonoides totais nos extratos secos (*spray dryer* e liofilizador) e no extrato glicólico a 10% foi obtida por espectrofotometria UV/vis de acordo com a seção 4.3.3.5. Para o estudo de estabilidade acelerada, as análises foram realizadas nos tempos: T30, T60, T90 e T180 dias, sendo as amostras armazenadas em câmara climática a 40 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR. Para o estudo de estabilidade de longa duração, as análises foram realizadas nos tempos: zero (T0) e T1 A (1 ano a temperatura ambiente armazenadas em dessecador).

A Figura 42 mostra a concentração de flavonoides totais nos extratos secos selecionados (*spray dryer* e liofilizador) e do extrato glicólico a 10% comparada a amostras do tempo zero (amostras referências para as análises) e quantificada ao longo do estudo de estabilidade acelerada.

Figura 42 – Monitoramento do teor de flavonoides totais dos extratos secos (*spray dryer* e liofilizador) e do extrato glicólico a 10% durante o estudo de estabilidade acelerada (40 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR).

Considerando que a proporção dos adjuvantes utilizados foi a mesma, os valores obtidos para os flavonoides totais variaram de acordo com a composição dos adjuvantes propriamente dita. A composição contendo maltodextrina:Aerosil® (M A 80) foi a que se mostrou mais estável ao longo do estudo. Este resultado está de acordo com os resultados reportados por Zampiér (2012), que utilizou maltodextrina:Aerosil® na secagem por *spray drying* do extrato de *Dalbergia ecastaphyllum*, onde o extrato não apresentou variação no teor de flavonoides durante o estudo de estabilidade acelerado. Além disso, a composição com β CD também foi avaliada no estudo citado e apresentou uma queda do teor de flavonoides totais inferior a 5%, valor aceitável para fitoterápicos segundo a RE 01/05. No presente estudo, não houve queda dos teores de flavonoides na composição β CD 80.

Com relação ao extrato PG LIO, pode ser observado que o teor de flavonoides não sofreu variação significativa no decorrer do estudo o que demonstra a estabilidade dos compostos avaliados mediante os dois processos de secagem distintos. A ausência dos adjuvantes de secagem no extrato liofilizado quando comparado aos extratos secos em *spray dryer* confirma a estabilidade dos flavonoides no extrato de *Psidium guajava*.

O extrato glicólico também não apresentou queda nos teores de flavonoides, mas sim um aumento dos mesmos ao longo do estudo comparando com o teor destes compostos do tempo zero da análise. Este fato pode caracterizar uma melhor solubilidade dos compostos no veículo utilizado (propilenoglicol). Resultado oposto foi verificado por Zampiér (2012), que submeteu o extrato glicólico de *D. ecastaphyllum* ao estudo de estabilidade acelerada e prolongada. O extrato glicólico apresentou uma queda de 40,32% no estudo de estabilidade acelerada evidenciando a instabilidade dos flavonoides no extrato glicólico daquela planta.

No geral, não foi observada degradação dos flavonoides totais presentes nos extratos secos nas condições forçadas de armazenamento (40 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ UR) por 180 dias. Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho de Bott (2008) no qual foi avaliada a influência das condições de armazenamento sobre a estabilidade do extrato atomizado de *Passiflora alata*. A degradação ocorreu apenas durante o processo de secagem.

Comparando as amostras no tempo 0 (T0) em relação aos outros tempos de armazenamento na estufa (40 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ UR) foi observado que a amostra β CD 80 não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) no decorrer do estudo, se manteve estável.

A amostra M A 80 apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) comparando o T0 com os demais tempos, porém se manteve estável no restante do tempo de estudo.

A amostra MDE A 80 também apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tempos T0 e T30, T60, T180. No entanto, entre o T0 e T90 não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Quanto ao extrato glicólico houve evidência de diferença estatística ($p < 0,05$) comparando o T0 e os outros tempos do estudo de estabilidade acelerada.

A amostra PG LIO apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) somente no T0 e T30, mas em relação aos outros tempos (T60, T90 e T180) não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

No estudo de estabilidade acelerada conduzido nos tempos 0, 30, 60, 90 e 180 dias pode-se verificar que o adjuvante β -ciclodextrina foi o que mais protegeu o extrato de *P. guajava* da umidade e condições extremas de temperatura. Quando se utilizou a composição maltodextrina:Aerosil[®] pode ser observado que, apesar da diferença estatística ($p < 0,05$) apresentada entre o tempo zero e os outros tempos de análise, esta composição não apresentou variações do teor de flavonoides no decorrer do estudo de estabilidade acelerada.

5.6.5 Análise do teor de polifenóis totais

A quantificação do teor de polifenóis totais nos extratos secos (*spray dryer* e liofilizador) foi obtida por espectrofotometria UV/vis de acordo com a seção 4.3.3.6. Para o estudo de estabilidade acelerado, as análises foram realizadas nos tempos: T30, T60, T90 e T180 dias, sendo as amostras armazenadas em câmara climática a 40 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ UR.

A Figura 43 apresenta os resultados de polifenóis totais para as amostras de extratos secos selecionados (*spray dryer* e liofilizador) e do extrato glicólico a 10% comparadas a amostras do tempo zero (amostras referências para as análises) e quantificados ao longo do estudo de estabilidade acelerado.

Figura 43 – Monitoramento do teor de polifenóis totais dos extratos secos (*spray dryer* e liofilizador) e do extrato glicólico a 10% durante o estudo de estabilidade acelerada (40 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ UR).

Com relação aos extratos secos em *spray dryer* (M A 80, MDE A 80 e β CD 80) pode-se observar que a composição M A 80 apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) entre o tempo zero e os demais tempos. Para esta composição foi observada uma queda de 5,4% de polifenóis ao final do estudo (T180 dias). Os resultados aqui encontrados estão próximos aos de Zampiér (2012) que obteve uma queda de 6,25% de polifenóis para as partículas produzidas com maltodextrina: Aerosil[®] do extrato de *D. ecastaphyllum*.

A composição MDE A 80 apresentou variações do teor de polifenóis no decorrer do estudo. Comparando-se o T0 com T30 e T90, houve diferença estatística ($p < 0,05$), T0 com T60 e T180, não houve evidência de diferença estatística ($p > 0,05$).

A composição β CD 80 apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) entre T0 e os demais tempos do estudo. O extrato seco contendo β -ciclodextrina apresentou a maior porcentagem de queda de polifenóis durante o estudo de estabilidade acelerado, a qual variou de 24,6 a 30%. Zampiér (2012) demonstrou que não houve diminuição do teor de polifenóis no estudo de estabilidade acelerado quando utilizou o adjuvante β CD. Assim, pode-se sugerir que para os polifenóis, no presente estudo, a eficiência de encapsulação da β CD não foi satisfatória, ou

seja, a inclusão de moléculas do extrato na β -ciclodextrina pode ter sido parcial. As ciclodextrinas são úteis farmacologicamente porque podem interagir com outras moléculas e formar complexos de inclusão. Estes complexos interagem geralmente na proporção de 1:1, embora complexos de ordem maior também foram postulados (STELLA; HE, 2008). O processo de inclusão é condicionado por fatores importantes como a forma e tamanho das moléculas hóspedes, sua compatibilidade geométrica com a cavidade da ciclodextrina hospedeira, como também sua polaridade (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

A amostra PG LIO apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) entre o tempo zero e os demais tempos avaliados no estudo de estabilidade acelerada. Com respeito ao processo de secagem, pode ser observado que o extrato seco no liofilizador (PG LIO) apresentou maiores teores de polifenóis totais apresentando uma queda do teor (8,15%) apenas no tempo de 30 dias de armazenamento na câmara climática. Nos outros tempos de avaliação não houve variação significativa dos teores de polifenóis. Desta forma, pode-se sugerir que os polifenóis apresentaram maior estabilidade após o processo de secagem por liofilização visto que a secagem ocorre a temperaturas mais baixas.

Finalmente, com relação ao extrato glicólico, pode-se observar que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) apenas entre o T0 e T90; entre o T0 e os demais tempos houve diferença estatística ($p < 0,05$). Apesar destas diferenças pode-se sugerir que os polifenóis possuem estabilidade frente às condições de temperatura, umidade e do solvente propilenoglicol utilizados no presente estudo. Resultados diferentes foram encontrados por Zampiér (2012) que observou uma diminuição do teor de polifenóis de 27% de queda no estudo de estabilidade do extrato glicólico da planta *Dalbergia ecastaphyllum*.

O presente estudo se limitou aos polifenóis totais, pois, como os taninos possuem uma significativa heterogeneidade (taninos condensados e hidrolizáveis) além do grau de interação com a caseína, tais fatores levaram às interferências na detecção destes compostos. Portanto, esta análise não foi realizada para o monitoramento do estudo de estabilidade.

5.6.6 Avaliação do potencial antioxidante dos extratos secos e glicólico no estudo de estabilidade acelerada

Foi realizado o monitoramento da atividade antioxidante dos extratos secos selecionados e do extrato glicólico a 10% através do método do radical DPPH (seção 4.3.3.7) durante o estudo de estabilidade a fim de avaliar a variação da atividade antioxidante mediante a variação da concentração dos compostos ativos. Para o estudo de estabilidade acelerado dos extratos secos, as análises foram realizadas nos tempos: zero (T0), T90 e T180 dias, sendo as amostras armazenadas em câmara climática a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR.

A Figura 44 apresenta os resultados obtidos dos extratos secos (*spray dryer*) selecionados e PG LIO (extrato seco no liofilizador).

Figura 44 - Monitoramento da atividade antioxidante dos extratos secos (*spray dryer* e liofilizador) através do método do radical DPPH expressa em % de Inibição durante o estudo de estabilidade acelerada ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR).

Na análise dos resultados obtidos pode-se observar que não houve grande variação da atividade antioxidante representada pela porcentagem de inibição dos extratos secos em *spray dryer*. Comparando a amostra M A 80 no tempo zero (T0) com T90 houve diferença

estatística ($p < 0,05$). Para os tempos zero e T180 não houve evidência de diferença estatística ($p > 0,05$).

As amostras MDE A 80 e β CD 80 não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) nos tempos zero e T90, mas entre o T0 e T180 houve diferença estatística ($p < 0,05$). Isto sugere que a estabilidade do extrato utilizando estes adjuvantes sob o ponto de vista da atividade antioxidante pode ser de até 90 dias.

Com a amostra PG LIO, comparando o T0 com T90 houve diferença estatística ($p < 0,05$). Em relação ao T0 e T180 não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

No geral, pode-se sugerir que os extratos secos apresentam estabilidade quanto à atividade antioxidante avaliada pelo método do radical DPPH.

Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de estabilidade dos extratos secos em *spray dryer* de *Dalbergia ecastaphyllum* (ZAMPIÉR, 2012) utilizando maltodextrina, Aerosil® e β -ciclodextrina como adjuvantes de secagem. A autora constatou um aumento da atividade antioxidante dos extratos secos tanto no estudo acelerado ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR) quanto no de longa duração (3 meses, $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR).

Importante ressaltar que os diferentes processos de secagem não afetaram a atividade antioxidante avaliada pelo método do radical DPPH quando se compara os valores da porcentagem de inibição dos extratos secos em *spray dryer* e do extrato seco em liofilizador (PG LIO).

Para o estudo de estabilidade acelerado do extrato glicólico a 10%, as análises foram realizadas nos tempos: zero (T0), T30, T60, T90 e T180 dias, sendo as amostras armazenadas em câmara climática a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR. A Figura 45 apresenta os resultados obtidos deste estudo.

Figura 45 - Monitoramento da atividade antioxidante do extrato glicólico a 10% através do método do radical DPPH expressa em % de inibição durante o estudo de estabilidade acelerada ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR).

Pode ser observado que a atividade antioxidante apresentou uma ligeira queda no período final do estudo (T180 dias). A queda da porcentagem de inibição mostrada nos tempos de 90 e 180 dias (T90 e T180) pode ser devido à formação de produtos de degradação, indicando que o extrato glicólico a 10% seja estável até 60 dias. Comparando o T0 com T30 e T60 não houve diferença estatística ($p > 0,05$). No entanto, T0 com T90 e T180 apresentaram evidência de diferença estatística ($p < 0,05$).

O extrato glicólico de *Psidium guajava* apresentou maior estabilidade quando comparado com o extrato glicólico da planta *Dalbergia ecastaphyllum* (ZAMPIÉR, 2012) o qual apresentou uma perda significativa da atividade antioxidante após 3 meses de armazenagem em câmara climática a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR.

5.6.7 Estudo de estabilidade prolongada dos extratos secos em *spray dryer* e liofilizador armazenados em dessecador a temperatura ambiente

Nessa seção são apresentados os resultados do estudo de estabilidade dos extratos secos em *spray dryer* e no liofilizador armazenados durante o período de 1 ano em dessecador a temperatura de 25 °C. Foi realizado o monitoramento da degradação dos compostos ativos, flavonoides totais (seção 4.3.3.5), polifenóis e taninos totais (seção 4.3.3.6) e da umidade residual (umidade de equilíbrio) incorporada pelos extratos secos em *spray dryer* e *freeze dryer*.

Para a determinação de flavonoides totais foi utilizado para a análise uma massa de 500 mg de sólidos do extrato (descontando o adjuvante de secagem), sendo que as análises foram realizadas no tempo zero (T0), logo após a obtenção dos extratos secos e após o período de 1 ano (T 1A) de armazenamento, como mostra a Figura 46.

Figura 46 – Monitoramento do teor de flavonoides totais dos extratos secos (*spray dryer* e liofilizador) durante o estudo de estabilidade prolongado.

Pode-se verificar que no geral não houve alteração do conteúdo de flavonoides dos extratos secos após 1 ano de armazenamento. Todos os extratos secos mostraram-se estáveis (perda <10%) nas mesmas condições de armazenamento. Dentre as composições, a que apresentou uma perda maior de flavonoides (6,7%) foi a que contém celulose microcristalina (na proporção de 40%). Cortés-Rojas e Oliveira (2012) relataram uma maior porcentagem de degradação de flavonoides (11,4%) quando secaram o extrato de *Bidens pilosa* no *spray dryer* utilizando como adjuvantes de secagem celulose microcristalina e Aerosil®. Em contrapartida, quando utilizaram o adjuvante β -ciclodextrina, obtiveram a mais baixa degradação do produto após a secagem, resultado este semelhante ao presente trabalho.

A formulação contendo maltodextrina:Aerosil® (M A 80) apresentou uma perda de flavonoides de 2,9% ao final do período de 1 ano de armazenamento. Com relação aos mecanismos de secagem, *spray dryer* e liofilizador, pode-se observar que os perfis de degradação foram semelhantes, visto que o extrato PG LIO apresentou uma porcentagem de queda de flavonoides de 3%.

Com base nos resultados experimentais da análise dos flavonoides totais não houve evidência de diferença estatística ($p>0,05$) no tempo 0 (tempo inicial) para T1 ano nas amostras A 40, A 80, MA 40, Dry Flo A 40, Dry Flo A 80 e β CD 80. Nas demais comparações houve diferença estatística ($p<0,05$).

Além dos flavonoides totais, a determinação de polifenóis e taninos totais foi realizada no estudo de estabilidade prolongado para os extratos secos em *spray dryer*. Foi utilizando para a análise a massa de 100 mg de sólidos do extrato (descontando o adjuvante de secagem) de acordo com a metodologia descrita em 4.3.3.6. As Figuras 47 e 48 apresentam os resultados obtidos destas análises.

Figura 47 – Monitoramento do teor de polifenóis totais dos extratos secos (*spray dryer* e liofilizador) durante o estudo de estabilidade prolongado.

Dentre todos os extratos secos avaliados, a formulação contendo β -ciclodextrina foi a que apresentou a menor taxa de queda (0,5%) de teor de polifenóis no estudo de estabilidade prolongado. As demais formulações apresentaram queda entre 8,9% (Cmic A 40) até 27,5% (Cmic A 80). A formulação contendo maltodextrina:goma arábica (Encapsia®):Aerosil® (MDE A 80) apresentou uma moderada queda de teor (9,2%). Assim, os resultados encontrados indicam que os polifenóis presentes no extrato de *Psidium guajava* não se mantiveram plenamente estáveis durante o período de 1 ano, sendo que a queda nos teores foi dependente dos adjuvantes utilizados.

Mediante a comparação das amostras de extratos secos no tempo 0 e 1 ano, a amostra que não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) foi o extrato seco β CD 80. Quanto às demais amostras, todas apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) comparando os tempos 0 e 1 ano.

Comparando o extrato seco no liofilizador aos extratos secos em *spray dryer*, o perfil de degradação apresentou uma queda de 25,7% do teor de polifenóis evidenciando a instabilidade no período avaliado (T1 ano) dos polifenóis presentes independentemente do método de secagem.

Figura 48 – Monitoramento do teor de taninos totais dos extratos secos (*spray dryer* e liofilizador) durante o estudo de estabilidade prolongado.

Os taninos apresentam uma grande heterogeneidade (taninos condensados e hidrolizáveis), como também podem ter diferentes graus de interação com a caseína, portanto tais fatores levam às interferências na detecção destes compostos. No estudo de estabilidade prolongado, pode-se verificar que para alguns extratos secos houve uma queda no teor de taninos, mas para outros foi verificado um aumento deste teor. Este fato pode ter ocorrido devido à formação de produtos de degradação destes compostos.

Entre as amostras de extratos secos comparadas no tempo 0 e 1 ano, a amostra que não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) foi o extrato seco Cmic A 40. As demais amostras de extratos secos apresentaram evidência de diferença estatística ($p < 0,05$).

Comparando o extrato liofilizado (PG LIO) com os demais extratos secos em *spray dryer*, a porcentagem de queda do teor de taninos totais foi de 4%, bem abaixo dos demais que apresentaram uma queda variando de 8,4 (MDE A 80) a 15% (M A 80).

O monitoramento da umidade incorporada pelos extratos secos em *spray dryer* foi realizado além do acompanhamento da degradação dos compostos ativos. Amostras originais dos extratos secos foram avaliadas quanto à umidade residual no início do estudo (tempo 0), sendo utilizadas como controle para comparação da absorção da umidade. Os resultados

obtidos relativos às umidades dos extratos secos no tempo inicial e no final do estudo (T1 ano) podem ser visualizados na Figura 49.

Figura 49 – Influência do tempo de armazenamento (1 ano) na umidade residual dos extratos secos em *spray dryer*.

Como pode ser visto, os adjuvantes Aerosil® (utilizado isoladamente), a mistura celulose microcristalina:Aerosil® e a mistura maltodextrina:Aerosil® (M A 40) mostraram uma maior tendência de absorver umidade. Em contrapartida, a formulação M A 80 não reteve a umidade após o período de 1 ano armazenada no dessecador a temperatura ambiente. Comportamento semelhante foi apresentado pelas outras formulações, sendo que a formulação contendo maltodextrina:goma arábica (Encapsia):Aerosil® (MDE A 80) apresentou a maior taxa de queda de umidade após o período de 1 ano (8% de queda de umidade) em relação ao teor de umidade no tempo inicial (T0).

Com os resultados obtidos da umidade residual dos extratos secos em *spray dryer* após 1 ano de armazenamento a temperatura de 25 °C, pode-se relacionar a incorporação de umidade à degradação dos compostos analisados. Os flavonoides foram os compostos considerados mais estáveis ao longo do estudo de estabilidade prolongado. Por outro lado, os polifenóis e taninos totais apresentaram grande variação nos teores no decorrer do estudo,

visto que, quando se utilizou a mistura maltodextrina:goma arábica (Encapsia):Aerosil® (MDE A 80), não houve retenção de umidade como também foram observadas as menores taxas de queda de teores daqueles compostos.

Para as amostras de extratos secos A 80, Dry Flo A 40, Dry Flo A 80, M A 80 e MDE A 80, não houve evidência de diferença estatística ($p>0,05$). As demais amostras apresentaram diferença estatística ($p<0,05$).

Bott, Labuza e Oliveira (2010) relataram que o mecanismo de degradação do flavonoide vitexina (composto marcador do extrato de *Passiflora alata*) no extrato seco em *spray dryer* foi também dependente da umidade residual (ou % UR de armazenamento). Em outro estudo, Sha et al. (2005) estudaram preparações sólidas comerciais de erva de São João. As amostras foram avaliadas quanto ao conteúdo de hipericina e pseudohipericina (estas amostras foram padronizadas para conter 0,3% de hipericina). Estudos de estabilidade foram conduzidos sob três diferentes condições de estocagem: 1) 25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR por seis meses; 2) 40 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR por seis meses e 3) 50 °C por um mês. Os autores constataram que houve significativa diminuição do conteúdo dos compostos marcadores com o tempo e ainda, a degradação foi menor quando as preparações sólidas foram estocadas a temperatura ambiente (25 °C e 60% UR).

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH foi realizada nos tempos 0 e 1 ano no estudo de estabilidade prolongada com o objetivo de investigar a influência do tempo de armazenamento em condições de temperatura e umidade ambiente naquela atividade biológica dos extratos secos analisados. A Figura 50 apresenta os resultados obtidos.

Figura 50 – Monitoramento da % Inibição medida pelo método do radical DPPH dos extratos secos (*spray dryer* e *freeze dryer*) durante o estudo de estabilidade prolongado.

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH mostram que a maioria dos extratos secos avaliados não apresentou variação na atividade antioxidante estimada por este método no decorrer do estudo. As amostras de extratos secos, A 80, Cmic A 80, Dry Flo A 40, MDE A 40 e PG LIO apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$). As demais amostras não apresentaram evidência de diferença estatística ($p > 0,05$).

Através dos dados apresentados pode-se sugerir que os extratos de *P. guajava* secos em *spray dryer* apresentaram estabilidade frente ao tempo de armazenamento, principalmente relacionada aos flavonoides totais presentes no extrato, os quais também se mantiveram estáveis durante o estudo de estabilidade prolongada.

Extratos secos de plantas medicinais são uma mistura complexa de compostos, sendo que cada um pode degradar de diferentes maneiras. O completo conhecimento da composição do produto durante o tempo de armazenamento e sua influência na atividade farmacológica daqueles extratos é um trabalho árduo. Assim, vários testes de estabilidade devem ser conduzidos para garantir que a estabilidade de um produto seja assegurada (BOTT; LABUZA; OLIVEIRA, 2010).

6. Conclusões

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento deste trabalho levou à obtenção de informações relevantes sobre as diversas etapas envolvidas na padronização de extratos secos de *Psidium guajava*. A seguir apresentam-se as principais conclusões obtidas dentro das condições experimentais analisadas.

6.1 Caracterização das matérias-primas vegetais e seleção da cultivar para o estudo

Foi realizado um estudo comparativo entre várias espécies de *Psidium guajava* obtidas de diferentes locais de coleta com o objetivo de investigar suas características físico-químicas e selecionar o material vegetal com os maiores teores dos compostos de interesse, compostos fenólicos, para o prosseguimento do projeto.

Devido ao fato de que o uso popular do chá das folhas de goiaba ser amplamente difundido, foram realizadas operações de extração utilizando como solvente água e mistura hidroalcoólica (etanol 70% v/v). A solução hidroalcoólica foi mais eficiente no processo extrativo apresentado valores de sólidos solúveis superiores aos obtidos com o extrato aquoso. O conteúdo de polifenóis também foi analisado nos dois sistemas solvente e os resultados obtidos foram maiores para a o extrato etanólico de todas as mostras avaliadas. Portanto, etanol e água (70:30 v/v) foi usado como solvente nos processos posteriores de extração.

Posteriormente, novas soluções extrativas foram obtidas com o solvente selecionado (etanol:água 70% v/v) e após sua caracterização físico-química verificou-se que o perfil dos compostos fenólicos obtido das cultivares foi semelhante. No entanto, analisando os resultados da avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH, pode ser verificado que a cultivar P. Sato apresentou resultados promissores com relação à atividade sequestrante de radicais DPPH sendo, portanto selecionada para a continuação do estudo.

6.2 Estudo comparativo dos métodos de secagem mediante avaliação físico-química dos extratos secos

Após a obtenção da solução extrativa da cultivar P. Sato e caracterização físico-química, pode-se verificar a manutenção das propriedades avaliadas, como a concentração de sólidos, densidade, pH, teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante avaliada pelo

método do DPPH. Assim, foram preparadas as composições de secagem visando à produção dos extratos secos padronizados de *P. guajava*. Vários adjuvantes de secagem foram utilizados em proporções diferentes com o intuito de realizar um estudo exploratório sobre o comportamento dos adjuvantes frente aos processos de secagem utilizados, além de estabelecer o adjuvante com o melhor desempenho na função de proteger os princípios ativos da degradação, melhorar sua estabilidade e ainda melhorar o rendimento do produto.

Foram utilizados dois tipos de secadores para a obtenção dos produtos secos: *spray dryer* e *freeze dryer* e os produtos obtidos foram analisados quanto as suas propriedades físico-químicas e atividade biológica.

Para o *spray dryer*, com relação à recuperação dos produtos, pode-se observar que os valores ficaram entre 51% para a composição maltodextrina:Aerosil® e 64% para a composição contendo celulose microcristalina:Aerosil®. A eficiência energética deste secador não sofreu variação, tendo em vista que as condições de secagem foram mantidas constantes para todos os experimentos de secagem.

Foi realizada uma exploração preliminar dos métodos de secagem e dos diferentes adjuvantes visando selecionar os extratos secos com melhores características físico-químicas, os quais foram avaliados posteriormente em maior profundidade.

No geral, os extratos secos em *spray dryer* apresentaram valores baixos de umidade, sendo que, para a atividade de água que representa a água disponível para reações bioquímicas em um sistema, os valores variaram de 0,09 (composição contendo somente Aerosil®) a 0,25 (composição contendo Dry Flo:Aerosil®).

Em relação à solubilidade em água dos extratos secos, as formulações contendo Maltodextrina:Aerosil®, Maltodextrina:Encapsia:Aerosil® e β -ciclodextrina, nas concentrações de 80% apresentaram uma maior solubilidade. A solubilidade em água também foi avaliada para o extrato seco no liofilizador (PG LIO), obtendo-se um valor de 73,54 (4,12) %. Este resultado mostra que a solubilidade do extrato foi melhorada com a adição dos adjuvantes como maltodextrina, goma arábica (Encapsia) e β -ciclodextrina.

As partículas produzidas em *spray dryer* apresentaram diâmetros médios que variaram de 8 a 37 μm o que está dentro da faixa esperada para produtos atomizados, que é de 5 a 150 μm .

Quanto às características farmacotécnicas dos produtos obtidos em *spray dryer*, todos os extratos secos obtidos não foram considerados coesivos ou de fluxo restrito, porém suas características de fluidez foram consideradas medianas.

Através da quantificação dos compostos fenólicos dos extratos secos, pode-se comparar o desempenho de ambos os secadores (*spray dryer* e *freeze dryer*). Para a secagem no *spray dryer* não houve degradação dos mesmos principalmente em relação às formulações M A 40 e MA 80, MDE A 40 e MDE A 80. A formulação β CD 80 apresentou uma pequena taxa de degradação em relação ao conteúdo de flavonoides totais (3%).

Com relação à secagem por liofilização, os resultados dos teores de compostos fenólicos foram semelhantes como, por exemplo, comparando-se os valores do teor de flavonoides totais dos extratos obtidos por liofilização aos obtidos por *spray drying*, os extratos secos mostraram comportamentos semelhantes. Mediante os resultados apresentados dos teores de fenólicos pode-se concluir que os métodos de secagem utilizados não influenciaram nas propriedades químicas dos extratos secos obtidos apesar dos processos distintos de secagem.

Os resultados obtidos da avaliação preliminar de todos os extratos secos obtidos em *spray dryer* e no *freeze dryer* permitiram selecionar alguns extratos secos baseado nos teores de compostos de interesse para o estudo mais aprofundado. Estes extratos selecionados foram as composições M A 80, MDE A 80, β CD 80 (*spray drying*) e o extrato liofilizado (PG LIO) para efeito de comparação quanto ao processo de secagem. As três formulações secas no *spray dryer* apresentaram valores de solubilidade em água superiores as demais formulações, além dos teores de compostos fenólicos serem um pouco maiores do que os das demais formulações nas mesmas proporções. Isto sugere que estes adjuvantes forneceram maior proteção aos compostos avaliados do extrato de *Psidium guajava*.

6.3 Estabilidade dos extratos secos e do extrato glicólico

As amostras dos extratos secos selecionados (*spray dryer* e *freeze dryer*) e do extrato glicólico de *Psidium guajava* submetidas a testes de estabilidade acelerada (câmara climática a temperatura de 40 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ UR) por 180 dias não apresentaram variação de umidade em função do período de armazenamento. A composição contendo

maltodextrina:Aerosil® foi a que apresentou o menor teor de umidade no tempo zero (após sua produção).

Nas análises de difração de raios-X, os perfis observados do tempo zero das composições contendo maltodextrina:Aerosil® e maltodextrina:Encapsia:Aerosil® foram característicos de substâncias amorfas. A composição contendo β -ciclodextrina apresentou perfil de substância semi-cristalina, porém este perfil é compatível com o perfil do adjuvante seco no *spray dryer* isoladamente, sem o extrato, como também do adjuvante *in natura*. Comparando os difratogramas do tempo zero e tempo de 180 dias na câmara climática, não houve alterações significativas dos perfis das composições analisadas, o que indica a estabilidade dos extratos secos frente às condições forçadas de armazenamento estudadas.

A análise colorimétrica é uma importante ferramenta para a avaliação da estabilidade de extratos, visto que a decomposição de um composto sensível à umidade, luz ou oxigênio pode ser manifestada por uma mudança de cor. Os resultados da análise colorimétrica dos extratos secos, do extrato liofilizado (PG LIO) e do extrato glicólico de *P. guajava* mostraram que não houve degradação dos compostos dos extratos ao longo do estudo de estabilidade acelerada.

Com relação aos metabólitos secundários flavonoides totais, os extratos secos, o extrato liofilizado PG LIO e o extrato glicólico não apresentaram queda nos teores destes compostos no decorrer do estudo o que demonstra a estabilidade dos compostos avaliados mediante os dois processos de secagem distintos. A composição contendo maltodextrina:Aerosil® (M A 80) foi a que se mostrou mais estável ao longo do estudo. Em contrapartida, os polifenóis totais apresentaram variações nos teores destes compostos, mas não foram significativas, portanto considera-se que os polifenóis possuem estabilidade frente às condições de temperatura, umidade e do solvente propilenoglicol (extrato glicólico) utilizados no presente estudo. O extrato seco contendo β -ciclodextrina apresentou a maior porcentagem de queda de polifenóis durante o estudo de estabilidade acelerado, a qual variou de 24,6 a 30%. Além disso, os polifenóis apresentaram maior estabilidade após o processo de secagem por liofilização.

No monitoramento da atividade antioxidante dos extratos secos selecionados e do extrato glicólico através do método do radical DPPH durante o estudo de estabilidade pode-se observar que não houve diminuição da atividade antioxidante representada pela porcentagem de inibição dos extratos secos em *spray dryer*, portanto, os extratos secos apresentam estabilidade quanto à atividade antioxidante avaliada por este método. Os diferentes processos

de secagem não afetaram a atividade antioxidante avaliada pelo método do radical DPPH quando se compara os valores da porcentagem de inibição dos extratos secos em *spray dryer* e do extrato seco em liofilizador (PG LIO). Para o extrato glicólico, a queda da porcentagem de inibição mostrada nos tempos de 90 e 180 dias (T90 e T180) pode ser devido à formação de produtos de degradação, indicando que o extrato glicólico a 10% seja estável até 60 dias.

No estudo de estabilidade prolongada dos extratos secos em *spray dryer* e *freeze dryer*, armazenados em dessecador por 1 ano a temperatura ambiente, não houve perda do conteúdo de flavonoides dos extratos secos após 1 ano de armazenamento. Todos os extratos secos mostraram-se estáveis (perda <10%) nas mesmas condições de armazenamento. A composição que apresentou maior perda (6,7%) de flavonoides foi a que contém celulose microcristalina (na proporção de 40%). Para os polifenóis, os resultados mostraram que estes compostos não se mantiveram estáveis durante o período de 1 ano, sendo que a queda nos teores foi dependente dos adjuvantes utilizados. A formulação contendo β -ciclodextrina foi a que apresentou a menor taxa de queda (0,5%) de teor de polifenóis. O extrato seco no liofilizador (PG LIO) apresentou um perfil de degradação com queda de 25,7% do teor de polifenóis. Com relação aos taninos totais, para alguns extratos secos houve uma queda no teor destes compostos, mas para outros foi verificado um aumento deste teor, o que pode caracterizar a presença de produtos de degradação destes compostos.

Com relação à umidade, as formulações A 40 e A 80, Cmic A 40 e Cmic A 80, M A 40 e β CD 80 mostraram uma maior tendência de absorver umidade.

Quanto à atividade antioxidante avaliada pelo método do DPPH, a maioria dos extratos secos avaliados não apresentou variação na atividade antioxidante estimada por este método no decorrer do estudo.

6.4 Atividade antioxidante dos extratos secos

Inicialmente foi realizada a avaliação da atividade antioxidante dos extratos secos em *spray dryer* e *freeze dryer* pelo método do DPPH^{*}. A porcentagem de inibição máxima do DPPH^{*} foi de 88 % para os extratos secos e o valor de CI₅₀ ficou entre 6,16 (A 40) a 10,31 μ g/mL (Cmic A 80). O extrato PG LIO apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) comparado ao extrato concentrado. Com relação aos processos de secagem utilizados, o extrato seco no liofilizador (PG LIO) apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) apenas entre A 80, Cmic A 80, Dry Flo A 40, M A 40 e M A 80.

Comparando os dois processos de secagem utilizados para a secagem das formulações contendo os adjuvantes, os resultados sugerem que os processos de secagem (*spray dryer* e *freeze dryer*), para grande parte dos extratos secos, não afetaram significativamente a atividade antioxidante dos mesmos.

Dentre os adjuvantes avaliados, os que se mostraram mais promissores foram a maltodextrina, a goma arábica (Encapsia) e a β -ciclodextrina, portanto, foram selecionados para o prosseguimento do trabalho os extratos secos em *spray dryer*, M A 80, MDE A 80 e β CD 80 e o extrato seco no *freeze dryer* (PG LIO).

Na avaliação da atividade antioxidante dos extratos selecionados foram empregados vários métodos. De acordo com a avaliação pelo método ABTS^{•+}, os extratos secos em *spray dryer* mostraram atividade antioxidante semelhante entre si, quando comparados ao extrato concentrado. A operação de secagem não causou perdas significativas na atividade antioxidante dos extratos analisados. Com relação ao extrato seco no liofilizador (PG LIO), o processo de liofilização não alterou a atividade antioxidante do extrato.

Segundo o método ORAC, não houve diferenças significativas entre as amostras de extratos secos em *spray dryer*. O extrato seco por liofilização (PG LIO) apresentou valores superiores de ORAC, o que sugere a maior atividade sequestrante de radicais peroxil pelo extrato obtido nestas condições de secagem.

Os resultados do método FRAP mostraram que não houve diferenças significativas entre as determinações relacionadas aos extratos secos em *spray dryer*. O extrato liofilizado apresentou um valor superior de FRAP aos dos extratos secos por atomização e ao extrato concentrado, portanto, o método de secagem por liofilização pode ter preservado os compostos antioxidantes do extrato resultando na maior capacidade redutora dos íons férricos.

A avaliação da atividade antioxidante pelo método da quimioluminescência (QL) realizada para estudar a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos humanos ativados mostrou que os extratos secos selecionados (*spray dryer* e *freeze dryer*), nas condições avaliadas, possuem atividade inibitória da QL em PMN estimulados de maneira dependente da concentração.

A capacidade das amostras em inibir a QL produzida por neutrófilos estimulados não está relacionada com a toxicidade direta dos extratos sobre tais células, o que foi comprovado pelos ensaios de citotoxicidade.

6.5 Atividade antimicrobiana dos extratos secos

Os extratos secos (*spray dryer* e *freeze dryer*) apresentaram valores relevantes de CIM contra a bactéria *S. aureus* e não apresentaram atividade contra as bactérias Gram negativas, na avaliação da atividade antibacteriana pelo método de microdiluição.

No ensaio da atividade antimicrobiana contra leveduras, todos os extratos secos avaliados, apresentaram boa atividade antimicrobiana, segundo os critérios adotados por Holetz et al. (2002) contra a levedura *C. glabrata*. Contra as demais leveduras, os extratos secos foram inativos. O extrato concentrado apresentou uma atividade antimicrobiana considerada boa contra *C. glabrata* e *C. krusei* e moderada contra *C. albicans*.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS

- ABDUL-FATTAH, A.; KALONIA, D. S.; PIKAL, M. J. The challenge of drying method selection for protein pharmaceuticals: product quality implications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Hoboken, v. 96, n. 8, p. 1886-1916, 2007.
- ABUSHAMMALA, H.; HASHAIKEH, R.; COONEY, C. Microcrystalline cellulose powder tableting via networked cellulose-based gel material. **Powder Technology**, Lausanne, v. 217, p. 16–20, 2012.
- AK, T.; GÜLÇİN, İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions**, Shannon, v. 174, p. 27–37, 2008.
- ALLAMILLA-BELTRÁN, L.; CHANONA-PÉREZ, J. J.; JIMÉNEZ-APARICIO, A. R.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G.F. Description of morphological changes of particles along spray drying. **Journal of Food Engineering**, London, v. 67, p. 179–184, 2005.
- ALLEN, R. C.; LOOSE, L. D. Phagocytic activation of a luminal-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Maryland Heights, v. 69, n. 1, p. 245-252, 1976.
- ALLEN, R. C.; STJERNHOLM, R. L.; STEELE, R. H. Evidence for the generation of an electronic state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, Maryland Heights, v. 47, n. 4, p. 679-684, 1972.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; GIAMPIERI, F.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M.; DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; MARTINEZ-SANCHEZ, G.; BOMPADRE, S.; QUILES, J. L.; SANTOS-BUELGA, C.; BATTINO, M. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, p. 1508-1516, 2012.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M.; Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro*. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, P. M.; LEITE, P. H. A. S.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, L. F.; PEREIRA, M. S. V.; HIJINO, J. S.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 16, n. 2, p. 192-196, 2006.
- ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; RUFINO, M. S. M.; SAMPAIO, C. G. Antioxidant activity measurement in tropical fruits: a case study with acerola. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 773, p. 299-305, 2008.

AMARAL, S.; MIRA, L.; NOGUEIRA, J. M.; SILVA, A. P.; HELENA FLORENCIO, M. Plant extracts with anti-inflammatory properties – a new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 1876-1883, 2009.

ANAS, K.; JAYASREE, P. R.; VIJAYAKUMAR, T.; MANISH-KUMAR, P. R. In vitro antibacterial activity of *Psidium guajava* L. leaf extract on clinical isolates of multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 1, n. 46, p. 41-46, 2008.

ANWAR, S. H.; KUNZ, B. The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying. **Journal of Food Engineering**, London, v. 105, p. 367–378, 2011.

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**, Philadelphia, v. 28, p. 412–421, 2010.

ARIMA, H.; DANNO, G. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 66, p. 727–1730, 2002.

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

AVALI, S.; CAUSSAT, A. Experimental study on fluidization of micronized powders. **Powder Technology**, Lausanne, v. 157, p. 114–120, 2005.

BAE, K. E.; LEE, S. J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 25, n. 8, p. 549–560, 2008.

BAKOWSKA-BARCZAKA, A. M.; KOŁODZIEJCZYK, P. P. Black currant polyphenols: their storage stability and microencapsulation. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 34, p. 1301–1309, 2011.

BALAYDIN, H. T.; GÜLÇİN, I.; MENZEK, A.; GÖKSU, S.; SAHİN, E. Synthesis and antioxidant properties of diphenylmethane derivative bromophenols including a natural product. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, London, v. 25, p. 685–695, 2010.

BARBALHO, S. M.; FARINAZZI-MACHADO, F. M. V.; GOULART, R. A.; BRUNNATI, A. C. S.; OTTOBONI, A. M. M. B.; NICOLAU, C. C. T. *Psidium Guajava* (Guava): a plant of multipurpose medicinal applications. **Medicinal & Aromatic Plants**, Los Angeles, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2012.

BARBARA J. B. **A beginner's guide to blood cells**. 2 ed. Oxford, Blackwell Publishing, 2004.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.1, p.113-123, jan./fev. 2006.

BAUER, R. Quality criteria and standardization phytopharmaceuticals: can acceptable drug standards be achieved. **Drug Information Journal**, Thousand Oaks, v. 32, p. 101–110, 1998.

BAUGH, S.; IGNELZI, S. Hydrolysis and redox factors affecting analysis of common phenolic marker compounds in botanical extracts and finished products. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 83, n. 5, p. 1135-1140, 2000.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v.219, p. 561-571, 2004.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 239, p. 70-76, 1996.

BERBERICH, J.; DEE, K.-H.; HAYAUCHI, Y.; PORTNER, C. A new method to determine discoloration kinetics of uncoated white tablets occurring during stability testing—an application of instrumental color measurement in the development pharmaceuticals, **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 234, p. 55–66, 2002.

BERTÉ, K. A. S.; BEUX, M. R.; SPADA, P. K. W. D. S.; SALVADOR, M.; HOFFMANN-RIBANI, R. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, p. 5523–5527, 2011.

BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; DI STASI, L. C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 4, p. 387-390, 2006.

BIMAKR, M.; RAHMAN, R. A.; GANJLOO, A.; TAIP, F. S.; SALLEH, L.; SARKER, Z. I. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves by using response surface methodology. **Food Bioprocess Technology**, New York, v. 5, p. 912–920, 2012.

BIRDI, T.; DASWANI, P.; BRIJESH, S.; TETALI, P.; NATU, A.; ANTIA, N. Newer insights into the mechanism of action of *Psidium guajava* L. leaves in infectious diarrhea. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 10, n. 33, p. 1-11, 2010.

BISBY, R. H.; BROOKE, R.; NAVARATNAM, S. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 108, p. 1002–1007, 2008.

BISCAIA, D.; FERREIRA, S. R. S. Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 17-23, 2009.

BLASA, M.; ANGELINO, D.; GENNARI, L.; NINFALI, P. The cellular antioxidant activity in red blood cells (CAA-RBC): a new approach to bioavailability and synergy of phytochemicals and botanical extracts. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 125, p. 685-691, 2011.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v. 26, p. 1199–1200, 1958.

BONE, S. Dielectric studies of water clusters in cyclodextrins: relevance to the transition between slow and fast forms. **The Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 110, p. 20609–20614, 2006.

BOTT, R. F. **Influência do processo de obtenção, das condições de armazenamento e das propriedades físico-químicas sobre a estabilidade de extratos secos padronizados de plantas medicinais**. 2008. 178 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

BOTT, R. F.; LABUZA, T. P.; OLIVEIRA, W. P. Stability testing of spray- and spouted bed-dried extracts of *Passiflora alata*. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 28, p. 1255–1265, 2010.

BOTT, R. F.; OLIVEIRA, W. P. Storage conditions for stability testing of pharmaceuticals in hot and humid regions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 33, n. 4, p. 393-401, 2007.

BRAGA, G. K.; OLIVEIRA, W. P. Manufacturing of drug loaded chitosan microspheres by spray drying: development, characterization, and potential use in dentistry. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 25, p. 303–310, 2007.

BRAGA, P. C.; DAL SASSO, M.; FONTI, E.; CULICI, M. Antioxidant activity of bisabolol: inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil bursts and cell-free systems. **Pharmacology**, Basel, v. 83, p. 110–115, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, Darmstadt, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Autoriza ad referendum, a publicação do Guia para realização de estudos de estabilidade. Brasília, DF, 2005.

_____. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2006. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

_____. Ministério da Saúde. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**. Brasília, DF, 2007.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília, DF, 2010 a.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Brasília, DF, 2010 b.

_____. Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS Espécies vegetais**. 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

BRINGAS-LANTIGUA, M.; EXPÓSITO-MOLINA, I.; REINECCIUS, G. A.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, O.; PINO, J. A. Influence of spray-dryer air temperatures on encapsulated mandarin oil. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 29, n. 5, p. 520–526, 2011.

BRITAIN, H. G.; BOGDANOWICH, S. J.; BUGAY, D. E.; DE VINCENTIS, J.; LEWEN, G.; NEWMAN, A. W. Physical characterization of pharmaceutical solids. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 8, n. 8, p. 963-973, 1991.

BROWN, E. J. Phagocytosis. **Bioassays**, New York, v. 17, p. 109-117, 1995.

BURSAL, E.; GÜLÇİN, I. Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). **Food Research International**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 1482–1489, 2011.

BUSSE, W. The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products. **Drug Information Journal**, Thousand Oaks, v. 34, p. 15-23, 2000.

BÜYÜKOKUROGLU, M. E.; GÜLÇİN, İ. In vitro antioxidant and antiradical properties of *Hippophae rhamnoides* L. **Pharmacognosy Magazine**, Mumbai, v. 4, p. 189–195, 2009.

CACARETO, N. D. D.; MONTEIRO FILHO, E. S.; PESSÔA FILHO, P.A; MEIRELLES, A. J. A. Water activity of aqueous solutions of ethylene oxide-propylene oxide block copolymers and maltodextrins. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 173-181, 2010.

CACERES, A.; CANO, O.; SAMAYOA, B.; AGUILAR, L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Part I. Screening of 84 plants against enterobacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 30, n. 1, p. 55-73, 1990.

CÁDIZ-GURREA, M. S.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; JOVEN, J.; SEGURA-ARRETERO, A. Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium bourgatii* extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Research International**, Oxford, v. 50, p. 197–204, 2013.

CALDEHE-CHEZET, F.; GUERRY, M.; CHALCHAT, J. C.; FUSILLIE, C.; VASSON, M.-P.; GUILLOT, J. Anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human polymorphonuclear neutrophils and monocytes. **Free Radical Research**, London, v. 38, n. 8, p. 805-811, 2004.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 6, p. 420-428, 2005.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, Chicago, v. 44, p. 1309-1315, 1998.

_____. Measurent of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. **Methods in Enzimology**, Maryland Heights, v. 299, p. 50-62, 1999.

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

CATHCART, M. K. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, New York, v. 24, p. 23-28, 2003.

CHAH, K. F.; EZE, C. A.; EMUELOSI, C. E.; ESIMONE, C. O. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 104, n. 1/2 , p. 164-167, 2006.

CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; WONG, S. K.; LIM, K. K.; TAN, S. P.; LIANTO, F. S.; YONG, M. Y. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 113, p. 166-172, 2009.

CHARLES, W. W.; PHILIP, E. S.; CARL, W. C. Determination of organic acids and sugars in *Psidium guajava* L. cultivars by high-performance liquid chromatography. **Journal of the Food and Agriculture**, Philadelphia, v. 33, p. 777-780, 2006.

CHEN, H.; SHI, S.; LIU, A.; TANG, X. Combined application of extrusion-spheronization and hot-melt coating technologies for improving moisture-proofing of herbal extracts. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Hoboken, v. 99, n. 5, p. 2444-2454, 2010.

CHEN, H.-Y.; YEN, G.-C. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 101, p. 686-694, 2007.

CHEN, Y.; DUAN, G.; XIE, M.; CHEN, B.; LI, Y. Infrared-assisted extraction coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of eight active

compounds in *Radix Salviae miltiorrhizae*. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 33, n. 17/18, p. 2888-2897, 2010.

CHENG, F. C.; SHEN, S. C.; WU, J. S. Effect of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extract on glucose uptake in rat hepatocytes. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 74, n. 5, p. 32-38, 2009.

CHEUNG, K.; ARCHIBALD, A. C.; ROBINSON, M. F. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 130, n. 5, p. 2324-2329, 1983.

CHIOU, D.; LANGRISH, T. A. G. Development and characterisation of novel nutraceuticals with spray-drying technology. **Journal of Food Engineering**, London, v. 82, p. 84-91, 2007.

CHIOU, D.; LANGRISH, T. A. G.; BRAHAM, R. Partial crystallization behavior during spray drying: simulations and experiments. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 26, p. 27-38, 2008.

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C.; BRAGAGNOLO, N. *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 127, p. 419-426, 2011.

CHOUDHURY, S.; SHARAN, L.; SINHA, M. P. Phytochemical and antimicrobial screening of *Psidium Guajava* L. leaf extracts against clinically important gastrointestinal pathogens. **Journal of Natural Product and Plant Resources**, Rajasthan, v. 2, n. 4, p. 524-529, 2012.

CHU, K. K. W.; CHOW, A. H. L. Impact of carbohydrate constituents on moisture sorption of herbal extracts. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 17, n. 9, p. 1133-1137, 2000.

CLAS, S.-D.; DALTON, C. R.; HANCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: application in drug development. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, London, v. 2, p. 311-320, 1999.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard – Sixth edition. M7-A6**. Wayne: CLSI, 2003.

_____. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard-Third Edition. M27-A3**. Wayne: CLSI, 2008.

CORTÉS-ROJAS, D. F. **Extratos secos padronizados de *Bidens pilosa* L.:** desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade biológica. 2011. 165 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; CHAGAS-PAULA, D. A.; COSTA, F. B.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Bioactive compounds in *Bidens pilosa* L. populations: a key step in the standardization of phytopharmaceutical preparations. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 23, n.1, p. 28–35, 2012.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; OLIVEIRA, W. P. Physicochemical properties of phytopharmaceutical preparations as affected by drying methods and carriers. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 30, p. 921–934, 2012.

COSTA-SILVA, T. A.; NOGUEIRA, M. A.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P.; SAID, S.; OLIVEIRA, W. P. Lipase production by endophytic fungus: Stability of enzymatic activity after spray drying in the presence of carbohydrates. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 29, p. 1112–1119, 2011.

COSTA-SILVA, T. A.; SAID, S.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Stabilization of endophytic fungus *Cercospora kikuchii* lipase by spray drying in presence of maltodextrin and *b*-cyclodextrin. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 28, n. 11, p. 1245–1254, 2010.

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**, Philadelphia, v. 29, p. 709-718, 2011.

COUTO, R. O.; CONCEICAO, E. C.; CHAUL, L. T.; OLIVEIRA, E. M. S.; MARTINS, F. S.; BARA, M. T. F.; REZENDE, K. R.; ALVES, S. F.; PAULA, J. R. Spray-dried rosemary extracts: physicochemical and antioxidant properties. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 131, p. 99–105, 2012.

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

CZEPULA, A. I. S. **Desenvolvimento de preparações semi-sólidas contendo extrato de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski (*Acmela brasiliensis*, *Wedelia paludosa* (ASTERACEAE) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica *in vivo***. 2006. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

DAHLGREN, C.; STENDAHL, O. Role of myeloperoxidase in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. **Infection and Immunity**, Washington, v. 39, n. 2, p. 736-741, 1983.

DAS, S.; DUTTA, S.; DEKA, S. A study of the anti-ulcer activity of the ethanolic extract of the leaves of *Psidium guajava* on experimental animal models. **The Internet Journal of Pharmacology**, Sugar Land, v. 7, n. 1, DOI: 10.5580/5b, 2009.

DORTA, E.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: Effect on antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 45, p. 261-268, 2012.

DUFFY, C. F.; POWER, R. F. Antioxidant and antimicrobial properties of some chinese plants extracts. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.17, p. 527-529, 2001.

DWECK, A. C. A review of *Psidium guajava*. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, Kelantan, v. 8, p. 27–30, 2001.

EDWARDS, S. W. The O₂⁻ generating NADPH oxidase of phagocytes: structure and methods of detection. **Methods: A Companion to Methods in Enzymology**, New York, v. 9, n. 3, p. 563-577, 1996.

ETUK, E. U.; FRANCIS, U. U. Acute toxicity and efficacy of *Psidium guajava* leaves water extract on *Salmonella Typhi* infected wistar rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 6, n. 3, p. 195-197, 2003.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY INSPECTIONS (EMA). **ICH Q1A (R2) stability testing of new drug substances and products**. London, 2003. Disponível em: <http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002651.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2013.

FAN, L.; LI, J.; DENG, K.; AI, L. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 87, p. 1849–1854, 2012.

FANG, X.; WANG, J.; ZHOU, H.; JIANG, X.; ZHU, L.; GAO, X. Microwave-assisted extraction with water for fast extraction and simultaneous RP-HPLC determination of phenolic acids in Radix Salviae Miltiorrhizae. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 32, p. 2455–2461, 2009.

FARMACOPEIA AMERICANA - THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP 29 ed. Rev., Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Easton: Mack, 2006.

FARMACOPEIA AMERICANA - THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP 30 ed. Rev., Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Easton: Mack, 2007.

FARMACOPEIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília, DF: FIOCRUZ, 2010. v. 1.

FAUSTINO, J. M. F.; BARROCA, M. J.; GUINÉ, R. P. F. Study of the drying kinetics of green bell pepper and chemical characterization. **Food and Bioproducts Processing**, London, v. 85, n. 3, p. 163–170, 2007.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FAZAEI, M.; EMAM-DJOMEH, Z.; ASHTARI, A. K.; OMID, M. Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. **Food and Bioproducts Processing**, London, v. 90, p. 667-675, 2012.

FERNANDES JÚNIOR, A.; SILVA, N. C. C. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **The Jornal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

FERNANDES, L. P. **Desenvolvimento tecnológico de produtos particulados obtidos a partir de *Lippia sidoides* pela técnica de *spray drying* e avaliação das propriedades antifúngicas**. 2008. 138 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

FERNANDES, L. P.; CANDIDO, R. C.; OLIVEIRA, W. P. Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. **Food and Bioproducts Processing**, London, v. 90, n. 3, p. 425-432, 2012.

FERNANDES, L. P.; TURATTI, I. C. C.; LOPES, N. P.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C.; OLIVEIRA, W. P. Volatile retention and antifungal properties of spray-dried microparticles of *Lippia sidoides* essential oil. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 26, n. 12, p. 1534-1542, 2008.

FERRANDINO, A.; GUIDONI, S. Anthocyanins, flavonols and hydroxycinnamates: an attempt to use them to discriminate *Vitis vinifera* L. cv ‘Barbera’ clones. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 230, p. 417-427, 2010.

FIGUEIREDO, A. S. G. **Efeito da sazonalidade no perfil químico e na atividade antioxidante de *Baccharis deacunculifolia* (Asteraceae) e ação moduladora desta planta sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos**. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

FLOEGEL, A.; KIM, D. O.; CHUNG, S. J.; SONG, W. O.; FERNANDEZ, M. L.; BRUNO, R. S.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Development and validation of an algorithm to establish a total antioxidant capacity database of the US diet. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, London, v. 61, n. 6, p. 600-623, 2010.

FLOEGEL, A.; KIM, D.-O.; CHUNG, S.-J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, Maryland Heights, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, 2011.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. Estabilidade de drogas. In: ATTWOOD, D.; FLORENCE A. T., ROTHSCHILD, Z. **Princípios físicos químicos em farmácia**. São Paulo: EDUSP, 2003. p.155-218.

FONTANA, A. J. **Measurement of water activity for product quality**: advantages chilled-mirror dewpoint sensors. 1998. Disponível em: <<http://www.aqualab.com/education/measurement-of-water-activity-for-product-quality/>>. Acesso em: 15 nov. 2012.

FRANKS, F. Accelerated stability testing of bioproducts: attractions and pitfalls. **Trends in Biotechnology**, London, v. 12, n. 4, p. 114-117, 1994.

FREITAS, M.; LIMA, J. L. F. C.; FERNANDES, E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 649, p. 8-23, 2009.

FURLAN, C.; SALATINO, A. Flavonoides de variedades comerciais de *Psidium guajava*. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE BOTÂNICA, 9., 2006, Santo Domingo. **Resumos...** Santo Domingo: [s.l.], 2006. p. 547.

GAFNER, S.; BERGERON, C. The challenges of chemical stability testing of herbal extracts in finished products using state-of-the-art analytical methodologies. **Current Pharmaceutical Analysis**, Bussum, v. 1, p. 203-215, 2005.

GALLO, L.; LLABOT, J. M.; ALLEMANDI, D.; BUCALÁ, V.; PIÑA, J. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. **Powder Technology**, Lausanne, v. 208, p. 205-214, 2011.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P.; FONSECA, M. J. V. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 41, p. 1521-1527, 2008.

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

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

GIL-ALEGRE, J. A.; BERNABEU, M. A.; CAMACHO, M. A.; TORRES-SUAREZ, A. I. Statistical evaluation for stability studies under stress storage conditions. **Il Farmaco**, v. 56, p. 877-883, 2001.

GINSBURG, I.; MISGAV, R.; GIBBS, D. F.; VARANI, J.; KOHEN, R. Chemiluminescence in activated human neutrophils: role of buffers and scavengers. **Inflammation**, New York, v. 17, n. 3, p. 227-243, 1993.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONÇALVES, F. A.; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J.; MACRAE, A.; SOUSA, O. V.; FONTELES-FILHO, A. Antibacterial activity of Guava, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (HELLER). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 11-15, 2008.

GONG, Y.; LIU, X.; HE, W.-H.; XU, H.-G.; YUAN, F.; GAO, Y.-X. Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 83, p. 481-489, 2012.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. Spray drying of tomato pulp: effect of feed concentration. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 22, n. 10, p. 2309-2330, 2004.

GOUVEIA, S.; GONÇALVES, J.; CASTILHO, P. C. Characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts from flowers of *Andryala glandulosasp. varia* (Lowe ex DC.) R.Fern., an endemic species of Macaronesia region. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 42, p. 573-582, 2013.

GRAEL, C. F. F.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L. M.; JORDÃO, C. O.; TAKEARA, R.; GOBBO-NETO, L.; POLIZELLO, A. C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C. *In vitro* study of antioxidant and scavenger properties of phenolic compounds from *Lychnophora* species. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 867-870, 2010.

GUEDES, R. C. M.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Efeito de variáveis de processo e de formulação sobre propriedades físicas e químicas de extratos secos de *Petiveria Alliacea* L. (Guiné) obtidas em *spray drying*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS, 34., 2009, Vassouras. **Anais...Vassouras: ENEMP**, 2009. p. 1223-1231.

GULATI, V.; HARDING, I. H.; PALOMBO, E. A. Enzyme inhibitory and antioxidant activities of traditional medicinal plants: Potential application in the management of hyperglycemia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 12, n. 77, p. 1-9, 2012.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, Heidelberg, v. 86, p. 345-391, 2012.

GÜLÇİN, İ.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum*) assayed by different methodologies. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 21, p. 354-361, 2007.

GÜLÇİN, İ.; GAGUA, N.; BEYDEMİR, S.; BAYRAM, R.; BAKURIDZE, A.; GEPIREMEN, A. Apoptotic, antioxidant, antiradical and antiglaucoma effects of majdine and isomajdine from *Vinca herbacea* Waldst. and Kit. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, London, v. 27, n. 4, p. 587-594, 2012.

GÜLÇİN, İ.; MSHVILDADZE, V.; GEPDIREMEN, A.; ELIAS R. Screening of antioxidant and antiradical activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* Tuber. **Phytomedicine**, Jena, v. 13, p. 343–351, 2006.

GÜLÇİN, İ.; SAT, I. G.; BEYDEMİR, S.; ELMASTAS, M.; KÜFREVIOĞLU, Ö. I. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 87, p. 393–400, 2004.

GÜLÇİN, İ.; TEL, A. Z.; KIRECCI, E. Antioxidant, antimicrobial, antifungal and antiradical activities of *Cyclotrichium niveum* (Boiss.) Manden and Scheng. **International Journal of Food Properties**, Philadelphia, v. 11, p. 450–471, 2008.

GUTIÉRREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 117, p. 1-27, 2008.

HAKKARAINEN, B.; FUJITA, K.; IMMEL, S.; KENNE, L.; SANDSTRÖM, C. ¹H NMR studies on the hydrogen-bonding network in mono- α -D-glucopyranosyl- β -cyclodextrin and its complex with adamantane-1-carboxylic acid. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 340, p. 1539–1545, 2005.

HENRIQUES, C.; ALIAGA, C.; LISE, E. Formation and decay of ABTS derived radical cation: a comparison of different preparations procedures. **International Journal of Chemical Kinetics**, Hoboken, v. 34, n. 12, p. 659-665, 2002.

HENSON, P. M. The immunology release of constituents from neutrophils leukocytes. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 107, n. 6, p. 1535-1546, 1971.

HOFLING, J. F.; ANIBAL, P. C.; OBANDO-PEREDA, G. A.; PEIXOTO, I. A. T.; FURLETTI, V. F.; FOGGIO, M. A.; GONÇALVES, R. B. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, Sao Carlos, v. 70, n. 4, p. 1065-1068, 2010.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HOLLANDER, M.; WOLFE, D. A. **Nonparametric statistical methods**. 2. ed., New York: Wiley, 1999. (Mathematics).

HOSSAIN, M. B.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A. B.; BRUNTON, N. P. Effect of drying method on the antioxidant capacity of six *Lamiaceae* herbs. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 123, p. 85–91, 2010.

HSIEH, C.-L.; LIN, Y.-C.; KO, W.-S.; PENG, C.-H.; HUANG, C.-N.; PENG, R. Y. Inhibitory effect of some selected nutraceutic herbs on LDL glycation induced by glucose and glyoxal. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 102, p. 357–363, 2005.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

IBARRA, A.; CASES, J.; BILY, A.; HE, K.; BAI, N.; ROLLER, M.; COUSSAERT, A.; RIPOLL, C. Importance of extract standardization and in vitro/ex vivo assay selection for the evaluation of antioxidant activity of botanicals: a case study on three *Rosmarinus officinalis* L. extracts. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 13, n. 5, p. 1167-1175, 2010.

IMAGE-PRO® Plus, 7.0.0.591 for windows XP/Vista. Media Cybernetics, c1993-2009. Patent # 7,489,828.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz – Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo, 1985.

JABERIAN, H.; PIRI, K.; NAZARI, J. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 136, p. 237-244, 2013.

JACOPIC, J.; VEBERIC, R.; STAMPAR, F. Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. **Acta Agriculturae Slovenica**, Ljubljana, v. 93, p. 11-15, 2009.

JAIARJ, P.; KHOOHASWAN, P.; WONGKRAJANG, Y.; PEUNGVICHA, P.; SURIYAWONG, P.; SARAYA, M. L. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 67, p. 203-212, 1999.

JANCAR, S.; CRESPO, M. S. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. **Trends Immunology**, London, v. 26, p. 48-55, 2005.

JIMENEZ, E. A.; RINCON, M.; PULIDO, R.; SAURA, C. F. Guava fruit (*Psidium guajava*) as a new source of antioxidant dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 5489-5493, 2001.

JIMÉNEZ, N.; BOHUON, P.; DORNIER, M.; BONAZZI, C.; PÉREZ, A. M.; VAILLANT, F. Effect of water activity on anthocyanin degradation and browning kinetics at high temperatures (100–140 °C). **Food Research International**, Oxford, v. 47, p. 106–115, 2012.

KABEYA, L. M. **Estudo do efeito de cumarinas simples no metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho**: aspectos metodológicos, avaliação da atividade e da sua relação com a toxicidade e com propriedades físico-químicas dos compostos. 2002. 140 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

KAHLER, C. P. Evaluation of the use of the solvent dimethyl sulfoxide in chemiluminescent studies. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, Maryland Heights, v. 26, n. 6, p. 626-633, 2000.

KAMEL, S.; ALI, N.; JAHANGIR, K.; SHAH, S.; EL-GENDY, A. Pharmaceutical significance of cellulose: a review. **Express Polymer Letters**, Budapest, v. 2, p. 758–778, 2008.

KATIKI, L. M.; FERREIRA, J. F. S.; GONZALEZ, J. M.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S.; CHAGAS, A. C. S.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 192, p. 218–227, 2013.

KEEY, R. B. **Drying of loose and particulate solids materials**. New York: Hemisphere Publishing, 1992.

KHA, T. C.; NGUYEN, M. H.; ROACH, P. D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal of Food Engineering**, London, v. 98, p. 385–392, 2010.

KHAN, I.; SANGWAN, P. L.; ABDULLAH, S. T.; GUPTA, B. D.; DHAR, J. K.; MANICKAVASAGAR, R.; KOUL, S. Ten marker compounds-based comparative study of green tea and guava leaf by HPTLC densitometry methods: Antioxidant activity profiling. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 34, p. 749–760, 2011.

KIM, D.-O.; LEE, K. W.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 3713–3717, 2002.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, São Paulo, v.30, n. 3, p. 241–248, 2009.

KOÇ, M.; KOÇ, B.; YILMAZER, M. S.; ERTEKIN, F. K.; SUSYAL, G.; BAGDATLIOĞLU, N. Physicochemical characterization of whole egg powder microencapsulated by spray drying. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 29, n. 7, p. 780–788, 2011.

KOKO, W. S.; MESAİK, M. A.; YOUSAF, S.; GALAL, M.; CHOUDHARY, M. I. *In vitro* immunomodulating properties of selected Sudanese medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 118, p. 26–34, 2008.

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

KOPPRASCH, S.; PIETZCH, J.; GRAESSLER, J. Validation of different chemiluminescent substrates for detecting extracellular generation of reactive oxygen species by phagocytes and endothelial cells. **Luminescence**, Chichester, v. 18, n. 5, p. 268–273, 2003.

KRATCHANOVA, M.; DENEV, P.; CIZ, M.; LOJEK, A.; MIHAILOV, A. Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. **Acta Biochimica Polonica**, Warsaw, v. 57, n. 2, p. 229-234, 2010.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, London, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em polpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LABUZA, T. P.; LABUZA, P. S. Influence of temperature and relative humidity on the physical states of cotton candy. **Journal of Food Processing and Preservation**, Hoboken, v. 28, p. 274-287, 2004.

LACAZ, C. S. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LANGRISH, T. A. G.; WANG, S. Crystallization rates for amorphous sucrose and lactose powders from spray drying: a comparison. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 27, p. 606-614, 2009.

LARSEN, K. L. Large Cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 43, p. 1-13, 2002.

LI, H.; DENG, C.; ZHU, H.; HU, C.; LIU, R.; YOUNG, J. C.; TSAO, R. Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. **Food Research International**, Oxford, v. 46, p. 250-259, 2012.

LI, Y.; ZHU, H.; TRUSH, M. A. Detection of mitochondria-derived reactive oxygen species production by the chemilumigenic probes lucigenin and luminal. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1428, p. 1-12, 1999.

LIANG, Q.; QIAN, H.; YAO, W. Identification of flavonoids and their glycosides by high-liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection. **European Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 11, n. 1, p. 93-101, 2005.

LING, L. T.; RADHAKRISHNAN, A. K.; SUBRAMANIAM, T.; CHENG, H. M.; PALANISAMY, U. D. Assessment of antioxidant capacity and cytotoxicity of selected malaysian plants. **Molecules**, Basel, v. 15, p. 2139-2151, 2010.

LIST, P. H.; SCHIMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. Boca Raton: CRC, 1989.

LIU, M.; LI, Y.; CHOU, G.; CHENG, X.; ZHANG, M.; WANG, Z. Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb Radix Salviae Miltiorrhizae. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1157, p. 51-55, 2007.

- LIU, X.; QIU, Z.; WANG, L.; CHEN, Y. Quality evaluation of *Panax notoginseng* extract dried by different drying methods. **Food and Bioproducts Processing**, London, v. 89, p. 10–14, 2011.
- LOPES, G. C.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. RP-LC-UV Determination of proanthocyanidins in *Guazuma ulmifolia*. **Chromatographia**, Heidelberg, v. 69, p. 175-181, 2009.
- LOPES, G. C.; ROCHA, J. C. B.; ALMEIDA, G. C.; MELLO, J. C. P. Condensed tannins from the bark of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Sao Paulo, v. 20, n. 6, p. 1103-1109, 2009.
- LOPES, G. C.; SANCHES, A. C.C.; TOLEDO, C. E. M.; ISLER, A. C.; MELLO, J. C. P. Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 135-143, 2009.
- LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa - SP, Instituto Plantarum, 2008, 544 p.
- LOZOYA, X.; REYES-MORALES, H.; CHAVES-SOTO, M. A.; MARTINEZ-GARCIA, M. D. E. L. C.; SOTO-GONZALES, Y.; DOUBOVA, S. V. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 83, n. 1/4, p. 19-24, 2002.
- LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorfonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 132, p. 2015-2020, 1984.
- LUTTERODT, G. D.; ISMAIL, A.; BASHEER, R. H.; MOHD BAHARUDIN, H. Antimicrobial effects of *Psidium guajava* L. extract as one mechanism of its antidiarrhoeal action. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, Kelantan, v. 6, n. 2, p. 17-20, 1999.
- MA, X.; WU, H.; LIU, L.; YAO, Q.; WANG, S.; ZHAN, R.; XING, S.; ZHOU, Y. Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. **Scientiae Horticulturae**, Amsterdam, v. 129, p. 102-107, 2011.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MAHOMOODALLY, F.; MESAİK, A.; CHOUDHARY, M. I.; SUBRATTY, A. H.; GURIB-FAKIM, A. *In vitro* modulation of oxidative burst via release of reactive oxygen species from immune cells by extracts of selected tropical medicinal herbs and food plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Singapore, v. 5, n. 6, p. 440-447, 2012.

MARTINS, F. T.; SANTOS, M. H.; COELHO, C. P.; BARBOSA, L. C. A.; DIAS, G. C.; FRACCA, M. P.; NEVES, P. P.; STRINGHETA, P. C.; DORIGUETTO, A. C. A powder X-ray diffraction method for detection of polyprenylatedbenzophenones in plant extracts associated with HPLC for quantitative analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 54, n. 3, p. 451–457, 2011.

MASTERS, K. **Spray drying handbook**. 5th ed. London: Longman, 1991.

MASUDA, T.; INABA, Y.; MAEKAWA, T.; TAKEDA, Y.; YAMAGUCHI, H.; NAKAMOTO, K.; KUNINAGA, H.; NISHIZATO, S.; NONAKA, A. Simple detection method of powerful antiradical compounds in the raw extract of plants and its application for the identification of antiradical plant constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 7, p. 1831-1838, 2003.

MAYER-SCHOL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How to neutrophils and pathogens interact? **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 7, n. 1, p. 62-66, 2004.

MENSHUTINA, N. V.; GORDIENKO, M. G.; VOINOVSKIY, A. A.; ZBICINSKI, I. Spray drying of probiotics: process development and scale-up. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 28, n. 10, p. 1170–1177, 2010.

METWALLI, A. M.; OMAR, A. A.; HARRAZ, F. M.; EL SOHAFY, S. M. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaves. **Pharmacognosy Magazine**, Mumbai, v. 6, n. 23, p. 216-222, 2010.

METWALLY, A. M.; OMAR, A. A.; GHAZY, N. M.; HARRAZ, F. M. Monograph of *Psidium guajava* L. leaves. Review article. **Pharmacognosy Journal**, Bangalore, v. 3, n. 21, p. 89-104, 2011.

MEZHERICHER, M.; LEVY, A.; BORDE, I. Theoretical models of single droplet drying kinetics: a review. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 28, p. 278–293, 2010.

MICHELIN, D. C.; FINATI, S. C. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., Convolvulaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Joao Pessoa, v. 20, n. 1, p. 18-22, 2010.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.

MOREIRA, G. E. G.; MAIA COSTA, M. G.; SOUZA, A. C. R.; BRITO, E. S.; MEDEIROS, M. F. D.; AZEREDO, H. M. C. Physical properties of spray dried acerola pomace extract as affected by temperature and drying AIDS. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 42, p. 641–645, 2009.

MOURA-COSTA, G. F.; NOCCHI, S. R.; CEOLE, L. F.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; TEMPONI, L. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Antimicrobial activity of plants used as medicinal on na indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 143, p. 631-638, 2012.

MUKHTAR, H. M.; ANSARI, S. H.; ALI, M.; NAVED, T.; BHAT, Z. A. Effect of water extract of *Psidium guajava* on alloxan-induced diabetic rats. **Pharmazie**, Eschborn, v. 59, p. 734–735, 2004.

MUKHTAR, H. M.; ANSARI, S. H.; BHAT, Z. A.; NAVED, T.; SINGH, P. Antidiabetic activity of an ethanol extract obtained from the stem bark of *Psidium guajava* (Myrtaceae). **Pharmazie**, Eschborn, v. 61, p. 725–727, 2006.

NADEEM, H. S.; TORUN, M.; ÖZDEMİR, F. Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 44, p. 1626-1635, 2011.

NAGATOMI, R. The implication of alterations in leukocyte subset counts on immune function. **Exercise Immunology Review**, Tubingen, v. 12, p. 54-71, 2006.

NAIR, B.; YAMARIK, T. A.; ANDERSEN, F. A. Final report on the safety assessment of AluminumStarchOctenylsuccinate. **International Journal of Toxicology**, Thousand Oaks, v. 21, n. 2, p. 1-7, 2002.

NAIR, R.; CHANDA, S. *In-vitro* antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 38, p. 452-458, 2007.

NANTITANON, W.; YOTSAWIMONWAT, S.; OKONOGI, S. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 43, p. 1095-1103, 2010.

NATALE, W.; PRADO, R. M. Fertiirrigação em goiabeira. In: BOARETTO, A. E.; VILLAS BOAS, R. L.; SOUZA, W. F.; VIDAL, I. R. (Org.). **Fertiirrigação: teoria e prática**. Piracicaba: CENA/USP, 2006. p. 494–535. v. 1.

NAYAK, C. A.; RASTOGI, N. K. Effect of selected additives on microencapsulation of anthocyanin by spray drying. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 28, n. 12, p. 1396–1404, 2010.

NERY, C. G. C.; PIRES, M. A. S.; PIANETTI, G. A.; VIANNA-SOARES, C. D. Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 61-73, 2008.

NIEN-YUNG, C.; KUANG-HSIUNG, C. **The illustrated medical plants of Taiwan**. Taipei: SMC Publishing, 2004.

NINFALI, P.; GENNARI, L.; BIAGIOTTI, E. Improvement in Botanical Standardization of Commercial Freeze-dried Herbal Extracts by using the Combination of Antioxidant Capacity and Constituent Marker Concentrations. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 92, n. 3, p. 797-805, 2009.

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*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 22, n. 5, p. 1119-1129, 2012.

OH, W. K.; LEE, C. H.; LEE, M. S.; BAE, E. Y.; SOHN, C. B.; OH, H.; KIM, B. Y.; AHN, J. S. Antidiabetic effects of extracts from *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 96, p. 411-415, 2005.

OJEWOLE, J. A. Hypoglycemic and hypotensive effects of *Psidium guajava* Linn.(Myrtaceae) leaf aqueous extract. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, Barcelona, v. 27, p. 689-695, 2005.

_____. Anti-inflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn., (myrtaceae) leaf aqueous extracts in rats and mice. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, Barcelona, v. 7, n. 28, p. 441-447, 2006.

OKAMOTO, M. K. H.; KATO, E. T. M.; BACCHI, E. M. Morfoanatomia de folhas de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, La Plata, v. 28, n. 4, p. 599-603, 2009.

OLIVEIRA, O. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; BARROS, M. P.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.115, p. 469-475, 2009.

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

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

OLIVEIRA, W. P.; FREITAS, L. A. P.; FREIRE, J. T. Secagem de produtos farmacêuticos. In: FREIRE, J. T.; SILVEIRA, A. M. **Fenômenos de transporte em sistemas particulados: fundamentos e aplicações**. São Carlos: Suprema, 2009. cap. 10.

OLIVEIRA, W. P.; SOUZA, C. R. F.; KUROSZAWA, L. E.; PARK, K. J. Spray drying of food and herbal products. In: WOO, M. W.; MUJUNDAR, A. S.; DAUD, W. R.W. **Spray drying technology**. Singapura, 2010. p. 113-156. cap. 5. v. 1.

OSORIO, C.; FORERO, D. P.; CARRIAZO, J. G. Characterisation and performance assessment of guava (*Psidium guajava* L.) microencapsulates obtained by spray-drying. **Food Research International**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 1174–1181, 2011.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Princípios de bioestatística**. São Paulo: Thomson, 2004.

PALOZZA, P.; KRINSKY, N. I. Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: an overview. **Methods in Enzymology**, Maryland Heights, v. 213, p. 403–419, 1992.

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

PAULA, F. S.; KABEYA, L. M.; KANASHIRO, A.; FIGUEIREDO, A. S. G.; AZZOLINI, A. E. C. S.; UYEMURA, S. A.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, p. 163–170, 2009.

PELOZO, M. I. G.; CARDOSO, M. L. C.; MELLO, J. C.P. Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 3, p. 447-451, 2008.

PENG, C.-C.; PENG, C.-H.; CHEN, K.-C.; HSIEH, C.-L.; PENG, R. Y. The aqueous soluble polyphenolic fraction of *Psidium guajava* leaves exhibits potent anti-angiogenesis and anti-migration actions on DU145 cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2011, n. 219069. doi:10.1093/ecam/nej005.

PEREDA, J. A. O.; RODRIGUEZ, M. I. C. R.; ALVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLON, G. D. G. F.; PERALES, L. L. H.; CORTECER, M. D. S. **Tecnologia de alimentos - componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 1.

PEREIRA, M. C.; STEFFENS, R. S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P. F.; RIOS, A. O.; VIZZOTTO, M.; FLÔRES, S. H. Characterization and antioxidant potential of brazilian fruits from the Myrtaceae family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, p. 3061–3067, 2012.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. **Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes**: efecto de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parâmetros de riesgo cardiovascular em humanos. 2007. 244 f. Tesis (Doctoral) – Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Autónoma de Madrid, 2007.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, M. E.; SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, Oxford, v. 41, p. 274-285, 2008.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, Oxford, v. 39, p. 791-800, 2006.

PÉREZ-SERRADILLA, J. A.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 124, p. 1652-1659, 2011.

PÉREZ-SERRADILLA, J. A.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Simultaneous ultrasound-assisted emulsification-extraction of polar and nonpolar compounds from solid plant samples. **Analytical Chemistry**, Rajkot, v.79, n. 17, p. 6767-6774, 2007.

PHILIP JACOB, P.; MADHUMITHA, G.; MARY SARAL, A. Free radical scavenging and reducing power of *Lawsonia inermis* L. seeds. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Singapore, v. 4, n. 6, p. 457-461, 2011.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and pharmacognosy. **Phytochemistry**, Oxford, v. 68, p. 2960–2972, 2007.

PICCIRILLO, C.; DEMIRAY, S.; SILVA FERREIRA, A. C.; PINTADO, M. E.; CASTRO, P. M. L. Chemical composition and antibacterial properties of stem and leaf extracts from Ginja cherry plant. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 43, p. 562–569, 2013.

PIETTA, P.; MAURI, P. Analysis of flavonoids in medicinal plants. **Methods in Enzymology**, Maryland Heights, v. 335, p. 26–45, 2001.

PIFFERI, G.; RESTANI, P. The safety of pharmaceutical excipients. II **Farmaco**, v. 58, n. 8, p. 541–550, 2003.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EFIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PODSĘDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant activity of *Brassica* vegetables: a review. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 40, p. 1-11, 2007.

POMMER, C. V.; MURAKAMI, K. R. N.; WATLINGTON, F. Goiaba no mundo. **O Agrônomo**, Campinas, v. 58, n. 1/2, p. 22-26, 2006. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/agronomico/pdf/v58_Goiaba_no_mundo.pdf>. Acesso em: 10 out. 2012.

PRABU, G. R.; GNANAMANI, A.; SADULLA, S. Guaijaverin a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 101, p. 487–495, 2006.

PRASAD, K. N.; YANG, B.; YANG, S.; CHEN, Y.; ZHAO, M.; ASHRAF, M.; JIANG, Y. Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) seeds. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.116, p. 1-7, 2009.

PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 3273-3279, 2003.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.53, p. 4290-4302, 2005.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian 1995. v. 2.

PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIÊNCIA Y TECNOLOGIA PARA EL DESARROLLO (CYTED). **270 plantas medicinais ibero-americanas**. Madrid, 1995.

PU, J.; BANKSTON, J. D.; SATHIVEL, S. Production of microencapsulated crawfish (*Procambarus clarkii*) astaxanthin in oil by spray drying technology. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 29, n. 10, p. 1150–1160, 2011.

PUCHAU, B.; ZULET, M. A.; ECHÁVARRI, A. G.; HERMSDORFF, H. H. M.; MARTÍNEZ, J. A. Dietary total antioxidant capacity is negatively associated with some metabolic syndrome features in healthy young adults. **Nutrition**, New York, v. 26, p. 534-541, 2010.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity dietary of polyphenols as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

QADAN, F.; THEWAINI, A. J.; ALI, D. A.; AFIFI, R.; ELKHAWAD, A.; MATALKA, K. Z. The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne-developing organisms. **The American Journal of Chinese Medicine**, Singapore, v. 33, p. 197–204, 2005.

QIAN, H.; NIHORIMBERE, V. Antioxidant Power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. **Journal of Zhejiang University Science**, Hangzhou, v. 5, n. 6, p. 676-683, 2004.

QUINN, M. T.; GAUSS, K. A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.76, p. 760-781, 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, c2011.

RAGHAVAN, G. S. V.; ORSAT, V. Electro-technology in drying and processing of biological materials. In: INTERNATIONAL DRYING SYMPOSIUM, 11., 1998, Halkidiki. **Proceedings...** Thessaloniki IDS, 1998. p. A:73–84.

RAHMAN, M. S. Food stability beyond water activity and glass transition: macro-micro region concept in the state diagram. **International Journal of Food Properties**, Philadelphia, v. 12, p. 726–740, 2009.

RAMOS, D. P.; LEONEL, S.; SILVA, A. C.; SOUZA, M. E.; SOUZA, A. P.; FRAGOSO, A. M. Épocas de poda na sazonalidade, produção e qualidade dos frutos da goiabeira ‘Paluma’. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 909-918, 2011.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicicon**, Oxford, v. 39, p. 603–613, 2001.

RATTES, A. L. R.; OLIVEIRA, W. P. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. **Powder Technology**, Lausanne, v. 171, p. 7–14, 2007.

RAZBORSEK, M. I. Stability studies on trans-rosmarinic acid and GC–MS analysis of its degradation product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 55, p. 1010–1016, 2011.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 16, p. 1195-1236, 1998.

_____. Formulating drug delivery systems by spray drying. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 24, p. 433–446, 2006.

RÉ, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, Philadelphia, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REINER, S. J.; REINECCIUS, G. A.; PEPPARD, T. L. A comparison of the stability of beverage cloud emulsions formulated with different gum acacia- and starch-based emulsifiers. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 75, p. 236-246, 2010.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. **Methods in Enzymology**, Maryland Heights, v. 234, p. 279–293, 1994.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 66, p. 401-436, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, Maryland Heights, v.23, p. 726–740, 2010.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 92, p. 235–254, 2005.

ROMANIK, G.; GILGENAST, E.; PRZYJAZNY, A.; KAMÍŃSKI, M. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 70, p. 253-261, 2007.

ROWE, R.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. (Ed.). **Handbook of pharmaceutical excipients**. 5th ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2006. p. 188-191.

ROWE, R.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009.

ROY, C. K.; KAMATH, J. V.; ASAD, M. Hepatoprotective activity of *Psidium guajava* L. leaf extract. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 4, n. 44, p. 305-311, 2006.

RUFINO, M. S. M. **Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais**, Universidade Federal do Semi-Arido, Mossoro, RN, (Tese), 2008, 237f. Disponível em: <http://pct.capes.gov.br/teses/2008/23003014011P0/TES.pdf> Acesso em: 12 jul. 2012.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 125).

_____. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007a. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 127).

_____. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. **Comunicado Técnico on line**, Fortaleza, n. 128, jul. 2007b. Disponível em: http://www.cnpat.embrapa.br/home/down/index.php?pub/Cot_128.pdf. Acesso em: 04 ago. 2012.

RYU, N. H.; PARK, K.-R.; KIM, S.-M.; YUN, H. M.; NAM, D.; LEE, S.-G.; JANG, H.-J.; AHN, K. S.; KIM, S.-H.; SHIM, B. S.; CHOI, S. H.; MOSADDIK, A.; CHO, S. K.; AHN, K. S. A Hexane Fraction of Guava Leaves (*Psidium guajava* L.) Induces anticancer activity by suppressing AKT/mammalian target of rapamycin/ribosomal p70 S6 kinase in human prostate cancer cells. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 15, n. 3, p. 231-241, 2012.

SAHIN-NADEEM, H.; TORUN, M.; OZDEMIR, F. Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 44, n. 7, p. 1626–1635, 2011.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: standards and regulation. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 81, p. 462–471, 2010.

SAITO, K.; KOHNO, M.; YOSHIZAKI, F.; NIWANO, Y. Extensive screening for edible herbal extracts with potent scavenging activity against superoxide anions. **Plant Foods for Human Nutrition**, New York, v. 63, p. 65-70, 2008.

SALVADOR, M. J.; LOURENÇO, C. C.; ANDREAZZA, N. L.; PASCOAL, A. C.; STEFANELLO, M. C. Antioxidant capacity and phenolic content of four Myrtaceae plants of the south of Brazil. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 6, n. 7, p. 977-982, 2011.

SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; SCHIAVINI, M. S.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 3, p. 429-436, 2005.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, London, v. 8, p. 121-137, 2002.

SAS/STAT® User's Guide, Version 9.0, Cary, NC, USA: SAS Institute Inc., 2002.

SATO, J.; GOTO, K.; NANJO, F.; KAWAI, S.; MURATA, K. Antifungal activity of plant extracts against *Arthrrium sacchari* and *Chaetomium funicola*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 90, n. 4, p. 442-446, 2000.

SCHALL, R. Estimation in generalized linear models with random effects. **Biometrika**, Oxford, v. 78, n. 4, p. 719-727, 1991.

SERBETCI TOHMA, H.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging activity of aerial parts and roots of Turkish liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). **International Journal of Food Properties**, Philadelphia, v. 13, p. 657–671, 2010.

SHAH, A. K.; AVERY, B. A.; WYANDT, C. M. Content analysis and stability evaluation of selected commercial preparations of St. John's wort. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 31, n. 9, p. 907-916, 2005.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food Phenolics: Phenolics in cereal, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 4, p. 1523-1542, 2006.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.113, p. 1202-1205, 2009.

SHEN, L.; HONG-FANG, J.; HONG-YU, Z. How to understand the dichotomy of antioxidants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Maryland Heights, v.362, p. 543-545, 2007.

SILVA, M. C. **Aproveitamento do resíduo do despolpamento da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) para obtenção de pigmento com propriedades funcionais**. 2012. 122 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SILVA, V.; GENTA, G.; MOLLER, M. N.; MASNER, M.; THOMSON, L.; ROMERO, N.; RADI, R.; FERNANDES, D. C.; LAURINDO, F. R. M.; HEINZEN, H.; FIERRO, W.; DENICOLA, A. Antioxidant activity of uruguayan propolis. *In Vitro* and cellular assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, p. 6430–6437, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SIMÕES-AMBROSIO, L. M. C.; GREGÓRIO, L. E.; SOUSA, J. P. B.; FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G.; AZZOLINI, A. E. C. S.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIM, Y. M. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils, **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 81, p. 1102–1108, 2010.

SINGH, S.; SINGH, R. P. *In vitro* methods of assay of antioxidants: an overview. **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 24, p. 392-415, 2008.

SOARES E SILVA, L.; SILVA, L. S.; BRUMANO, L.; STRINGHETA, P. C.; PINTO, M. A. O.; DIAS, L. O. M.; MULLER, C. S. M.; SCIO, E.; FABRI, R. L.; CASTRO, H. C.; AMARAL, M. P. H. Preparation of dry extract of *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) and determination of its coumarin levels by spectrophotometry and HPLC-UV. **Molecules**, Basel, v. 17, p. 10344-10354, 2012.

SOLLOHUB, K.; CAL, K. Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Hoboken, v. 99, n. 2, p. 587-597, 2010.

SOLVAL, K. M.; SUNDARARAJAN, S.; ALFARO, L.; SATHIVEL, S. Development of cantaloupe (*Cucumis melo*) juice powders using spray drying technology. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 46, p. 287-293, 2012.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAM, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p. 289-326.

SOUZA, C. R. F. **Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos spray dryer e leito de jorro**. 2003. 179 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

_____. **Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras:** estudo da viabilidade técnica e econômica do processo em leito de jorro. 2007. 219 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

SOUZA, C. R. F.; DONIDA, M. W.; ROCHA, S. C. S.; OLIVEIRA, W. P. The Role of Colloidal Silicon Dioxide in the Enhancement of the Drying of Herbal Preparations in Suspended State. **Chemical Engineering Communications**, Philadelphia, v. 196, p. 391–405, 2009.

SOUZA, C. R. F.; GEORGETTI, S. R.; SALVADOR, M. J.; FONSECA, M. J. V.; OLIVEIRA, W. P. Antioxidant activity and physical-chemical properties of spray and spouted bed dried extracts of *Bauhinia forficata*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo v. 45, n. 2, p. 209-218, 2009.

SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Spouted bed drying of *Bauhinia forficata* Link extract: The effects of feed atomizer position and operating conditions on equipment performance and product properties. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo v. 22, n. 2, p. 239–247, 2005.

_____. Powder properties and system behavior during spray drying of *Bauhinia forficata* link extract. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 24, p. 735–749, 2006.

SOUZA, C. R. F.; SCHIAVETTO, I. A. F.; THOMAZINI, C. F.; OLIVEIRA, W. P. Processing of *Rosmarinus officinalis* Linne extract on spray and spouted bed dryers. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 59-69, 2008.

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

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SPRINGFIELD, E. P.; EAGLES, P. K. F.; SCOTT, G. Quality assessment of South African herbal medicines by means of HPLC fingerprinting. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 101, p. 75-83, 2005.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

STANG, D. *Psidium guajava* L. Miami, 2007. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Image/100119005>> Acesso em: 17 jan. 2013.

_____. *Psidium guajava* L. Cartago, 2008. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/22101794>> Acesso em: 17 jan. 2013.

STEINMANN, D.; GANZERA, M. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 55, p. 744-757, 2011.

STELLA, V. J.; HE, Q. Cyclodextrins. **Toxicologic Pathology**, Thousand Oaks, v. 36, p. 30-42, 2008.

SUZUKI, K.; OHNO, S.; SUZUKI, Y.; OHNO, Y.; OKUYAMA, R.; ARUGA, A.; YAMAMOTO, M.; ISHIHARA, K.-O.; NOZAKI, T.; MIURA, S.; YOSHIOKA, H.; MORI, Y. Effect of green tea extract on reactive oxygen species produced by neutrophils from cancer patients. **Anticancer Research**, Attiki, v. 32, p. 2369-2376, 2012.

TABART, J.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J.-O.; DOMMES, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 113, p. 1226-1233, 2009.

TALAZ, O.; GULÇIN, I.; GOKSU, S.; SARACOGLU, N. Antioxidant activity of 5, 10-dihydroindeno[1, 2-b]indoles containing substituents on dihydroindeno part. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 17, p. 6583-6589, 2009.

TASCA, A. P. W. **Efeito do processamento industrial para obtenção de goiabada sobre os compostos antioxidantes e cor**. 2007. 121 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of guava fruits. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health**, Bangkok, v. 36, p. 254-257, 2005.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruits extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, Maryland Heights, v. 19, p. 669-675, 2006.

THELEN, M.; DEWALD, B.; BAGGIOLINI, M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 73, n. 4, p. 797-821, 1993.

TIWARI, M.; CHAWLA, G.; BANSAL, A. K. Quantification of olanzapine polymorphs using powder X-ray diffraction technique. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 43, p. 865-872, 2007.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; CRUZ, M. M. B.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. C. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TONELI, J.; PARK, K.; NEGREIROS, A.; MURR, F. Spray-drying process optimization of chicory root inulin. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 28, p. 369-379, 2010.

TONON, R. V. **Secagem por atomização do suco de açaí**: influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto. 2009. 210 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by *spray drying*. **Journal of Food Engineering**, London, v. 88, p. 411-418, 2008.

TONON, R. V.; BRABET, C.; PALLET, D.; BRAT, P.; HUBINGER, M. D. Physicochemical and morphological characterisation of açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. **International Journal of Food Science and Technology**, Chichester, v. 44, p. 1950–1958, 2009.

UNGAR, Y.; OSUNDAHUNSI, O. F.; SHIMONI, E. Thermal Stability of Genistein and Daidzein and Its Effect on Their Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 4394, 2003.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Agricultural Research Service. **Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2 (2010)**. 2010. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=15866>>. Acesso em: 5 jan. 13.

VALDUGA, E.; LIMA, L.; PRADO, R.; PADILHA, F. F.; TREICHEL, H. Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva “Isabel” (*Vitis labrusca*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1568-1574, 2008.

VARGAS, A. D.; SOTO, H. M.; GONZALEZ, H. V. A.; ENGLEMAN, E. M.; MARTINEZ, G. A. Kinetics of accumulation and distribution of flavonoids in guava (*Psidium guajava*). **Agrociencia**, Chapingo, v. 40, p. 109–115, 2006.

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

VEIGA, F. J. B.; PECORELLI, C. C. M. F.; RIBEIRO, S. S. L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. Coimbra: MinervaCoimbra, 2006. Cap. 2, 228 p.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 18, p. 464-471, 2008.

VEIT, M. Note for guidance on stability testing of existing herbal drug preparations and related herbal medicinal products. **Pharmazeutische Industrie**, Aulendorf, v. 64, p. 20–23, 2002.

VIEIRA, R.; RODRIGUES, D.; GONÇALVES, F.; MENEZES, F.; ARAGÃO, J.; SOUSA, O. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* Linn. and *Carya papaya* Linn.) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. **Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. Revista**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 145-148, 2001.

VYAS, N.; TAILANG, M.; GAVATIA, N. P.; GUPTA, B. K. Antioxidant potential of *psidium guajava* linn. **International Journal of PharmTech Research**, Mumbai, v. 2, n. 1, p. 417-419, 2010.

WARDMAN, P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. **Free Radical Biology & Medicine**, Philadelphia, v. 43, p. 995-1022, 2007.

WITAYAPAN, N.; SONGWUT, Y.; SIRIPORN, O. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 43, p. 1095-1103, 2010.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Laboratory Investigation**, London, v. 80, p. 617-653, 2000.

WOJEIKOWSKI, K.; STEVENSON, L.; LEACH, D.; WOHLMUTH, H.; GOBE, G. Antioxidant capacity of 55 medicinal herbs traditionally used to treat the urinary system: a comparison using a sequential three-solvent extraction process. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, New Rochelle, v. 13, p. 103-109, 2007.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidants capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 12, p. 4026-4037, 2004.

XU, W.; ZHANG, F.; LUO, Y.; MA, L.; KOU, X.; HUANG, K. Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum*. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 344, p. 217-222, 2009.

YAMASHIRO, S.; NOGUCHI, K.; MATSUZAKI, T.; MIYAGI, K.; NAKASONE, J.; SAKANASHI, M. Cardioprotective effects of extracts from *Psidium guajava* L. and *Limonium wrightii*, okinawan medicinal plants, against ischemia-reperfusion injury in perfused rat hearts. **Pharmacology**, Basel, v. 67, n. 3, p. 128-135, 2003.

YANG, Y. L.; HO, Y. A.; CHENG, H. H.; LO, H. J. Distribution and susceptibility to amphotericin B and fluconazole of *Candida* spp. isolated from Taiwan. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 133, p. 325-330, 2005.

YOSHIHASHI, Y.; KITANO, H.; YONEMOCHI, E.; TERADA, K. Quantitative correlation between initial dissolution rate and heat of fusion of drug substance. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 204, p. 1-6, 2000.

YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 48, p. 27-42, 2001.

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

ZERAIK, M. L.; SERTEYN, D.; DEBY-DUPONT, G.; WAUTERS, J.-N.; TITS, M.; YARIWAKE, J. H.; ANGENOT, L.; FRANCK, T. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 128, p. 259-265, 2011.

ZHANG, W.; CHEN, B.; WANG, C.; ZHU, Q.; MO, Z. Mechanism of Quercetin as antidiarrheal agent. **Di Yi Junyi Daxue Xuebao**, Guangzhou, v. 23, n. 10, p. 1029-31, 2003.

ZHENG-FANG, H.; CHEN, L. L.; QI, J.; WANG, Y.-H.; ZHANG, H.; YU, B.-Y. Two new benzofuran derivatives with anti-inflammatory activity from *Liriope spicata* var. *prolifera*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 82, p. 190-192, 2011.

ZHONG, X.-K.; LI, D.-C.; JIANG, J.-G. Identification and quality control of Chinese medicine based on the fingerprint techniques. **Current Medicinal Chemistry**, Bussum, v. 16, p. 3064-3075, 2009.

ZYCHLINSKY, A.; WEINRAUCH, Y.; WEISS, J. Forum in immunology.introduction: forum in immunology on neutrophils. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, n. 14, p. 1289-1291, 2003.

Anexos

ANEXO A - Ofício de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP n°. 108/2011
kms

Ribeirão Preto, 21 de novembro de 2011.

À
PÓS-GRADUANDA MAURETTE DOS REIS VIEIRA FERNANDES
Orientador: Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira
Departamento de Ciências Farmacêuticas
FCFRP / USP

Prezada Professora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 97ª Sessão Ordinária, realizada em 19/10/2011, o projeto de pesquisa intitulado "PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE PRODUTOS MICROPARTICULADOS A PARTIR DA ESPÉCIE *PSIDIUM GUAJAVA L.* PELO PROCESSO SPRAY DRYING", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP n°. 238**.

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, "o TCLE *deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador*".

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Atenciosamente,

PROF.ª. DR.ª. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Via do Café, S/N - Telefone: (016) 3633-3036
Fax: (016) 3633-1092
14.040-903 - Ribeirão Preto SP. - Brasil

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Doadores para obtenção das células

Nome do projeto de pesquisa: “Padronização e avaliação biológica de produtos microparticulados a partir da espécie *Psidium guajava* L. pelo processo *spray drying*”.

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim

Pesquisador participante: Maurette dos Reis Vieira Fernandes

Prezado(a) Voluntário(a),

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar deste trabalho de pesquisa. Este projeto faz parte de um estudo desenvolvido por pesquisadores da USP-Ribeirão Preto, que procuram entender melhor o efeito de extratos vegetais sobre células do sangue.

A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento.

Por que esta pesquisa está sendo feita?

No nosso sangue existe um tipo de célula chamada neutrófilo, que age junto com outras células e proteínas para nos defender contra os microrganismos (micróbios, bactérias) que causam as infecções. Durante a ação do neutrófilo, acontece uma produção de substâncias reativas ao oxigênio que ajudam a destruir os microrganismos. No entanto, se esta produção for muito grande, os neutrófilos podem ter efeitos prejudiciais, destruindo os tecidos saudáveis. Para verificar se alguns extratos de plantas (no nosso caso a goiabeira), secos até se obter um pó no equipamento chamado *spray dryer* têm alguma ação sobre os neutrófilos, estamos testando esses extratos. Os resultados dessa pesquisa pode nos ajudar a entender como esses extratos agem no nosso organismo e também ajudar a descobrir novos produtos fitoterápicos. A planta *Psidium guajava* está na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus), justificando assim a investigação da sua atividade terapêutica.

Como será feita a pesquisa?

Após ter concordado em participar do estudo e ter assinado este documento, será coletada uma amostra de 20 mL do seu sangue para que possamos separar os neutrófilos. O sangue será

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Via do Café, S/N - Telefone: (016) 3633-3036
Fax: (016) 3633-1092
14.040-903 - Ribeirão Preto SP. - Brasil

colhido da veia do braço, do mesmo jeito que é feito na coleta para a realização de exame de sangue.

Quais são os riscos que podem ocorrer?

Os riscos que poderão ocorrer são a formação de manchas roxas, um pouco de inchaço e dor no local da picada da agulha. Esses problemas são passageiros, ou seja, desaparecem dentro de alguns dias. Portanto, os riscos são mínimos.

O que acontece se eu não aceitar participar?

Caso não queira participar, não haverá prejuízo nenhum para você. Sua participação é voluntária.

Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. O único benefício será o de auxiliar-nos a entender como esses produtos naturais agem no nosso organismo, se são benéficos ou não para a saúde, e também, possivelmente para descobrir novos medicamentos.

Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que o seu nome e de todos os participantes não serão divulgados em nenhum momento.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com a Professora Dra. Yara Maria Lucisano Valim pelo telefone: (16) 3602-4212.

Eu, _____,
autorizo a retirada de 20 mL de sangue periférico para a realização de pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano à minha saúde, que a finalidade dessa pesquisa é ajudar a entender como extratos obtidos de plantas agem no nosso organismo e também ajudar a descobrir novos medicamentos, e que minha identidade será sempre mantida em sigilo.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do Voluntário e RG

Assinatura do Pesquisador