UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo da extração e secagem por *spray dryer* das cascas de
Endopleura uchi (Huber) Cuatrec. Humiriaceae**

Luciana Alves Tacon

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo da extração e secagem por *spray dryer* das cascas de
Endopleura uchi (Huber) Cuatrec. Humiriaceae**

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientado(a): Luciana Alves Tacon

Orientador(a): Prof. Dr. Luis Alexandre
Pedro de Freitas

Ribeirão Preto
2012

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.

Tacon, Luciana Alves

Estudo da extração e secagem por *spray dryer* das cascas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. Humiriaceae. Ribeirão Preto, 2012.
106p.; 30cm.

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

Orientador: Freitas, Luis Alexandre Pedro.

1. Bergenina. 2. Secagem. 3. Uxi. 4. Maceração. 5. Ultrassom

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Alves Tacon

Estudo da extração e secagem por *spray dryer* das cascas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. Humiriaceae

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador(a): Luis Alexandre Pedro de Freitas

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus queridos e amados pais: Sebastiana e Vitor, por todo o amor, dedicação, ensinamentos e esforços. Sem eles nada disso seria possível.

Agradecimentos

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a DEUS, por iluminar meu caminho e colocar pessoas tão maravilhosas em minha vida.

A meus pais: Vitor e Sebastiana, por me apoiarem, pelo amor, pela dedicação, pela educação, pelo carinho e apoio e por estarem comigo sempre. Sem eles nada disso seria possível.

Ao Prof. Dr Luis Alexandre, meu grande e querido orientador, obrigada por todos estes anos de convivência, pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade e por me ensinar ter paciência. Aprendi muito não só questões e conceitos técnicos, mas lições de vida. Depois de tanto tempo o considero como um segundo pai, muito obrigada.

Aos meus grandes e queridos amigos de laboratório: Ana Rita, Bia, Marcela, Silvia Simone, Wellington. Obrigada de coração por me ajudarem sempre que precisava, pelo carinho, pela amizade e por todos os momentos que vivemos. Cada um de vocês tem um lugar muito especial em meu coração.

Ao meu amigo de laboratório Rodrigo, obrigada pela paciência, pela amizade, pelos seus conselhos, pelas discussões sempre tão proveitosas e cheias de ensinamentos. Obrigada mesmo.

Ao Cenzi, que sempre que precisava estava disposto a me ajudar. Obrigada também por sua amizade e pela convivência.

A professora doutora Maria José Vieira Fonseca, por disponibilizar seu laboratório para realização de ensaios de cromatografia.

Ao professor doutor Jairo Kenupp Bastos por me ajudar no início deste mestrado, e por disponibilizar seu laboratório para realização de experimentos.

A professora doutora Regina Celia Candido e a Joseane Cristina Ferreira pela realização dos ensaios de atividade antimicrobiana e pela paciência.

A professora doutora Maria José Vieira Fonseca, ao professor doutor Jairo Kenupp Bastos e a doutora Cláudia Regina Fernandes Souza pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

Aos técnicos de laboratório: Jabor, José Orestes, Henrique, Mario pelo auxílio no desenvolvimento de experimentos ao longo do mestrado. Obrigada também pela paciência que sempre tiveram comigo.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação da FCFRP-USP pela dedicação, paciência e pelos esforços prestados.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido.

Aos meus amigos-irmãos César e Clévia por dividirem comigo os momentos de alegria e tristeza; pela nossa grande amizade e por estarem comigo sempre, enfim pela família que formamos.

Ao meu lindo cachorro Huly por estar comigo sempre e todas as vezes que precisava, ficava do meu lado e fazia cara de quem estava entendendo tudo. Obrigada pelo amor e carinho. Ao Petit, por me ajudar nesta reta final, me distraindo e pelo carinho.

A toda minha família, tias, tios, primos, primas e minha avó por me incentivarem e apoiarem sempre.

Ao meu amor Eduardo, pelo carinho, paciência, amizade, amor e compreensão. Obrigada por estar ao meu lado.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho:

Muito Obrigada!

“O amor e o desejo são as asas do espírito das grandes façanhas.”

Johann Goethe

RESUMO

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

O Brasil possui uma biodiversidade em flora muito grande e uma das plantas brasileiras que tem despertado muito interesse e tem sido alvo de muitos estudos é a *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, Humiriaceae. Esta espécie é originária da Amazônia Brasileira e é muito utilizada popularmente para o tratamento de afecções do trato genito-urinário feminino e como anti-inflamatório. Acredita-se que suas ações sejam devidas a seu principal ativo constituinte a bergenina. Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar diferentes técnicas de extração das cascas de *Endopleura uchi*, bem como avaliar o processo de secagem do extrato, utilizando a técnica por *spray dryer*. Para isso foram realizados estudos de extração aplicando as técnicas de maceração dinâmica e ultrassom. Foi realizada a caracterização destes extratos (análise do teor de sólidos, atividade antioxidante, teor de fenóis e de bergenina), a fim de obter aquele com as características mais desejadas para dar seguimento ao processo de secagem por *spray dryer*. Estas análises foram feitas com auxílio da técnica funções de desejabilidade. As partículas secas obtidas foram submetidas as análises de quantificação do marcador, avaliação da atividade antioxidante, do teor de fenóis e estudo das características farmacotécnicas, tais como: umidade, densidade aparente, compactada, ângulo de repouso, tamanho médio de partícula. Além disso, a morfologia das partículas obtidas foi analisada com auxílio da microscopia eletrônica de varredura. Em seguida, após uma série de avaliações utilizando ferramentas estatísticas, escolheu-se um extrato para estudo de possível atividade antimicrobiana contra micro-organismos do gênero *Candida*. Os resultados obtidos para a caracterização dos processos extrativos mostraram que o teor de sólidos chegou até a 5,11%, a atividade antioxidante teve sua IC₅₀ variando de 2,0 a 6,0 µg/mL, e o teor de fenóis variou de 26 a 47%. Também foram encontrados altos teores de bergenina, na faixa de 31 a 38%. Além disso, seu rendimento chegou a 4,0% com relação à quantidade de planta. Já com relação ao processo de secagem, obteve-se altos valores de rendimento (50 a 72%), sendo que a temperatura foi o fator que mais influenciou. O ângulo de repouso variou de 26 a 39°, conferindo fluxos excelentes a aceitáveis. O tamanho de partícula teve uma grande variação de 76 a 306 µm. As partículas mostraram-se com formato bem esférico e algumas com uma superfície mais rugosa. Os extratos apresentaram inibição no crescimento sobre diferentes gêneros de *Candida* avaliados. Contudo, os fatores escolhidos influenciaram bastante nas características dos extratos. As extrações realizadas comprovaram o alto teor de fenóis e a alta atividade antioxidante de *Endopleura uchi*. E o processo de secagem nas condições estudadas não interferiu nas atividades biológicas da planta mostrando-se promissora como antioxidante e como um possível antimicrobiano.

Palavras-chave: bergenina, secagem, uxi, maceração, ultrassom

ABSTRACT

TACON, L. A. **Extraction and spray drying studies of *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. Humiriaceae barks.** 2012. 106p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Brazil has one of the world's largest biodiversity in flora and a plant that has attracted attention is the *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, Humiriaceae, which is native of the Brazilian Amazon. This specie is utilized in treatment of the affections of feminine tract genito urinary and such as anti-inflammatory. It is believed that their actions are deriving from the major constituent, the bergenin. Thus, the objective of this work was to study different extraction techniques and the best conditions for drying uchi extracts in a spray dryer. For this extraction studies were chosen as being extractive processes: the dynamic maceration and ultrasound. It's realized the extracts characterization (solid content analyze, antioxidant activity; phenols content and bergenin content), for the achievement characteristics more desirables for drying in spray dryer. The analyzes were performed with desirability functions assistant. After realized this process, the dried particles obtained were submitted the analyzes of the marker quantification, evaluation antioxidant activity, solid contents and study pharmacotechnical characteristics such as moisture, bulk and tapped densities, repose angle, the mean particle size. The morphology of the particles was analyzed with scanning electron microscopy. After various analyzes utilizing statistics tools, was determined the best extract for study of the possible antimicrobial activity adversely microorganisms of *Candida* species. The results obtained for the extractive process characterization showed a solid content of the 5,11%, the antioxidant activity (IC₅₀) ranged from 2.0 to 6.0 µg/mL, the phenols content ranged from 36 to 47%. Achieve elevated bergenin content ranged from 31 to 38%. The bergenin yields amounted to 4.0% in relationship the plant quantity. In drying process, the values for yield were high (50 to 72%) and temperature was the parameter that more influenced. The repose angle ranged from 26 to 39°, conferring excellent to acceptable flow. The mean particle size had a bigger variation, ranged from 76 to 306 µm. The particles showed spherical format and some of them with irregular surface. The extracts presented inhibition in growth of the different species *Candida* evaluated. However, the chosen factors significantly affect the characteristics of the extract. The extractions indicated the high phenols content and high antioxidant activity of the *Endopleura uchi*. And the drying process, in studies conditions, did not interfere in biological activities of the plant. Thus, *Endopleura uchi* showed how good antioxidant and a possible antimicrobial.

Keywords: bergenin, drying, uxi, maceration, ultrasound.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. <i>Endopleura uchi</i> . (Fonte: (CARVALHO et al., 2007)).....	24
Figura 2.2. Folha de <i>Endopleura uchi</i> (Fonte: (CARVALHO; MULLER; BENCHIMOL, 2007)).....	25
Figura 2.3. Flores de <i>Endopleura uchi</i> (Fonte: (CARVALHO; MULLER; BENCHIMOL, 2007)).....	25
Figura 2.4. Frutos de Uxi.....	26
Figura 2.5. Estrutura química da bergenina.....	27
Figura 2.6. Esquema <i>spray dryer</i>	30
Figura 2.7. Esquema da redução da molécula de DPPH.....	35
Figura 2.8. Exemplos de classes de polifenóis.....	36
Figura 2.9. Desenho esquemático dos pontos do planejamento Box Behnken.....	40
Figura 2.10. Desenho esquemático da distribuição dos níveis e dos fatores.....	41
Figura 2.11. Tipos de função de desejabilidade.....	42
Figura 2.12. Formatos das funções de desejabilidade (Adaptado de COLOMBARI, 2004).....	43
Figura 4.1. Esquema do processo extrativo de maceração dinâmica.....	48
Figura 4.2. Sonicador utilizado para extração (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil).....	49
Figura 4.3. Mini Spray Dryer MSD 0.5 (Labmaq do Brasil, Ltda).....	53
Figura 4.4. Esquema da placa de microdiluição.....	58
Figura 5.1. Distribuição granulométrica do material cominuído de <i>Endopleura uchi</i>	60
Figura 5.2. Curva padrão de bergenina para o método por CLAE.....	62
Figura 5.3. Cromatograma do padrão bergenina em diferentes concentrações. a) 25; b) 50; c) 100; d) 200; e) 400 µg/mL.....	63
Figura 5.4. Cromatograma de um extrato obtido por maceração dinâmica.....	64
Figura 5.5. Cromatograma de um extrato obtido por ultrassom.....	65
Figura 5.6. Gráfico de superfície resposta do teor de sólidos em função do tempo e da % de planta. a) Maceração dinâmica; b) Ultrassom.....	66
Figura 5.7. Gráfico de superfície resposta da IC ₅₀ em função da temperatura e do tempo – Maceração dinâmica.....	68
Figura 5.8. Processo de ultrassom. Gráfico de superfície resposta do teor de fenóis em função do tempo e da potência.....	69

Figura 5.9. Processo de ultrassom. Gráfico de superfície resposta do teor de fenóis em função da potência e da % de planta.....	70
Figura 5.10. Gráfico de superfície resposta do teor de bergenina em função do tempo e da % de planta. a) Maceração dinâmica; b) Ultrassom	72
Figura 5.11. Gráfico de superfície resposta do rendimento de bergenina em função do tempo e da % de planta. a) Maceração dinâmica; b) Ultrassom.....	73
Figura 5.12. Gráfico de superfície resposta do rendimento em função da temperatura e da % de aditivo.....	78
Figura 5.13. Gráfico de superfície resposta da IC ₅₀ em função da temperatura e da % de Aditivo.....	79
Figura 5.14. Gráfico de superfície resposta do TF em função da temperatura e da % de Aditivo.....	80
Figura 5.15. Gráfico de superfície resposta da da em função da temperatura e da % de Aditivo.....	85
Figura 5.16. Gráfico de superfície resposta da dc em função da temperatura e da % de Aditivo.....	86
Figura 5.17. Gráfico de superfície resposta do FH em função da temperatura e da % de Aditivo.....	87
Figura 5.18. Gráfico de superfície resposta do IC em função da temperatura e da % de Aditivo.....	88
Figura 5.19. Gráfico de superfície resposta do AR em função da temperatura e da % de Aditivo.....	90
Figura 5.20. Gráfico de superfície resposta do D ₅₀ em função da temperatura e da % de Aditivo.....	91
Figura 5.21. Fotomicrografia do pó liofilizado a) Aumento de 1000. b) Aumento de 5000.....	92
Figura 5.22. Fotomicrografia do extrato seco por <i>spray drying</i> sem nenhum aditivo. a) Aumento de 1000. b) Aumento de 5000. c) Aumento de 10000.....	93
Figura 5.23. Fotomicrografia do pó do experimento 4. a) Aumento de 1000. b) Aumento de 5000. c) Aumento de 10000.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Planejamento fatorial para a maceração dinâmica.....	48
Tabela 4.2. Fatores estudados e seus níveis para a maceração dinâmica.....	49
Tabela 4.3. Planejamento fatorial para a extração com ultrassom.....	50
Tabela 4.4. Fatores estudados e seus níveis para o processo de ultrassom.....	50
Tabela 4.5. Parâmetros do processo de secagem por <i>spray dryer</i>	53
Tabela 4.6. Planejamento fatorial para o processo de secagem.....	54
Tabela 4.7. Fatores estudados e seus níveis para o processo de secagem.....	54
Tabela 5.1. Caracterização dos extratos obtidos por maceração dinâmica.....	61
Tabela 5.2. Caracterização dos extratos obtidos por ultrassom.....	61
Tabela 5.3. Análise estatística do TS – Maceração dinâmica.....	65
Tabela 5.4. Análise estatística do TS – Ultrassom.....	66
Tabela 5.5. Análise estatística da IC ₅₀ – Maceração dinâmica.....	67
Tabela 5.6. Análise estatística da IC ₅₀ – Ultrassom.....	67
Tabela 5.7. Análise estatística do TF – Maceração dinâmica.....	69
Tabela 5.8. Análise estatística do TF – Ultrassom.....	69
Tabela 5.9. Análise estatística do teor de bergenina – Maceração dinâmica.....	71
Tabela 5.10. Análise estatística do teor de bergenina – Ultrassom.....	71
Tabela 5.11. Análise estatística do rendimento de bergenina – Maceração dinâmica.....	71
Tabela 5.12. Análise estatística do rendimento de bergenina – Ultrassom.....	71
Tabela 5.13. Resultados das análises de otimização.....	74
Tabela 5.14. Resultados das análises de otimização – respostas escolhidas.....	75
Tabela 5.15. Comparação dos resultados reais e preditos.....	75
Tabela 5.16. Valores dos rendimentos do processo de secagem.....	76
Tabela 5.17. Caracterização dos extratos obtidos no processo de secagem...	77
Tabela 5.18. Análise estatística do rendimento do processo de secagem.....	78
Tabela 5.19. Análise estatística da IC ₅₀ dos pós obtidos pelo processo de secagem.....	79
Tabela 5.20. Análise estatística do teor de fenóis dos pós obtidos pelo processo de secagem.....	80
Tabela 5.21. Análise estatística do teor de bergenina dos pós obtidos pelo processo de secagem.....	81
Tabela 5.22. Análise estatística do rendimento de bergenina dos pós obtidos pelo processo de secagem.....	81

Tabela 5.23. Características farmacotécnicas dos pós obtidos.....	82
Tabela 5.24. Análise estatística do teor de umidade dos pós obtidos pelo processo de secagem.....	82
Tabela 5.25. Fluxo de pós relacionado ao FH e IC.....	84
Tabela 5.26. Análise estatística da densidade aparente dos pós obtidos pelo processo de secagem.....	84
Tabela 5.27. Análise estatística da densidade compactada dos pós obtidos pelo processo de secagem.....	85
Tabela 5.28. Análise estatística do FH dos pós obtidos pelo processo de secagem.....	86
Tabela 5.29. Análise estatística do IC dos pós obtidos pelo processo de secagem.....	87
Tabela 5.30. Classificação do fluxo do pó baseado no ângulo de repouso....	89
Tabela 5.31. Análise estatística do teor de umidade dos pós obtidos pelo processo de secagem.....	89
Tabela 5.32. Análise estatística do tamanho médio de partícula, D_{50} , dos pós obtidos pelo processo de secagem.....	90
Tabela 5.33. CIM para as diferentes amostras analisadas.....	95
Tabela 5.34. CFM para as diferentes amostras analisadas.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
AR	Ângulo de repouso
Ca	<i>Candida albicans</i>
CFM	Concentração fungicida mínima
Cg	<i>Candida glabrata</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
Ck	<i>Candida krusei</i>
Cp	<i>Candida parapsilosis</i>
Ct	<i>Candida tropicalis</i>
IT	Índice de Intumescência
D ₅₀	Tamanho médio de partículas
da	Densidade aparente
dc	Densidade compactada
DPPH	2,2-difenilpicrilhidrazil
FH	Fator de Hausner
IC	Índice de Carr
RB	Rendimento de bergenina
TB	Teor de bergenina
TF	Teor de fenóis
TS	Teor de sólidos
TU	Teor de umidade

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VII
1 – INTRODUÇÃO	19
2 – REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 - <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.	23
2.1.1 – Descrição da planta	24
2.1.2 – Importância de <i>Endopleura uchi</i>	26
2.2 - Bergenina	27
2.3 - Secagem	29
2.3.1 - Secagem por <i>spray dryer</i>	29
2.4 - Métodos extrativos	32
2.5 - Atividade Antioxidante	34
2.6 - Fenóis	36
2.7 - Atividade antimicrobiana	37
2.7.1 - Atividade antimicrobiana sobre o gênero <i>Candida</i>	38
2.8 - Planejamentos experimentais e otimização por funções de desejabilidade	39
2.8.1 - Desejabilidade	41
3 – OBJETIVOS	45
3.1 - Objetivos gerais	45
3.2 - Objetivos específicos	45
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 - Obtenção do material vegetal	47
4.2 - Distribuição granulométrica	47
4.3 - Determinação do Índice de Intumescência (IT)	47
4.4 - Estudo dos processos extrativos	47
4.4.1 - Maceração dinâmica	47
4.4.2 - Ultrassom	49
4.5 - Caracterização dos extratos	50
4.5.1 - Teor de sólidos (TS)	50
4.5.2 - Atividade antioxidante	51
4.5.3 - Análise de fenóis	51
4.5.4 - Análise de Bergenina	52
4.6 - Otimização da extração por características dos extratos	52
4.7 - Processo de secagem em <i>spray dryer</i>	52
4.7.1 - Rendimento do processo	54

4.8 - Análise das características do produto seco	54
4.8.1 - Umidade	55
4.8.2 - Densidade aparente (<i>da</i>)	55
4.8.3 - Densidade compactada (<i>dc</i>)	55
4.8.4 - Determinação do Fator de Hausner (FH) e índice de Carr (IC)	55
4.8.5 - Determinação do ângulo de repouso (AR)	56
4.8.6 - Tamanho das partículas (D_{50})	56
4.9 - Morfologia das partículas obtidas	56
4.10 - Atividade antimicrobiana	57
4.10.1 - Teste da microdiluição em caldo para determinação de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).	57
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 - Distribuição granulométrica	60
5.2 - Índice de Intumescência	60
5.3 - Caracterização dos extratos	60
5.4 - Análise estatística - Processos extrativos	65
5.4.1 - Teor de sólidos (TS)	65
5.4.2 - Atividade antioxidante (AA)	67
5.4.3 - Teor de Fenóis (TF)	68
5.4.4 - Análise de Bergenina	71
5.5 - Otimização da extração baseado nas características dos extratos	73
5.6 - Secagem em <i>spray dryer</i>	76
5.7 - Caracterização do extrato seco	76
5.8 - Análise estatística - pós obtidos na secagem	77
5.8.1 - Rendimento (R)	77
5.8.2 - Atividade Antioxidante (AA)	79
5.8.3 - Teor de Fenóis	80
5.8.4 - Análises de bergenina	81
5.9 - Caracterização farmacotécnica do pó	81
5.9.1 - Teor de Umidade (TU)	82
5.9.2 - Análise do fluxo dos pós	83
5.9.3 - Ângulo de Repouso (AR)	88
5.9.4 - Tamanho das partículas	90
5.10 - Morfologia das Partículas	92
5.11 - Atividade antimicrobiana	95
6 - CONCLUSÕES	99
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

Introdução

1 – INTRODUÇÃO

O uso de plantas para tratar e curar patologias é muito antigo. A busca de espécies de vegetais que propiciasse o bem estar sempre atraiu o ser humano. A pesquisa de plantas seja para a parte nutricional, assim como para o tratamento de doenças datam de muito antes de Cristo, e várias civilizações deixaram manuscritos que descreviam a utilização de ervas para o tratamento de males (POLITI, 2009).

No entanto, esta busca ávida pode representar certos perigos, principalmente o modismo dos últimos anos que traz o conceito de que o uso de plantas medicinais é intrinsecamente seguro, baseado no fato de que as pessoas sempre as usaram. Porém, a ciência demonstra que toda planta é uma mistura de compostos e classes bioquímicas que podem causar interações e respostas complexas e algumas vezes desconhecidas, proporcionando muitas vezes graves intoxicações ou até mesmo a morte. Por isso é de suma importância a pesquisa e análise científica sobre as possíveis atividades terapêuticas ou tóxicas das plantas, principalmente as que possuem grande alcance popular (VEIGA JÚNIOR, 2008).

O Brasil possui uma biodiversidade em flora muito grande e uma boa parte desta é muito pouco conhecida ou estudada para fins medicinais. O uso de plantas se baseia na cultura popular, assim são extremamente raras plantas nativas brasileiras que foram transformadas em fitoterápicos e posteriormente comercializadas. Por isso o estudo e avaliação de espécies nativas brasileiras se fazem necessários, para que o Brasil possa ocupar um lugar de destaque no mercado mundial de fitoterápicos (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Uma das plantas brasileiras que tem despertado muito interesse, pois é alvo de vários estudos e pode possivelmente tornar-se um medicamento fitoterápico é a *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, Humiriaceae. Esta espécie é originária da Amazônia Brasileira, está dispersa por toda a bacia amazônica; sendo conhecida popularmente como uxi, uxi-amarelo, uchi e uchi-pucu, dentre outras sinonímias (SCHULTES, 1979).

Há poucos estudos relacionados à *Endopleura uchi* e dentre estes, a maioria se concentra no fruto, alimento bastante apreciado e consumido pela população local (NUNOMURA et al., 2009).

Os frutos de uchi são uma fonte muito rica em ácidos graxos, fibras, esteróides, sais minerais, vitaminas C e E, e são considerados muito importantes tanto economicamente como nutricionalmente para os habitantes da região

amazônica. (MAGALHÃES et al., 2007). Foram identificados 42 componentes no fruto de uxi, sendo os majoritários 3,3-dimetil-2-butanol (18,8%) e eugenol (14 %), além de possuir uma grande quantidade de carotenos. Dentre os ácidos graxos, foram encontrados em maior quantidade o ácido oléico (7,38%) e o ácido palmítico (3,78%) (MARX et al., 2002).

Popularmente, utiliza-se a casca da árvore de uxi no controle de colesterol, diabetes, artrite e como anti-inflamatório (CORREIA, 1984). Tradicionalmente na região da bacia amazônica, o chá da casca de *Endopleura uchi*, tem sido empregado para o tratamento de miomas uterinos e afecções do trato genito urinário feminino.

Acredita-se que o principal ativo constituinte desta planta é a bergenina, um C-glicosídeo do 4-O-metil ácido gálico, encontrada tanto no fruto como nas cascas de *Endopleura uchi* (MAGALHÃES et al., 2007; NUNOMURA et al., 2009). A literatura demonstra várias atividades biológicas atribuídas a este glicosídeo: atividade antiinflamatória (NUNOMURA, et al, 2009); antihepatotóxica (KIM, et al., 2000); antifúngica (PRITHIVIRAJ et al., 1997).

Em muitas preparações farmacêuticas e cosméticas, e inclusive nos fitoterápicos, o uso de extratos secos de plantas facilita a incorporação do princípio ativo, e pode possibilitar a preparação de formas farmacêuticas, como comprimidos e cápsulas (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR., 2000). Muitas plantas medicinais são exportadas na forma bruta, e depois importadas na forma de extratos secos padronizados, os quais possuem um valor agregado muito maior.

A secagem está muito ligada na obtenção de produtos para consumo humano, produtos alimentícios, cosméticos e principalmente farmacêuticos, pois, de maneira geral, confere maior estabilidade ao material, além de diminuir o crescimento de microrganismos, assim como a degradação física e química das substâncias. Isto porque os produtos secos possuem baixa ou nenhuma atividade de água, o que diminui o risco de contaminação. Ademais, o material em forma de pó muitas vezes ocupa um menor volume, o que muitas vezes acaba sendo uma grande vantagem, pois diminui o espaço físico para armazenamento e transporte (MASTERS, 1991).

Com relação à secagem de plantas uma das técnicas mais empregadas é a secagem por *spray dryer*, esta técnica teve seu surgimento por volta da metade do século 18; foi patenteada em 1865 com a secagem de ovos e começou a ganhar

aplicações industriais em 1920, com a obtenção de sabão em pó e leite bovino em pó. A partir deste momento, disseminou-se para diferentes áreas industriais e atualmente é muito aplicada nas áreas química; alimentícia e farmacêutica. Na área de produtos naturais, está crescendo cada vez mais (MASTERS, 1991; FREITAS et al., 2010).

Diante da importância do estudo de processos extrativos no desenvolvimento de fitoterápicos e o grande potencial que *Endopleura uchi* tem apresentado, o objetivo do trabalho foi estudar técnicas de extração desta planta a fim de escolher o melhor extrato para secagem.

Como processos extrativos, optou-se pelo estudo da maceração dinâmica e pelo ultrassom, técnicas consideradas simples e eficientes. Após a análise destes processos com o auxílio da ferramenta desejabilidade, escolheu-se o melhor extrato para iniciar o processo de secagem. Esta foi realizada pela técnica de *spray drying*, devido a suas grandes vantagens, como por exemplo, a rapidez e a versatilidade.

Ao término da secagem, o pó obtido foi caracterizado e apresentou características farmacotécnicas apropriadas mantendo as atividades farmacológicas da planta *Endopleura uchi*. Além disso, estes extratos secos mostraram ação no crescimento de gêneros de *Candida*, inibindo o crescimento das leveduras em diferentes concentrações dos extratos. Desta forma, a planta *Endopleura uchi* pode ser considerada como um possível antimicrobiano e possui um grande potencial para um futuro fitoterápico.

Revisão de literatura

2 – REVISÃO DE LITERATURA

A seguir será apresentada uma revisão a respeito da planta *Endopleura uchi*, assim como a importância da técnica de secagem, principalmente por *spray dryer*, além de temas relevantes para o desenvolvimento deste trabalho, como o estudo das atividades antioxidante e antimicrobiana, métodos extrativos, tendo como destaque a maceração dinâmica e o ultrassom e a utilização de ferramentas estatísticas, para facilitar a análise e o delineamento de ensaios.

2.1 - *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.

Endopleura uchi é uma espécie nativa da Amazônia Brasileira de grande utilização pelos habitantes desta região. Tanto o fruto como a madeira são bastante utilizados. A espécie está praticamente dispersa em todos os estados da região com maior distribuição e frequência nos estados do Pará e Amazonas (CARVALHO; MULLER; BENCHIMOL, 2007).

O fruto é muito conhecido e consumido na Amazônia Brasileira, no entanto é quase que completamente desconhecido nas outras regiões do Brasil. Pode ser consumido como fruta fresca ou na forma de doces.

A madeira é utilizada na construção civil e naval para fabricação de laminados (SOUZA; MAGLIANO; CAMARGOS, 1997).

Existem várias denominações comuns para a espécie: uxi, uxi-liso, uxi verdadeiro, uxi-amarelo, uxi-pucu, pururu, cumate. O uxi pertence a família Humiriaceae, que por sua vez engloba aproximadamente 49 espécies distribuídas em oito gêneros: *Duckesia*, *Endopleura*, *Hylocarpa*, *Humiria*, *Humirastrum*, *Sacoglottis*, *Shistostemon* e *Vantanea* (CUATRECASAS, 1961).

O botânico Jacques E. Huber foi quem primeiro classificou o uxizeiro, em 1898, como *Sacoglottis uchi*. No entanto, em 1961, o botânico José Cuatrecasas que tinha estudado profundamente a família Humiriaceae verificou grandes diferenças entre o uxi e o gênero *Sacoglottis*, assim criou o gênero *Endopleura* e propôs uma nova nomenclatura: *Endopleura uchi*, que vigora até o momento.

A palavra “endopleura” é de origem grega “endon” (dentro) e “pleuron” (costela). Esta palavra foi escolhida pelo fato de as sementes do uxi estarem contidas no endocarpo em estruturas semelhantes a costelas (CARVALHO; MULLER; BENCHIMOL, 2007).

2.1.1 – Descrição da planta

Endopleura uchi (Huber) Cuatrec. É uma árvore de médio a grande porte (Figura 2.1). que pode chegar até 30 m de altura, em indivíduos bem desenvolvidos. Em média, sua altura fica em torno de 25 m.

O tronco do uxizeiro possui casca espessa, é reto, cilíndrico, apresenta uma madeira avermelhada e pode ter até 1 m de diâmetro.

Figura 2.1: *Endopleura uchi*. (Fonte: (CARVALHO; MULLER; BENCHIMOL, 2007))

As folhas desta espécie são simples, coriáceas, elíptico-oblongas, alternas, possuem margens serrilhadas e ápice acuminado. Quando jovens apresentam cor avermelhada e quando estão maduras possuem coloração verde escuro. (Figura 2.2).

Figura 2.2: Folha de *Endopleura uchi* (Fonte: (CARVALHO; MULLER; BENCHIMOL, 2007))

A Figura 2.2 mostra as diferentes colorações da folha de uxi considerando a sua idade e em detalhe a margem serrilhada da folha.

As flores são pequenas, com coloração branco-esverdeadas, apresentam aroma levemente perfumado, possuem cinco sépalas e cinco pétalas. São hermafroditas, o androceu é constituído em média por 25 estames. O ovário é glabro e subgloboso; o estigma é lobulado e está praticamente no mesmo plano das anteras. (Figura 2.3)

Figura 2.3: Flores de *Endopleura uchi* (Fonte: (CARVALHO; MULLER; BENCHIMOL, 2007))

Os frutos de uxi podem ser considerados como drupa elipsóideia, possuem o epicarpo liso de coloração verde nos frutos jovens e amarelo nos frutos mais maduros. O mesocarpo é de coloração amarelo-clara, possui aspecto carnosos farináceo, tem aroma agradável, é rico em óleo. Na Figura 2.4 pode-se verificar uma fotografia dos frutos de uxi.

Os caroços de uxi são bastante duros, possuem aspecto liso devido ao tecido compacto e fibroso (CARVALHO; MULLER; BENCHIMOL, 2007).

2.1.2 – Importância de *Endopleura uchi*

Os habitantes da região, como dito anteriormente, utilizam bastante as diferentes partes de *Endopleura uchi*, os frutos, por exemplo, possuem grande importância nutricional assim como econômica. Eles são ricos em ácidos graxos, fibras, esteróides, sais minerais, vitaminas C e E (MAGALHÃES et al., 2007). Foram identificados 42 componentes no fruto de uxi, sendo os majoritários 3,3-dimetil-2-butanol (18,8%) e eugenol (14 %), além de possuir uma grande quantidade de carotenos. Dentre os ácidos graxos, foram encontrados em maior quantidade o ácido oléico (7,38%) e o ácido palmítico (3,78%) (MARX et al., 2002). Devido a grande riqueza nutricional, os habitantes da região o utilizam na produção de doces, sucos, cremes e sorvetes, desta maneira constituem uma fonte de renda para os moradores da Amazônia Brasileira.

Figura 2.4: Frutos de Uxi

Os caroços de uxi também servem como fonte de renda, uma vez que são empregados na fabricação de artesanatos, como pequenas peças de decoração e bijouterias (anéis, colares, brincos) (CARVALHO; MULLER; BENCHIMOL, 2007).

A madeira do uxizeiro é usada na construção civil e naval para fabricação de laminados (SOUZA; MAGLIANO; CAMARGOS, 1997). Ela pode ser enquadrada no grupo de madeiras pesadas com uma alta densidade 800 kg/m³.

Atualmente, a casca de uxi está sendo bastante empregada com finalidades terapêuticas, principalmente, pelos habitantes da região. O chá da casca de uxi é utilizado no tratamento de afecções do trato genito urinário feminino e no tratamento de tumores uterinos benignos; além de ser muito usado como anti-inflamatório. No entanto, existem poucos estudos científicos relacionados (CARVALHO; MULLER; BENCHIMOL, 2007).

Assim, *Endopleura uchi*, é uma planta que merece destaque, pois além de já possuir uma grande importância econômica e nutricional para os habitantes da região da Amazônia brasileira, ela pode vir a ter aplicação como medicamento fitoterápico. Para isto, estudos devem ser realizados a fim de se obter comprovações científicas, relevantes e seguras para a indicação do tratamento das diferentes afecções, nas quais o uxi já é empregado popularmente.

2.2 - Bergenina

A bergenina é um dos principais constituintes de *Endopleura uchi*, sua estrutura química pode ser visualizada na Figura 2.5. Ela é um C-glicosídeo do 4-O-metil ácido gálico, encontrada tanto no fruto como nas cascas de *Endopleura uchi* (MAGALHÃES et al., 2007; NUNOMURA et al., 2009). A bergenina é uma molécula presente em vários gêneros, além do gênero *Endopleura*, ela é encontrada no *Bergenia*, *Ardisia*, *Mallotus*, entre outros.

Figura 2.5: Estrutura química da bergenina

A literatura demonstra várias atividades biológicas atribuídas a este glicosídeo. Nunomura et al; (2009) caracterizaram a bergenina e analisaram sua ação sobre três enzimas muito importantes no descobrimento de novos fármacos anti-inflamatórios, as enzimas ciclooxigenases, COX-1, COX-2 e fosfolipase A₂. A bergenina conseguiu inibir seletivamente COX-2 com um IC₅₀ de 1,2 µmol/L, demonstrando ser possivelmente a responsável pela atividade anti-inflamatória dos chás das cascas de *Endopleura uchi* usados popularmente.

A bergenina encontrada também na espécie *Mallotus japonicus* demonstrou atividade anti-hepatotóxica, em ensaios utilizando tetracloreto de carbono para induzir citotoxicidade em hepatócitos. O uso de bergenina aumentou as atividades das enzimas glutathione S-transferase e glutathione redutase; que são importantes enzimas sintetizadas no fígado; e possuem atividade antioxidante, contribuindo para redução dos radicais livres e também são importantes na metabolização de xenobióticos (desintoxicação) (KIM et al., 2000).

Em estudo com extratos de seis espécies de *Ardisia* (*A. japonica*, *A. escallonioides*, *A. mamillata*, *A. compressa*, *A. crenata*, e *A. elliptica*); a bergenina, molécula do gênero *Ardisia* mostrou-se eficaz no efeito antiproliferativo contra as células HepG2 (células de hepatoma humano), mostrando o potencial quimiopreventivo e quimioterápico destes extratos (NEWELL et al., 2010).

A bergenina e a norbergenina extraídas da espécie de *Ardisia japonica* mostraram uma moderada atividade anti-HIV *in vitro* (PIACENTE et al., 1996).

Outra atividade importante conferida à bergenina é a antimicrobiana, ela mostrou-se bastante eficiente na inibição de crescimento de microrganismos, principalmente leveduras do gênero *Candida* (SILVA et al., 2009).

Muitos novos candidatos a fármacos possuem problemas na sua farmacocinética ou por serem mal distribuídos ou por não possuírem características adequadas de solubilidade. Como a bergenina tem mostrado importantes atividades, a literatura mostra ensaios com a determinação dos parâmetros farmacocinéticos da bergenina. Num ensaio feito com uma única administração intravenosa em ratos, determinou-se diferentes parâmetros relacionados a farmacocinética da bergenina: o volume de distribuição central encontrado foi de 0,67L/Kg; já o periférico foi de 11,35L/kg, o que indica uma ampla distribuição da bergenina em ratos, sua meia vida foi de 4,13 h; mostrando uma velocidade moderada de eliminação (SHI; SHI; MENG, 2006).

Num estudo de farmacocinética da bergenina com humanos, após uma administração oral de 250 mg de bergenina encontrou-se uma concentração plasmática máxima de $66,6 \pm 22,1$ ng/mL e uma meia vida de $3,7 \pm 2,4$ h mostrando também uma velocidade moderada de eliminação. Por ser uma administração oral há certa degradação da bergenina e, além disso, por se tratar de humanos existe uma variabilidade inter-indivíduo aumentando assim os desvios-padrões dos resultados (GU et al., 2009).

2.3 - Secagem

A secagem está muito ligada na obtenção de produtos para consumo humano, produtos alimentícios, cosméticos e principalmente farmacêuticos, pois, de maneira geral, confere maior estabilidade ao material, além de diminuir o crescimento de microrganismos, assim como a degradação física e química das substâncias. Isto porque os produtos secos possuem baixa ou nenhuma atividade de água, o que diminui o risco de contaminação. Ademais, o material em forma de pó muitas vezes ocupa um menor volume, o que acaba sendo uma grande vantagem, pois diminui o espaço físico para armazenamento e transporte (MASTERS, 1991; AULTON, 2005).

2.3.1 - Secagem por *spray dryer*

A técnica de secagem por *spray dryer* é uma das mais versáteis para transformação dos produtos em pó. Ela teve seu início na metade do século XVIII com um processo de pulverização e aquecimento para a secagem de ovos. Logo após, aproximadamente em 1920, disseminou-se para nível industrial com a secagem de leite e sabão em pó. Depois foi utilizada em diferentes tipos de indústria como a química, alimentícia e farmacêutica (MASTERS, 1991; CAL; SOLLOHUB, 2010).

A secagem por *spray dryer* é uma técnica extremamente versátil, pois é possível secar os mais variados produtos, em diversas concentrações e condições. Com este tipo de técnica é possível secar desde mililitros por hora até dezenas de toneladas por hora. Ela possibilita um fácil aumento de escala (FREITAS et al., 2010).

No que se refere ao processo, é possível o controle de variáveis como a temperatura de entrada e saída do ar de secagem, a vazão do ar, vazão de

alimentação do produto, como vai ser a atomização entre outras. Um esquema do *spray dryer* pode ser visto na Figura 2.6.

Figura 2.6: Esquema *spray dryer*

Ela permite também influenciar em importantes propriedades do produto secado, como o tamanho de partícula obtido, a higroscopicidade, a escoabilidade, atividade de água e compressibilidade (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Além disso, é uma técnica extremamente rápida, permite um baixo tempo de residência dos materiais, pois em questões de segundos, já é possível obter o produto seco. E por causa desta rapidez, é possível utilizá-la para materiais termosensíveis, uma vez que o contato do material com o ar quente é muito rápido (FREITAS et al., 2010).

No entanto, para se obter um bom processo de secagem, é necessário conhecer alguns aspectos técnicos do processo, principalmente, no que se refere as características físico químicas dos materiais a serem secados e como estas propriedades vão ser afetadas pelas variáveis do processo (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Com relação a estas propriedades, uma de grande importância são as características de adesão dos materiais a serem secos, muito comum em substâncias utilizadas na área farmacêutica e de alimentos. Muitos produtos destas áreas possuem carboidratos ou polímeros que possuem características adesivas e no momento da secagem, causam uma grande retenção do material na câmara do equipamento. Esta adesividade é chamada por alguns autores como “*stickness point*” ou ponto de cola (BHANDARI; DATTA; HOWES, 1997), este ponto está intimamente ligado com as propriedades reológicas dos materiais e com sua transição vítrea, desta forma, a temperatura e a umidade vão afetar significativamente estas características. Por exemplo, com a mudança de temperatura ou com a retirada do solvente, há uma mudança abrupta na viscosidade da dispersão do produto. Assim na secagem, conforme vai “retirando-se” a água do produto, aumenta sua viscosidade, desta forma, existe uma concentração crítica, correspondente a uma viscosidade crítica, na qual o material passa a ter uma significativa adesividade (BHANDARI; DATTA; HOWES, 1997).

Uma das ferramentas bastante utilizadas para minimizar este tipo de inconveniente é o uso de aditivos de secagem, estes aditivos podem fazer com que ocorra um aumento na temperatura de transição vítrea, assim é possível secar o material em condições em que ocorra uma evaporação adequada do solvente, sem a adesão do produto (FREITAS et al., 2010).

Outro fator que gera a adesão dos produtos na câmara de secagem é a presença de cargas eletrostáticas, estas podem ser geradas pela passagem no sistema de alimentação, no bico atomizador ou pela fricção nas paredes da câmara e do ciclone. As soluções são carregadas negativamente quando entram em contato com o bico atomizador, e quando passam pelas paredes da câmara e do ciclone, que tem carga positiva ocorre a adesão. No entanto, este efeito eletrostático vai diminuindo com o tempo, após a “passagem” de várias camadas de pó (MURTOMAA et al., 2004).

Os aditivos de secagem também podem ser utilizados para conferir uma maior estabilidade ao produto seco, mudar características de liberação e escoabilidade. Assim, devido a técnica de secagem por *spray dryer* apresentar grandes vantagens, atualmente, está sendo muito utilizada para a secagem de extratos vegetais (ARAUJO; TEIXEIRA; FREITAS, 2010; COUTO et al., 2011).

Muitas vezes, os extratos oriundos de plantas possuem grandes quantidades de substâncias termolábeis, e apesar da técnica de secagem por *spray dryer* necessitar de ar muito quente para a secagem, o contato deste ar com o produto é muito curto, na ordem de segundos. Desta maneira, com a grande versatilidade do *spray*, é possível ajustar os parâmetros desta técnica e dependendo da situação, utilizar aditivos para secar extratos de plantas medicinais. O uso de aditivos é muito importante na secagem de extratos oriundos de plantas, pois muitos destes extratos possuem substâncias com alta massa molecular, como açúcares e ácidos orgânicos, o que ocasiona a aderência do material que está sendo seco na câmara de secagem (SOLLOHUB; CAL, 2010).

Couto et al., (2011) estudou a influência de diferentes aditivos na secagem de extratos de *Eugenia dysenterica* DC e observou que para obtenção de pós com elevada qualidade farmacotécnica e sem perda de atividade biológica seria necessária a incorporação de pequenas quantidades do aditivo manitol.

Estudos da secagem por *spray dryer* de extratos de *Rhamnus purshiana* (cáscara-sagrada) mostraram-se bastante viável quando era incorporado como adjuvante o dióxido de silício coloidal, pois resultaram em pós com baixa higroscopicidade, aumento da temperatura de transição vítrea do produto e baixo conteúdo de umidade, além de uma boa escoabilidade do produto seco (PINA et al., 2011). A secagem de extratos de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek com 10 a 20% de dióxido de silício coloidal relacionado ao teor de sólidos, também proporcionou pós com reduzida higroscopicidade (CARVALHO, 1997).

O dióxido de silício coloidal também proporcionou pós de *Passiflora edulis* com melhores características tecnológicas quando comparado aos outros aditivos utilizados como a gelatina ou a sua mistura com dióxido de silício coloidal (DE SOUZA et al., 2000).

2.4 - Métodos extrativos

A extração pode ser definida como a retirada de substâncias de interesse de um determinado meio, esta separação pode ser sólido-sólido, líquido-líquido ou sólido-líquido. No caso de materiais vegetais tem-se uma extração sólido-líquido (CORREIA, 2006).

Existem diversos fatores que interferem no processo de extração: as características do material vegetal, o tamanho de partícula, o meio extrator

(solvente); as condições físicas do meio, temperatura, pH, agitação e o método empregado na extração. Todos estes devem ser muito bem analisados antes de iniciar o processo (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2004).

Com relação as características do material vegetal, é muito importante avaliar seu grau de divisão, se é proveniente de cascas, folhas, flores, raízes, a sua solubilidade, qual o tipo de substância que deseja-se extrair.

O meio extrator está diretamente ligado com a solubilidade e o tipo de ativo desejado, pois com base nisto escolhe-se a polaridade do solvente. No entanto, deve-se preocupar com a toxicidade do mesmo, seu custo e sua disponibilidade.

As condições físicas afetam bastante o processo, dependendo da temperatura algumas substâncias são mais facilmente extraídas, a agitação melhora muitas vezes, o contato da droga vegetal com o solvente. E dependendo o pH vai facilitar a extração de determinadas moléculas.

Existem muitos métodos extrativos e para eleger um, deve-se analisar o tempo requerido, o custo, a simplicidade e a facilidade de aumento de escala.

Entre os diferentes métodos extrativos, destacam-se a maceração dinâmica e o ultrassom, métodos estes escolhidos para a realização do trabalho.

A maceração dinâmica é um processo de extração variante da maceração, ou maceração simples (SONAGLIO et al., 2004).

A maceração é muito usada devido a sua simplicidade e adequação a diferentes escalas: laboratoriais a industriais. Este método consiste em deixar a droga vegetal em contato com o solvente por um tempo determinado.

No caso da maceração dinâmica existe a presença da agitação de forma constante, fazendo com que ocorra um aumento do contato do material vegetal com o solvente, aumentando assim a eficiência de extração. Pode ser feito em temperatura ambiente ou à quente. O intumescimento da droga vegetal é um importante fator, pois aumenta a permeabilidade da parede celular e consequentemente facilita a difusão do solvente (CORREIA, 2006).

Este é um método recomendado para drogas vegetais que são ricas em substâncias ativas e que não apresentam estruturas como gomas, resinas e alginatos. Outro ponto importante é que dependendo do tempo da maceração, não é recomendado o uso de soluções etanólicas inferiores a 20%, pois pode proporcionar a proliferação microbiana (SONAGLIO et al., 2004).

Apesar da maceração não levar a extração exaustiva da droga, possui grande versatilidade e é de fácil adaptação a escalas maiores.

A extração por ultrassom tem ganhado destaque na obtenção de diferentes tipos de substâncias bioativas. Este método permite o aumento da extração de determinadas substâncias, uma vez que diminui o tamanho de partícula, facilita o rompimento das paredes celulares e, além disso, aumenta a transferência de massa da planta para o meio extrator através da cavitação (VELJKOVIC et al., 2006).

Algumas espécies vegetais tiveram suas extrações muito bem sucedidas empregando-se como método o ultrassom. O ultrassom ajudou na extração de substâncias responsáveis pelo efeito herbicida de extratos de chicória (WANG et al., 2011). Extratos etanólicos de anis obtidos por ultrassom mostraram recuperações significativamente superiores aos obtidos pelos métodos convencionais de extração (extração por refluxo) (CHEN et al., 2011).

E, além disso, este tipo de método permitiu um aumento de quase trinta vezes dos rendimentos da luteolina e apigenina quando comparado com métodos extrativos tradicionais (TABARAKI; NATEGHI, 2011; TAN et al., 2011). A luteolina e apigenina são flavonóides muito importantes encontrados em alguns alimentos como exemplo: chá, vinho tinto, maçãs, alface, couve, mirtilos, laranjas e aipo.

O ultrassom foi aplicado para a extração de polifenóis e antioxidantes do farelo de arroz usando etanol como solvente, resultando em extratos que apresentaram uma boa atividade antioxidante e um considerável conteúdo de fenóis (TABARAKI; NATEGHI, 2011).

Assim, o ultrassom pode ser uma técnica bastante útil no emprego de extrações de determinadas substâncias.

2.5 - Atividade antioxidante

Os agentes oxidantes, como por exemplo, os radicais livres contribuem de forma significativa para inúmeras doenças, como as cardiovasculares, degenerativas, tumores, envelhecimento precoce, entre outras.

O metabolismo envolvendo oxigênio é essencial para as células, no entanto, o organismo humano produz muitas espécies reativas de oxigênio que podem oxidar o DNA, proteínas e lipídeos. Um exemplo é o ataque aos ácidos graxos insaturados da cadeia lipídica, um radical livre inicia a reação com a dupla ligação do ácido graxo insaturado que após uma série de reações origina um processo em cadeia. Após

várias moléculas oxidadas, pode iniciar um processo inflamatório gerando os danos celulares (ANTOLOVICH et al., 2002).

Esta formação de espécies reativas de oxigênio pode ser controlada pela produção endógena de substâncias antioxidantes, como a superóxido dismutase, a catalase, entre outras enzimas, assim como pela ingestão na dieta de antioxidantes, como o ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E (tocoferóis), polifenóis e selênio. Estas substâncias antioxidantes conseguem reagir com as espécies reativas de oxigênio reduzindo-as, assim conseguem estabilizá-las para não reagirem com as moléculas endógenas impedindo de causarem danos ao organismo, como as patologias citadas acima (SOUSA et al., 2007).

Devido as grandes vantagens das substâncias antioxidantes, é muito importante identifica-las e quantifica-las de maneira correta. Um dos métodos mais utilizados e conhecidos é o método do radical DPPH (difenilpicrilhidrazil) (LIMA et al., 2006; MARQUELE et al., 2006; ANDRADE et al., 2007; SOUSA et al., 2007).

Este método é usado para medir a atividade antioxidante *in vitro*. Para tal utiliza-se a molécula de difenilpicrilhidrazil que é caracterizada como um radical livre estável por virtude da deslocalização dos elétrons. Essa ressonância confere a solução uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em torno de 520 nm. Na forma radical, este composto absorve nesta faixa e quando ocorre a redução por um antioxidante, a absorção na faixa violeta desaparece; dando origem a coloração amarela, devido a presença do grupo picril. Um esquema desta reação pode ser visto na Figura 2.7.

Figura 2.7: Esquema da redução da molécula de DPPH

Apesar da molécula de DPPH não ser encontrada endogenamente, este teste dá uma boa idéia se o extrato, ou outras substâncias apresentam atividade antioxidante.

Os resultados deste teste são expressos em IC_{50} que é a quantidade de amostra necessária para reduzir a concentração de DPPH em 50%.

A reação de DPPH envolve uma rápida eletrotransferência de ânions fenóxido para o DPPH, e a presença de ácidos ou bases no meio reacional pode afetar no equilíbrio da reação, por isso a grande importância de manter o meio reacional tamponado. (ANTOLOVICH et al., 2002).

2.6 - Fenóis

As substâncias fenólicas são uma classe de substâncias que possuem importante atividade antioxidante. Estas substâncias são encontradas em muitos vegetais, microrganismos e no metabolismo de animais.

Eles podem ser classificados em diferentes categorias, como: fenóis simples, ácidos fenólicos, taninos condensados e hidrolisáveis, estilbenos, lignanas, ligninas e flavonóides. Alguns exemplos destas classes encontram-se na Figura 2.8. Esta variedade se deve a grande diversidade de estruturas químicas. A substância pode ser considerada um fenol, quando possuem pelo menos um anel aromático (benzeno), o qual pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (CARVALHO; GOSMANN; SCKENKEL, 2004).

Figura 2.8: Exemplos de classes de polifenóis

Devido a sua estrutura química e suas propriedades redutoras, os fenóis atuam como potentes antioxidantes, uma vez que conseguem neutralizar ou seqüestrar os radicais livres, além de quelar os metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo.

Uma das técnicas mais utilizadas para a quantificação de fenóis é a que utiliza como substância de coloração, o reagente de Folin-Ciocalteu. Este reagente é uma mistura de dois ácidos: fosfomolibdico e fosfotungstístico. Neste, o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+, porém na presença de agentes redutores, como os fenóis, por exemplo, formam o molibdênio e o tungstênio azul, com estados de oxidação em média 5 e 6, o que faz ocorrer uma mudança na coloração, desta maneira é possível medir a concentração em função da coloração (SOUSA et al., 2007).

2.7 - Atividade antimicrobiana

A resistência de micro-organismos aos fármacos utilizados na atualidade tem crescido bastante, e a busca por novas moléculas que possuam atividade antimicrobiana motiva muitas indústrias farmacêuticas e centros de pesquisa. Esta resistência aos antibióticos é um problema que atinge tanto os países em desenvolvimento como os desenvolvidos. O uso de antibióticos é cada vez maior em todo o mundo e muitas vezes a sua utilização é inadequada contribuindo para a crescente resistência dos micro-organismos e consequentemente levando a um problema de saúde pública.

Antes da “era sintética”, a maioria dos fármacos, aproximadamente 80% era de origem natural, no entanto após o avanço da química medicinal, houve uma inversão nos valores e os sintéticos começaram a se sobressair sobre os de origem natural (MCCHESENEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007).

Atualmente, a busca por novas moléculas fez com que os estudos envolvendo fontes naturais e principalmente plantas fossem retomados, pois mesmo com algumas desvantagens dos produtos naturais como difícil padronização, alta variabilidade na produção, alto custo de produção; eles são fontes e modelos indiscutíveis, e podem ser muito úteis na descoberta de novos antibióticos.

Com os avanços das técnicas de análise, identificação e quantificação das substâncias aumentaram consideravelmente a velocidade de elucidação estrutural dos compostos naturais, tornando-os mais competitivos com os compostos

sintéticos. E, além disso, na década passada, quinze novos fármacos derivados de produtos naturais (alguns exemplos: daptomicina, anidulafungina, doripenem, tigeciclina, telitromicina, entre outros) foram lançados nos principais mercados dos Estados Unidos, Europa e Japão (BUTLER, 2004; NEWMAN; CRAGG, 2007).

Além das substâncias isoladas estão sendo analisados os extratos como um todo, pois dependendo da molécula, ela isolada não tem atividade, no entanto quando se testa o extrato como um todo, os resultados são bem promissores.

2.7.1 - Atividade antimicrobiana sobre o gênero *Candida*

As infecções que acometem a pele e as mucosas são doenças muito frequentes, principalmente em países tropicais, e em pessoas que estão com o sistema imune debilitado. Os principais micro-organismos envolvidos são os fungos dermatófitos e as leveduras do gênero *Candida*. Este gênero está muito bem distribuído, as espécies de *Candida* podem habitar plantas, o trato gastro-intestinal de mamíferos, e também podem estabelecer uma relação de comensalismo em mucosas humanas, principalmente em mucosas do trato genito urinário feminino. No trato gastro-intestinal cerca de 50-70% de isolados de leveduras foram identificados como *Candida albicans*. Além disso, algumas outras espécies mais freqüentes são: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, enquanto *C. kefyr* e *C. guilliermondii* são encontradas ocasionalmente (GIANINNI et al., 2007).

Como visto a *Candida albicans* é uma das leveduras mais freqüentes, e pode se tornar oportunista em casos de infecções sistêmicas em pessoas com sistema imune comprometido e/ou predispostas. No caso desta levedura, muitos trabalhos envolvendo produtos naturais estão sendo feitos para o encontro de uma possível substância ou grupo de substâncias que tenha ação sobre esta levedura, encontrando resultados positivos na inibição da mesma (ELSOHLY et al., 2002; GIANINNI et al., 2007; SILVA et al., 2009).

Extratos de *Endopleura uchi* também já demonstraram ter ação inibitória sobre as leveduras do gênero *Candida*, mais especificamente as espécies: *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*; esta atividade foi atribuída à presença da bergenina; e isto explica o grande uso tradicional do chá das cascas de *Endopleura uchi* no tratamento de infecções genito urinárias femininas (SILVA et al., 2009).

Com relação ao nível de inibição dos produtos naturais quando comparado aos antimicrobianos padrões ainda há dúvidas. Alguns autores só consideram ter

atividade quando a sua concentração inibitória mínima (MIC) for comparável aos antimicrobianos padrões. Uma classificação para materiais vegetais foi proposta por Aligianis et al. (2001), na qual extratos e/ou substâncias vegetais com uma MIC até 500 µg/mL, apresentam uma forte inibição antimicrobiana; MIC entre 600 a 1500 µg/mL é considerado uma inibição moderada e MIC acima de 1600 µg/mL como fraca inibição (ALIGIANNIS et al., 2001).

Assim, o uso de fontes naturais como pesquisa para novos antimicrobianos ainda é um caminho bastante promissor, seja o extrato como um todo, a substância isolada ou um modelo para o desenvolvimento de um protótipo.

2.8 - Planejamentos experimentais e otimização por funções de desejabilidade

Os planejamentos experimentais são ferramentas cada vez mais importantes e de grande utilidade no delineamento de ensaios, nos quais se deseja estudar diferentes variáveis. Assim antes de iniciar uma pesquisa, devem-se analisar cuidadosamente as variáveis escolhidas, ainda mais quando o objeto de estudo são processos nos quais se pretende fazer um aumento de escala (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

Quando se estuda uma variável por vez mantendo as outras fixas, o método é denominado univariado, já quando se analisa várias variáveis ao mesmo tempo é chamado de método multivariado, o último apresenta muitas vantagens como menor tempo requerido para análise e possibilidade de avaliação das interações entre as variáveis, fato este de grande importância, pois muitas vezes a combinação entre as variáveis é que gera os melhores resultados (CUNICO et al., 2008).

Dentre os diferentes tipos de planejamento o que merece destaque são os planejamentos fatoriais, pois com estes tipos de ensaios é possível analisar um grande número de variáveis com um reduzido número de ensaios. Dentro dos planejamentos fatoriais alguns conceitos são muito importantes:

- Fator: pode ser entendido como cada variável do processo ou do estudo.
- Nível: é definido como as condições de trabalho dos fatores, geralmente é classificado como nível alto (+1); nível médio (0) e nível baixo (-1).
- Resposta: característica do processo que quer ser analisada em função dos fatores.

- Modelo estatístico: equação gerada através dos efeitos de cada fator na resposta, exemplo: $y = a_0 + a_1.x_1 + a_2.x_2 + a_3.x_1.x_2 + \dots$; onde y = resposta; a_n = coeficientes obtidos estatisticamente; x_n = fatores.

Os planejamentos, geralmente podem ser representados por z^x , onde z é o número de níveis e x o número de fatores. O caso mais simples é aquele em que para cada fator (x) existem apenas dois níveis (z), assim, por exemplo, considerando três fatores para estudo em dois níveis, tem-se 2^3 ; o que resulta num total de oito experimentos. Dependendo do objetivo dos ensaios é necessário trabalhar com mais de um nível ou mais variáveis, por exemplo, três níveis e três variáveis; 3^3 , resulta em 27 experimentos, com isto pode-se trabalhar com diversas combinações (CUNICO et al., 2008).

No entanto, dependendo da combinação, o número de experimentos começa a ficar elevado, assim se torna inviável utilizar este tipo de planejamento. Desta forma pode-se optar por outro tipo, um exemplo que é muito utilizado é o planejamento do tipo Box Behnken, onde se trabalha com três níveis e três fatores. Neste tipo de planejamento, existem doze pontos nos centros das arestas mais três pontos centrais, como esquematizado no cubo da Figura 2.9.

Figura 2.9: Desenho esquemático dos pontos do planejamento Box Behnken

Quando se trabalha com três níveis pode se obter regressões com termos quadráticos e, além disto, para cada efeito existe um componente linear e um quadrático, possibilitando uma maior área e componentes de análise.

A Figura 2.10 mostra um esquema da distribuição dos níveis e dos fatores no planejamento fatorial.

Figura 2.10: Desenho esquemático da distribuição dos níveis e dos fatores

Contudo, os planejamentos experimentais, principalmente os fatoriais e o Box Behnken possuem grandes vantagens, eles podem determinar qual fator influencia mais em uma determinada resposta, quais as possíveis interações entre os fatores, o grau de influência das mesmas e além de tudo isto é possível com um número, muitas vezes, reduzido de experimentos e um menor tempo de análise. Assim, os planejamentos são ferramentas muito úteis no delineamento de ensaios.

2.8.1 - Desejabilidade

Um processo que possui múltiplas respostas e que cada uma tem sua influência na qualidade final, pode ser otimizado pelo método da função de desejabilidade.

Este método é muito empregado em ambientes industriais, pois nestes a maioria dos processos é multivariável e possui muitas respostas que afetam a qualidade do produto ou método final (COLOMBARI, 2004).

Para cada característica (x), existem uma resposta (y) e uma função de desejabilidade (d) que varia de 0 a 1, quanto mais próximo de 1 for a função de d ,

mais desejável a resposta (DERRINGER; SUICH, 1980). Assim, num processo com muitas respostas, pode-se obter uma função de desejabilidade global (D), e esta pode ser calculada segundo a equação 2.1:

$$D = [d_1.(y_1).d_2.(y_2).d_3.(y_3).d_4.(y_4).....d_n.(y_n)]^{1/n} \quad \text{Equação 2.1}$$

Sendo n o número de respostas do sistema. E mais uma vez quanto mais perto de 1, melhor. As desejabilidades individuais (y) vão depender da faixa de valores da característica (x), deve-se determinar um valor inferior, um superior e um valor “alvo”, esta especificação dos valores é muito importante, uma vez que é ela que vai demarcar a y (RÉTHY; KOCZOR; ERDÉLYI, 2004).

Existem diferentes tipos de função de desejabilidade, a classificação é feita baseada no objetivo da resposta, a minimização, a maximização ou atingir um determinado valor alvo. Para cada objetivo, precisa-se definir o alvo e/ou o limite inferior e superior. A Figura 2.11 representa um esquema dos tipos de desejabilidade.

Exemplo, na minimização determina-se um valor alvo, assim respostas abaixo deste valor possuem um y próximo de 1, respostas acima deste valor fica próxima de zero, ou seja, não desejável, pois neste tipo quanto menor o valor, mais desejável é a resposta.

Figura 2.11: Tipos de função de desejabilidade

O formato da função de desejabilidade vai depender do peso atribuído a cada característica, quanto maior o peso, mais facilmente o valor alvo é alcançado. Por exemplo, na função de maximização, quanto maior o peso dado a característica, mais acentuada será a curva em direção ao valor alvo (DELCASTILLO;

MONTGOMERY; MCCARVILLE, 1996). A Figura 2.12 mostra um esquema destes diferentes formatos para os tipos das funções de desejabilidade.

Figura 2.12: Formatos das funções de desejabilidade (Adaptado de COLOMBARI, 2004).

Desta forma, a idéia básica da função de desejabilidade é transformar um problema de múltiplas respostas em um problema com uma resposta, através de transformações matemáticas, facilitando a resolução da situação.

Assim, como pode ser visto, *Endopleura uchi* é uma planta que merece destaque, pois além de já possuir uma grande importância econômica e nutricional para os habitantes da região Amazônica, ela pode vir a ter aplicação como medicamento fitoterápico. Para isto, estudos devem ser realizados a fim de se obter comprovações científicas da eficácia, segurança e qualidade do uxi. Além disto, a obtenção destes parâmetros é muito influenciada pelos processos extrativos, evidenciando a importância de seu estudo.

E para aumentar a viabilidade dos extratos, a sua transformação em pó é uma alternativa bastante vantajosa, pois a secagem diminui a degradação física e química, aumenta a estabilidade, facilita o transporte e armazenamento. E das técnicas para transformação em produto seco a que apresenta muitas vantagens e está sendo cada vez mais utilizada é a secagem por *spray dryer* pelo fato de ser versátil, possuir um fácil aumento de escala e além de ser extremamente rápida.

Objetivos

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivos gerais

Estudar a extração das cascas de *Endopleura uchi*, assim como avaliar o processo de secagem dos seus extratos, utilizando a técnica por *spray dryer*.

3.2 - Objetivos específicos

- Estudar os parâmetros relativos aos processos de extração.
- Caracterizar os extratos obtidos nos processos extrativos
- Realizar testes de secagem por *spray dryer*.
- Estudar a atividade antioxidante dos extratos de *Endopleura uchi*
- Estudar e quantificar o principal marcador (bergenina)
- Avaliar as propriedades farmacotécnicas do pó obtido, tais como umidade, densidade aparente, densidade compactada, ângulo de repouso e tamanho médio de partícula.
- Aplicar planejamentos experimentais adequados ao estudo e que permitam a obtenção de modelo empírico relacionando os fatores estudados com o teor de bergenina, atividade antioxidante, entre outras características.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos secados contra cepas do gênero *Candida*.

Materiais e Métodos

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Obtenção do material vegetal

O material vegetal foi adquirido da Flores e Ervas (Piracicaba, São Paulo, Brasil). Lote 029071/SFS015. Posteriormente, foi submetido a um processo de moagem, utilizando-se moinho de facas (Solab, SL31). Este material vegetal consistia de cascas de *Endopleura uchi*.(Huber) Cuatrec.

4.2 - Distribuição granulométrica

A distribuição granulométrica do material vegetal moído foi realizada com auxílio de um conjunto de tamises com abertura de malha de 25 a 1000 μm e um agitador de peneiras (Bertel).

4.3 - Determinação do Índice de Intumescência (IT)

Para determinação do IT, 1 g de material vegetal pulverizado foi pesado e adicionado a uma proveta de 25 mL. Em seguida, adicionou-se 25 mL de solvente água destilada. Posteriormente, a proveta foi agitada a cada 15 minutos durante 1 hora e deixada em repouso por 3 horas a temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi feito utilizando etanol 70°GL, uma vez que este foi o solvente escolhido como líquido extrator. O índice de intumescência é dado pela diferença do volume ocupado pelo material vegetal no início (V_i) e no final (V_f) do ensaio (Equação 4.1) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

$$IT = V_f - V_i$$

Equação 4.1

4.4 - Estudo dos processos extrativos

4.4.1 - Maceração dinâmica

O primeiro método de extração estudado foi a maceração dinâmica. As condições experimentais eleitas para serem analisadas foram: o tempo e a temperatura de extração e a porcentagem de material vegetal utilizada em relação ao solvente. O solvente utilizado foi etanol 70°GL, as extrações foram realizadas em erlenmeyer de 250 mL, num agitador magnético multi ponto, com velocidade de agitação igual a 600 rpm. A temperatura foi controlada através de estufas adaptadas para os agitadores multi ponto. Uma fotografia esquematizando o sistema de maceração dinâmica encontra-se na Figura 4.1

Figura 4.1: Fotografia do processo extrativo de maceração dinâmica

Após a realização do processo extrativo, os extratos foram filtrados utilizando filtro de papel qualitativo.

Para análise dos parâmetros de extração de forma mais precisa, optou-se por utilizar um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken com três níveis e três variáveis (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978). A Tabela 4.1 mostra os fatores escolhidos e os níveis selecionados na sua forma codificada, usando a nomenclatura -1 (nível baixo), 0 (nível médio) e 1 (nível alto) e a Tabela 4.2 mostra os níveis nos seus valores reais. Na Tabela 4.1, nota-se que existe uma triplicata no ponto central, ou seja, nos experimentos 13,14 e 15 para os três fatores, utiliza-se o nível médio (0).

Tabela 4.1: Planejamento fatorial para a maceração dinâmica

<i>Exp</i>	<i>Tempo codificado</i>	<i>Temperatura codificado</i>	<i>% Planta codificado</i>
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1

10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Tabela 4.2: Fatores estudados e seus níveis para a maceração dinâmica

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Tempo (h)	6	12	18
Temperatura (°C)	25	35	45
% Planta (%)	10	30	50

4.4.2 - Ultrassom

Para a extração por ultrassom utilizou-se um sonicador (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil). Uma fotografia do mesmo pode ser encontrada na Figura 4.2. As condições do processo extrativo fixadas foram etanol 70°GL como solvente, e temperatura controlada a 25°C. Num béquer de 250 mL foram adicionados a massa de planta e de etanol 70°GL referentes a cada condição do planejamento.

Figura 4.2: Sonicador utilizado para extração (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil)

Os extratos também foram filtrados após o término do processo extrativo, utilizando um filtro de papel qualitativo. A exemplo, da maceração dinâmica, também foi feito um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken com três níveis e três variáveis (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978). A Tabela 4.3 mostra os fatores com os seus níveis codificados e a Tabela 4.4 nos valores não codificados.

Tabela 4.3: Planejamento fatorial para a extração com ultrassom

Exp	Tempo codificado	Potência codificado	% Planta codificado
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Tabela 4.4: Fatores estudados e seus níveis para o processo de ultrassom

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Tempo (min)	4	8	12
Potência *	30	65	100
% Planta (%)	10	30	50

*Nota: a potência de 100% do sonicador corresponde a 500 W

4. 5 - Caracterização dos extratos

4.5.1 - Teor de sólidos (TS)

O teor de sólidos dos extratos obtidos tanto pela maceração dinâmica como pelo ultrassom foi analisado de forma gravimétrica. Uma alíquota (~ 5,0 g) dos extratos foi pesada antes e colocada em estufa com circulação de ar e temperatura controlada de 35°C. Esta alíquota foi pesada novamente até obter peso constante. A análise foi feita em triplicata.

Após a realização dos diferentes processos extrativos, e análise do TS, os extratos foram submetidos a um processo de liofilização. (Liofilizador de Bancada Terroni, Enterprise I). A liofilização foi escolhida para analisar e quantificar de forma mais correta os testes descritos a seguir (itens 4.5.2 a 4.5.4), já que ao invés de determinar a massa teórica por meio da densidade, pode-se pesar a massa correta.

4.5.2 - Atividade antioxidante

A avaliação de atividade antioxidante foi realizada pelo método do radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH). Para cada extrato, foram feitas cinco concentrações, analisadas em triplicata, além disso, preparou-se o branco e o controle positivo (C+) da reação. Eram adicionados em tubos de ensaios:

- Amostra: 1,0 mL de tampão acetato, pH 5,5; 1,0 mL de etanol; 50 µL de amostra e 500 µL de DPPH (200 µM).
- Branco: 1,0 mL de tampão acetato, pH 5,5; 1,5 mL de etanol.
- C+: 1,0 mL de tampão acetato, pH 5,5; 1,0 mL de etanol; 50 µL de etanol e 500 µL de DPPH (200 µM).

Após 15 minutos de reação, no escuro, a absorvância foi medida em um comprimento de onda de 520 nm no espectrofotômetro Camspec M330.

Através das absorbâncias medidas, calculou-se a % de inibição, com o auxílio da Equação 4.2.

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \left(\frac{Abs_{amostra}}{Abs_{C+}} * 100 \right) \quad \text{Equação 4.2}$$

Os resultados foram expressos em IC₅₀, quantidade em µg/mL necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH.

4.5.3 - Análise de fenóis

A quantificação de fenóis foi realizada utilizando o reagente de Folin Ciocalteu. Este reagente é uma mistura de dois ácidos: fosfomolibdico e fosfotungstístico, os quais possuem, respectivamente, o molibdênio e o tungstênio no estado de oxidação 6+. Estes dois compostos quando estão na presença de agentes redutores, como os fenóis, mudam de estado oxidativo, levando a formação da coloração azul. Com isto, a concentração pode ser medida através de análise espectrofotométrica. Quanto mais agentes redutores, mais intensa a coloração azul.

A curva padrão foi feita com ácido gálico, substância utilizada como referência para análise de fenóis. A absorvância foi medida em 760 nm (MARQUELE et al., 2006).

4.5.4 - Análise de Bergenina

A quantificação da bergenina foi feita através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Utilizou-se um cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo LC - 10 AT, com um detector UV-Vis SPD-10-A e injetor manual.

O método utilizado foi adaptado de Nunomura et al. (2009), sendo suas principais características: análise em modo isocrático, a fase móvel (FM) utilizada metanol: água (20:80), coluna C-18 Shim - PACK; CLS – ODS (280 x 4.0 mm e tamanho de partícula 5 µm) e o comprimento de onda de 272 nm. A vazão utilizada da fase móvel foi de 0,8 mL/min.

A curva padrão foi construída usando-se um padrão de bergenina, pureza de 95,4% (Chromadex Ltd).

4.6 - Otimização da extração por características dos extratos

Após a realização de toda caracterização dos extratos, foi necessário escolher o melhor processo extrativo, e em seguida a melhor condição dentro do planejamento fatorial, a fim de realizar-se a secagem em *spray dryer*. Para isto, usou-se como ferramenta de otimização a análise pelo método de funções desejabilidade, com o auxílio do software Minitab® 15 (Lead Technologies Inc.).

4.7 - Processo de secagem em *spray dryer*

Após a otimização do processo de extração, iniciou-se o estudo de secagem. A secagem foi realizada em Mini Spray Dryer MSD 0.5 (Labmaq do Brasil, Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil), Figura 4.3.

Figura 4.3: Mini Spray Dryer MSD 0.5 (Labmaq do Brasil, Ltda)

Neste processo de secagem utilizou-se como bico atomizador um duplo fluido com diâmetro de abertura de 1,0 mm. Os parâmetros do processo encontram-se na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Parâmetros do processo de secagem por *spray dryer*

Parâmetros operacionais	Valores
Vazão do ar de secagem (m ³ /min)	1,5
Vazão do ar comprimido (L/min)	40
Pressão do ar comprimido (bar)	4
Vazão de alimentação dos extratos (mL/min)	5

Para uma análise mais adequada do processo de secagem, optou-se por fazer um planejamento fatorial completo, com três níveis e duas variáveis, e mais duas replicatas no ponto central, num total de onze experimentos (3^2+2); sendo que as variáveis escolhidas foram a temperatura de saída do equipamento e a porcentagem de aditivo utilizada em função do teor de sólidos do extrato. Estas variáveis foram eleitas pelo fato de afetarem bastante o processo de secagem de extratos de plantas (SOUZA et al., 2007; ARAUJO; TEIXEIRA; FREITAS, 2010). A Tabela 4.6 mostra o planejamento fatorial adotado para o processo de secagem e a Tabela 4.7 mostra os valores reais dos níveis escolhidos

Tabela 4.6: Planejamento fatorial para o processo de secagem

<i>Exp</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Aditivo</i>
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	1
4	0	-1
5	0	0
6	0	1
7	1	-1
8	1	0
9	1	1
10	0	0
11	0	0

Tabela 4.7: Fatores estudados e seus níveis para o processo de secagem

<i>Fatores</i>	<i>Níveis</i>		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	40	60	80
Aditivo (%)	20	60	100

Com relação à % de aditivo, como citado anteriormente ela foi feita baseada no teor de sólidos do extrato a ser seco, assim utilizou-se até 100% de aditivo, ou seja, uma relação 1:1 do teor de sólidos e aditivo, a fim de obter resultados mais abrangentes. Após uma série de pré-testes com diferentes adjuvantes de secagem, tais como: maltodextrina, amido, aerosil®, sorbitol, manitol, optou-se por utilizar uma mistura de amido e aerosil® numa proporção de 1:1.

4.7.1 - Rendimento do processo

O rendimento do processo de secagem foi calculado através da razão da massa de pó obtida após o processo e da quantidade de sólidos presente em cada experimento.

4.8 - Análise das características do produto seco

Primeiramente, os pós obtidos na secagem foram submetidos às análises de atividade antioxidante, teor de fenóis e análise de bergenina descritas nos itens 4.5.2 a 4.5.4. Estas análises foram realizadas a fim de avaliar se houve alguma alteração de suas características após o processo de secagem.

Após estas primeiras análises foram avaliadas as propriedades farmacotécnicas do pó obtido, tais como umidade, densidade aparente, densidade compactada e ângulo de repouso.

4.8.1 - Umidade

A umidade foi avaliada com a balança analisadora de umidade com lâmpada de halogênio (Ohaus). Análise do tipo gravimétrica.

4.8.2 - Densidade aparente (*da*)

Em uma proveta de 10,0 mL, foram adicionadas uma massa específica, verificou-se o volume ocupado por esta massa e assim através da razão entre a massa e o volume, determinou-se a densidade aparente do pó (ALIGIANNIS et al., 2001; USPXXX, 2007).

4.8.3 - Densidade compactada (*dc*)

A mesma proveta acima citada foi submetida a batidas constantes, aproximadamente 100 vezes, ou até, o máximo de compactação. Após as batidas, verificou-se o volume ocupado pelo pó, obtendo-se assim a densidade compactada (USPXXX, 2007).

4.8.4 - Determinação do Fator de Hausner (FH) e Índice de Carr (IC)

O FH é o quociente da razão entre a densidade compactada e a densidade aparente; como mostra a equação 4.3:

$$FH = \frac{dc}{da} \quad \text{Equação 4.3}$$

Os materiais os quais apresentam FH inferior a 1,25 são facilmente compressíveis em contrapartida aos que apresentam valores superiores.

O IC é determinado segundo a equação 4.4:

$$IC = \left(\frac{dc - da}{dc} \right) \times 100 \quad \text{Equação 4.4}$$

Materiais com índice inferior a 15% apresentam boas características de compressão.

4.8.5 - Determinação do ângulo de repouso (AR)

A determinação do ângulo de repouso tem sido utilizada como um método indireto de quantificar a fluxibilidade de um pó, em função da sua relação com a coesão entre as partículas.

Para a determinação do ângulo de repouso de cada amostra de pó utilizou-se um funil e uma placa circular de diâmetro fixo (2,0 cm), o funil foi colocado a uma distância de 3,0 cm da placa, no mesmo foi adicionado uma massa fixa de pó, suficiente para o preenchimento total da base. Em seguida mediu-se, com o auxílio de uma régua com graduação de 1,0 mm, a altura do cone formado pelo produto seco (AULTON, 2005).

O ângulo formado (α°) pode ser obtido através do cálculo da tangente inversa das medidas da altura (H) e do raio da base (R), demonstrado na equação 4.5:

$$\text{tg}^{-1}(\alpha) = \frac{H}{R} \quad \text{Equação 4.5}$$

4.8.6 – Tamanho das partículas (D_{50})

A análise do tamanho de partícula foi realizada através da tamisação. Para tal, utilizaram-se tamises de diferentes tamanhos, 600; 300; 150; 106; 75; 45 e 25 μm . Os mesmos foram dispostos de forma decrescente. E uma quantidade fixa de cada amostra era colocada no primeiro tamis, em seguida, batidas sucessivas eram realizadas até uniformidade na distribuição. A quantidade de amostra analisada foi de 500 mg.

4.9 – Morfologia das partículas obtidas

Após toda a análise dos pós obtidos no processo de secagem por *spray dryer*, foi feita a análise da morfologia de partículas. Para este teste foram selecionadas três amostras para serem avaliadas, o extrato liofilizado, o extrato seco por *spray dryer* sem nenhum aditivo e o extrato 4 do planejamento fatorial (item 4.6), pois apresentou boa atividade antioxidante, características razoáveis de fluxo e bons níveis de bergenina.

Assim, para análise da morfologia das partículas, foi utilizada como técnica a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Primeiramente, as partículas passaram por um banho de ouro e depois foram avaliadas através do microscópio PHILIPS

modelo FEG XL 30, em aumentos de 2.000, 5.000 e 10.000 vezes para a obtenção de suas imagens.

4.10 - Atividade antimicrobiana

A exemplo da morfologia de partículas descrita no item 4.9, foram selecionadas quatro amostras para serem testadas, o extrato liofilizado, o extrato seco por *spray dryer* sem nenhum aditivo e dois extratos do planejamento fatorial de secagem (experimentos 1 e 4; item 4.6), escolhidos por apresentarem características razoáveis, como um bom rendimento, ótima IC₅₀.

Para análise da atividade antimicrobiana utilizou-se como meio de cultivo o caldo RPMI-1640 GIBCO BRL® (Life Technologies, Grand Island, EUA), com glutamina, sem bicarbonato de sódio, suplementado de glicose e tamponado com MOPS a pH 7,0. (NCCLS, 2002)

O inóculo foi preparado em água deionizada esterilizada, equivalente à escala 0,5 de McFarland, utilizando-se colônias de 24 h. A concentração foi ajustada por contagem de células em câmara de Neubauer, para a obtenção de um inóculo de concentração igual a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. A viabilidade e a pureza do inóculo foram controladas por cultivo de alíquotas de suspensão em placas de ágar Sabouraud dextrose, incubadas a 37 °C durante 48 horas. As cepas utilizadas foram *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 64548, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* ATCC 90030 e *Candida tropicalis* ATCC 750

As amostras foram solubilizadas em água e em seguida, adicionou-se DMSO (Dimetil sulfoxido), não ultrapassando a concentração final de 1% do mesmo.

4.10.1 - Teste da microdiluição em caldo para determinação de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).

Alíquotas de 100 µL de cada substância diluída a ser testada foram depositadas nos poços, das colunas de 2 a 11 da placa de microdiluição.

Volumes de 100 µL da suspensão de leveduras foram colocadas nos poços da placa de microdiluição. Os poços da coluna 1 foram utilizados como controle do meio (controle negativo), sendo depositados nestes 200 µL de meio RPMI-1640 GIBCO BRL®. Os poços da coluna 12 foram utilizados como controle positivo, sendo depositados nestes 200 µL de inóculo. Um esquema da placa de microdiluição pode ser encontrado na Figura 4.4.

Figura 4.4: Esquema da placa de microdiluição

As microplacas foram incubadas a 37°C, durante 48 horas. A leitura foi realizada visualmente, comparando-se o crescimento no poço controle positivo, com os demais poços referentes às concentrações das substâncias testadas.

Foi considerado CIM a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 100% das leveduras.

A concentração que apresentou 100% de inibição do crescimento quando comparado com o controle positivo foi avaliada quanto a capacidade de matar 100% dos microrganismos. Volumes de 10 µL da respectiva concentração (CIM) foi semeada em placas de ágar Sabouraud dextrose por estrias e após incubação a 37°C durante 48 h foi observado a presença ou ausência de crescimento e considerado CFM a menor concentração capaz de matar 100% das leveduras (NCCLS, 2002).

Todos os testes foram realizados em duplicata.

Resultados e Discussão

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Distribuição granulométrica

A distribuição granulométrica do material vegetal moído encontra-se na Figura 5.1.

Figura 5.1: Distribuição granulométrica do material cominuído de *Endopleura uchi*

A cominuição foi feita para reduzir o tamanho de partícula e aumentar a área superficial, melhorando assim o processo extrativo. A maior parte do material vegetal ficou na faixa de 300 a 500 µm, como não se obteve partículas com tamanhos acima de 1000 µm, optou-se por utilizar todo o material vegetal, uma vez que este tamanho é bastante adequado para processos extrativos.

5.2 - Índice de Intumescência

O valor médio do IT foi de 1,0 mL, assim para cada 1,0 g de material vegetal adicionou-se mais 1,0 mL de solvente (etanol 70°GL), pois de acordo com o IT, só consegue se extrair ativos da planta após o seu intumescimento. Desta maneira, o cálculo do IT é muito importante para os processos extrativos.

5.3 - Caracterização dos extratos

As Tabelas 5.1 e 5.2 mostram os valores obtidos da análise do teor de sólidos, da atividade antioxidante, do teor de fenóis e da quantificação da bergenina para os extratos obtidos por maceração dinâmica e por ultrassom, respectivamente.

Tabela 5.1 - Caracterização dos extratos obtidos por maceração dinâmica

<i>Experimento</i>	<i>TS (%)</i>	<i>IC₅₀ (μg/mL)</i>	<i>Teor de Fenóis (%)</i>	<i>Teor Bergenina (%)</i>	<i>Rendimento Bergenina (%)</i>
1	2,90	4,32	40,10	36,87	1,93
2	3,30	4,05	39,68	35,79	2,26
3	3,15	4,35	47,82	34,98	2,06
4	3,57	4,73	36,09	32,37	2,16
5	1,14	4,58	37,85	34,70	2,93
6	1,62	4,65	37,05	33,66	4,00
7	1,82	5,44	31,89	38,07	0,52
8	5,11	4,02	36,12	37,01	1,47
9	1,64	4,62	38,78	31,82	3,90
10	1,14	4,71	34,65	32,06	2,71
11	2,90	4,38	36,22	34,98	0,76
12	1,48	5,87	36,63	35,56	0,39
13	3,24	4,78	39,01	35,48	2,09
14	3,20	5,09	38,85	35,41	2,03
15	3,65	5,04	38,56	33,83	2,20

Tabela 5.2 - Caracterização dos extratos obtidos por ultrassom

<i>Experimento</i>	<i>TS (%)</i>	<i>IC₅₀ (μg/mL)</i>	<i>Teor de Fenóis (%)</i>	<i>Teor Bergenina (%)</i>	<i>Rendimento Bergenina (%)</i>
1	2,16	3,293	26,06	36,86	1,40
2	2,65	3,503	31,79	39,15	1,76
3	3,07	2,763	34,90	35,71	1,78
4	3,13	4,96	23,65	36,00	2,08
5	0,8	3,775	35,14	38,27	2,46
6	1,01	4,052	33,33	36,53	2,42
7	3,45	3,408	36,79	37,26	0,78
8	4,46	3,397	37,37	36,45	1,30
9	0,76	3,45	34,49	32,70	2,21
10	0,99	3,818	36,09	34,76	3,21
11	2,68	3,379	37,05	32,78	0,85
12	3,91	4,224	36,15	34,87	0,99
13	2,9	2,86	36,99	33,03	2,51
14	1,84	2,987	34,78	34,71	1,66
15	2,26	2,991	36,03	34,68	1,94

Analisando-se as Tabelas 5.1 e 5.2, observa-se que o teor de sólidos foi maior para o processo de maceração, variando de 1,14 a 5,11%, enquanto para o processo de extração por ultrassom, esta variação foi de 0,76 a 4,46%. Geralmente, quanto maior o teor de sólidos maior a probabilidade de extração dos ativos de interesse.

A atividade antioxidante foi expressa em IC_{50} , ou seja, qual é a concentração de extrato necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH. Assim, quanto menor a IC_{50} mais antioxidante é o extrato. Analisando as Tabelas 5.1 e 5.2, todos os extratos apresentaram boa atividade antioxidante, sendo o método de extração por ultrassom o responsável por menores IC_{50} , chegando a 2,76 $\mu\text{g/mL}$. Assim, é necessária uma pequena concentração de extrato para inibir o radical DPPH, concentrações na ordem de $\mu\text{g/mL}$, comparável ou superior a plantas com reconhecida atividade antioxidante (LIMA et al., 2006; MARQUELE et al., 2006; SOUZA et al., 2007; ARAUJO; TEIXEIRA; FREITAS, 2010).

Como a classe dos fenóis é uma das mais importantes dentre as substâncias antioxidantes, decidiu-se avaliar os teores desta classe e observa-se que todos os extratos possuem um alto teor de fenóis, variando de 23 a 47%. Isto corrobora com a alta atividade antioxidante dos extratos adquiridos de *Endopleura uchi*, uma vez que as substâncias fenólicas conseguem neutralizar ou seqüestrar os radicais livres devido a sua estrutura química e suas propriedades redutoras, além de quelar os metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação quanto da propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007).

O teor de bergenina foi calculado com base na concentração presente em cada extrato, esta concentração por sua vez foi obtida através da curva padrão de bergenina. (Figura 5.2).

Figura 5.2: Curva padrão de bergenina para o método por CLAE.

Para ambos os processos extrativos, observam-se altos teores de marcador, em média 36%. A Figura 5.3 mostra os cromatogramas das diferentes concentrações do padrão bergenina, com um grau de pureza de 95,4% (Chromadex, Ltda).

Figura 5.3: Cromatograma do padrão bergenina em diferentes concentrações. a) 25; b) 50; c) 100; d) 200; e) 400 $\mu\text{g/mL}$

Na Figura 5.3, observam-se picos simétricos e bem característicos do padrão bergenina, sendo que o tempo de retenção ficou em média de 17,57 minutos. Tempo bastante próximo dos valores encontrados por Nunomura et al., (2009) que determinou um tempo de retenção de aproximadamente 16 minutos.

As Figuras 5.4 e 5.5 mostram um exemplo do perfil cromatográfico de extratos obtidos por maceração dinâmica e por ultrassom, respectivamente.

Figura 5.4: Cromatograma de um extrato obtido por maceração dinâmica

Tanto na Figura 5.4 como na 5.5, observa-se o pico da bergenina bastante característico em ambos os cromatogramas, e além disso, verifica-se que o mesmo encontra-se bastante isolado dos demais

O rendimento de bergenina foi calculado com base na massa de bergenina encontrada pela análise em CLAE sobre a massa de planta utilizada nos processos extrativos. Valor expresso em porcentagem. Nota-se que o processo de maceração dinâmica proporcionou um rendimento um pouco maior, chegando a 4,0%; valor este que é ligeiramente maior quando comparado à literatura (NUNOMURA et al., 2009).

Figura 5.5: Cromatograma de um extrato obtido por ultrassom

5.4 - Análise estatística – Processos extrativos

Com o auxílio do *software* Statistica®, realizou-se a análise estatística para todas as características avaliadas nos extratos, para ambos os processos; maceração dinâmica e ultrassom. As Tabelas 5.3 a 5.12 mostram os resultados das análises estatísticas. Elas estão dispostas sempre comparando os dois processos; e considerando um grau de significância com $p \leq 0,05$. As análises foram dispostas considerando cada variável avaliada.

5.4.1 - Teor de sólidos (TS)

Tabela 5.3 - Análise estatística do TS – Maceração dinâmica

Efeitos Gerais	SS	MS	F	P
Tempo	2,62892	2,62892	4,71447	0,082010
Tempo ²	0,22702	0,22702	0,40711	0,551513
Temperatura	0,23978	0,23978	0,43000	0,540960
Temperatura ²	0,54670	0,54670	0,98040	0,367566
% Planta	4,19196	4,19196	7,51747	0,040705
% Planta ²	5,23564	5,23564	9,38910	0,027969
Tempo*Temperatura	0,00010	0,00010	0,00018	0,989833
Tempo*%Planta	1,96841	1,96841	3,52996	0,119057
Temperatura*%Planta	0,20476	0,20476	0,36719	0,570993

Graus de liberdade = 1

Tabela 5.4 - Análise estatística do TS – Ultrassom

Efeitos Gerais	SS	MS	F	P
Tempo	0,39161	0,39161	2,37329	0,184056
Tempo ²	0,53903	0,53903	3,26669	0,130509
Potência	1,01531	1,01531	6,15310	0,055804
Potência ²	0,00508	0,00508	0,03077	0,867634
% Planta	14,96045	14,96045	90,66481	0,000216
% Planta ²	0,30079	0,30079	1,82285	0,234870
Tempo*Potência	0,04623	0,04623	0,28014	0,619258
Tempo*%Planta	0,16000	0,16000	0,96965	0,369988
Potência*%Planta	0,25000	0,25000	1,51507	0,273106

Graus de liberdade = 1

Com base na Tabela 5.3, nota-se que o TS foi influenciado pela % de planta e por este parâmetro ao quadrado, o grau de significância foi de 5% para ambos. A análise de efeitos quadráticos só pôde ser feita, pois se trabalhou com três níveis diferentes dos fatores estudados. (Tabela 4.1). A Figura 5.6 a) mostra a superfície de resposta desta influência da % de planta sobre o teor de sólidos, quanto maior a % de planta maior o teor de sólidos, e com base no gráfico também se pode notar o pouco ou nenhum efeito do tempo sobre o TS. Efeito semelhante da influência da % de planta pode ser visto na Figura 5.6 b) para o processo de ultrassom. Neste processo, observa-se que a % de planta teve um alto grau de influência no teor de sólidos, sendo que o nível de significância foi de 0,5% (Tabela 5.4).

Figura 5.6: Gráfico de superfície resposta do teor de sólidos em função do tempo e da % de planta. a) Maceração dinâmica; b) Ultrassom

Desta maneira, no processo de maceração dinâmica, a equação resultante do ajuste para os fatores significantes do TS, com $R = 0,9196$, é representada pela Equação 5.1.

$$TS = 3,36 + 0,72[(\%P-30)/20] - 1,19[(\%P-30)/20]^2 \quad \text{Equação 5.1}$$

No processo de ultrassom, a equação com $R = 0,9775$, é representada pela Equação 5.2:

$$TS = 2,33 + 1,37[(\%P-30)/20] \quad \text{Equação 5.2}$$

5.4.2 - Atividade antioxidante (AA)

A atividade antioxidante foi avaliada pela quantidade de amostra necessária para reduzir a concentração de DPPH em 50%, ou seja a IC_{50} .

Tabela 5.5 - Análise estatística da IC_{50} – Maceração dinâmica

Efeitos Gerais	SS	MS	F	P
Tempo	0,19158	0,19158	2,0005	0,216390
Tempo ²	0,64013	0,64013	6,6842	0,049111
Temperatura	0,64355	0,64355	6,7199	0,048702
Temperatura ²	0,13629	0,13629	1,4231	0,286404
% Planta	0,16445	0,16445	1,7172	0,247018
% Planta ²	0,05044	0,05044	0,5267	0,500550
Tempo*Temperatura	0,10498	0,10498	1,0962	0,343060
Tempo*%Planta	0,55652	0,55652	5,8111	0,060817
Temperatura*%Planta	0,49210	0,49210	5,1385	0,072727

Graus de liberdade = 1

Tabela 5.6 - Análise estatística da IC_{50} – Ultrassom

Efeitos Gerais	SS	MS	F	P
Tempo	0,89312	0,89312	5,4162	0,067441
Tempo ²	0,35942	0,35942	2,1797	0,199875
Potência	0,57245	0,57245	3,4715	0,121470
Potência ²	0,51027	0,51027	3,0944	0,138884
% Planta	0,05900	0,05900	0,3578	0,575807
% Planta ²	0,59077	0,59077	3,5826	0,116942
Tempo*Potência	0,98704	0,98704	5,9858	0,058181
Tempo*%Planta	0,02074	0,02074	0,1258	0,737346
Potência*%Planta	0,05688	0,05688	0,3450	0,582504

Graus de liberdade = 1

Observando a Tabela 5.5, a temperatura exerceu uma forte influência sobre a IC_{50} , sendo que quanto menor a temperatura maior a atividade antioxidante. A outra

variável significativa neste processo foi o tempo de extração ao quadrado, ou seja, tempos intermediários (aproximadamente 12 h) foram responsáveis por maiores IC_{50} e consequentemente menores atividades antioxidantes (Figura 5.7). O grau de significância foi de 5% para ambos. No processo de ultrassom não houve nenhuma variável estatisticamente significativa como pode ser notado na Tabela 5.6.

Figura 5.7: Gráfico de superfície resposta da IC_{50} em função da temperatura e do tempo – Maceração dinâmica

Assim, no processo de maceração dinâmica, a equação resultante do ajuste para os fatores significantes da AA, com $R = 0,9283$, é representada pela Equação 5.3.

$$AA = 4,97 - 0,42[(t-12)/6]^2 - 0,28[(T-35)/10] \quad \text{Equação 5.3}$$

No processo de ultrassom, como visto anteriormente não houve fator estatisticamente significativo para a AA.

5.4.3 - Teor de Fenóis (TF)

Como pode ser visto na Tabela 5.7, não houve nenhum fator estatisticamente significativo para o teor de fenóis no processo de maceração dinâmica.

Já na extração por ultrassom, o TF foi afetado pelos três fatores estudados no planejamento fatorial (tempo, potência e % de planta), a influência dos mesmos foi de forma quadrática, além disto, o TF foi afetado pela % de planta na sua forma linear e pela interação do tempo e da potência (Tabela 5.8).

Tabela 5.7 - Análise estatística do TF – Maceração dinâmica

<i>Efeitos Gerais</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Tempo	9,500	9,500	1,1015	0,341996
Tempo ²	1,505	1,505	0,1744	0,693519
Temperatura	0,022	0,022	0,0025	0,961936
Temperatura ²	8,084	8,084	0,9373	0,377433
% Planta	6,971	6,971	0,8083	0,409837
% Planta ²	50,893	50,893	5,9006	0,059445
Tempo*Temperatura	32,002	32,002	3,7104	0,112028
Tempo*%Planta	6,330	6,330	0,7340	0,430738
Temperatura*%Planta	5,179	5,179	0,6004	0,473453

Graus de liberdade = 1

Tabela 5.8 - Análise estatística do TF – Ultrassom

<i>Efeitos Gerais</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Tempo	5,690	5,690	4,806	0,079858
Tempo ²	46,682	46,682	39,434	0,001504
Potência	0,249	0,249	0,210	0,665993
Potência ²	39,511	39,511	33,377	0,002185
% Planta	8,647	8,647	7,305	0,042646
% Planta ²	39,899	39,899	33,704	0,002138
Tempo*Potência	72,141	72,141	60,940	0,000553
Tempo*%Planta	1,425	1,425	1,204	0,322516
Potência*%Planta	1,563	1,563	1,320	0,302584

Graus de liberdade = 1

As Figuras 5.8 e 5.9 mostram de forma mais clara estes efeitos.

Figura 5.8: Processo de ultrassom. Gráfico de superfície resposta do teor de fenóis em função do tempo e da potência.

Observando a Figura 5.8, nota-se o efeito quadrático da potência e do tempo, bem como o efeito de sua interação.

Figura 5.9: Processo de ultrassom. Gráfico de superfície resposta do teor de fenóis em função da potência e da % de planta.

Na Figura 5.9, observa-se o efeito da influência da % de planta. Além disso, a superfície formada é caracterizada como sela, isto ocorre quando as variáveis influenciam a resposta de forma quadrática, só que inversa. Neste caso, os valores de % de planta intermediários resultaram em menores teores de fenóis. Já os níveis intermediários de potência é que propiciaram melhores teores de fenóis.

Desta maneira, no processo de ultrassom, a equação resultante do ajuste para os fatores significantes do TF, com $R = 0,9869$, é representada pela Equação 5.4.

$$\begin{aligned} \text{TF} = & 35,92 - 3,56[(t-8)/4]^2 - 3,27[(P-65)/35]^2 + 1,04[(\%P-30)/20] + 3,29[(\%P-30)/20]^2 \\ & - 4,25 \{[(t-8)/4]*[(P-65)/35]\} \end{aligned} \quad \text{Equação 5.4}$$

No processo de maceração dinâmica, como visto anteriormente na Tabela 5.7, não houve fator estatisticamente significativo.

5.4.4 - Análise de bergenina

As Tabelas 5.9 a 5.12 mostram as análises do marcador bergenina, estas avaliações consistem no teor do marcador e no seu rendimento.

Tabela 5.9 - Análise estatística do teor de bergenina – Maceração dinâmica

<i>Efeitos Gerais</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Tempo	4,186	4,186	3,107	0,138263
Tempo ²	5,127	5,127	3,805	0,108564
Temperatura	2,515	2,515	1,867	0,230070
Temperatura ²	4,330	4,330	3,214	0,133010
% Planta	22,383	22,383	16,613	0,009578
% Planta ²	0,181	0,181	0,135	0,728683
Tempo*Temperatura	0,579	0,579	0,430	0,540932
Tempo*%Planta	0,000	0,000	0,000	0,994249
Temperatura*%Planta	0,028	0,028	0,021	0,891085

Graus de liberdade = 1

Tabela 5.10 - Análise estatística do teor de bergenina – Ultrassom

<i>Efeitos Gerais</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Tempo	0,000	0,000	0,000	0,996186
Tempo ²	34,841	34,841	12,216	0,017374
Potência	0,003	0,003	0,001	0,974798
Potência ²	0,284	0,284	0,100	0,765088
% Planta	0,098	0,098	0,034	0,860265
% Planta ²	0,025	0,025	0,009	0,929104
Tempo*Potência	0,994	0,994	0,348	0,580638
Tempo*%Planta	0,218	0,218	0,076	0,793421
Potência*%Planta	0,000	0,000	0,000	0,992443

Graus de liberdade = 1

Tabela 5.11 - Análise estatística do rendimento de bergenina – Maceração dinâmica

<i>Efeitos Gerais</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Tempo	0,75149	0,75149	5,56230	0,064875
Tempo ²	0,07714	0,07714	0,57093	0,483945
Temperatura	0,29102	0,29102	2,15403	0,202120
Temperatura ²	0,07805	0,07805	0,57770	0,481498
% Planta	13,50562	13,50562	99,96405	0,000171
% Planta ²	0,00138	0,00138	0,01023	0,923354
Tempo*Temperatura	0,01354	0,01354	0,10023	0,764342
Tempo*%Planta	0,00360	0,00360	0,02668	0,876655
Temperatura*%Planta	0,16889	0,16889	1,25009	0,314357

Graus de liberdade = 1

Tabela 5.12 - Análise estatística do rendimento de bergenina – Ultrassom

<i>Efeitos Gerais</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Tempo	0,16046	0,16046	1,6877	0,250576
Tempo ²	0,12025	0,12025	1,2648	0,311813
Potência	0,41749	0,41749	4,3912	0,090264
Potência ²	0,04099	0,04099	0,4311	0,540454

% Planta	5,06720	5,06720	53,2980	0,000755
% Planta ²	0,05093	0,05093	0,5357	0,497082
Tempo*Potência	0,00067	0,00067	0,0071	0,936158
Tempo*%Planta	0,07600	0,07600	0,7994	0,412250
Potência*%Planta	0,18169	0,18169	1,9111	0,225408

Graus de liberdade = 1

Na maceração dinâmica (Tabela 5.9 e 5.11), houve variáveis significantes para o teor de bergenina e para seu rendimento, no caso da primeira resposta a % de planta influenciou com um nível de significância de 1%, quanto maior a % de planta maior o teor do marcador, porém no rendimento de bergenina este efeito foi inverso, quanto maior a % de planta menor o rendimento de bergenina, isto porque como os teores ficaram próximos, quanto mais massa de planta utilizada menor o rendimento. Estes efeitos podem ser vistos na Figura 5.10 a) e 5.11 a).

Já no processo extrativo por ultrassom, o teor do marcador foi influenciado pelo tempo ao quadrado, com um nível de significância de 5%; isto pode ser visto mais claramente na Figura 5.10 b) observa-se a superfície resposta em forma de parábola, os tempos intermediários proporcionaram menores teores de bergenina. Já com relação ao rendimento, a variável que exerceu influência significativa num nível de 0,1% foi a % de planta; observando a Figura 5.11 b); nota-se que quanto menor a % de planta maior o rendimento, efeito semelhante ao ocorrido no processo de maceração dinâmica.

Figura 5.10 Gráfico de superfície resposta do teor de bergenina em função do tempo e da % de planta. a) Maceração dinâmica; b) Ultrassom

Figura 5.11 Gráfico de superfície resposta do rendimento de bergenia em função do tempo e da % de planta. a) Maceração dinâmica; b) Ultrassom

Assim, no processo de maceração dinâmica, as equações resultantes dos ajustes para os fatores significantes do TB e do RB, com $R = 0,9253$ e $R = 0,9780$; respectivamente são representadas pelas Equações 5.5 e 5.6.

$$TB = 34,91 + 1,67[(\%P-30)/20] \quad \text{Equação 5.5}$$

$$RB = 2,10 - 1,30[(\%P-30)/20] \quad \text{Equação 5.6}$$

No processo de ultrassom, as equações para o TB e RB com $R = 0,8509$ e $R = 0,9631$; respectivamente, são representadas pelas Equações 5.7 e 5.8

$$TB = 34,14 + 3,07[(t-8)/4] \quad \text{Equação 5.7}$$

$$RB = 2,04 - 0,79[(\%P-30)/20] \quad \text{Equação 5.8}$$

5.5 - Otimização da extração baseado nas características dos extratos

O planejamento fatorial é uma importante ferramenta para proporcionar diferentes caminhos e orientar quais características deseja-se obter e quais os fatores podem ser melhorados (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978; PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005). No entanto, esta ferramenta proporcionou,

para os métodos extrativos escolhidos, muitas variáveis e diferentes respostas obtidas, assim era necessário fazer uma otimização de resposta. Isto foi realizado através do método da desejabilidade. Este método matemático pode fornecer as melhores combinações dos parâmetros escolhidos que permitam as respostas mais desejáveis (COLOMBARI, 2004).

Neste tipo de análise, escolhe-se quais variáveis deseja-se otimizar e qual o peso de cada uma na resposta global. Assim, quanto maior o coeficiente de resposta, chamado de índice de desejabilidade, mais otimizada a sua resposta. (Descrito mais detalhadamente no item 2.8.1)

Esta otimização pode ser vista na Tabela 5.13. No caso, foram feitas otimizações para os processos extrativos de maceração dinâmica e de ultrassom, sendo escolhidas como respostas mais relevantes a atividade antioxidante e o teor de bergenina. Quanto mais próximo de 1 for o índice de desejabilidade melhor a resposta.

Tabela 5.13 - Resultados das análises de otimização

Maceração	Ultrassom
Solução Global (níveis codificados) Tempo = 1 Temperatura = -1 % Planta = -0,676768 Desejabilidade IC50 – desejabilidade = 0,896283 RB – desejabilidade = 0,922130 Índice de Desejabilidade = 0,909114	Solução Global (níveis codificados) Tempo = -0,656566 Potencia = 0,393939 % Planta = -0,616162 Desejabilidade IC50 – desejabilidade = 0,728795 RB – desejabilidade = 0,780740 Índice de Desejabilidade = 0,754320

Como pode ser visto na Tabela 5.13, o processo com maior índice de desejabilidade global foi o de maceração dinâmica, com um valor de 0,9091.

Para decodificar os níveis, utiliza-se a equação 5.9, na qual há a substituição dos níveis em seus valores reais (maiores e menores) descritos na Tabela 4.2

$$cod = \frac{ncod - 0.5(maior + menor)}{0.5(maior - menor)} \quad \text{Equação 5.9}$$

Onde, cod = valor codificado; ncod = valor não codificado, valor real.

Assim através do índice de desejabilidade, escolheu-se como método extrativo a maceração dinâmica e os níveis das variáveis foram os encontrados no programa, ou seja, tempo (1); temperatura (-1) e % de planta (-0,67) e de acordo com a equação 5.9, os valores reais correspondem a 18h; 25°C e 16,5%; respectivamente.

Além disso, a maceração dinâmica é um processo muito usado devido a sua simplicidade e adequação a diferentes escalas: laboratoriais a industriais e a agitação melhora o contato do material vegetal com o solvente, aumentando a eficiência de extração (CORREIA, 2006).

Na análise de otimização de resposta, além do índice de desejabilidade, é possível estimar os valores das respostas escolhidas. A Tabela 5.14 mostra os valores propostos e calculados pelo programa Minitab®.

Tabela 5.14 - Resultados das análises de otimização – respostas escolhidas

Maceração	Ultrassom
Repostas preditas IC50 = 4,20 µg/mL RB = 3,69 %	Repostas preditas IC50 = 3,04 µg/mL RB = 2,50 %

Assim, foi realizada uma extração em maior quantidade pelo processo eleito de maceração dinâmica para dar continuidade nos experimentos. Uma parte deste extrato foi retirada e liofilizada nas mesmas condições descritas no item 4.5.1. E realizou-se análises da atividade antioxidante (Item 4.5.2) e do rendimento de bergenina (Item 4.5.4) para verificar a compatibilidade dos resultados reais com os preditos pela otimização. A Tabela 5.15 mostra esta comparação dos valores.

Tabela 5.15 - Comparação dos resultados reais e preditos

Predito	Real
IC50 = 4,20 µg/mL RB = 3,69 %	IC50 = 3,82 µg/mL RB = 3,65 %

Observando a Tabela 5.15, nota-se a proximidade dos valores preditos e reais, evidenciando a confiabilidade da ferramenta de desejabilidade. Desta maneira, este tipo de ferramenta pode ser utilizado em diferentes tipos de experimentos e processos laboratoriais, seguindo o exemplo de ambientes industriais (COLOMBARI, 2004).

Este tipo de ferramenta possibilita uma maior abrangência dos resultados e pode ajudar a tomar decisões quando se depara com processos em que há uma grande variedade de respostas, através do auxílio matemático.

5.6 - Secagem em *spray dryer*

Após a escolha do melhor processo extrativo, bem como suas melhores condições, realizou-se como dito anteriormente uma extração em maior volume para iniciar o processo de secagem. Desta forma, a Tabela 5.16 mostra os valores de rendimentos obtidos para cada secagem. Nota-se que houve uma grande diferença de rendimento, mas mesmo com esta variação em todos os ensaios os valores de rendimentos são altos, considerando a escala laboratorial (AMERI; MAA, 2006; MARTINS et al., 2012).

Tabela 5.16 - Valores dos rendimentos do processo de secagem

<i>Experimento</i>	<i>Rendimento (%)</i>
1	50,8
2	50,5
3	46,8
4	64,8
5	64,8
6	66,0
7	70,9
8	72,2
9	68,9
10	64,4
11	65,2

5.7 – Caracterização do extrato seco

Os pós obtidos no processo de secagem foram submetidos as análises de atividade antioxidante, teor e rendimento de bergenina assim como o teor de fenóis, para verificar se houve alterações significativas destes parâmetros após o processo de secagem por *spray dryer*. Os resultados desta caracterização encontram-se na Tabela 5.17.

Tabela 5.17 - Caracterização dos extratos obtidos no processo de secagem

<i>Experimento</i>	<i>IC₅₀</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Teor de</i> <i>Fenóis (%)</i>	<i>Teor</i> <i>Bergenina</i> (%)	<i>Rendimento</i> <i>Bergenina</i> (%)
1	3,92	27,34	34,68	3,96
2	4,83	30,29	33,08	3,78
3	7,95	30,10	34,20	3,90
4	3,43	31,57	32,78	3,74
5	5,16	30,42	32,24	3,68
6	7,25	31,47	34,76	3,97
7	4,58	29,42	36,76	4,20
8	9,87	29,17	33,42	3,81
9	11,90	25,42	32,24	3,68
10	5,76	31,19	34,99	3,99
11	5,45	30,10	35,87	4,09

Analisando a Tabela 5.17, observa-se que os valores de IC₅₀ variaram bastante; de 3,43 a 11,90 $\mu\text{g/mL}$, mas mesmo com esta variação, obteve-se valores baixos de IC₅₀, indicando que dependendo da condição experimental, o processo de secagem possibilitou a manutenção de valores com baixa IC₅₀, e consequentemente, ótima atividade antioxidante.

Os teores de fenóis variaram de 27,34 a 31,57%, também ficaram próximos dos valores obtidos para os processos extrativos (Tabelas 5.1 e 5.2).

Para teor de bergenina, obtiveram-se resultados com uma pequena variação de 32,24 a 36,76%, e para o seu rendimento, encontraram-se valores de 3,68 a 4,20%; indicando que as condições de secagem utilizadas não afetaram o marcador bergenina.

5.8 - Análise estatística – pós obtidos na secagem

5.8.1 – Rendimento (R)

A Tabela 5.18 mostra a análise estatística para o rendimento do processo de secagem. Como pode ser visto, a temperatura exerceu uma influência muito grande no rendimento, com um nível de significância de 0,001%. Este fator ao quadrado também exerceu influência no rendimento do processo com um nível de 1% de significância.

Tabela 5.18 - Análise estatística do rendimento do processo de secagem

Efeitos Gerais	SS	MS	F	P
Temperatura	680,54	680,54	221,650	0,000025
Temperatura ²	56,53	56,53	18,411	0,007783
Aditivo	2,16	2,16	0,704	0,439852
Aditivo ²	1,15	1,15	0,374	0,567330
Temperatura*Aditivo	1,00	1,00	0,326	0,592893

Graus de liberdade = 1

A Figura 5.12 mostra a influência linear e quadrática da temperatura. Observa-se que quanto maior a temperatura maior o rendimento do processo, no entanto, até certo ponto (~ 80°C), após este valor inicia-se um platô, ou seja, aumentando a temperatura o rendimento não tem mudanças consideráveis. Nota-se ainda nenhum efeito da % de aditivo. Estes efeitos podem ser vistos na Figura 5.12. A temperatura e a quantidade de aditivo adicionada são parâmetros que interferem bastante no processo de secagem, por isso o motivo da sua escolha. Na maioria dos processos a temperatura e o rendimento são diretamente proporcionais (CAL; SOLLOHUB, 2010; JANGAM; THORAT, 2010; ZHANG et al., 2010).

Figura 5.12: Gráfico de superfície resposta do rendimento em função da temperatura e da % de aditivo

A equação resultante do ajuste dos fatores significantes para o rendimento do processo com um $R = 0,9899$; é mostrada na Equação 5.10

$$R = 65,19 + 10,65[(T-60)/20] - 4,72[(T-60)/20]^2 \quad \text{Equação 5.10}$$

5.8.2 – Atividade antioxidante (AA)

A atividade antioxidante, que é analisada através da IC_{50} foi afetada pela temperatura na forma linear e quadrática e pela % de aditivo utilizado; com significância de 1; 5 e 1%; respectivamente. Resultados estes mostrados na Tabela 5.19.

Tabela 5.19 - Análise estatística da IC_{50} dos pós obtidos pelo processo de secagem

<i>Efeitos Gerais</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Temperatura	15,4722	15,4722	20,2161	0,006422
Temperatura ²	8,3611	8,3611	10,9247	0,021352
% Aditivo	38,2639	38,2639	49,9957	0,000875
% Aditivo ²	0,0951	0,0951	0,1243	0,738784
Temperatura*% Aditivo	2,6912	2,6912	3,5164	0,119611

Graus de liberdade = 1

A Figura 5.13 mostra mais claramente a influência dos fatores sobre a IC_{50} ; nota-se que quanto maior a % de aditivo, maior a IC_{50} e consequentemente menor a atividade antioxidante. Observa-se ainda que temperaturas intermediárias e mais brandas proporcionaram menores IC_{50} , ou seja, uma maior atividade antioxidante. O aumento de temperatura pode propiciar a degradação de algumas classes químicas de substâncias e assim fazer com que diminua a atividade antioxidante, pois dependendo da classe ela pode ser responsável pela atividade ou fazer um sinergismo com outras moléculas e ajudar na redução de radicais.

Figura 5.13: Gráfico de superfície resposta da IC_{50} em função da temperatura e da % de aditivo

A equação resultante do ajuste dos fatores significantes para a atividade antioxidante com um $R = 0,9718$; é mostrada na Equação 5.11

$$AA = 5,48 + 1,60[(T-60)/20] + 1,81[(T-60)/20]^2 + 2,52[(A-60)/40] \quad \text{Equação 5.11}$$

5.8.3 – Teor de Fenóis

A Tabela 5.20 mostra a análise estatística para o teor de fenóis. Observa-se que houve influência da temperatura na sua forma quadrática e da interação da temperatura e da % de aditivo. A significância foi de 5% para ambos.

Tabela 5.20 - Análise estatística do teor de fenóis dos pós obtidos pelo processo de secagem

<i>Efeitos Gerais</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Temperatura	2,304	2,304	2,281	0,191326
Temperatura ²	12,428	12,428	12,307	0,017135
% Aditivo	0,302	0,302	0,299	0,607976
% Aditivo ²	0,447	0,447	0,443	0,535323
Temperatura*% Aditivo	11,434	11,434	11,322	0,020001

Graus de liberdade = 1

A Figura 5.14 mostra melhor este efeito, observa-se que temperaturas intermediárias propiciaram melhores teores de fenóis.

Figura 5.14: Gráfico de superfície resposta do TF em função da temperatura e da % de aditivo

A equação resultante do ajuste dos fatores significantes para o teor de fenóis com um $R = 0,9235$; é mostrada na Equação 5.12

$$TF = 32,11 - 2,21[(T-60)/20]^2 - 1,69\{[(T-60)/20]*[(A-60)/40]\} \quad \text{Equação 5.12}$$

5.8.4 – Análises de bergenina

Analisando-se as Tabelas 5.21 e 5.22, nota-se que tanto o teor como o rendimento de bergenina não foram influenciados de forma significativa pelos fatores estudados (temperatura do processo e % de aditivo). No entanto, o teor de bergenina e o seu rendimento mantiveram valores bastante semelhantes àqueles apresentados pelos extratos obtidos por maceração dinâmica e ultrassom. Isto pode evidenciar que o processo de secagem por *spray dryer* não afetou o marcador bergenina.

Tabela 5.21 - Análise estatística do teor de bergenina dos pós obtidos pelo processo de secagem

Efeitos Gerais	SS	MS	F	P
Temperatura	0,035	0,035	0,011	0,920403
Temperatura ²	0,065	0,065	0,020	0,891908
% Aditivo	1,520	1,520	0,476	0,521008
% Aditivo ²	0,327	0,327	0,102	0,761819
Temperatura*% Aditivo	4,080	4,080	1,277	0,309672

Graus de liberdade = 1

Tabela 5.22 - Análise estatística do rendimento de bergenina dos pós obtidos pelo processo de secagem

Efeitos Gerais	SS	MS	F	P
Temperatura	0,00042	0,00042	0,010	0,924208
Temperatura ²	0,00074	0,00074	0,018	0,899067
% Aditivo	0,02042	0,02042	0,490	0,515029
% Aditivo ²	0,00466	0,00466	0,112	0,751529
Temperatura*% Aditivo	0,05290	0,05290	1,270	0,310865

Graus de liberdade = 1

5.9 - Caracterização farmacotécnica do pó

A análise de propriedades farmacotécnicas de pós é de grande importância no desenvolvimento de um medicamento seja ele de origem sintética ou vegetal (AULTON, 2005).

Algumas características da análise farmacotécnica dos pós obtidos no processo de secagem por *spray dryer* encontram-se na Tabela 5.23.

Esta caracterização compreende a análise do teor de umidade (TU), densidade aparente (*da*) e compactada (*dc*), fator de Hausner (FH), índice de Carr (IC), ângulo de repouso (AR) e tamanho de partícula, expresso em D_{50} .

Tabela 5.23 – Características farmacotécnicas dos pós obtidos

Exp	TU (%)	da	dc	FH	IC	AR (°)	D₅₀(μm)
1	5,36	0,2	0,26	1,33	25	39	306
2	5,59	0,24	0,34	1,43	30	37	181
3	5,76	0,29	0,43	1,48	32	30	76
4	5,79	0,16	0,22	1,33	25	37	184
5	5,72	0,22	0,32	1,43	30	33	121
6	5,6	0,32	0,46	1,43	30	28	83
7	5,89	0,16	0,22	1,33	25	39	218
8	5,06	0,21	0,3	1,43	30	34	126
9	5,43	0,28	0,41	1,43	30	26	77
10	5,46	0,23	0,35	1,54	35	31	125
11	5,94	0,24	0,33	1,43	30	31	106

5.9.1 – Teor de Umidade (TU)

O teor de umidade de um produto seco pode ser considerado como um indicador de qualidade do pó e do processo de secagem. Índices de umidade abaixo de 7% indicam que o pó apresenta uma boa qualidade. Como pode ser visto na Tabela 5.23, todos os pós apresentaram um teor de umidade muito semelhante, variando de 5,06 a 5,94. Estes valores podem ser considerados como valores satisfatórios. Considerando ainda que em todos os experimentos de secagem, trabalhou-se com temperaturas abaixo de 100°C (JANGAM; THORAT, 2010; ZHANG et al., 2010).

A Tabela 5.24 mostra a análise estatística da umidade, como pode ser visto nenhum fator influenciou de forma significativa.

Tabela 5.24 – Análise estatística do teor de umidade dos pós obtidos pelo processo de secagem

Efeitos Gerais	SS	MS	F	P
Temperatura	0,0181	0,0181	0,291	0,612743
Temperatura ²	0,1289	0,1289	2,066	0,210153
% Aditivo	0,0104	0,0104	0,167	0,699710
% Aditivo ²	0,0529	0,0529	0,848	0,399447
Temperatura*% Aditivo	0,1849	0,1849	2,964	0,145744

Graus de liberdade = 1

5.9.2 – Análise do fluxo dos pós

O fluxo de um pó é uma determinação de grande importância para a caracterização de um produto seco, uma vez que na maioria dos processos industriais os pós têm que ser transferidos de um local para o outro e quanto mais livre o fluxo, mais fácil esta transferência. O fluxo de um pó está diretamente relacionado com as propriedades das partículas como a adesão e a coesão. A adesão pode ser considerada como uma força molecular que ocorre entre superfícies diferentes, por exemplo, o pó e o recipiente de acondicionamento, já a coesão é uma força molecular entre superfícies semelhantes, por exemplo, as superfícies da própria partícula. Estas forças são principalmente decorrentes das interações de van der Waals e aumentam inversamente ao tamanho de partícula (AULTON, 2005).

A da e a dc são empregadas para determinar o FH e o IC. O FH está relacionado com o atrito das partículas e conseqüentemente com o fluxo. O IC pode ser definido como percentual de compressibilidade de um pó, medida da resistência dos arranjos formados por um pó, ou seja, relaciona-se com a sua estabilidade. O IC é uma medida de um único ponto e às vezes não reflete a facilidade ou a velocidade com a qual um pó se consolida. Alguns pós podem ter um IC elevado, indicando um mau fluxo, mas consolidam-se rapidamente. (AULTON, 2005)

A Tabela 5.23 mostra estas características e como pode ser observado a “ da ” variou de 0,16 a 0,32 g/mL. A dc de 0,22 a 0,46 g/mL. Estes valores como ditos anteriormente são utilizados para calcular o FH e o IC. Na Tabela 5.25, pode ser encontrada a classificação dos pós segundo estes índices. (USPXXX, 2007)

Analisando estes índices para as partículas obtidas (Tabela 5.23), observa-se que o fluxo dos pós pode ser classificado de tolerável a muito ruim, uma vez que o FH variou de 1,33 a 1,54 e o IC de 25 a 35. Deve-se ressaltar que estas são medidas pontuais e relacionam-se a estabilidade de empacotamento e dependem muito do método empregado (HEBERLÉ; WEHRMANN; PETROVIC, 2000; USPXXX, 2007). Os dados mostram que os pós estudados possuem altas forças de coesão, ou seja, a interação entre as superfícies da própria partícula é alta.

Além disso, pós derivados de extratos de plantas, secos por *spray drying*, tendem a possuir uma baixa fluidez, isto ocorre devido ao pequeno tamanho de partícula formado, devido às altas pressões utilizadas para realização da atomização (formação das pequenas gotículas), contribuindo para uma maior molhabilidade e

uma maior adesão das partículas, o que acaba dificultando o fluxo (SOLLOHUB; CAL, 2010).

Tabela 5.25: Fluxo de pós relacionado ao FH e IC.

Propriedade de Fluxo	FH	IC
Excelente	1,00-1,11	<10
Bom	1,12-1,18	11-15
Razoável	1,19-1,25	16-20
Tolerável	1,26-1,34	21-25
Ruim	1,35-1,45	26-31
Muito ruim	1,46-1,59	32-37
Extremamente ruim	>1,60	>38

As Tabelas 5.26 a 5.28 mostram as análises estatísticas da *da*, *dc*, FH e IC.

Tabela 5.26 – Análise estatística da densidade aparente dos pós obtidos pelo processo de secagem

Efeitos Gerais	SS	MS	F	P
Temperatura	0,001067	0,001067	4,3694	0,090864
Temperatura ²	0,000101	0,000101	0,4139	0,548318
% Aditivo	0,022817	0,022817	93,4639	0,000201
% Aditivo ²	0,000191	0,000191	0,7826	0,416851
Temperatura*% Aditivo	0,000225	0,000225	0,9217	0,381129

Graus de liberdade = 1

Como pode ser visto na Tabela 5.26, a % de aditivo influenciou de forma bastante significativa, nível de 0,05% a densidade aparente. A Figura 5.15 mostra este efeito, sendo que quanto menor a % de aditivo, menor a “*da*”, desta maneira quanto menos aditivo utilizado, menor a massa de pó que ocupa um determinado volume.

Figura 5.15: Gráfico de superfície resposta da da em função da temperatura e da % de aditivo

A equação resultante do ajuste dos fatores significantes para a densidade aparente (da) com um $R = 0,9758$; é mostrada na Equação 5.13

$$da = 0,23 + 0,06[(A-60)/40] \quad \text{Equação 5.13}$$

Analisando a Tabela 5.27 nota-se que a % de aditivo exerceu uma grande influência com um nível de significância de 0,005%, sobre a densidade compactada, a exemplo do efeito ocorrido com a densidade aparente.

Tabela 5.27 – Análise estatística da densidade compactada dos pós obtidos pelo processo de secagem

<i>Efeitos Gerais</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Temperatura	0,001667	0,001667	4,882	0,078155
Temperatura ²	0,000340	0,000340	0,995	0,364349
% Aditivo	0,060000	0,060000	175,745	0,000044
% Aditivo ²	0,000180	0,000180	0,526	0,500722
Temperatura*% Aditivo	0,000100	0,000100	0,293	0,611595

Graus de liberdade = 1

O efeito da % de aditivo sobre a densidade compactada pode ser visto na Figura 5.16. Quanto maior a % de aditivo, maior a densidade compactada.

Figura 5.16: Gráfico de superfície resposta da dc em função da temperatura e da % de aditivo

A equação resultante do ajuste dos fatores significantes para a densidade compactada (dc) com um $R = 0,9866$; é mostrada na Equação 5.14

$$dc = 0,33 + 0,10[(A-60)/40] \quad \text{Equação 5.14}$$

A Tabela 5.28 mostra a análise estatística para o FH, e a exemplo das densidades, o único fator que exerceu significância foi a % de Aditivo, com um nível de 5%.

Tabela 5.28 – Análise estatística do FH dos pós obtidos pelo processo de secagem

<i>Efeitos Gerais</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Temperatura	0,000417	0,000417	0,208	0,667374
Temperatura ²	0,000295	0,000295	0,147	0,716900
% Aditivo	0,020417	0,020417	10,198	0,024172
% Aditivo ²	0,009362	0,009362	4,676	0,082933
Temperatura*% Aditivo	0,000625	0,000625	0,312	0,600440

Graus de liberdade = 1

Observando a Figura 5.17, nota-se que conforme a % de aditivo foi aumentando, aumentou-se o FH, entretanto isto ocorreu até mais ou menos 80% de aditivo, depois, iniciou-se uma relação inversa.

Figura 5.17: Gráfico de superfície resposta do FH em função da temperatura e da % de aditivo

A equação resultante do ajuste dos fatores significantes para o FH com um $R = 0,8753$; é mostrada na Equação 5.15.

$$FH = 1,46 + 0,06[(A-60)/40] \quad \text{Equação 5.15}$$

Na Tabela 5.29, estão os dados resultantes da análise estatística do IC, nota-se que a exemplo das outras análises do fluxo de pós, a % de aditivo exerceu influência significativa, com um nível de 5%.

Tabela 5.29 – Análise estatística do IC dos pós obtidos pelo processo de secagem

Efeitos Gerais	SS	MS	F	P
Temperatura	0,667	0,667	0,1642	0,702059
Temperatura ²	0,702	0,702	0,1729	0,694823
% Aditivo	48,167	48,167	11,8647	0,018346
% Aditivo ²	23,202	23,202	5,7152	0,062337
Temperatura*% Aditivo	1,000	1,000	0,2463	0,640719

Graus de liberdade = 1

A Figura 5.18 mostra o efeito desta influência, a exemplo do FH, quanto maior a % de aditivo, maior o IC, no entanto, isto ocorre até um determinado momento, aproximadamente 80% de aditivo, acima deste valor, começa uma relação inversamente proporcional.

Figura 5.18: Gráfico de superfície resposta do IC em função da temperatura e da % de aditivo

A equação resultante do ajuste dos fatores significantes para o IC com um $R=0,8906$; é mostrada na Equação 5.16

$$IC = 31,21 + 2,83[(A-60)/40] \quad \text{Equação 5.16}$$

5.9.3 – Ângulo de Repouso (AR)

O ângulo de repouso é um método indireto bastante empregado para determinar o fluxo de um pó.

Analisando a Tabela 5.23, nota-se que todas as amostras apresentaram ângulos inferiores a 40° , variando de 26 a 39° , assim todas as amostras podem ser consideradas detentoras de fluxos excelentes a aceitáveis, como classificado na Farmacopéia Americana (2007), visto na Tabela 5.30.

Esta diferença de fluxo quando se compara o FH e IC com o ângulo de repouso, pode ser decorrente do fato de os primeiros estarem relacionados com a estabilidade e a velocidade de empacotamento. (HEBERLÉ; WEHRMANN; PETROVICK, 2000).

Tabela 5.30 – Classificação do fluxo do pó baseado no ângulo de repouso

Ângulo	Fluxo
25-30	Excelente
31-35	Bom
36-40	Razoável
41-45	Regular
46-55	Pobre
56-65	Muito Pobre
>66	Ruim

A Tabela 5.31 mostra a análise estatística para o ângulo de repouso, como pode ser visto, ele foi afetado significativamente, pela % de aditivo empregada, num grau de significância de 0,5%

Tabela 5.31 – Análise estatística do teor de umidade dos pós obtidos pelo processo de secagem

Efeitos Gerais	SS	MS	F	P
Temperatura	8,167	8,167	3,533	0,118949
Temperatura ²	14,528	14,528	6,284	0,054035
% Aditivo	174,241	174,241	75,370	0,000335
% Aditivo ²	0,928	0,928	0,401	0,554188
Temperatura*% Aditivo	3,361	3,361	1,454	0,281845

Graus de liberdade = 1

Na Figura 5.19, pode ser visto mais claramente esta influência, quanto maior a quantidade de aditivo, menor o ângulo de repouso, e consequentemente, melhor o fluxo. Um dos aditivos empregados no processo de secagem, o dióxido de silício coloidal, é muito usado com a finalidade de melhorar as propriedades tecnológicas de um pó, principalmente o fluxo e a higroscopicidade (DE SOUZA et al., 2000; PINA et al., 2011). Assim, ele pode ser responsável por este efeito no ângulo de repouso.

Figura 5.19: Gráfico de superfície resposta do AR em função da temperatura e da % de aditivo

A equação resultante do ajuste dos fatores significantes para o ângulo de repouso com um $R = 0,9723$; é mostrada na Equação 5.17

$$AR = 32,18 - 5,39[(A-60)/40] \quad \text{Equação 5.17}$$

5.9.4 – Tamanho das partículas

O tamanho de partícula também é de fundamental importância na caracterização de um pó. Ele pode ser expresso em D_{50} , que é considerado como o tamanho médio de partícula.

Como pode ser visto na Tabela 5.23, houve uma grande variação no D_{50} , obtiveram-se valores de 76 a 306 μm .

A análise estatística feita para o tamanho médio de partícula, D_{50} , encontra-se na Tabela 5.32.

Tabela 5.32 – Análise estatística do tamanho médio de partícula, D_{50} , dos pós obtidos pelo processo de secagem

Efeitos Gerais	SS	MS	F	P
Temperatura	3310,69	3310,69	6,3850	0,052732
Temperatura ²	3252,72	3252,72	6,2732	0,054182
% Aditivo	37122,43	37122,43	71,5942	0,000379
% Aditivo ²	633,92	633,92	1,2226	0,319197
Temperatura*% Aditivo	2021,03	2021,03	3,8977	0,105347

Graus de liberdade = 1

Como pode ser visto o fator que exerceu grande influência, com um grau de significância de 0,05% foi a % de aditivo. Na Figura 5.20, este efeito pode ser visualizado mais claramente, observa-se que quanto maior a % de aditivo, menor o tamanho de partícula, efeito inversamente proporcional.

Figura 5.20: Gráfico de superfície resposta do D_{50} em função da temperatura e da % de Aditivo

A equação resultante do ajuste dos fatores significantes para o D_{50} com um $R = 0,9738$; é mostrada na Equação 5.18

$$D_{50} = 117,55 - 78,65[(A-60)/40] \quad \text{Equação 5.18}$$

Este efeito bastante pronunciado no tamanho de partícula influencia também o fluxo e o empacotamento do pó, uma vez que quanto mais aditivo utilizado menor o tamanho de partícula, menor o ângulo de repouso e menor o empacotamento, pois as partículas menores já estão mais próximas, diminuindo a compactação e consequentemente o empacotamento (HEBERLÉ; WEHRMANN; PETROVIC, 2000; GALLO et al., 2011).

5.10 – Morfologia das Partículas

As Figuras 5.21 a 5.23 mostram as fotomicrografias provenientes do pó liofilizado, do extrato seco por *spray dryer* sem nenhum aditivo e o pó do experimento 4 do planejamento fatorial (item 4.6); respectivamente.

a)

b)

Figura 5.21: Fotomicrografia do pó liofilizado a) Aumento de 1000. b) Aumento de 5000

Analisando a Figura 5.21, nota-se que as partículas provenientes da liofilização são em formatos pontiagudos, podendo ser decorrente do processo de secagem que é feito através da sublimação da água de forma bastante lenta.

a)

b)

c)

Figura 5.22: Fotomicrografia do extrato seco por *spray dryer* sem nenhum aditivo.
a) Aumento de 1000. b) Aumento de 5000. c) Aumento de 10000.

a)

b)

c)

Figura 5.23: Fotomicrografia do pó do experimento 4. a) Aumento de 1000. b) Aumento de 5000. c) Aumento de 10000.

Tanto na Figura 5.22 como na Figura 5.23, observam-se partículas com formato bem esférico, principalmente, no aumento de 10000 (Figura 5.22 c e 5.23 c). Este formato pode ser proveniente da técnica de secagem por *spray dryer*, que através da aspersão em mínimas gotículas, possibilita uma rápida evaporação do solvente, pois como a atomização gera gotículas de tamanho bem pequeno, a evaporação da água ocorre de forma bastante rápida, possibilitando a formação de partículas esféricas, como encontrado na literatura (WALTON; MUMFORD, 1999; WALTON, 2000; MARTINS et al., 2012).

Na Figura 5.23, nota-se que as partículas possuem uma superfície mais rugosa, devido a utilização dos aditivos de secagem, amido e aerosil® que contribuíram para este tipo de morfologia, partículas esféricas, entretanto com superfície apresentando irregularidades.

5.11 - Atividade antimicrobiana

A Tabela 5.33 mostra os resultados obtidos da concentração inibitória mínima, para todas as amostras analisadas. Como pode ser observado, todas as amostras mostraram inibição no crescimento sobre os diferentes gêneros de *Candida* avaliados; as cepas *Cg* e *Ck* mostraram-se bastante sensíveis, uma vez que concentrações baixas (cerca de 3,25 µg/mL) foram capazes de inibir seu crescimento, diferente da cepa *Ca* que precisou de extratos mais concentrados para inibir seu crescimento, mas mesmo assim todos os extratos mostraram-se eficientes na inibição do crescimento das leveduras.

Tabela 5.33 – CIM para as diferentes amostras analisadas

Cepas	Extratos			
	E1	E4	EL	ES
<i>Ca</i>	2500 µg/mL	2500 µg/mL	2500 µg/mL	2500 µg/mL
<i>Cg</i>	3,25 µg/mL	3,25 µg/mL	3,25 µg/mL	3,25 µg/mL
<i>Ck</i>	3,25 µg/mL	3,25 µg/mL	3,25 µg/mL	3,25 µg/mL
<i>Cp</i>	9,76 µg/mL	3,25 µg/mL	3,25 µg/mL	9,76 µg/mL
<i>Ct</i>	156 µg/mL	156 µg/mL	156 µg/mL	156 µg/mL

Os dados referentes à concentração fungicida mínima (CFM) estão mostrados na Tabela 5.34. A CFM relaciona-se a concentração capaz de matar as leveduras e não apenas inibir seu crescimento. Como pode ser visto na Tabela 5.34, apenas as cepas *Ck* e *Ct* foram sensíveis as amostras analisadas. Para a cepa *Ck*, os extratos

E1 e E4 foram capazes de matar a levedura. Já para *Ct* todos os extratos analisados mataram a cepa.

Tabela 5.34 – CFM para as diferentes amostras analisadas

Cepas	Extratos			
	E1	E4	EL	ES
Ca	-	-	-	-
Cg				
Ck	78,12 µg/mL	2500 µg/mL	-	-
Cp	-	-	-	-
Ct	1250 µg/mL	312 µg/mL	625 µg/mL	625 µg/mL

(-) sem ação fungicida

No desenvolvimento de um possível fitoterápico, a escolha e a padronização de processos extrativos são muito importantes para selecionar qual o caráter das substâncias de interesse e qual o melhor caminho para chegar até elas, além disso, precisa-se avaliar a viabilidade técnico-econômica do processo escolhido, pois muitas vezes apesar de eficiente, ele não é viável economicamente, pelo seu elevado custo de investimento.

No caso dos extratos estudados de *Endopleura uchi*, a técnica que se mostrou mais viável, foi a maceração dinâmica, este processo além de possibilitar boas características do extrato, como alto teor de bergenina e uma boa atividade antioxidante, ele pode ser considerado uma técnica simples que envolve um baixo custo de investimento.

Além disso, a secagem por *spray dryer* possibilitou pós com características farmacotécnicas apropriadas e sem interferência das propriedades farmacológicas da planta *Endopleura uchi*, uma vez que se manteve na maioria dos pós obtidos, extratos secos com elevada atividade antioxidante e alto teor do marcador bergenina, além de permitir a obtenção de todas as vantagens que a secagem oferece como: diminuição da atividade microbiana, aumento da estabilidade, facilidade de transporte e estocagem e no caso da secagem por *spray dryer* a rapidez e a versatilidade da técnica. Somado a isto, algumas amostras analisadas dos extratos secos por spray apresentaram ação sobre o crescimento de gêneros de *Candida*, inibindo o crescimento das leveduras em diferentes concentrações dos extratos.

E em adição a tudo isto, o uso de ferramentas estatísticas possibilitou uma melhor análise dos resultados e uma maior exploração dos mesmos, mostrando que

o uso de planejamentos experimentais pode ser muito útil na avaliação das características de interesse e no delineamento de futuros experimentos.

Desta maneira, mais estudos devem ser realizados, uma vez que a planta *Endopleura uchi* mostrou-se promissora como antioxidante e pode ser considerada como um possível antimicrobiano. Além disso, o estudo da biodiversidade brasileira de plantas deve ser cada vez mais analisado, uma vez que a mesma é muito rica e pode ser fonte de muitos medicamentos fitoterápicos, ou mesmo identificar moléculas que podem ser protótipos no desenvolvimento de novos fármacos.

Conclusões

6 – CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho são:

- Os parâmetros escolhidos para os processos extrativos exerceram forte influência nas características dos extratos
- As extrações realizadas mostraram o alto teor de fenóis e a alta atividade antioxidante de *Endopleura uchi*.
- O teor e o rendimento de bergenina também foram muito altos, maiores que aqueles encontrados na literatura.
- O processo extrativo que se mostrou mais viável, nas condições estudadas, foi à maceração dinâmica.
- O processo de secagem mostrou-se bastante viável e com altos rendimentos considerando uma escala laboratorial. A temperatura foi o parâmetro que exerceu forte influência no rendimento do processo.
- A secagem não interferiu nas propriedades avaliadas do extrato de *Endopleura uchi*, assim mantiveram-se os teores de fenóis, uma ótima atividade antioxidante e altos teores de bergenina.
- Os pós obtidos apresentaram características farmacotécnicas razoáveis, sendo que a % de aditivo utilizada exerceu forte influência nas suas propriedades.
- Para os diferentes gêneros de *Candida* estudados, os extratos de *Endopleura uchi* apresentaram ação no crescimento dos microrganismos, inibindo o crescimento das leveduras em diferentes concentrações dos extratos.
- Os planejamentos experimentais foram ferramentas muito importantes na realização dos experimentos e análises.

Em resumo, o extrato de *Endopleura uchi* mostrou-se bastante promissor como antioxidante e como um possível antimicrobiano, indicando que mais estudos devem ser realizados.

Referências Bibliográficas

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.

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

ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; KARINA BORA; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae- imosoideae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, V. G.; ALLEN JR., L. V. **Farmacotécnica: Formas farmacêuticas & Sistemas de liberação de fármacos**. 6ª Ed. São Paulo: 2000. 568p.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, n. 3, p. 183-198, 2002.

ARAÚJO, R. R.; TEIXEIRA, C. C. C.; FREITAS, L. A. P. The Preparation of Ternary Solid Dispersions of an Herbal Drug via Spray Drying of Liquid Feed. **Drying Technology**, v. 28, n. 3, p. 412-421, 2010.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ªed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BHANDARI, B. R.; DATTA, N.; HOWES, T. Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. **Drying Technology**, v. 15, n. 2, p. 671-684, 1997.

BOX, M.; HUNTER, W., G; HUNTER, J. S. **Statistics for experiments**. N. York: : 1978.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, Dec 2004.

CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 575-586, Feb 2010.

CARVALHO, E. L. S. **Desenvolvimento de produtos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek - Celastraceae (espinaheira-santa)**. 1997. 133p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCKENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCKENKEL, E. P., *et al* (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. cap. 20, p.519-535.

CARVALHO, J. E. U.; MULLER, C. H.; BENCHIMOL, R. L. **Uxizeiro: Botânica, Cultivo e Utilização**. 1ª Ed. Belém, PA: 2007. 107p.

CHEN, W. X.; LI, C. F.; ZHANG, W. M.; BAI, X. P.; DOU, H. G. Optimization of the Ultrasonic-Assisted Extraction of Aniseed and Its Comparison with Conventional Extraction Methods. **Advances in Biomedical Engineering**, p. 277-280, 2011.

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

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: 1984.

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

COUTO, R. O.; ARAÚJO, R. R.; TACON, L. A.; CONCEIÇÃO, E. C.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R.; FREITAS, L. A. P. Development of a Phytopharmaceutical Intermediate Product via Spray Drying. **Drying Technology**, v. 29, p. 709-718, 2011.

CUATRECASAS, J. A taxonomic revision of the Humiriaceae. **Contributions from the United States National Herbarium**, v. 35, p. 25-214, 1961.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento Fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, p. 23-32, Jan-Jun 2008.

DE SOUZA, K. C. B.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L.; GONZALEZ ORTEGA, G. The adjuvants Aerosil 200 and Gelita-Sol-P influence on the technological characteristics of spray dried powders from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, p. 331-336, 2000.

DELCASTILLO, E.; MONTGOMERY, D. C.; MCCARVILLE, D. R. Modified desirability functions for multiple response optimization. **Journal of Quality Technology**, v. 28, n. 3, p. 337-345, Jul 1996.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous-Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

ELSOHLY, H. N.; ZHANG, Z. Z.; JACOB, M. R.; PASCO, D. S.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Lycopodium cernuum*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 7, p. 979-985, Jul 2002.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução á análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., *et al* (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFSC, 2004. cap. 10, p.229-245.

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

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

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**, v. 208, p. 205-214, 2011.

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

GU, J. K.; YU, W. S.; WANG, Y. W.; ZHANG, Y. H.; LAN, J.; LIU, Z. Y.; FAWCETT, J. P.; ZHANG, D. Quantitation of bergenin in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 1-2, p. 33-36, Jan 1 2009.

HEBERLÉ, G.; WEHRMANN, L.; PETROVICK, P. R. Caracterização do Produto Seco por Aspersão de *Cecropia glaziovii* Sneth. (Cecropiaceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 203-210, 2000.

JANGAM, S. V.; THORAT, B. N. Optimization of Spray Drying of Ginger Extract. **Drying Technology**, v. 28, p. 1426-1434, 2010.

KIM, H. S.; LIM, H. K.; CHUNG, M. W.; KIM, Y. C. Antihepatotoxic activity of bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated hepatocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 1, p. 79-83, Jan 1 2000.

LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS FILHO, P. R.; GOUVÊA, C. M. C. P. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16 n. 4, p. 531-536, 2006.

MAGALHÃES, L. A. M.; LIMA, M. P.; MARINHO, H. A.; FERREIRA, A. G. Identificação de bergenina e carotenóides no fruto de uchi (*Endopleura uchi*, Humiriaceae). **Acta Amazonica**, v. 37, n. 3, p. 447-450, 2007.

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

MARTINS, R. M.; SIQUEIRA, S.; TACON, L. A.; FREITAS, L. A. P. Microstructured ternary solid dispersions to improve carbamazepine solubility. **Powder Technology**, v. 215-216, p. 156-165, 2012.

MARX, F.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. D. B.; MAIA, J. G. S. Studies of edible amazonian plants. Part 5: Chemical characterisation of Amazonian *Endopleura uchi* fruits. **European Food Research and Technology**, v. 214, n. 4, p. 331-334, Apr 2002.

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

MCCCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-2022, Jul 2007.

MURTOMAA, M.; SAVOLAINEN, M.; CHRISTIANSEN, L.; RANTANEN, J.; LAINE, E.; YLIRUUSI, J. Static electrification of powders during spray drying. **Journal of Electrostatics**, v. 62, n. 1, p. 63-72, Sep 2004.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Publication of M27-A2: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: approved standard. Second edition. **NCCLS, Wayne**, v. 22, n. 15, p. 1-30, 2002.

NEWELL, A. M. B.; DE MEJIA, E. G.; YOUSEF, G. G.; LILA, M. A.; RAMIREZ-MARES, M. V. Comparative *in vitro* bioactivities of tea extracts from six species of *Ardisia* and their effect on growth inhibition of HepG2 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 3, p. 536-544, Aug 9 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, Mar 2007.

NUNOMURA, R. C. S.; OLIVEIRA, V. G.; DA SILVA, S. L.; NUNOMURA, S. M. Characterization of Bergenin in *Endopleura uchi* Bark and its Anti-Inflammatory Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1060-1064, 2009.

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

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

PIACENTE, S.; PIZZA, C.; DETOMMASI, N.; MAHMOOD, N. Constituents of *Ardisia japonica* and their *in vitro* anti-HIV activity. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 6, p. 565-569, Jun 1996.

PINA, J.; GALLO, L.; LLABOT, J. M.; ALLEMANDI, D.; BUCALA, V. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cascara sagrada) extract powder physical properties. **Powder Technology**, v. 208, n. 1, p. 205-214, Mar 2011.

POLITI, F. A. S. **Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae).** . 2009. 143p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

PRITHIVIRAJ, B.; SINGH, U. P.; MANICKAM, M.; SRIVASTAVA, J. S.; RAY, A. B. Antifungal activity of bergenin, a constituent of *Flueggea microcarpa*. **Plant Pathology**, v. 46, n. 2, p. 224-228, Apr 1997.

RÉTHY, Z.; KOCZOR, Z.; ERDÉLYI, J. Handling Contradicting Requirements Using Desirability Functions **Acta Polytechnica Hungarica**, v. 1, n. 2, p. 5-12, 2004.

SCHULTES, R. E. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes. XXI. Interesting native uses of the Humiriaceae in the northwest Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2, p. 89-94, 1979.

SHI, Y. P.; SHI, Y. B.; MENG, Q. G. Determination and pharmacokinetic study of bergenin in rat plasma by RP-HPLC method. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 10, p. 1065-1070, Oct 2006.

SILVA, S. L.; OLIVEIRA, V. G.; YANO, T.; NUNOMURA, R. C. S. Antimicrobial activity of bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 187-192, 2009.

SOLLOHUB, K.; CAL, K. Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 587-597, Feb 2010.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROWICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., *et al* (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. cap. 13, p.289-326.

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

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

SOUZA, M. H.; MAGLIANO, M. M.; CAMARGOS, J. A. A. **Madeiras tropicais brasileiras**. Brasília: 1997. 152p.

TABARAKI, R.; NATEGHI, A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 6, p. 1279-1286, Nov 2011.

TAN, X. L.; ZHANG, Q.; ZHOU, M. M.; CHEN, P. L.; CAO, Y. Y. Optimization of Ultrasonic-Assisted Enzymatic Hydrolysis for the Extraction of Luteolin and Apigenin from Celery. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 5, p. C680-C685, Jun-Jul 2011.

USPXXX. **American Pharmacopeia - United States Pharmacopeial Convention**. Rockville, USA: 2007.

VEIGA JÚNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 308-313, Abr./Jun. 2008 2008.

VELJKOVIC, V. B.; VELICKOVIC, D. T.; MILENOVIC, D. M.; RISTIC, M. S. Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, n. 2, p. 150-156, Feb 2006.

WALTON, D. E. The morphology of spray-dried particles a qualitative view. **Drying Technology**, v. 18, n. 9, p. 1943-1986, 2000.

WALTON, D. E.; MUMFORD, C. J. Spray dried products - Characterization of particle morphology. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 77, n. A1, p. 21-38, Jan 1999.

WANG, Q. Z.; LIU, Y. Y.; CUI, J.; DU, J. H.; CHEN, G.; LIU, H. T. Optimization of ultrasonic-assisted extraction for herbicidal activity of chicory root extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1429-1438, Nov 2011.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 14-152, 2001.

ZHANG, C. H.; HUANG, L. X.; WANG, C. P.; MUJUMDAR, A. S. Experimental and Numerical Investigation of Spray-Drying Parameters on the Dried Powder Properties of *Ginkgo biloba* Seeds. **Drying Technology**, v. 28, n. 3, p. 380-388, 2010.