



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**



**DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO SECO POR ASPERSÃO
OBTIDO A PARTIR DAS CASCAS DO CAULE de *Libidibia*
ferrea MARTIUS var. *ferrea* (FABACEAE)**

LEIDYANA MORAES DA COSTA

**MANAUS
2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**



LEIDYANA MORAES DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO SECO POR ASPERSÃO
OBTIDO A PARTIR DAS CASCAS DO CAULE de *Libidibia*
ferrea MARTIUS var. *ferrea* (FABACEAE)**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dra. Tatiane Pereira de Souza

**MANAUS
2012**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

C837d Costa, Leidyana Moraes da

Desenvolvimento de produto seco por aspersão obtido a partir das cascas do caule de *Libidibia ferrea* Martius var *ferrea*(fabaceae) / Leidyana Moraes da Costa .- Manaus: UFAM, 2012.
127f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) —
Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientadora: Prof^a Dr^a Tatiane Pereira de Souza

1. Pau- ferro- Cascas 2. Jucá- Taninos 3. Plantas Medicinais I. Souza, Tatiane Pereira de (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (1997) 582.738(043.3)

Dedico aos meus pais, Aladir e Vicente, que sempre me apoiaram incondicionalmente; aos meus irmãos Elton e Nelton; aos meus tios Maria da Penha, Maria e João bolinha e as minhas primas Telo, Pipita, Bilu, Mara e Marta que não sabiam exatamente o que tanto eu estudava, mas sempre torceram por mim. Amodoro muiiiittto vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por me dar força, coragem e saúde para realizar mais este sonho;

À Professora Dr^a. Tatiane de Souza, minha orientadora, pela oportunidade de ter desenvolvido este trabalho, pela orientação, pela paciência, pelo exemplo profissional e pelos ensinamentos que certamente procurarei transmitir. A ti, meu respeito, admiração e amizade;

Ao Professor Dr. Pedro Rolim/UFPE pelo auxílio e disponibilidade de seu laboratório e equipamentos;

Ao Professor Dr. Luiz Augusto/INPA pelo auxílio, disponibilidade de seu laboratório e pelo fornecimento do material vegetal utilizado no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Professor Dr. Emerson Lima/UFAM pelo auxílio e disponibilidade de seu laboratório e equipamentos;

À Professora Dr^a. Maria de Meneses/UFAM pelas sábias conversas, ensinamentos, amizade e muitas risadas. A ti, também dedico esse momento tão feliz porque antes de eu mesma acreditar em mim ela já acreditava, pois tudo começou com ela e a agradecerei para todo o sempre;

Aos Professores Msc. Éllen Paes/UFAM e Dr. Pierre Santos/UFAM pela disponibilidade dos seus laboratórios, equipamentos e pela amizade;

A todos os amigos nordestinos adquiridos em Recife:

Nataly Alves: pela amizade, carinho, respeito, ajuda, confiança, ombro amigo, risadas, e muitos, muitos momentos felizes compartilhados com ela e com a família dela que acolheu de braços abertos uma estranha que tinha vindo de longe e me deram muito carinho e alegria;

Adriana Campos: pela linda amizade inesperada, incondicional e maravilhosa que surgiu em meio do suporte dela durante a execução do teste da avaliação da porosidade das partículas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE/PE). Nunca vou esquecer-me dos nossos almoços semanais repletos de risadas, fofocas, desabafos, sonhos, planos e muita comida boa com suco de laranja;

Edwin Millet pela amizade, momentos divertidos e suporte na execução do procedimento para determinação do tamanho de partícula no CETENE/PE;

André: pela amizade, carinho, paciência e pelos muitos doces que ele trazia de Gravata pra eu e Nataly comermos (Hum, deliciosos!) e ainda dizia que estávamos engordando, é praticar!. Ah, eu não poderia esquecer de agradecer, também, pelas super dicas de cozinha dadas por ele (risos altos!);

Leonardo: pelos momentos de muitíssima descontração, altas risadas e amizade;

Deliane Amorim: pela amizade e momentos divertidíssimos que passamos juntas;

Dona Tida: pela amizade, carinho e pelos muitos momentos divertidos e inesquecíveis;

Paulo Amorim: pela amizade, carinho, atenção e muitos momentos divertidos e felizes que passamos juntos;

À amiga Helenkassya Araújo pela nossa amizade de muitos anos, carinho, compreensão e muitas alegrias compartilhadas que vivemos e viveremos por muito tempo;

À amiga Dayana Grimm pela amizade, carinho e conselhos importantíssimos;

À amiga Dorotéia Couto pela amizade e ajuda incondicional no laboratório e fora dele;

Aos amigos Fernanda Guilhon, Salomão Martin e Jane Vasconcelos pela amizade, ajuda, carinho, altas risadas e crescimento pessoal e profissional;

À amiga Carolina Campos pela amizade, ajuda incondicional no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, sem dúvidas a ti dedico também esse sonho, obrigada querida amiga pois você foi uma das minhas melhores conquistas de 2011;

Às amigas Latife Barakat e Lílían Bastos pela amizade durante todo esse período, pelo ombro amigo, pelas gargalhadas e pelo aprendizado de vida;

Ao amigo Arleilson Lima pela amizade e ajuda na execução dos testes biológicos *in vitro*;

Às amigas Tatiana Pedrosa e Natacha Pinheiro pela amizade e pelo apoio constante;

Às colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Fernanda Farias, Jackeline Marinho e Ísis Costa pela amizade, ajuda e boa convivência;

Aos colegas do mestrado, Gleyce Barbosa, Francivaldo Lima, Nívea, Camila Fabbri, Daniele Baraúna e Iara Filard pela amizade que surgiu neste período;

Ao CETENE/PE pela oportunidade de executar alguns dos meus testes usufruindo a infraestrutura desse centro cujas pessoas me receberam muitíssimo bem;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e à Faculdade de Ciências farmacêuticas da UFAM;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

Um obrigada a todos, do fundo do meu coração!



Não Sei...

Não sei... se a vida é curta ou longa demais para nós,
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
Se não tocamos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser:

Colo que acolhe,
Braço que envolve,
Palavra que conforta,
Silêncio que respeita,
Alegria que contagia,
Lágrima que corre,
Olhar que acaricia,
Desejo que sacia,
Amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida.

É o que faz com que ela não seja nem curta,
nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura... Enquanto durar.

(Cora Coralina)



RESUMO

A espécie vegetal *Libidibia ferrea* conhecida popularmente como “jucá” ou “pau-ferro” é largamente utilizada pela medicina popular da Amazônia para o tratamento do diabetes. Dentre os seus principais constituintes químicos destacam-se os taninos. Estudos farmacológicos realizados com as cascas do caule demonstraram atividades antimicrobiana, hipotensora, vasodilatadora e hipoglicemiante. A referida espécie está inserida no Formulário Nacional de Fitoterápicos. O presente trabalho refere-se ao desenvolvimento e caracterização tecnológica de produtos secos por aspersão a partir de solução extrativa aquosa das cascas do caule de *L. ferrea*. O material vegetal de *L. ferrea* foi coletado em diferentes épocas e lugares de Manaus, sendo caracterizado a fim de auxiliar no estabelecimento de parâmetros para o controle de qualidade dessa espécie vegetal. Os produtos secos foram produzidos através de um delineamento fatorial do tipo 2³, tendo como variável independente o tipo de adjuvante de secagem (dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina e goma arábica) e como variáveis dependentes as características tecnológicas e biológicas dos produtos obtidos. Dentre os parâmetros tecnológicos avaliados nos pós destacam-se o rendimento operacional, umidade residual, características reológicas, morfologia e granulometria, porosidade e comportamento frente à ambiente com umidade relativa controlada de 65%. Além disso, foi avaliada a capacidade de inibição *in vitro* da enzima conversora de angiotensina (ECA) e da α -glicosidase pelos produtos obtidos. Adicionalmente, foi desenvolvido e validado método analítico em cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) para a quantificação polifenóis na matéria-prima vegetal de *L. ferrea*. Os resultados obtidos permitiram observar que os parâmetros estudados estão dentro dos limites preconizados pela Farmacopéia Brasileira. No entanto, todos os demais parâmetros avaliadas evidenciaram diferenças quantitativas estatisticamente significantes entre as amostras estudadas sugerindo que as condições edafoclimáticas alteram as características físico-químicas desta espécie e, portanto, podem influenciar na qualidade, eficácia e segurança de um produto final proposto. O método desenvolvido e validado em CLAE mostrou-se eficiente para a quantificação de ácido gálico, contemplando todos os critérios preconizados. Dentre os adjuvantes utilizados, a análise demonstrou que os adjuvantes adicionados à solução extrativa não contribuíram para um rendimento superior, assim como não proporcionaram melhores características reológicas. Na avaliação da atividade inibitória da α -glicosidase, no modelo experimental *in vitro*, todos os produtos oriundos da *L. ferrea* inibiram, significativamente, a enzima α -glicosidase. Em contrapartida, não foi constatada atividade inibitória para a ECA.

Palavras-chave: pau-ferro, jucá, produto seco por aspersão, taninos.

ABSTRACT

Libidibia ferrea popularly known as “jucá” or “pau-ferro” is widely used in popular medicine for treatment of diabetes. The tannins are majority chemical constituents. Pharmacological studies, with the stem bark, showed main activities: antimicrobial, hypotensive, vasodilator and hypoglycemiant. This species are inserted in National Formulary Herbal Medicine. The goal of this work is the technological development and characterization of spray dried products from aqueous solution of the stem bark of *L. ferrea*. The vegetable material of *L. ferrea* was collected at different times and places from Manaus-AM, being characterized in order to establish parameters for quality control of this species. The dried products were produced using a 2³ factorial design, where the independent variable was the type of adjuvant (colloidal silicon dioxide, microcrystalline cellulose and arabic gum) and the dependents variables were biological and technological characteristics of the products obtained. The dried products were evaluated as yielding, residual moisture, rheological properties, morphology, particle size, porosity and behavior in controlled environment with a relative humidity of 65%. In addition, it was evaluated the ability of *in vitro* inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) and α -glucosidase of the products obtained. Additionally, it was developed and validated an analytical method in liquid chromatography (HPLC) to quantify polyphenols in *L. ferrea* raw material. The results of raw material characterization demonstrate that were within the limits recommended by the Brazilian Pharmacopoeia. However, there were statistically significant quantitative differences among the samples studied suggesting that climatic conditions change the physico-chemistries characteristics of this species and therefore may influence the quality, efficacy and safety of the products. The HPLC method was validate and it was efficient for the quantification of gallic acid. Considering the dried products the work showed that the adjuvants studied did not contribute to increase the efficiency of dry operation when compared to the dry extract without adjuvant or improve the rheological characteristics. Evaluation of *in vitro* activity demonstrates that all products from *L. ferrea* inhibited significantly the enzyme α -glucosidase, however they were no efficient against ACE.

Key words: pau-ferro, juca, spray dried product, tannins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Árvore de <i>L. ferrea</i> matriz INPA; folhas; fruto imaturo; fruto maduro; detalhe da semente; detalhe das sementes dentro da vagem e flores de <i>L. ferrea</i> .	24
Figura 02	Classificação dos taninos	37
Figura 03	Mecanismos de ação dos inibidores da ECA	50
Figura 04	Material Vegetal (cascas do caule) de <i>Libidibia ferrea</i>	61
Figura 05	Distribuição granulométrica dos lotes da espécie <i>L. ferrea</i>	81
Figura 06	Representação gráfica do diâmetro médio de partícula empregando as curvas de retenção e passagem dos lotes da espécie <i>L. ferrea</i>	82
Figura 07A	Perfil cromatográfico das soluções extrativas oriundas dos lotes 1 e 2	84
Figura 07B	Perfil cromatográfico das soluções extrativas oriundas dos lotes 2 e 3	85
Figura 08	Aspecto macroscópico dos produtos secos por aspersão obtidos a partir de solução extrativa aquosa das cascas do caule do lote 2 da espécie <i>L. ferrea</i>	88
Figura 09	Gráfico de Pareto para a umidade residual dos produtos secos	91
Figura 10	Fotomicrografia eletrônica de varredura de produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>L. ferrea</i> (aumento de 2000 e 15000x, respetivamente), preparados com diferentes adjuvantes de secagem: ESA (extrato seco), PSA-1 (celulose microcristalina) e PSA-2 (dióxido de silício coloidal).	94
Figura 11	Fotomicrografia eletrônica de varredura de produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>L. ferrea</i> (aumento de 2000 e 15000x, respetivamente: PSA-3 (goma arábica), PSA-4 (celulose microcristalina + dióxido de silício coloidal) e PSA-5 (dióxido de silício coloidal + goma arábica)	95
Figura 12	Fotomicrografia eletrônica de varredura de produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>L. ferrea</i> (aumento de 2000 e 15000x, respetivamente): PSA-6 (goma arábica + celulose microcristalina) e PSA-7 (dióxido de silício coloidal + goma arábica + celulose microcristalina)	96
Figura 13A	Isotermas de adsorção-dessorção para o ESA (extrato seco), PSA-1 (celulose microcristalina), PSA-2 (dióxido de silício coloidal) e PSA-3 (goma arábica)	98
Figura 13B	Isotermas de adsorção-dessorção para PSA-4 (celulose microcristalina + dióxido de silício coloidal), PSA-5 (dióxido de silício coloidal + goma arábica), PSA-6 (goma arábica + celulose microcristalina) e PSA-7 (dióxido de silício coloidal + goma arábica + celulose microcristalina)	99
Figura 14	Gráfico de Pareto para as densidades brutas e de compactação	102
Figura 15	Representação gráfica de curvas de sorção de umidade para o extrato seco por aspersão e produtos secos por aspersão da espécie <i>L. ferrea</i> submetidos à atmosfera de 65% de umidade relativa	104
Figura 16	Perfil cromatográfico de solução aquosa das cascas do caule de <i>L. ferrea</i>	104

Figura 17	Perfil cromatográfico das substâncias de referência ácido gálico e epicatequina	105
Figura 18	Perfil cromatográfico da sobreposição dos picos após contaminação da solução extrativa com padrões de referência ácido gálico e epicatequina	105
Figura 19	Espectros de varredura das substâncias de referências e picos da solução extrativa	106
Figura 20	Curvas analíticas das substâncias de referências: ácido gálico e epicatequina	107
Figura 21	Curvas analíticas dos picos marcadores da solução extrativa da espécie <i>L. ferrea</i>	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Classificação taxonômica da planta <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>ferrea</i>	22
Tabela 02	Farmacógenos da espécie <i>L. ferrea</i> utilizados na medicina popular	25
Tabela 03	Ação dos inibidores da enzima conversora de angiotensina	50
Tabela 04	Origem de coleta dos lotes 1, 2, 3 e 4 de <i>L. ferrea</i>	60
Tabela 05	Planejamento fatorial 2 ³ para a produção dos produtos secos	67
Tabela 06	Descrição do planejamento fatorial 2 ³ utilizado para a preparação dos produtos secos de <i>L. ferrea</i>	67
Tabela 07	Condições operacionais de secagem da solução extrativa aquosa de cascas do caule de <i>L. ferrea</i>	68
Tabela 08	Gradiente de eluição do sistema cromatográfico para <i>L. ferrea</i>	72
Tabela 09	Caracterização físico-química das MPV das cascas do caule da espécie <i>L. ferrea</i>	80
Tabela 10	Ensaio de controle de qualidade das MPV das cascas do caule da espécie <i>L. ferrea</i> oriunda de Santa Maria/RS	80
Tabela 11	Análise comparativa do teor de taninos totais das soluções extrativas aquosas oriundas de diferentes lotes de cascas do caule de <i>L. ferrea</i>	83
Tabela 12	Caracterização físico-química da solução extrativa aquosa do lote 2 produzida a partir das cascas do caule de <i>L. ferrea</i>	86
Tabela 13	Aspectos macroscópicos do ESA e dos PSA	87
Tabela 14	Rendimento de secagem e umidade residual do ESA e dos PSA obtidos	89
Tabela 15	Análise de variância dos fatores principais e interações para a umidade dos produtos secos	91
Tabela 16	Tamanho de partícula do ESA e dos PSA nas frequências de 10%, 50% e 90%	92
Tabela 17	Caracterização dos poros	97
Tabela 18	Características tecnológicas dos PSA das cascas do caule de <i>L. ferrea</i>	101
Tabela 19	Análise da variância dos efeitos dos fatores principais e interações para densidades bruta e de compactação dos produtos secos	102
Tabela 20	Parâmetros de linearidade para substâncias de referência e picos presentes na solução extrativa de <i>L. ferrea</i>	108
Tabela 21	Repetibilidade e precisão intermediária das substâncias de referência e picos presentes na solução extrativa da espécie <i>L. ferrea</i> expressos em valores de áreas (m _{AU})	108
Tabela 22	Resultado do ensaio de exatidão do ácido gálico e epicatequina	109
Tabela 23	Limites de detecção e de quantificação para as substâncias de referência	109
Tabela 24	Resultado do teor do ácido gálico no ESA e nos PSA obtidos	110
Tabela 25	Inibição das enzimas α -glicosidase e conversora de	110

	angiotensina (ECA) pelos extratos secos oriundos de diferentes lotes	
Tabela 26	Inibição <i>in vitro</i> da enzima α -glicosidase e da ECA pelos PSA oriundos de <i>L. ferrea</i>	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	- Análise de variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVE	- Acidente vascular encefálico
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	- Celulose microcristalina
DM	- Diabetes mellitus
FNF	- Formulário Nacional de Fitoterápicos
IAM	- Infarto agudo do miocárdio
IECA	- Inibidores da enzima conversora de angiotensina
MPV	- Matéria-prima vegetal
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PD	- Perda por dessecação
PSA	- Produto seco por aspersão
RENISUS	- Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SUS	- Sistema Único de Saúde
TE	- Teor de extrativos

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
REVISÃO DO TEMA.....	21
2.1 Classificação botânica da espécie <i>Libidibia ferrea</i>	22
2.2 Aspectos gerais da espécie	22
2.2.1 Aspectos botânicos	22
2.2.2 Floração e frutificação	25
2.2.3 Aspectos etnofarmacológicos	25
2.2.4 Estudos fitoquímicos	26
2.2.5 Estudos farmacológicos	26
2.2.5.1 Frutos	26
2.2.5.2 Sementes	29
2.2.5.3 Casca do caule	29
2.2.6 Estudos tecnológicos	31
2.3 Substâncias fenólicas	32
2.3.1 Taninos	33
2.3.1.1 Classificação dos taninos	34
2.3.1.2 Algumas propriedades físico-químicas dos taninos.....	36
2.3.1.3 Propriedades biológicas dos taninos	38
2.4 Adjuvantes farmacêuticos	40
2.4.1 Celulose microcristalina	40
2.4.2 Dióxido de silício coloidal.....	41
2.4.3 Goma Arábica	43
2.5 Controle de qualidade de matérias-primas vegetais	44
2.6 Extratos secos vegetais e produto seco por aspersão.....	46
2.7 Enzimas como alvos de avaliação de atividade biológica.....	49
2.7.1 Enzima conversora de angiotensina	49
2.7.2 Enzima α -glicosidase	51
OBJETIVOS	54
3.1 Geral	55
3.2 Específicos.....	55
MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 MATERIAL.....	57
4.1.1 Equipamentos e acessórios	57
4.1.2 Solventes e Reagentes	58
4.1.3 Adjuvantes farmacêuticos.....	58
4.1.4 Substâncias de referência (padrões)	59
4.2 Métodos.....	60
4.2.1 Material vegetal	60
4.2.2 Obtenção da matéria-prima vegetal	61
4.2.3 Caracterização da matéria-prima vegetal (MPV)	61
4.2.3.1 Determinação de perda por dessecação	61
4.2.3.2 Teor de extrativos	62
4.2.3.3 Determinação de cinzas totais	62
4.2.3.4 Análise granulométrica por tamisação	63
4.2.4 Preparação e caracterização da solução extrativa	63
4.2.4.1 Determinação de resíduo seco	64
4.2.4.2 Determinação de densidade relativa	64
4.2.4.3 Determinação do pH	64

4.2.4.4	Análise do teor de taninos totais.....	65
4.2.4.5	Determinação do perfil por cromatografia líquida de alta eficiência da solução extrativa	66
4.2.5	Obtenção e desenvolvimento de produtos secos por aspersão de <i>L. ferrea</i>	66
4.2.6	Caracterização físico-química dos PSA de <i>L. ferrea</i>	68
4.2.6.1	Rendimento operacional.....	68
4.2.6.2	Avaliação das características macroscópicas	68
4.2.6.3	Umidade residual	69
4.2.6.4	Análise microscópica das partículas dos PSA por microscopia eletrônica de varredura	69
4.2.6.5	Análise de distribuição do tamanho de partículas	69
4.2.6.6	Análise da área superficial e tamanho de poros das partículas	69
4.2.6.7	Avaliação da densidade bruta e de compactação, fator de Hausner, índice de Carr e índice de densificação	70
4.2.7	Avaliação do comportamento em atmosfera com umidade controlada	71
4.2.8	Validação de metodologia analítica para doseamento de constituintes polifenólicos de <i>L. ferrea</i> por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	71
4.2.8.1	Condições Cromatográficas	71
4.2.8.2	Identificação dos picos	72
4.2.8.3	Validação do método	72
4.2.8.3.1	Curvas analíticas das substâncias de referências e extrato seco	72
4.2.8.3.2	Parâmetros de validação	73
4.2.9	Avaliação de inibição enzimática da α -glicosidase e da enzima conversora de angiotensina <i>in vitro</i> dos PSA	75
4.2.9.1	Inibição da α -glicosidase	75
4.2.9.2	Inibição da enzima conversora de angiotensina	76
4.2.10	Análise estatística.....	77
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....		78
5.1	Caracterização da matéria-prima vegetal (MPV) de <i>Libidibia ferrea</i>	79
5.2	Desenvolvimento e caracterização da solução extrativa	83
5.3	Obtenção e caracterização do extrato seco (ESA) e dos produtos secos por aspersão (PSA)	86
5.4	Ensaio preliminar em ambiente com atmosfera controlada	103
5.5	Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para doseamento de constituintes polifenólicos da casca do caule de <i>L. ferrea</i> por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	104
5.6	Avaliação <i>in vitro</i> da inibição enzimática da α -glicosidase e da enzima conversora de angiotensina (ECA)	110
CONCLUSÕES.....		113
REFERÊNCIAS.....		116

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A adesão da população à utilização de produtos de origem natural e a insatisfação geral quanto à segurança e ao custo das terapias convencionais são alguns dos fatores que contribuíram fortemente para o crescente consumo dos fitoterápicos (MARQUES, 1992). Nesse contexto, a realização de pesquisas objetivando o desenvolvimento de formas farmacêuticas, contendo produtos derivados de plantas medicinais, com eficácia, segurança e qualidade comprovadas, vem incentivando um número crescente de pesquisadores em todo o mundo e, especialmente, no Brasil (PETROVICK et al., 1997).

Na indústria farmacêutica, as plantas medicinais são utilizadas como matéria-prima para a extração de princípios ativos, produção de extratos vegetais (fluidos, moles ou secos) e obtenção de formas farmacêuticas. Diante do crescimento desse mercado, tornou-se necessário efetuar uma regulamentação para assegurar a qualidade dessa classe de produtos. Nesse sentido, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Resolução RDC nº 14/2010, a qual estabelece requisitos de controle de qualidade visando o registro desses produtos junto ao Ministério da Saúde (BRASIL, 2004). O controle de qualidade de um produto envolve várias etapas que vão desde a obtenção da matéria-prima, passando por processos de padronização com caracterização qualitativa e quantitativa de seus princípios ativos, a fim de garantir a qualidade, eficácia e segurança, o que é exigido em qualquer tipo de medicamento. Segundo Farias (2004), a qualidade da matéria-prima vegetal não garante a eficácia do produto final, mas é fator determinante da mesma.

O extrato vegetal na forma de pó, desde que obtido adequadamente, apresenta inúmeras vantagens frente à forma fluida, tais como, menor espaço necessário para o armazenamento do produto, melhor estabilidade, facilidade de manuseio e padronização dos princípios ativos presentes, o que aumenta o interesse de empresas, principalmente, farmacêuticas e cosméticas, que fabricam produtos derivados de extratos vegetais, uma vez

que podem utilizá-lo como forma intermediária para a produção de medicamentos e cosméticos (SENNA et al., 1997).

Entretanto, em geral, extratos secos vegetais não possuem boas características reológicas e nem de compressibilidade. Soma-se ainda sua elevada higroscopicidade. Assim, faz-se necessária uma seleção apropriada da técnica de secagem e emprego de adjuvantes farmacêuticos, os quais podem alterar as propriedades físicas e/ou físico-químicas do produto obtido. Por isso, é de extrema importância, do ponto de vista tecnológico, o desenvolvimento do extrato seco, o que inclui avaliação de parâmetros que influem no processo de secagem e caracterização dos extratos, visando à obtenção de um produto padronizado.

A espécie vegetal *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea* sofreu alteração taxonômica recente e, atualmente, o nome científico reconhecido pela ciência para esta espécie é *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz var. *ferrea*, a qual caracteriza-se como uma árvore nativa do Brasil, sendo atualmente cultivada em toda parte do mundo. Na Amazônia, está presente em todos os estados tendo sido registrada no Pará, Rondônia, Amazonas, Roraima e Amapá (SOUZA et al., 2007). Esta espécie é extensamente utilizada pela medicina popular para emagrecimento, como cicatrizante, no tratamento de feridas cutâneas, como descongestionante, no tratamento de enterocolite e diarreia, para tratamento de diabetes e contra reumatismo, mostrando ainda possíveis benefícios no sistema cardiovascular dos usuários (PIO CÔRREA, 1984; CREPALDI, SANTANA & LIMA, 1998; NAKAMURA et al., 2002a; OLIVEIRA, 2008; DE SOUZA, 2009).

Estudos farmacológicos realizados com as cascas do caule demonstraram atividades antimicrobiana, hipotensora, vasodilatadora do sistema cardiovascular, atividade inibitória potente da topoisomerase II humana e atividade inibitória da proliferação celular e eficiência na reparação cicatricial de feridas cutâneas de caprinos e atividade hipoglicêmica (PEREIRA et al., 2006; MENEZES et al., 2007; NOZAKI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010;

VASCONCELOS et al., 2011). Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esteroides e compostos fenólicos (SILVA, 2008).

A referida espécie é uma das 61 plantas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) e está inserida também no Formulário Nacional de Fitoterápicos (FNF), no entanto ainda não existe monografia em nenhuma Farmacopéia ou código oficial que defina os marcadores químicos para esta espécie vegetal, nem metodologia analítica validada para quantificação destes, bem como parâmetros físico-químicos e tecnológicos estabelecidos para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal e produtos derivados.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um produto seco por aspersão a partir de uma solução extrativa aquosa obtida das cascas do caule de *L. ferrea*, utilizando diferentes adjuvantes de secagem e ferramenta estatística.

Capítulo 2

REVISÃO DO TEMA

2.1 Classificação botânica da espécie *Libidibia ferrea*

A *Libidibia ferrea* possui diversas sinônimas populares, tais como: pau-ferro, jucá, ibirá-obi, imirá-itá (SOUZA, 2007). A classificação taxonômica dessa espécie vegetal encontra-se na Tabela 1 (CHASE et al., 2003; LIMA et al., 2010).

Tabela 1. Classificação taxonômica da planta *Libidibia ferrea* var. *ferrea*

TAXONOMIA	
Divisão	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe	Magnoliopsida (Dicotyledonae)
Subclasse	Rosidae
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Subfamília	Caesalpiniaceae (Caesalpinioideae, Leguminosae)
Espécie	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz var. <i>ferrea</i>

2.2 Aspectos gerais da espécie

2.2.1 Aspectos botânicos

Libidibia ferrea é uma espécie nativa do Brasil onde apresenta pelo menos três variedades típicas: *leiostachya*, *parvifolia* e *ferrea*. As variedades *leiostachya* e *parvifolia* são mais comuns no centro oeste e sudeste brasileiro, ocorrendo naturalmente na Mata Atlântica e no Cerrado, onde são reconhecidas popularmente por pau-ferro, havendo diferenças características entre as variedades no que se refere ao crescimento da espécie. A variedade *leiostachya* apresenta árvores que podem atingir o dossel superior da floresta, com 20-30 m de altura, e diâmetro do tronco de até 1 m, retilíneo, cilíndrico, alto e robusto, com casca lisa e com grandes manchas brancas sobre fundo escuro, de belo efeito decorativo. Como já afirmado é comum na Mata Atlântica e dentre as etapas de seu aproveitamento e

Leidyana Moraes da Costa

domesticação tornou-se uma espécie comumente cultivada na arborização urbana das cidades brasileiras (NOGUEIRA, 1977). Por outro lado, a árvore adulta de jucá é descrita como árvores pequenas a medianas de até 10 m de altura (Figura 1), de tronco menor, ocorrendo comumente na vegetação de caatinga, no agreste e sertão nordestino, com crescimento espontâneo em estados como o Ceará e na Bahia (PRANCE & SILVA, 1975). Esta variedade foi introduzida na Amazônia por imigrantes nordestinos, possivelmente nos dois principais ciclos de migração caracterizados como a “época da borracha”, e hoje em estados como o Acre é uma planta presente nos quintais, sendo aproveitada como árvore de sombra e para produção de frutos com fins medicinais.

Na Amazônia, esta árvore pode atingir alturas de 10-15m, possui tronco de 40 a 60 cm de diâmetro, com manchas claras sobre fundo escuro (OLIVEIRA, 2006). As folhas da árvore adulta podem medir de 7 a 20 cm e são cobertas com pelos amarelados e curtos (Figura 1) (GALDINO, MESQUITA & KOSSMANN, 2007).

O fruto possui dimensões médias de 8,3 x 1,8 x 0,8 cm, verde quando imaturo, tornando-se marrom na maturação, é indeiscente, formato oblongo, levemente achatado e sinuoso com sutura ventral saliente, base arredondada a curvada e ápice arredondado (Figura 1) (GALDINO, MESQUITA & KOSSMANN, 2007).

As sementes possuem tamanho médio de 0,9 x 0,5 x 0,5 cm. Apresentam coloração variando de verde claro a amarelado, opaca, de consistência firme e tegumento levemente rugoso. Formato ovoide a discoide, na base achatada e ápice arredondado. As sementes são separadas em cavidades individuais distintamente visíveis e apresentam disposição unisseriada e transversal (Figura 1) (GALDINO, MESQUITA & KOSSMANN, 2007).

As flores são amarelas, pequenas e em cachos (Figura 1) (OLIVEIRA, 2006; GALDINO, MESQUITA & KOSSMANN, 2007).



(A)



(B)



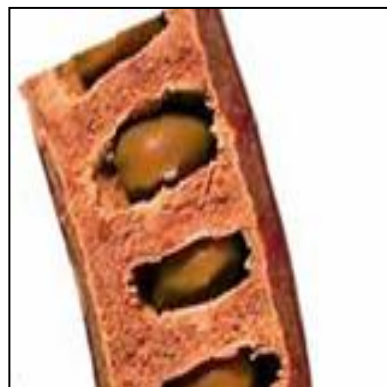
(C)



(D)



(E)



(F)



(G)

Figura 1. (A) árvore de *L. ferrea* matríz INPA; (B) folhas; (C) fruto imaturo; (D) fruto maduro; (E) detalhe da semente; (F) detalhe das sementes dentro da vagem e (G) flores de *L. ferrea*.

2.2.2 Floração e frutificação

A floração ocorre na estação seca até início da estação chuvosa, e a frutificação ocorre no final da estação seca e se prolonga pela estação chuvosa. Possui flores amarelas pequenas e em cachos. Tem anualmente uma alta produção de frutos. As sementes apresentam germinação numa amplitude térmica de 15 a 40°C, e podem ser armazenadas por pelo menos oito meses (GALDINO, MESQUITA & KOSSMANN, 2007). Pode ser empregada na arborização de ruas e avenidas e aproveitada para plantios em áreas degradadas, além de fornecer lenha e madeira para construção civil (PIO CÔRREA, 1984).

2.2.3 Aspectos etnofarmacológicos

Diversos farmacógenos da espécie *L. ferrea* são utilizados na medicina popular, sendo estes discriminados na tabela 2:

Tabela 2. Farmacógenos da espécie *L. ferrea* utilizados na medicina popular do Brasil

Farmacógenos	Indicação baseada na medicina popular
Sementes	- usadas para emagrecer, como depurativo e para contusões (DE SOUZA, 2009).
Frutos	- combatem à anemia, afecções hemoptísicas pulmonares e diabetes (tosses seguidas de sangue) (OLIVEIRA, 2008a); prevenção do câncer (NAKAMURA et al., 2002a).
Raízes	- antipiréticas e antidiarreicas (PIO CÔRREA, 1984).
Folhas	- a infusão das folhas desta espécie na região da Mata Atlântica é usada para o tratamento de problemas respiratórios, especialmente bronquites, além do uso comum contra gripes, resfriados e tosses (COELHO, 2004).
Casca	- usada para emagrecer, como depurativo e para contusões adstringentes e cicatrizantes; é usada ainda como descongestionante, no tratamento de enterocolite e diarreia, para tratamento de diabetes e contra reumatismo, mostrando ainda possíveis benefícios no sistema cardiovascular dos usuários (OLIVEIRA, 2008a); - no estado do Rio Grande do Norte, o pó da casca da <i>Libidibia ferrea</i> é bastante usado pela população para o tratamento de feridas cutâneas (OLIVEIRA, 2010).
Madeira	- anticatarral e cicatrizante (PIO CÔRREA, 1984; CREPALDI, SANTANA & LIMA, 1998).

2.2.4 Estudos fitoquímicos

Estudo fitoquímico preliminar do extrato hidroalcoólico da casca e das folhas demonstrou a presença de flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e compostos fenólicos (SILVA, 2008). Taninos são os compostos majoritários do extrato e podem ser considerados os responsáveis pela atividade antidiabética (SOUZA et al., 2006).

Nozaki et al. (2007) isolaram do caule de *L. ferrea* o pauferrol A ($C_{45}H_{34}O_{12}$), um derivado de chalcona, o qual apresentou importante inibição da DNA-topoisomerase II e indução da apoptose de células leucêmicas.

González et al. (2004) identificaram, também, no caule da planta a presença de flavonóides, taninos, cumarinas, esteróides e derivados antracênicos.

2.2.5 Estudos farmacológicos

2.2.5.1 Frutos

DA SILVA et al. (2011) exploraram as habilidades de proteção antioxidante e proteção do DNA dos extratos hidroalcoólicos de frutos de *Anadenanthera colubrina* (ACHE), *Libidibia ferrea* (LFHE) e *Pityrocarpa moniliformis* (PMHE). O potencial antioxidante desses extratos foram testados (fosfomolibdênio e poder redutor; superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico e capacidade de proteção DNA). O conteúdo fenólico total foi medida pelo método de Folin-Ciocalteu. ACHE exibiu o maior teor de fenólicos (578 mg/g), seguido por LFHE (460 mg/g) e PMHE (448 mg/g) no ensaio com fosfomolibdênio, ACHE mostrou 24,81% de atividade em relação ao ácido ascórbico, enquanto LFHE e PMHE tinha 21,08% e 18,05%, respectivamente. Estas plantas mostraram capacidade para inibir

espécies altamente reativas e, os valores CI_{50} variaram de 10,66 a 14,37 $\mu\text{g/mL}$ para radical superóxido; 26,05 a 45,43 $\mu\text{g/mL}$ para peróxido de hidrogênio; 178,42 a 182,98 $\mu\text{g/mL}$ para a redução de energia e 199,2 a 283 $\mu\text{g/mL}$ para o óxido nítrico. Concluiu-se que estes extratos possuem a capacidade de reparar o dano do DNA induzido por radicais hidroxilas, cuja atividade antioxidante está relacionada com o teor de fenólicos, demonstrando que elas podem ser usadas como fonte de compostos bioativos relevantes para a manutenção da estabilidade oxidativa da matriz alimentar, cosméticos e/ou preparações farmacêuticas.

Lucinda et al.(2010) avaliaram o efeito e a segurança da exposição em longo prazo de *L. ferrea* em órgãos vitais, sistema reprodutivo e produção de espermatozóides de ratos Wistar. Ratos machos imaturos e adultos foram tratados com 300 mg/kg de extrato aquoso de *L. ferrea* durante ciclos de espermatogênese desta espécie. Os resultados obtidos sugerem que a administração em longo prazo de *L. ferrea* não alterou significativamente o corpo, os órgãos reprodutivos e vitais e a produção de gametas não foram afetados. Desse modo, a referida espécie vegetal parece não afetar o funcionamento normal do sistema reprodutivo de ratos Wistar.

Sampaio et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana de extrato metanólico de frutos de *L. ferrea* contra patógenos orais, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis* e *Lactobacillus casei* através do método de microdiluição para células planctônicas e em um modelo de biofilme *in vitro*. Os resultados obtidos sugerem que o extrato testado *in vitro* tem atividade antibacteriana contra patógenos orais em modelos planctônicos ou biofilme.

Peters et al. (2008) avaliaram a toxicidade do extrato aquoso oriundo dos frutos *L. ferrea*, o qual foi administrado a ratas fêmeas Wistar durante o período de implantação do blastocisto (5° ao 7° dia de gestação). A toxicidade materna foi avaliada indiretamente por meio do peso corporal, consumo de alimentos, água, atividade locomotora, piloereção,

diarréia, sangramento vaginal, fígado, peso dos rins e mortes. O número de corpos lúteos, implantações, reabsorções e fetos vivos e mortos também foram registrados. O índice de implantação e a proporção de reabsorções foram calculados. Nenhuma das variáveis analisadas apresentou diferenças significativas, sendo assim, nesse modelo, *L. ferrea* não parece ser tóxica e nem interfere na implantação do blastocisto.

Souza et al. (2006) investigaram o potencial clastogênico e citotóxico do extrato aquoso bruto dos frutos de *L. ferrea* em células da medula óssea de ratos *Wistar* usando o sistemas de teste do micronúcleo e de aberrações cromossômicas. Os animais foram tratados por gavagem com três concentrações do extrato, 500, 1000 e 1500 mg/kg e ciclofosfamida, 30 mg/kg. Células da medula óssea foram coletadas 24 h após o tratamento. Não houve diferença estatisticamente significativa na média de eritrócitos policromáticos micronucleados, número médio de aberrações cromossômicas ou índice mitótico (IM) para as três concentrações comparados ao controle negativo, sugerindo que o extrato aquoso bruto de frutos do *L. ferrea* não tem efeito clastogênico e citotóxico em células da medula óssea de ratos *Wistar*.

Nakamura et al. (2002a) avaliaram o efeito anti-tumoral a partir do extrato de acetato de etila dos frutos de *L. ferrea*, *in vitro*, pelo teste de ativação do antígeno viral precoce do vírus *Epstein-Barr*, e seus constituintes ativos foram identificados como ácido gálico (1) e galato de metila (2), os quais foram isolados a partir do extrato de acetato de etila de frutos de jucá. Do total de 49 compostos relacionados às substâncias 1 e 2 foram analisados correlacionando estrutura *versus* atividade. Desses 49 compostos foram encontrados três derivados da acetofenona, 2,6-diidroxiacetofenona, 2,3,4 triidroxiacetofenona e 2,4,6-triacetofenona, os quais demonstraram atividade inibitória potente.

Nakamura et al. (2002b) avaliaram os efeitos de dois componentes ativos, 1 (ácido gálico) e 2 (galato de metila) isolados do extrato etanólico do fruto de *L. ferrea*, sobre o processo de promoção de tumor em dois estágios de carcinogênese *in vivo*. Os resultados

obtidos demonstraram diminuição significativa do número médio de papilomas por animal estudado.

Ueda et al. (2001) isolaram inibidores da aldose redutase a partir do extrato dos frutos secos de *L. ferrea* sendo o ácido elágico um dos compostos identificados através de comparação com uma amostra de referência.

Carvalho et al. (1996) investigaram e confirmaram as ações anti-inflamatória e analgésica do extrato bruto aquoso dos frutos *L. ferrea*.

2.2.5.2 Sementes

Cavalheiro et al. (2009) investigaram atividades biológicas no extrato aquoso de sementes de *L. ferrea*. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato de sementes de *L. ferrea* não apresenta atividades tóxica aguda, hemolítica, heparinásica, antibacteriana e antifúngica. Entretanto, foram observadas as atividades celulásica, amilásica, anticoagulante e larvicida contra *Aedes aegypti*, indicando a presença de compostos bioativos de interesse farmacológico e/ou industrial.

2.2.5.3 Casca do caule

Vasconcelos et al. (2011) investigaram e elucidaram os mecanismos pelos quais o extrato aquoso da casca do caule de *L. ferrea* reduz os níveis de glicose no sangue em ratos diabéticos, estreptozotocina induzidos pelas vias enzimáticas da proteína quinase B (PKB / Akt), AMP-proteína-quinase ativada (AMPK) e acetil-CoA carboxilase (ACC). Os resultados indicam que o extrato aquoso da casca do caule de *L. ferrea* possui propriedades hipoglicemiantes e, possivelmente, atua na regulação de captação de glicose no fígado e nos

músculos por meio da ativação da Akt, restaurando o balanço energético intracelular, confirmada pela inibição da ativação da AMPK.

Oliveira et al. (2010) avaliaram os efeitos do tratamento tópico do jucá (*L. ferrea*) em feridas cutâneas de caprinos. As avaliações das feridas foram feitas do ponto de vista clínico, bacteriológico, morfométrico e histopatológico nos períodos pré-determinados (7, 14 e 21 dias). Os resultados obtidos demonstraram que a utilização tópica da pomada de *L. ferrea* apresentou eficiência significativa no auxílio da reparação cicatricial de feridas cutâneas de caprinos.

Menezes et al. (2007) investigaram os efeitos cardiovasculares do extrato aquoso da casca do caule de *L. ferrea*. Os resultados obtidos permitiram concluir, utilizando abordagens *in vivo* e *in vitro*, que o referido extrato induz hipotensão associada à taquicardia, no entanto, na dose de 40 mg/kg induz bradiarritmias transitórias. Assim, esta planta parece ter um potencial uso clínico contra doenças cardiovasculares, no entanto, maiores estudos são necessários para avaliar sua segurança e margem terapêutica antes do uso humano.

Nozaki et al. (2007) isolaram do extrato metanólico do caule de *L. ferrea* o paufferol A, um derivado original de chalcona, um trímico de chalcona fundido por um anel ciclobutano, o qual apresentou atividade inibitória potente contra topoisomerase II humana e atividade inibitória da proliferação celular.

Pereira et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos alcoólicos da casca de *L. ferrea* contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterobacter gergoviae*. A análise dos dados indicou que houve moderada inibição contra as diferentes linhagens bacterianas testadas, onde o extrato apresentou halo de inibição superior a 17 mm, frente à cepa de *S. aureus*, indicando ação antimicrobiana positiva. Ao comparar o extrato de *L. ferrea* com outra espécie de *Caesalpinia*, foi observado que o extrato alcoólico de *C. pyramidalis* mostrou um melhor desempenho, quando considerada a variedade de

microrganismos sensíveis, no entanto, quanto à intensidade do efeito, a espécie *L. ferrea*, revelou uma atividade antimicrobiana eficiente.

2.2.6 Estudos tecnológicos

Barakat et al. (2011) desenvolveu uma forma farmacêutica plástica, gel à base de ácido carboxivinílico (Carbopol®), avaliando a incorporação de extrato seco, obtido da entrecasca dos frutos de *L. ferrea*, nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% (m/V). O controle de qualidade realizado nas formulações avaliou as propriedades físico-químicas (organolépticas, pH e reologia), demonstrando que ambos possuíam pH compatível com a pele e comportamento não-newtoniano plástico. A atividade antimicrobiana do extrato seco e de todas as formulações obtidas foi demonstrada frente às cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans* empregando-se o método de difusão em ágar e medição do halo de inibição. Os resultados obtidos demonstraram que tanto o extrato seco como todas as formulações do gel contendo o extrato apresentam atividade antimicrobiana em função do tempo de incubação. A melhor atividade foi frente à *Candida albicans*. Entre as três formulações obtidas, a que apresentou melhor viabilidade foi o gel com 5% de extrato, pelo perfil reológico e antimicrobiano.

Rodrigues et al. (2009), realizaram estudos para otimização de solução extrativa de entrecasca dos frutos de *L. ferrea*, com atividade inibitória da enzima α -glicosidase. Os resultados demonstraram que tanto o percentual de droga vegetal como a concentração de etanol foram fatores significantes sobre o resíduo seco e teor de taninos totais das soluções obtidas. Com relação ao resíduo seco, as soluções extrativas preparadas com 50% de etanol apresentaram maiores teores de sólidos solúveis, enquanto que as obtidas com 100% de etanol originaram maiores teores de taninos totais. Com relação à atividade biológica de inibição da enzima α -glicosidase, a solução extrativa que apresentou maior percentual de inibição foi a

obtida com 7,5% de droga vegetal e 50% de etanol. Sendo estas as condições para padronização de uma solução extrativa com atividade de inibição da enzima α -glicosidase.

Marinho et al. (2008) estudaram as propriedades físico-químicas da matéria-prima vegetal constituída da entrecasca de frutos de *L. ferrea* coletada em diferentes localidades na região de Manaus/AM, e observaram haver diferenças significativas entre elas, principalmente, em relação ao teor extrativo que variou de 28,7 g% a 40,5 g%. Os mesmos autores verificaram a influência de fatores tecnológicos no processo extrativo de substâncias químicas a partir de matéria-prima vegetal. Nesse estudo, os resultados demonstraram que a água parece ser o melhor líquido extrator, sendo a decocção o melhor método de extração.

Frasson, Bittencourt & Heinzmann (2003) determinaram os seguintes parâmetros físico-químicos de controle de qualidade das cascas do caule da espécie *L. ferrea*: cinzas insolúveis em ácido (0,153%); teor de cinzas totais (5,31%); teor de água e substâncias voláteis (5,54%); índice de amargor o qual permitiu concluir que a droga contém substâncias amargas; índice de entumescimento (1,5 mL) o qual sugeriu a presença de mucilagem/goma no material analisado; índice de espuma (IE<100) e teste de hemólise (negativo até a concentração de 5% do extrato). A amostra apresentou menos do que 0,0003546 ppm de cloretos e menos do que 0,0012008 ppm de sulfatos. Não foram encontrados microrganismos considerados patogênicos na amostra e o perfil obtido por cromatografia em camada delgada indicou ausência de saponinas e a presença de taninos.

2.3 Substâncias fenólicas

Uma das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica sendo esta caracterizada por um conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. Nas células vegetais, o metabolismo divide-se em primário e secundário. Entende-se por

metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas. Esse é o caso dos aminoácidos, dos nucleotídeos, dos lipídios, carboidratos e da clorofila. Em contrapartida, o metabolismo secundário origina substâncias que não possuem uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as plantas (PERES, 2004).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos. Os terpenos derivam-se do ácido malônico (citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido malônico e os compostos nitrogenados são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina), os quais derivam do ácido chiquímico e de aminoácidos alifático (ornitina e lisina) (BERGAMASCH, 2010).

2.3.1 Taninos

Os taninos pertencem a um grupo de substâncias fenólicas provenientes do metabolismo secundário das plantas e são definidos como polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas (HASLAM, 1966). O nome tanino é derivado do francês “*tanin*” (substância de curtimento) e constitui uma das variedades de polifenóis naturais. Desde a antiguidade é sabido que estas substâncias orgânicas apresentam a propriedade de curtir a pele de animais até transformá-las em couro. Dependendo da sua origem e variedade da constituição química eles podem ter uma massa molar acima de 20.000 Daltons. Altas concentrações de taninos são encontradas em todas as partes da planta (RAHIM & KASSIM, 2008).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias, tais como: diarreias, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, renais, urinários e processos inflamatórios em geral (SANTOS & MELLO, 2010).

Embora sejam largamente utilizados para fins medicinais ou profiláticos, os taninos também são utilizados na estabilização da cerveja, curtimento de pele e produção de resinas. Atualmente, são empregados em processos biotecnológicos para produção de enzimas como a tanase, que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis produzindo ácido gálico e glicose. A maior aplicação desta enzima tem sido para produção de ácido gálico, que é utilizado na produção do medicamento trimetoprim e nas sínteses de ésteres como propilgalato, usado como antioxidante na indústria de alimentos. A enzima também é aplicada no processamento de cerveja e clarificação de sucos, processamento de chás instantâneos e tratamento de efluentes contaminados com substâncias fenólicas (BATTESTIN, MATSUDA & MACEDO, 2004).

2.3.1.1 Classificação dos taninos

Os taninos são classificados em dois grandes grupos: as proantocianidinas ou taninos condensados que são os responsáveis pelas características normalmente atribuídas a estas substâncias, como adstringência e precipitação de proteínas, e os taninos hidrolisáveis, que são ésteres do ácido gálico e seus dímeros (ácido digálico ou hexaidroxidifênico e elágico) com monossacarídeos, principalmente a glicose (CARVALHO, 2007).

Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente β -D-glicose, cujos radicais hidroxilas são esterificados com o ácido gálico. A substância β -1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glicose representa o padrão máximo de substituição alcançado, sendo

considerado o precursor imediato para ambas as classes de taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos). Em contrapartida, os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de alto peso molecular. A unidade monomérica é um flavan-3-ol (catequina ou epicatequina) com um flavan-3,4-diol ou uma molécula de leucoantocianidina como seu precursor. Condensações oxidativas ocorrem entre o carbono C-4 do anel heterocíclico e carbonos C-6 ou C-8 das unidades adjacentes. Existe ainda um outro tipo de tanino, os taninos complexos, designados inicialmente por “taninos não clássicos”, em que uma unidade glicosídica está ligada, por uma ligação C-C a uma catequina e cujos grupos hidroxila estão esterificados com o ácido gálico e com o ácido elágico. Com base nas suas características estruturais, portanto, é possível subdividir os taninos em quatro grandes grupos (Figura 2) (KHANBABAEI & REE, 2001; SANTOS & MELLO, 2010).

- (1) Galotaninos são todos os taninos que resultam da união de unidades gálicas via ligações denominadas *meta*-depsídicas;
- (2) Elagitaninos possuem um ou dois resíduos de hexa-hidróxi-difenoil-D-glicose de configuração (*R*) ou (*S*), os quais são obtidos pelo acoplamento oxidativo C-C entre dois resíduos de ácido gálico espacialmente adjacentes;
- (3) Taninos complexos são taninos em que uma unidade de catequina está vinculada glicosidicamente a uma unidade de galotanino ou elagiotanino;
- (4) Taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol.

2.3.1.2 Algumas propriedades físico-químicas dos taninos

- Os taninos são compostos não cristalizáveis;
- Eles são solúveis em água, formando soluções coloidais com reação e gosto adstringente apurado;
- Eles são solúveis em meio alcalino diluído, álcool, glicerina e acetona, sendo apenas pouco solúvel em outros solventes orgânicos;
- Suas soluções precipitam metais pesados, alcaloides, glicosídeos e proteínas (gelatina, por exemplo);
- Destaca-se que a luminosidade é um fator que afeta a produção de taninos, sendo diminuída em ambientes sombreados comparados a espécies cultivadas ao sol. Observou-se também que, quanto mais velha a planta, maior a concentração de taninos ((EL- SAKKA & AHMAD, 2010).

TANINOS

Galotaninos

Taninos Elágicos

Taninos Complexos

Taninos Condensados

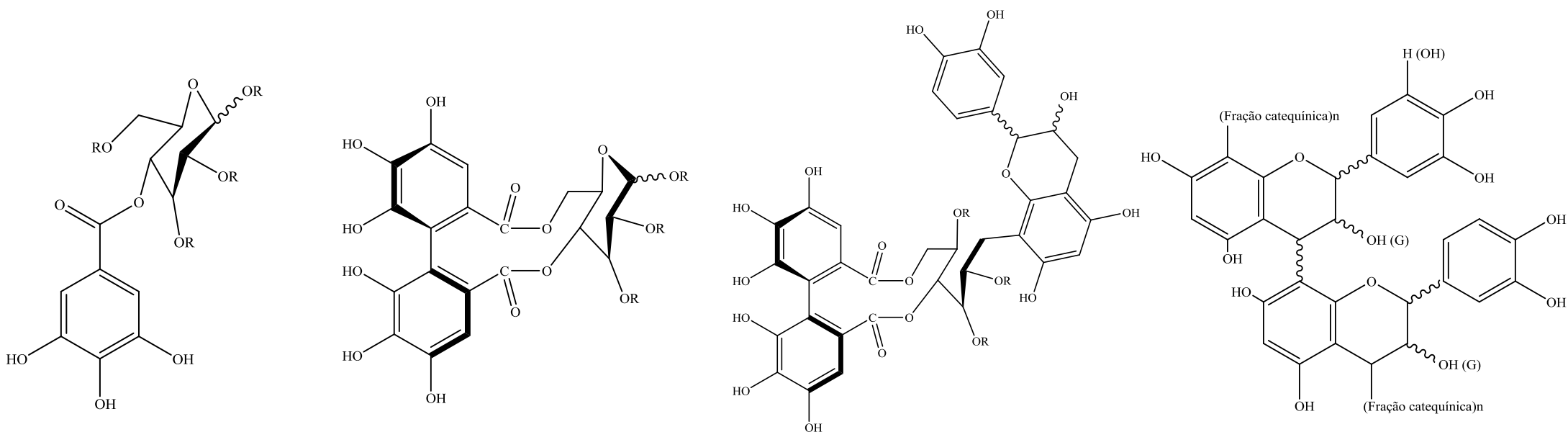


Figura 2. Classificação dos taninos.

2.3.1.3 Propriedades biológicas dos taninos

As atividades biológicas dos taninos contidos em extratos de plantas têm sido pesquisadas há muito tempo, sobretudo nas últimas duas décadas tem havido extensos estudos para o isolamento e caracterização de muitos representantes desta classe. O grupo de taninos inclui mais de 1000 produtos naturais caracterizados inequivocadamente. Nos extensos testes biológicos realizados, muitos representantes dos taninos apresentaram propriedades antivirais e antibacterianas, mas especialmente proeminente foi a atividade antitumoral. Alguns taninos, por exemplo, são capazes de inibir seletivamente a replicação do HIV (KHANBABAEE & REE, 2001).

A atividade antimicrobiana dos taninos foi bem documentada. Fungos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Chaetomium cupreum*, *Colleto-trichum graminicola*, *Coniophora olivacea*, *Coriolus versicolor*, *Crinipellis perniciosus*, *Fomes annosus*, *Gloeophyllum trabeum*, *Merulius lacrymans*, *Penicillium* espécies, *Poria monticola*, *Trametes hirsuta* e *Trichoderma viride* foram inibidos por taninos em diferentes preparações. Da mesma forma, diversas leveduras incluindo *Saccharomyces cerevisiae* foram também sensíveis a taninos (CHUNG et al., 1998).

O poder antisséptico dos taninos pode ser explicado por sua capacidade de precipitar as proteínas das células superficiais das mucosas e dos tecidos, formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada, impedindo, assim, o desenvolvimento de microrganismos (HASLAM, 1996).

Todo fermento celular, em qualquer organismo, acelera a formação de unidades ativas de oxigênio, na forma de radicais superóxido e de peróxidos de hidrogênio. Essas formas ativas, mesmo em plantas saudáveis, são responsáveis por suberização e lignificação das paredes celulares e pela ligação oxidativa cruzada de proteínas das paredes celulares. Quando ocorre

um ferimento vegetal, o radical hidroxila pode ser gerado em resposta às quantidades substancialmente grandes de peróxido de hidrogênio e reage muito rapidamente com qualquer molécula de uma célula viva. Em tais casos, os taninos, por apresentarem ação antioxidante, são moléculas que podem atuar no processo de estabilização desses radicais (PAIVA et al., 2002). Além disso, há um considerável aumento do interesse científico e comercial na determinação e quantificação destas substâncias, considerando-se as comprovadas implicações benéficas para a saúde humana.

O ácido elágico é um composto que exibe propriedades antioxidantes, antiproliferativas quimiopreventivo e antiaterogênico, em uma variedade de tecidos e células, como de mama, cólon e da próstata, os tecidos do fígado e de pulmão e células leucêmicas. O ácido elágico exerce seus efeitos através da ativação de várias vias de sinalização, incluindo a apoptose, proteção contra dano oxidativo ao DNA, ou oxidação-LDL e a alteração da expressão do fator de crescimento (PAPOUTSI et al., 2005).

O ácido gálico está amplamente distribuído em várias plantas, frutas e alimentos. O que diz respeito à toxicidade deste composto cuja DL_{50} é 5mg/kg do peso corporal de ratos. Várias atividades farmacológicas são atribuídas a ele, tais como: antibacteriana, antimelanogênica, antiviral e anti-inflamatória além da atividade anticâncer contra vários tipos de células (MAURYA, NANDAKUMAR & DEVASAGAYAM, 2011).

As propriedades das proantocianidinas, catequinas e epicatequinas, têm sido extensivamente revistas. Além da eliminação de radicais livres e atividade antioxidante, são relatadas ainda atividade antibacteriana, antiviral, anticarcinogênica, anti-inflamatória, antialérgica e ações vasodilatadoras. Proantocianidinas inibem a peroxidação lipídica, a agregação plaquetária, atuando também na permeabilidade e fragilidade capilar, afetam os sistemas enzimáticos, incluindo fosfolipase A2, ciclooxigenase e lipoxigenase. Além disso, resultados experimentais *in vitro* têm demonstrado que as proantocianidinas têm

especificidade pelo radical hidroxila além de ter a capacidade de inibir a atividade da xantina oxidase que é uma enzima geradora de radicais livres, elastase, colagenase, hialuronidase e beta-glicuronidase (REED, 1995).

2.4 Adjuvantes farmacêuticos

Adjuvantes farmacêuticos constituem substâncias auxiliares de destaque e diretamente envolvidas na composição das diversas formulações farmacêuticas, uma vez que, exercem efetivo papel na garantia de obtenção da forma farmacêutica adequada ao uso e ao efeito terapêutico desejado, regendo e influenciando de maneira significativa a cedência do constituinte ativo contido no medicamento (CAVALCANTI, 2002).

O conceito antigo de adjuvante considerava sua inércia química e sua inatividade toxicológica e farmacológica. Atualmente, a inércia química é vista com reservas, pois os adjuvantes possuem uma energia termodinâmica própria, atribuindo certa reatividade, provocando variações nas propriedades físico-químicas do componente ativo e sendo gatilho de algumas reações. Os adjuvantes adicionados à formulação devem favorecer a estabilidade, não prejudicando a forma farmacêutica final.

2.4.1 Celulose microcristalina

A celulose é um biopolímero de ocorrência natural e abundante na natureza. Diversas fibras naturais, tais como algodão e plantas superiores têm celulose como a seu principal constituinte. Ela possui em sua estrutura molecular longas cadeias com unidades de *D*-glicopirranose e cada unidade possui três grupos hidroxilas, com a exceção às extremidades terminais. A celulose é insolúvel em água e em solventes mais comuns, a sua pobre

solubilidade é atribuída principalmente às fortes ligações intramoleculares e intermoleculares de hidrogênio entre as cadeias individuais. Pode ser encontrada desde a forma de celulose nativa até de derivados, fisicamente e quimicamente modificados (KAMEL *et al.*, 2008; LIMA NETO & PETROVICK, 1997).

A celulose apresenta-se como pó branco ou quase branco, fino ou granuloso, composto por partículas porosas, inodoro e insípido. De acordo com a fonte originária da celulose e a técnica de transformação são encontrados diversos tipos de celulose possuindo diferentes propriedades. A granulometria, um dos fatores que pode ser modificado, é escolhida em função da utilização à qual a substância se destina. As celulosas com faixas de tamanho de partícula maior apresentam melhores propriedades de fluxo, aquelas com baixo grau de fluidez e escoamento são utilizadas para ativos sensíveis a processos de mistura e aquelas detentoras de altas densidades melhoram as características de fluidez dos pós e, conseqüentemente, a uniformidade de peso da forma farmacêutica final (COUTO, GONZÁLEZ ORTEGA & PETROVICK, 2000; TOLLER & SCHMIDT, 2005).

Sua gama de aplicações varia dos materiais de acondicionamento e embalagem, cumprindo também funções de adjuvante nas diversas formas farmacêuticas. Suas aplicações, cada vez maior em pesquisa com fármacos, incluem sua utilidade em formas farmacêuticas de liberação imediata (comprimidos e líquidos), de liberação modificada (multiparticulares e comprimidos matriciais), preparações tópicas, líquidos orais, melhorias organolépticas em comprimidos de dissolução bucal, anti-refluxo e nutracêuticos (SAIGAL *et al.*, 2009).

2.4.2 Dióxido de silício coloidal

O dióxido de silício coloidal é produzido por hidrólise à alta temperatura do tetracloreto de silício em uma chama de oxigênio. É constituído exclusivamente de sílica submicroscópica

dispersa e amorfa, cujas propriedades podem ser controladas por condições apropriadas e modificações de superfície. Estas alterações não influenciam o teor de sílica ou a forma amorfa, porém o tamanho de partícula, área superficial, a natureza hidrofílica e densidade são afetados. Os grupos siloxano e silanol, os quais estão situados na superfície das partículas do dióxido de silício coloidal, são responsáveis pelo comportamento hidrofílico da molécula. O dióxido de silício coloidal é indicado por um número que se refere à área superficial específica (m^2/g), por exemplo, Aerosil® 90, Aerosil® 130, Aerosil® 150, Aerosil® 200, etc (ALBERTINI et al., 2004).

O dióxido de silício coloidal tem sido largamente empregado na indústria farmacêutica para as mais variadas aplicações tais como a fabricação de pós, enchimento de cápsulas e comprimidos. Ele é detentor de capacidade adsorvente de umidade, sendo também caracterizado como agente de fluxo livre, deslizante e desintegrante (ALBERTINI et al., 2004; JONAT et al., 2006).

Destaca-se, também, outra aplicação do dióxido de silício coloidal que é o seu emprego na secagem por aspersão de extratos vegetais. Devido à composição complexa desses extratos vários problemas surgem durante a secagem no equipamento, tais como, a acumulação do produto nas paredes do aparelho e a aglomeração de partículas. A inclusão de adjuvantes de secagem, como o dióxido de silício coloidal, adicionados à solução a secar podem minimizar esses efeitos indesejáveis. Os resultados de estudos demonstram que há uma melhora significativa no desempenho de secagem caracterizada pelo aumento do rendimento do processo de secagem, além de contribuir positivamente sobre o teor de água do produto e melhorar as propriedades reológicas dos extratos (VASCONCELOS et al., 2005; SOUZA et al., 2009).

2.4.3 Goma Arábica

O uso de materiais poliméricos naturais também tem sido foco de grande atividade de pesquisa voltadas ao desenvolvimento formas farmacêuticas sólidas orais e/ou de liberação modificada. Os polímeros naturais (polissacarídeos e/ou oligossacarídeos), devido a suas propriedades de baixa toxicidade, biodegradabilidade, características filmogênicas, facilidade de derivatização, disponibilidade e baixo custo têm constituído um elemento de elevado interesse e destaque nas investigações voltadas à sua inclusão no grupo de excipientes farmacêuticos. Dentre as inúmeras propostas destaca-se o polissacarídeo goma arábica, (GABAS & CAVALCANTI, 2003).

A goma arábica ou goma acácia é um produto obtido pela dessecação espontânea do exsudato dos troncos e dos ramos da espécie *Acácia senegal* (Linne). Não é produzida no Brasil, somente em países africanos, principalmente no Sudão. As propriedades físico-químicas e químicas da goma-arábica sofrem modificações, dependendo da idade da planta, origem, condições climáticas, tempo de exsudação e tipo de armazenamento (LANDIM, 2008).

Quimicamente a goma arábica é um polissacarídeo complexo, ácido e de peso molecular de 500.000 Daltons. Sendo constituída, com quantidades variáveis, principalmente de arabinose, galactose, raminose e alguns ácidos derivados, tais como o ácido glicorônico e 4-O-metil-D-ácido glucorônico múltiplas glicoproteínas (RAMOS, 2006; LANDIM, 2008).

Esse excipiente farmacêutico possui reconhecimento e ampla aplicação na preparação de emulsões, suspensões, como ligante na fabricação de comprimidos convencionais, além de ser responsável pela camada aderente na fabricação de drágeas e, também, ser empregado como adjuvante de secagem na obtenção de extratos secos por *spray-dryer* (GABAS & CAVALCANTI, 2003).

Materiais ricos em açúcares e ácidos de baixo peso molecular, como suco de frutas e alguns extratos vegetais, são difíceis de atomizar, pois produzem pós muito higroscópicos, susceptíveis ao processo de aglomeração e problemas de fluidez e, conseqüentemente, pode haver comprometimento na estabilidade do produto e redução do rendimento do processo. Tais problemas podem ser evitados ou minimizados quando se adicionam adjuvantes de secagem como as maltodextrinas, que são carboidratos de alto peso molecular, os quais possuem alta temperatura de transição vítrea sendo capazes de diminuir a higroscopicidade dos pós e facilitar a secagem. No entanto, alguns estudos indicam que a goma arábica é mais efetiva que as maltodextrinas por possuírem uma temperatura de transição vítrea superior, tornando-se, portanto, mais efetivas na diminuição da higroscopicidade dos pós (OLIVEIRA, 2008b).

2.5 Controle de qualidade de matérias-primas vegetais

A qualidade da matéria prima-vegetal está diretamente ligada a diversos fatores como: cultivo, coleta e secagem, os quais determinam a presença e a estabilidade dos constituintes químicos, bem como a eficácia dos produtos derivados. As matérias-primas vegetais utilizadas para a produção de medicamentos fitoterápicos têm que passar por um rígido controle de qualidade químico, físico-químico e microbiológico, sendo que poucas das plantas utilizadas apresentam especificações de qualidade bem definidas em farmacopeias ou outras bibliografias de respaldo científico (FARIAS, 2010).

A qualidade implica controle devendo estar envolvidos uma série de ensaios e testes que englobam desde a identificação botânica da planta até o doseamento dos compostos ativos, passando por análises microbiológicas, onde se analisa a contaminação por microrganismos (bactérias e fungos) que podem provocar diversos prejuízos à saúde do

consumidor e à estabilidade do produto. Esses ensaios estão descritos no documento da OMS (Organização Mundial de Saúde) (WHO/Pharm/92.559), como relevantes e imprescindíveis na análise da qualidade das plantas medicinais, sendo assim, exigidos para a certificação de matérias-primas vegetais e registro de produtos derivados (BRASIL, 2010).

Dentre os ensaios de controle de qualidade físico-químicos, na análise da qualidade de plantas medicinais, destacam-se a:

- *Determinação de perda por dessecação (PD)*: o valor da perda por dessecação é indicativo do teor de material volátil presente na droga vegetal. A importância da realização deste ensaio está ligada à estabilidade microbiológica da droga, como expressão de sua suscetibilidade ao desenvolvimento de bactérias, fungos e da estabilidade química, representada especialmente pelos processos de hidrólise (WHO, 1992). Assim, este teste pode fornecer dados relacionados com o rendimento da extração, já que a secagem influi no estado de integridade das estruturas celulares, expondo-as mais ou menos ao contato com solventes. Além do mais, sob o ponto de vista tecnológico e de produção, é importante conhecer quantitativamente o conteúdo de água presente na matéria-prima vegetal, para que este valor seja considerado nos cálculos de rendimento (OLIVEIRA et al., 2001).

- *Teor de extrativos (TE)*: este ensaio indica a quantidade de substâncias extraíveis, ou seja, solúveis em determinado sistema solvente (OLIVEIRA et al., 2001).

- *Determinação de cinzas totais*: resíduo por incineração ou cinzas é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento de um produto em altíssimas temperaturas. Nem sempre este resíduo representa toda a substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem sofrer redução ou volatilização nesse aquecimento. Por outro lado, a determinação de cinzas

insolúveis em ácido, geralmente ácido clorídrico a 10% p/p, dá uma avaliação da quantidade de sílica (areia) existente na amostra (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1976).

- *Análise granulométrica por tamisação*: a tamisação é uma operação destinada a separar e classificar, mecanicamente, através das malhas com aberturas conhecidas e padronizadas, partículas sólidas com diferentes dimensões (PRISTA et al., 1992).

2.6 Extratos secos vegetais e produto seco por aspersão

Os extratos secos são preparações sólidas obtidas na forma de pó ou granulado após a eliminação total do solvente de extração, o qual pode ser obtido na presença ou não de adjuvantes farmacêuticos. Devem apresentar uma umidade residual máxima de 5%. A identificação dos extratos secos deve conter, além da denominação da droga, a mistura extrativa que deu origem ao produto, a relação ponderal da droga para uma parte de extrato, a concentração da substância marcadora e os adjuvantes presentes (FARMACOPÉIA BRASILEIRA V, 2010).

Extratos secos vegetais têm sido utilizados como produtos finais ou intermediários na obtenção de diferentes formas farmacêuticas (HEBERLÉ, WEHRMANN & PETROVICK, 2000).

No desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, a técnica de secagem por aspersão (*spray drying*) tem sido bastante empregada com intuito de se obter produtos intermediários ou produtos finais (COSTA et al., 2009).

No desenvolvimento de fitoterápicos, os extratos secos revelam-se de especial interesse para a indústria farmacêutica devido às vantagens que os mesmos oferecem, quando comparadas as formas farmacêuticas líquidas ou semi-sólidas: maior estabilidade, maior

facilidade de manipulação, características que refletem no produto final como na precisão das doses, eficácia terapêutica, segurança de utilização, facilidade de manuseio, transporte e armazenagem, além de favorecerem a manutenção da estabilidade química, microbiológica e farmacológica (PACHÚ, 2007). Entre as técnicas para obtenção de extratos secos destaca-se a secagem por aspersão, que consiste na evaporação de líquidos em solução ou suspensão por pulverização em pequenas gotículas numa câmara de secagem munida de ar quente, obtendo-se produtos pulverulentos (TEIXEIRA & BASSANI, 1997).

No secador por aspersão ou *spray-dryer*, a matéria- prima inicial deve se apresentar no estado líquido ou pastoso. O produto é inserido na câmara de secagem por um sistema de aspersão, de forma a reduzir o tamanho das partículas na forma de gotículas, permitindo uma maior área de transferência de calor e uma maior quantidade de transferência de massa. O tamanho das gotículas é, portanto, um fator importante para indicar a eficiência da secagem. A escolha das temperaturas, de entrada e de saída do equipamento de secagem, é determinada de acordo com o grau de sensibilidade do produto à temperatura. A velocidade de evaporação varia em razão inversa a pressão interna do secador, sendo assim, uma pressão baixa facilita a evaporação. A secagem por *spray-dryer* também pode ser empregada para diversos tipos de produtos alimentícios como: leite, chás, suco de tomate, ovos, bem como na indústria química como na secagem de massas de cerâmicas, argilas e detergentes (DEGÁSPARI et al., 2002).

O processo de secagem por aspersão apresenta diversas vantagens, tais como (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010):

- Seleção adequada do equipamento com base nas características pretendidas para o produto final;
- O controle da uniformidade e do tamanho das partículas do produto pela manipulação das variáveis do processo;

- Processo contínuo, podendo ser alteradas condições de operação sem a necessidade de interrupção, rapidez e rendimento;
- A evaporação ocorre em frações de segundos, em virtude da formação de inúmeras gotículas que proporcionam uma grande área superficial para trocas térmicas e transferência de massa;
- Baixa agressividade ao produto, o que a faz apropriada para produtos termossensíveis devido ao curto tempo de contato com a fonte de calor, podendo assim, ser empregada com sucesso na produção de produtos intermediários para fitomedicamentos;
- As partículas resultantes apresentam forma esférica uniforme e uma rápida dissolução, devido à grande área específica;
- Os custos do processo são baixos;
- Alguns sistemas podem operar em modo de circuito-fechado com um gás inerte para reduzir a oxidação do produto.

Entre as desvantagens acerca da utilização da técnica de secagem por este método podem ser citadas: i. O equipamento apresenta grandes dimensões, necessitando de instalações físicas adequadas; ii. O custo inicial é alto, pois necessita de investimento em instalações. Porém, o valor do produto final pode justificar o ônus inicial (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010).

Em geral, produtos secos por aspersão de extratos vegetais, mostram-se muito finos, leves, de baixa compressibilidade e de fluxo ruim, além de apresentarem-se higroscópicos (SPANIOL, 2007). Diante dessas características desfavoráveis, a necessidade de utilizar adjuvantes de secagem foi colocada em evidência por diversos pesquisadores, tanto como fator crítico no rendimento do processo, como na padronização da qualidade e manutenção da estabilidade de produtos secos obtidos. Entre os adjuvantes já testados estão o dióxido de silício coloidal, a celulose microcristalina, a goma arábica, o fosfato tricálcico e a maltodextrina (SILVA, 2007).

Adicionalmente, estudos realizados sobre o emprego de adjuvantes de secagem têm demonstrado uma melhora nas propriedades físico-químicas, bem como a capacidade de proporcionar um aumento do rendimento da operação, além de contribuir, positivamente, para a reconstituição de água do produto e para a estabilidade dele frente à umidade. Em contrapartida, a otimização dos parâmetros de secagem como temperaturas de entrada e de saída e velocidade de fluxo de alimentação, concentração e tipo de adjuvante tecnológico, assim como os teores de resíduo seco do extrato fluido a aspergir, são fatores indispensáveis para obtenção de extratos secos com melhores características tecnológicas e rendimento (VASCONCELOS et al., 2005).

2.7 Enzimas como alvos de avaliação de atividade biológica

2.7.1 Enzima conversora de angiotensina

Nos últimos trinta anos a possibilidade de bloquear, farmacologicamente, o sistema renina-angiotensina tornou possível uma verdadeira revolução na medicina cardiovascular. Graças às descobertas dos inibidores da enzima conversora, os IECA, e dos bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II, imensos progressos foram feitos no tratamento da hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, remodelação cardíaca e vascular, insuficiência renal crônica, hipertrofia ventricular, entre outras condições cardiovasculares (RIBEIRO, 2007).

Os mecanismos de ação dos inibidores da ECA são complexos e fundamentam-se na inibição da enzima conversora da angiotensina, que é uma carboxipeptidase capaz de fragmentar várias cadeias peptídicas, como a da angiotensina, das cininas e do neuropeptídeo Y (BARRETTO, 2002). As ações que mais imediatamente se associam a seus efeitos

cardiovasculares estão representadas na figura abaixo e são resultantes da diminuição da formação de angiotensina II e do acúmulo de bradicinina (Figura 3).

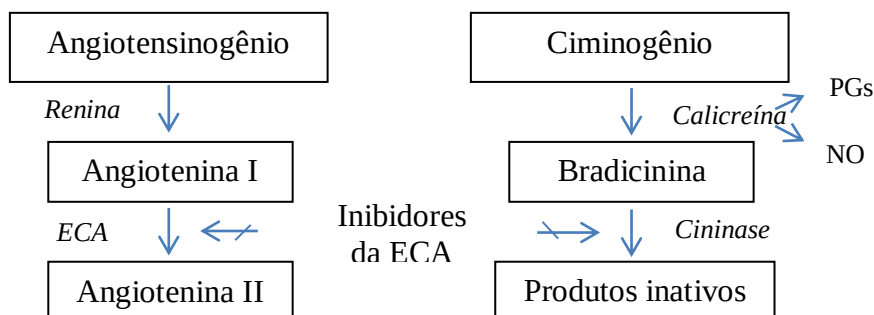


Figura 3. Mecanismos de ação dos inibidores da ECA: PG - prostaglandinas; NO - óxido nítrico; ECA - enzima conversora de angiotensina.

Resumidamente, os inibidores da ECA exercem: ação hemodinâmica, reduzindo a pré-carga e a pós-carga e diminuem a ação exagerada da angiotensina II na arteríola eferente glomerular renal preservando a pressão intraglomerular. Em pacientes hipertensos ou diabéticos, o efeito moderador da pressão intraglomerular é benéfico em longo prazo, prevenindo a agressão esclerosante que a pressão glomerular aumentada causa; ação neuro-hormonal, reduzindo a ação de vários agentes e acentuando a de outros, o que concorre para os efeitos hemodinâmicos e, de forma destacada, para a menor remodelagem miocárdica e vascular, menor trombogenicidade e menos sede (Tabela 3) (BARRETTO, 2002).

Tabela 3. Ação dos inibidores da enzima conversora de angiotensina

1) Ação hemodinâmica
Redução de pré-carga
Redução de pós-carga
2) Ação neuro-hormonal
Redução da angiotensina II
Aumento da bradicinina
Redução da atividade simpática
Redução da vasopressina
Redução da aldosterona
Redução da endotelina
Redução do PAI-1

3) Ação trófica
Redução da modelagem ventricular e vascular
4) Controle da sede
5) Efeito antitrombótico
Redução de eventos cardiovasculares (AVE e IAM)

2.7.2 Enzima α -glicosidase

Os inibidores da α -glucosidase estão entre os fármacos disponíveis para redução da glicose. A enzima α -glicosidase está localizada na borda em escova do intestino delgado e é necessária na quebra de carboidratos em monossacarídeos absorvíveis. Dessa forma, atrasam a absorção de hidratos de carbono a partir do intestino delgado e, assim, promovem a redução da glicemia pós-prandial e dos níveis de insulina. O objetivo da terapia oral em pacientes com diabetes tipo 2 é chegar a normoglicemia para evitar complicações posteriores (retinopatia, neuropatia, nefropatia e microangiopatia). Os fármacos como acarbose, voglibose e miglitol são amplamente utilizados no tratamento de pacientes com diabetes tipo 2 (CETTO, JIMÉNEZ & VÁZQUEZ, 2008).

Adicionalmente, a família das glicosidases promovem alterações de paredes celulares bacterianas e vegetais e hidrólise de polissacarídeos estruturais altamente insolúveis, como quitina e celulose. As glicosidases estão, paralelamente, envolvidas no processamento de glicoproteínas e a região oligossacarídica destes glicoconjugados desempenha funções fundamentais nos processos biológicos, como resposta imune, reconhecimento intercelular (incluindo fertilização), diferenciação celular, enovelamento, estabilidade e solubilidade das proteínas, além dos processos patológicos, como câncer e inflamação (MELO & CARVALHO, 2006).

A alfa-glicosidase é uma enzima que retarda a liberação de glicose a partir de oligossacarídeos por ser capaz de hidrolisar ligações 1,6-alfa-glucosídica quando a próxima ligação da sequência 1,4. A alfa-amilase, produzida por animais, vegetais e microrganismos, é

uma enzima que hidrolisa ligações α -glicosídicas produzindo mono ou oligossacarídeos α -anoméricos (hidrólise) formando ligações glicosídicas α -1,4 ou α -1,6 (transglicosilação).

Inibidores de α -glicosidases também têm sido estudados como potenciais agentes anti-HIV, com grande influência no ciclo de replicação viral. A estrutura morfológica dos vírus HIV tipo 1 e 2 inclui proteínas estruturais e funcionais e um genoma de RNA protegidos por uma capa externa, conhecida como envelope viral. O envelope é constituído por uma bicamada lipídica e contém uma proteína complexa conhecida como *env*, que consiste das glicoproteínas gp41, transmembrana, e gp120, exposta à camada externa do envelope e ancorada à gp41. Glucosidases I e II, envolvidas no processamento de Glc₃Man₉GlcNAc₂ da *N*-glicoproteína imatura na célula, participam da formação da glicoproteína gp120, responsável pela interação do vírus com os receptores CD4 dos linfócitos T4 (receptor primário), etapa inicial fundamental no processo de infecção viral. A glicoproteína gp120 apresenta regiões variáveis e conservadas de forma extensivamente glicosiladas, representando verdadeiros alvos para ligação aos receptores primários e neutralização por anticorpos liberados no processo de infecção (MELO & CARVALHO, 2006).

Nos últimos anos, vários pesquisadores têm focado os inibidores da alfa-glicosidase de plantas medicinais. Uma revisão recente de compostos hipoglicemiantes cita as seguintes espécies com capacidade de inibir a alfa-glicosidase: *Rhizoma polygonati* Odorati (Lilliaceae), *Syzygium malaccense* L. Merrill & L.M. Perry (Myrtaceae), *Lobelia chinensis* L. (Campanulaceae), *Nicandra physalodes* L. (Solanaceae), *Origanum majorana* L. (Lamiaceae), *Lactuca indica* L. (Compositae), *Cuscuta reflexa* Roxb (Convovulaceae) and *Hyssopus officinalis* L. (Lamiaceae). Como conclusão, os autores mencionam que os flavonóides e polifenóis, assim como seus derivados de glicose demonstraram ser efetivos inibidores da α -glicosidase (CETTO, JIMÉNEZ & VÁZQUEZ, 2008).

A maioria das plantas que são utilizadas como antidiabéticas, ao serem avaliadas farmacologicamente, demonstra ter atividade hipoglicemiante e possuir constituintes químicos que podem ser utilizados como modelos para novos agentes hipoglicemiantes. O mecanismo de ação pelos quais as plantas baixam a taxa de glicose do sangue pode ser atribuído aos seguintes fatores: aumento da liberação de insulina através da estimulação das células β -pancreáticas; resistência aos hormônios que aumentam a taxa de glicose; aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina; diminuição da perda de glicogênio; aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos; eliminação de radicais livres; resistência à peroxidação de lipídeos; correção da desordem metabólica causada em lipídeos e proteínas e estímulo ao aumento da microcirculação do sangue no organismo (NEGRI, 2005).

Capítulo 3

OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver produto seco por aspersão a partir da solução extrativa aquosa obtida das cascas do caule da espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea*.

3.2 Específicos

- Caracterizar a matéria-prima vegetal (cascas do caule) da *L. ferrea* visando o estabelecimento de parâmetros para o controle de qualidade da droga vegetal;
- caracterizar a solução extrativa aquosa das cascas do caule da *L. ferrea*;
- avaliar a influência de adjuvantes de secagem sobre as características físico-químicas e tecnológicas dos produtos secos por aspersão obtidos;
- caracterizar tecnologicamente o extrato seco por aspersão e os produtos secos por aspersão da *L. ferrea*;
- desenvolver e validar metodologia analítica em cromatografia líquida de alta eficiência para o controle de qualidade tanto da matéria-prima vegetal e produtos elaborados a partir das cascas do caule da espécie *L. ferrea*;
- avaliar *in vitro* a inibição da enzima α -glicosidase e da enzima conversora de angiotensina pelo extrato seco por aspersão e pelos produtos secos por aspersão obtidos.

Capítulo 4

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Equipamentos e acessórios

Aagitador magnético Nova Ética, modelo 114;

Analizador de superfície e de tamanho de poros Micromeritics ASAP 2420;

Analizador de tamanho de partícula Zetatracc Legacy S3500;

Balança analítica BEL, precisão de 0,02 mg;

Balança analítica Shimadzu, modelo AY 220, precisão de 0,01 mg;

Banho-maria Quimis, modelo 0334M-28;

Coluna cromatográfica Phenomenex®, Gemini 5µ C18 110Å, 250 X 4,6mm;

Compactador automático Varian®;

Cromatógrafo analítico a líquido de alta eficiência Shimadzu® modelo LC 20AT *proeminence*, provido de duas bombas 2LC-10ADvp, forno de coluna modelo CTO 010ASvp, sistema de controle modelo CBM 20, degaseificador modelo DGU-20A5, injetor automático de amostras modelo SIL-20A, e detector com arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A;

Espectrofotômetro UV-VIS, Shimadzu, modelo UV-1700 pharma spec;

Estufa com circulação e renovação de ar Solab, modelo SL102;

Liofilizador Vir-Tis, modelo 2KBTES;

Mufla Fanem, modelo 413;

Moinho de facas Tecnal;

Prensa hidráulica;

Rotavapor Tech Lab, modelo IKA RV10, com banho de água modelo IKA HB10;

Sistema de filtração Milipore®;

Tamisador Bertel®;

Torre de secagem por aspersão Mini Spray Dryer (modelo MSD 1.0) da Labmaq do Brasil.

4.1.2 Solventes e Reagentes

4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo;

Acetonitrila grau HPLC (Tédia Brasil);

Ácido acético glacial (CRQ);

Ácido clorídrico 3N;

Água destilada e água deionizada em equipamento Milli-Q;

Dimetilsulfóxido;

Hidróxido de sódio;

Metanol grau HPLC (J. T. Barker);

Orto-ftaldialdeído;

Tampão fosfato 5 mM pH 8,0;

Tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,9.

4.1.3 Adjuvantes farmacêuticos

Celulose microcristalina (Flocel® 101; número do lote 489; Gujarat Microwax Limited);

Dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200; número do lote HDKN-20; Wacker Chemical Alemanha);

Goma arábica (número do lote 06/0209; Proquímicos).

4.1.4 Substâncias de referência (padrões)

Ácido gálico (Sigma); número do lote G7384; Pureza de 97,5%;

Epicatequina (Sigma); número do lote 525952; Pureza de 95%.

4.2 Métodos

O presente trabalho possui caráter multidisciplinar e para sua execução foram realizadas parcerias em vários laboratórios. Os ensaios de caracterização do material vegetal, preparação de solução extrativa, obtenção de extrato seco e produtos secos por aspersão, validação de metodologia analítica, bem como os testes biológicos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Laboratório de Atividade Biológica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus/AM. A caracterização tecnológica do extrato e produtos secos foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e Laboratórios de Microscopia Eletrônica e Nanotecnologia Farmacêutica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife/PE.

4.2.1 Material vegetal

Cascas do caule da espécie vegetal *Libidia ferrea* foram coletadas em três localidades da cidade de Manaus (Tabela 4). A identificação botânica foi realizada no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e recebeu o código de registro de número 228.022.

Tabela 4. Origem de coleta dos lotes 1, 2, 3 e 4 de *L. ferrea*

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Data	21/12/2010	27/01/2011	27/01/2011	20/09/2010
Local	INPA V8	INPA, BR-174, KM 42	BR AM 104	INPA, BR-174, KM 42

INPA= Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

4.2.2 Obtenção da matéria-prima vegetal

O material vegetal (Figura 4), logo após a coleta, foi deixado à temperatura ambiente por 48 horas e, posteriormente, levado à estufa com circulação forçada de ar a temperatura de $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. Após secagem, as cascas foram submetidas à moagem em moinhos de facas, com abertura de malha de 1 mm, obtendo-se a matéria-prima vegetal (MPV) de *L. ferrea*.



Figura 4. Material Vegetal (cascas do caule) de *Libidibia ferrea*.

4.2.3 Caracterização da matéria-prima vegetal (MPV)

4.2.3.1 Determinação de perda por dessecação

Cerca de 2,0 g de MPV, exatamente pesados, foram colocados em pesa-filtros, previamente tarados, e secados na temperatura de $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por um período de 2 horas, em seguida os pesa-filtros foram resfriados em dessecador por 30 minutos e pesados. Este procedimento foi repetido até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem através da média de três determinações (FARMACOPEIA, 2010).

4.2.3.2 Teor de extrativos

A análise foi realizada pesando-se, exatamente, cerca de 1,0 g da MPV, a qual foi aquecida à ebulição com 100 mL de água durante 10 minutos. Após resfriamento, foi reconstituído o peso inicial com adição de água correspondente àquela evaporada. A solução foi filtrada, desprezando-se os 20 mL iniciais. Em seguida, foram pesados, exatamente, cerca de 20,0 g do filtrado, em pesa-filtro, previamente tarado, evaporando-se até a secura em banho de água fervente. O resíduo foi colocado na estufa à temperatura de $105 \pm 2^\circ\text{C}$ por 2 horas. Em seguida, foi resfriado em dessecador por 20 minutos e pesado. Este procedimento foi realizado até a obtenção do peso constante. O teor de extrativos (TE) foi calculado como percentual ponderal pela média de três determinações segundo a equação (1) (BUNDESVEREINIGUNG, 1986).

$$TE = \frac{g \times FD}{m - (m \times \frac{pd}{100})} \times 100 \quad (1)$$

Onde: TE = Teor de extrativos (%; m/m); g = massa do resíduo seco (g); Fator de Diluição = constante (FD = 5); m = massa da amostra inicial (g); pd = perda por dessecação da amostra (%; m/m).

4.2.3.3 Determinação de cinzas totais

Cadinhos de porcelana foram calcinados, previamente, em mufla a 450°C por 30 minutos. A seguir, foram resfriados em dessecador, por 30 minutos, e determinado o peso em balança analítica. Posteriormente, cerca de 3,0 g da MPV, exatamente pesados, foram

acondicionados nos cadinhos previamente calcinados. Em seguida o conjunto foi levado à mufla a 450°C onde permaneceram até a queima completa da amostra obtendo-se cinzas brancas. O conjunto foi, então, resfriado em dessecador por 30 minutos, seguido de pesagem. O processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do conjunto foi repetido com intervalos de 2 horas, até atingir peso constante. As cinzas obtidas foram determinadas pela média de três determinações (FARMACOPEIA, 2010).

4.2.3.4 Análise granulométrica por tamisação

Amostra, exatamente pesada, de 50 g da MPV foi submetida à passagem forçada por vibração, através de tamises com aberturas de malhas de 1,00; 0,800; 0,710; 0,600; 0,500; 0,400; 0,330; 0,250 mm e coletor, utilizando tamisador a 60 vibrações/minuto, durante 15 minutos. Após este processo, as frações retidas, nos tamises e coletor, foram pesadas em balança analítica e os dados analisados por método gráfico, construindo-se curvas de retenção e passagem, e histograma de distribuição, a fim de se obter o diâmetro médio de partículas e a amplitude granulométrica do pó, respectivamente. Os resultados obtidos correspondem à média de três determinações (VOIGT, 2000).

4.2.4 Preparação e caracterização da solução extrativa

A solução extrativa aquosa foi obtida por infusão a partir da MPV, por 15 minutos, numa relação droga:solvente de 7,5:100 (m/v). Posteriormente, a solução foi caracterizada conforme os ensaios discriminados abaixo.

4.2.4.1 Determinação de resíduo seco

Uma alíquota de 20,0 ml da solução extrativa foi exatamente pesada, diretamente em pesa-filtro, previamente tarado e evaporada até secar em banho-maria, sob agitação ocasional. Após evaporação da solução extrativa, o pesa-filtro contendo o resíduo foi levado à estufa $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até peso constante. O resultado foi expresso pela média e desvio padrão de três determinações (BUNDESVEREINIGUNG, 1986).

4.2.4.2 Determinação de densidade relativa

Esta análise foi realizada em picnômetro de 25 mL, previamente calibrado através da aferição do mesmo vazio e contendo água. Em seguida, foi determinada a massa do picnômetro contendo a solução extrativa. A densidade foi expressa pela média e desvio padrão de três determinações e calculada segundo a equação (2) (FARMACOPEIA, 2010).

$$d_{25}^{25} = \frac{m_{se}}{m_{H_2O}} \quad (2)$$

Onde: d = densidade relativa; m_{se} = massa de solução extrativa; m_{H_2O} = massa da água a 25°C .

4.2.4.3 Determinação do pH

O pH foi determinado utilizando-se cerca de 10,0 mL da solução extrativa, em peagâmetro previamente calibrado. O resultado foi expresso pela média de seis determinações (FARMACOPEIA, 2010).

4.2.4.4 Análise do teor de taninos totais (HARTKE & MUTSCHLER, 1987; MARTINS, 1998; SOARES et al., 2006)

Determinação de polifenóis totais: os teores de polifenóis totais foram obtidos por diluição de 2,0 mL da solução extrativa em 100,0 mL de água destilada (solução mãe). Posteriormente, foi diluído 6,0 mL da solução mãe em 25,0 mL de água destilada a fim de se obter uma solução de análise com concentração de 4,8 µL/mL. A absorvância foi medida no comprimento de onda de 264 nm em espectrofotômetro UV-visível.

Determinação de fração não-tanante: 150 mg de caseína foi adicionada a 10,0 mL da solução mãe, preparada conforme descrito anteriormente. A mistura foi agitada em agitador magnético, durante 01h e, em seguida, filtrada com papel filtro. A solução de análise foi obtida através da diluição de 2,0 mL do filtrado para 10,0 mL de água destilada. A leitura foi realizada conforme descrito na determinação de polifenóis totais.

O teor de taninos totais foi calculado através da diferença entre o teor de polifenóis totais e da fração não-tanante, conforme as equações abaixo:

$$PT = \frac{A1 \cdot FD}{A_{1cm} \% \cdot (m - p)} \quad (3) \qquad FNT = \frac{A2 \cdot FD}{A_{1cm} \% \cdot (m - p)} \quad (4)$$

$$TT = PFT - FNT \quad (5)$$

Onde: PT = polifenóis totais (g%); FNT = fração não-tanante (g%); TT = taninos totais (g%); A1 = absorvância de polifenóis totais; A2 = absorvância da fração não-tanante; FD = fator de diluição; m = massa de matéria-prima vegetal (g); p = perda por dessecação de matéria-prima vegetal (g); $A_{1cm} \%$ = coeficiente de absorção do ácido gálico.

O ensaio foi realizado em triplicata e o resultado expresso como média e desvio padrão.

4.2.4.5 Determinação do perfil por cromatografia líquida de alta eficiência da solução extrativa

A partir das soluções extrativas aquosas, oriundas das MPV (Lote 1, 2, 3 e 4), foram realizadas diluições para obter a concentração de 400 µL/mL, para todos os lotes, a fim de se observar e comparar o perfil cromatográfico dos lotes estudados. Posteriormente, estas soluções foram filtradas através de membrana de porosidade 0,45 µm e depositadas em frascos para injeção no cromatógrafo conforme método cromatográfico validado descrito no item 4.2.7.

4.2.5 Obtenção e desenvolvimento de produtos secos por aspersão de *L. ferrea*

A influência de diferentes tipos de adjuvantes farmacêuticos sobre as características dos produtos secos produzidos a partir da solução extrativa aquosa das cascas do caule de *L. ferrea* foi estudada através de um delineamento fatorial qualitativo do tipo 2³. Os fatores qualitativos estudados foram os adjuvantes de secagem: dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200), celulose microcristalina (Flocel® 101) e goma arábica (Tabela 5).

Tabela 5. Planejamento fatorial 2^3 para a produção dos produtos secos

Fatores	Níveis (%)
A: Celulose Microcristalina	(-) 0 (+) 10
B: Dióxido de Silício Coloidal	(-) 0 (+) 20
C: Goma arábica	(-) 0 (+) 5

As características utilizadas como resposta para avaliação dos efeitos dos fatores foram: umidade residual, densidade aparente e resposta biológica de ensaio *in vitro*.

Foram preparados lotes correspondentes à secagem de um litro de solução extrativa para cada um dos oito experimentos obtidos, sendo os mesmos ordenados ao acaso e sem reposição (Tabela 6).

Tabela 6. Descrição do planejamento fatorial 2^3 utilizado para a preparação dos produtos secos de *L. ferrea*

Experimento (n°)	Denominação	Combinações	Fator e nível		
			Fator A	Fator B	Fator C
1	ESA	1	-	-	-
2	PSA-1	a	+	-	-
3	PSA-2	b	-	+	-
4	PSA-4	ab	+	+	-
5	PSA-3	c	-	-	+
6	PSA-6	ac	+	-	+
7	PSA-5	bc	-	+	+
8	PSA-7	abc	+	+	+

Quando todos os fatores estudados estão no nível inferior (experimento 1) obtém-se um produto seco sem adjuvante, o qual se convencionou chamar de extrato seco por aspersão (ESA) e os demais produtos, contendo adjuvante, chamaram-se de produtos secos por aspersão (PSA) com diferentes numerações, referentes aos tipos e concentrações de adjuvantes.

Os adjuvantes de secagem foram adicionados em proporção ponderal calculada sobre o resíduo seco da solução extrativa. O material a ser seco foi mantido sob agitação, com

auxílio de agitador magnético, durante todo o procedimento de secagem, com o intuito de obter um produto com características homogêneas. Os ESA e PSA foram adicionados em frascos opacos, a fim de protegê-los da luz. As condições operacionais de secagem que foram utilizadas estão descritas na tabela 7.

Tabela 7. Condições operacionais de secagem da solução extrativa aquosa de cascas do caule de *L. ferrea*

Parâmetros	Valores
Temperatura de entrada	140°C
Temperatura de saída	90 ± 3°C
Fluxo de alimentação	6,5 mL/min
Diâmetro do aspirador	1,0 mm

4.2.6 Caracterização físico-química dos PSA de *L. ferrea*

4.2.6.1 Rendimento operacional

O rendimento operacional foi determinado pela pesagem do produto obtido no final da secagem e comparação com o teor de sólidos esperado.

4.2.6.2 Avaliação das características macroscópicas

As características macroscópicas foram avaliadas pela observação visual da cor e aspecto do produto (CARVALHO, 1997).

4.2.6.3 Umidade residual

A umidade residual foi determinada por método gravimétrico, utilizando-se estufa a 105°C, o ensaio foi realizado em triplicata (FARMACOPEIA, 2010).

4.2.6.4 Análise microscópica das partículas dos PSA por microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV - FEI modelo Quanta 200 FEG) foi realizada após prévia metalização, em metalizador modelo LEICA EM SCD 500, dos PSA com um filme de ouro. Os aumentos escolhidos para a visualização foram 2000x e 15000x.

4.2.6.5 Análise de distribuição do tamanho de partículas

A análise de distribuição do tamanho de partículas foi realizada por espalhamento de luz (granulometria a laser) por via úmida no aparelho *Zetatrak Legacy S3500*. Para esta análise foram pesados 7,25 g dos PSA produzidos. A massa pesada foi determinada através de pré-ensaios onde foi avaliada a sensibilidade de leitura do aparelho. Posteriormente, adicionaram-se 10 mL de álcool isopropílico aos PSA analisados e, em seguida, os frascos contendo as suspensões foram submetidos a um banho de água em ultrassom por dois minutos e ao final foram injetados no aparelho *Zetatrak Legacy S3500*.

4.2.6.6 Análise da área superficial e tamanho de poros das partículas

A medida de área superficial específica e as isotermas foram obtidas por adsorção física de nitrogênio sobre os PSA, pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET). Este método baseia-se na determinação do volume de nitrogênio líquido adsorvido a diversas pressões

relativas, na temperatura do nitrogênio líquido (77 K), a pressões relativas (P/P_0) no intervalo de 0,01 a 0,9. Para a realização deste ensaio, foi utilizado um Analisador de Área Superficial e Tamanho de Poros *Micromeritics ASAP 2420*, munido de *software* para determinar a área superficial (SBET), porosidade (tipo de poro e distribuição do tamanho de poro) e volume total de poros (método Barret-Joyner-Halenda, BJH). Foram pesados cerca de 200 mg dos PSA e estes foram degasificados por 24 horas a 110°C para remover impurezas adsorvidas no interior dos poros e na superfície do material.

4.2.6.7 Avaliação da densidade bruta e de compactação, fator de Hausner, índice de Carr e índice de densificação

Os volumes brutos e de compactação foram medidos em um aparato dotado de uma proveta de 5,0 mL fixada em um compactador automático Varian®, onde cerca de 0,75 g dos PSA foram posteriormente vertidos, individualmente, numa proveta de 5 mL determinando-se o seu volume bruto (V_b) e, em seguida submetidos a 10 (V_{10}), 500 (V_{500}) e 1250 quedas sequenciais. O ensaio foi continuado em sequências de 1250 quedas até que a diferença entre duas leituras subsequêntes fosse inferior ou igual a 0,1 mL, sendo este considerado como volume de compactação (V_c) (CARR, 1965; HAUSNER, 1967; GUYOT, 1995).

A partir dos dados obtidos neste ensaio foram calculados, respectivamente, as densidades brutas (δ_b) e de compactação (δ_c), o fator de Hausner (FH), índice de Carr (IC) e o índice de densificação (ID) (equações 6, 7, 8, 9 e 10), representando a média de três determinações. Os resultados do índice de densificação foram extrapolados para massa de 100 g.

$$db = \frac{Ma}{Vb}$$

(6)

$$dc = \frac{Ma}{Vc}$$

(7)

$$FH = \frac{dc}{db}$$

(8)

$$IC = \frac{dc - db}{dc} \times 100$$

(9)

$$ID = V_{10} - V_{500}$$

(10)

4.2.7 Avaliação do comportamento em atmosfera com umidade controlada

Solução saturada com resíduo sólido de nitrito de sódio anidro foi colocada em dessecador, a fim de obter ambiente com umidade relativa de 65%. Amostras exatamente, pesadas, de 500 mg, do ESA e PSA, foram colocadas em pesa-filtros sem tampas e armazenados em dessecadores. O teste foi realizado com um número de quatro repetições e a sorção de água foi estimada através da pesagem das amostras nas primeiras 24 e 48 horas, e, posteriormente, a cada 72 horas, por um período de 15 dias (CASADEBAIG, 1987; GAUDY et al., 1991).

4.2.8 Validação de metodologia analítica para doseamento de constituintes polifenólicos de *L. ferrea* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.2.8.1 Condições Cromatográficas

Para a separação cromatográfica foi utilizada como fase estacionária coluna de fase reversa C₁₈. Como sistema de eluição foi empregado gradiente linear conforme tabela 8, constituído de fase móvel metanol e ácido acético 0,5% (V/V). As análises foram realizadas empregando fluxo de 0,8 mL/min, volume injetado de 20 µL e detecção a 275 nm.

Tabela 8. Gradiente de eluição do sistema cromatográfico para *L. ferrea*

Tempo (min.)	Metanol (%)	Ácido acético 0,5% (V/V) (%)
0	20	80
10	40	60
20	60	40
30	60	40
40	40	60
50	20	80
60	20	80

4.2.8.2 Identificação dos picos

Os picos dos cromatogramas foram identificados através da comparação com o tempo de retenção e área do padrão ácido gálico e epicatequina no comprimento de onda de 275 nm. A quantificação foi feita por integração dos picos usando o método do padrão externo.

4.2.8.3 Validação do método

4.2.8.3.1 Curvas analíticas das substâncias de referências e extrato seco

As curvas de calibração foram obtidas em três dias consecutivos, conforme descrito abaixo:

Curva do ácido gálico

A curva do ácido gálico foi preparada pesando-se exatamente 10,0 mg de ácido gálico (padrão) e dissolvendo em água ultrapurificada em balão volumétrico de 10 mL. A partir desta solução foram realizadas diluições para obter concentrações de 2; 4; 6; 8 e 12 µg/mL.

As soluções foram filtradas através de membrana de porosidade 0,45 μm e posteriormente foram depositadas em frascos para injeção no cromatógrafo.

Curva da epicatequina

A curva da epicatequina foi preparada pesando-se exatamente 10,0 mg de epicatequina padrão e dissolvendo em água ultrapurificada:metanol (1:1 v/v) em balão volumétrico de 10 mL. A partir desta solução foram realizadas diluições para obter concentrações de 14; 28; 40; 54 e 70 $\mu\text{g/mL}$. As soluções foram filtradas através de membrana de porosidade 0,45 μm e posteriormente foram depositadas em frascos para injeção no cromatógrafo.

Curva de calibração do extrato seco (ESA)

A curva do extrato seco foi preparada pesando-se cerca de, exatamente, 250,0 mg do ESA dissolvidos em água ultrapurificada em balão volumétrico de 250 mL. A partir desta solução foram realizadas diluições para obter concentrações de 200; 400; 600; 800 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. As soluções foram filtradas através de membrana de porosidade 0,45 μm e posteriormente foram depositadas em frascos para injeção no cromatógrafo.

4.2.8.3.2 Parâmetros de validação

Linearidade

A linearidade foi determinada através da análise da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios de três curvas de calibração obtidas para as

substâncias de referências e extrato seco. Os resultados foram expressos pelo coeficiente de regressão linear, limites de confiança no ponto de interseção e pelo coeficiente de inclinação da reta.

Precisão

A precisão do método foi avaliada levando em consideração a repetibilidade e a precisão intermediária. Para avaliar a repetibilidade analítica da metodologia empregada na análise, preparou-se uma amostra que foi injetada em sextuplicata no mesmo dia, nas mesmas condições cromatográficas e pelo mesmo analista. No caso da precisão intermediária foram preparadas 3 amostras na mesma concentração, avaliadas em 3 dias diferentes e injetadas em triplicata. Os resultados foram expressos como coeficiente de variação.

Exatidão

A exatidão foi avaliada em termos de recuperação através do método de adição padrão. Quantidades conhecidas de ácido gálico e epicatequina (6,40 e 34,25 µg/mL, respectivamente) foram adicionadas em triplicata a uma alíquota da solução do extrato seco na concentração de 600 µg/mL. O ensaio foi realizado obedecendo à faixa de linearidade da metodologia. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, de acordo com equação 11.

$$Exatidão = \frac{ConcentraçãoMédiaExperimental}{ConcentraçãoTeórica} \times 100 \quad (11)$$

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados através da relação entre o desvio-padrão da curva analítica e o coeficiente angular, usando-se o fator multiplicador apropriado, conforme sugerido na RE nº 899/03 (Brasil, 2003). Estes parâmetros, LD e LQ foram calculados de acordo com as equações (12) e (13) respectivamente, (USP, 1995; Brasil, 2003).

$$LD = DP_a \times 3/IC \quad (12)$$

$$LQ = DP_a \times 10/IC \quad (13)$$

Onde, DP_a é o desvio-padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. IC é a inclinação da curva de calibração.

4.2.9 Avaliação de inibição enzimática da α -glicosidase e da enzima conversora de angiotensina *in vitro* dos PSA

4.2.9.1 Inibição da α -glucosidase

A inibição da α -glucosidase foi determinada pelo método modificado de Cetto, Jiménez & Vázquez (2008), cujo princípio baseia-se na degradação do substrato cromógeno 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo e formação de 4-nitrofenol. Neste ensaio, a acarbose na concentração de 2 mg/mL foi utilizada como droga padrão e o dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como controle negativo. As diluições do extrato foram realizadas utilizando água destilada. Em contrapartida, a enzima α -glicosidase obtida de *Saccharomyces cerevisiae* E.C

3.2.1.20 (*Sigma Aldrich Chemical*) e o substrato cromógeno 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo foram diluídos em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,9.

A metodologia foi executada utilizando 20 μ L de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,9 juntamente com extrato de *L. ferrea* nas concentrações de 0,0064; 0,032; 0,16; 0,8; 4 e 20 μ g/mL, os quais foram incubados a 37°C por 5 minutos com 180 μ L da enzima α -glicosidase (*Sigma Aldrich Chemical*). Posteriormente, adicionou-se 100 μ L do substrato cromógeno 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo e efetuou-se a primeira leitura (A1) em absorvância de 405 nm. A leitura final (A2) na mesma absorvância foi realizada depois de 15 minutos em estufa a 37°C. A acarbose, usada como droga inibidora padrão, foi trabalhada nas mesmas condições experimentais. Para o cálculo da inibição foi utilizada a equação 14:

$$\% \text{ inibição} = 100 - (A2 - A1 \text{ amostra} / A2 - A1 \text{ controle negativo}) \times 100 \quad (14)$$

Onde: A1= absorvância da leitura inicial; A2 = absorvância da leitura final.

4.2.9.2 Inibição da enzima conversora de angiotensina

A inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi determinada pelo método fluorimétrico indireto, descrito por Friedland e Silverstein (1976). A solução da ECA foi obtida como um extrato acetônico do pulmão de coelho, sendo esta adquirida comercialmente (*Sigma Aldrich Chemical, USA*) na concentração de 100 mg/mL em tampão fosfato 5 mM pH 8,0. A inibição da atividade foi determinada pela inibição da liberação do peptídeo *L*-histidil-*L*-leucina (His-Leu) 0,027 mg/mL em tampão, formado após hidrólise de um substrato tripeptídico sintético Hipuril-*L*-histidil-*L*-leucina (Hip-His-Leu). Ao dipeptídeo His-Leu formado foi adicionada uma substância fluorescente denominada de orto-ftaldialdeído na concentração de 2% em metanol e a fluorescência resultante foi quantificada em fluorímetro

(excitação = 360 nm e emissão = 500 nm).

A metodologia foi executada adicionando 10 µL do ESA e dos PSA de *L. ferrea* na concentração 100 µg/mL (poço teste), 10 µL do tampão fosfato (controle negativo) e 10 µL de solução de captopril (controle positivo) para posteriormente serem adicionados 40 µL da solução enzimática. Após 5 minutos de incubação a 37°C foi adicionado 50µL do His-Leu e incubado por uma hora a 37°C e em seguida foi adicionado 150 µL de hidróxido de sódio 5 M e 15µL de orto-oftaldialdeído a 2% (v/v) e incubado por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente para posterior adição de 50 µL de ácido clorídrico 3N e incubado por mais trinta minutos no escuro. Após, foi efetuada a centrifugação da microplaca a 2000 rpm por 10 minutos e 200 µL do sobrenadante obtido foram transferidos para uma placa escura para leitura no Leitor de Elisa (DTX 800, Multimode Detector, Beckman Coulter) em excitação = 360 nm e emissão = 500. A inibição foi determinada pela diferença entre amostras contendo ou não o agente inibidor e comparada com o captopril, inibidor padrão. Para o cálculo da inibição foi utilizada a equação 15:

$$\% \text{ inibição} = 100 - (A2 \text{ amostra} / A2 \text{ controle negativo}) \times 100 \quad (15)$$

Onde: A2 = absorbância da leitura final.

4.2.10 Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos foram interpretados com auxílio de ferramentas estatísticas aplicáveis em cada caso, tais como ANOVA *one way* seguida de teste de Tukey, ANOVA multivariada e análise de regressão múltipla, com auxílio de software Microsoft Excel[®], Statistica[®] e SigmaStat[®].

Capítulo 5

RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização da matéria-prima vegetal (MPV) de *Libidibia ferrea*

Os resultados de caracterização da MPV (Tabela 9) demonstram que todas as matérias-primas estudadas apresentaram umidade residual apropriada para o armazenamento que, de acordo com a literatura, deve estar na faixa de 8 a 14% de umidade (FARMACOPEIA, 2010). Porém, há diferenças significativas ($p < 0,05$) nos parâmetros analisados. Tal fato pode ser justificado pelas distintas épocas e locais de coleta do material vegetal.

O valor do teor extrativo foi satisfatório, para todas as amostras, demonstrando assim que água parece ser um excelente solvente extrator para esta espécie. De um modo geral, há uma quantidade considerável de cinzas totais no caule da espécie *L. ferrea*, o que pode ser explicado pela presença de sais inorgânicos no material vegetal (FRASSON, BITTENCOURT & HEINZMANN, 2003).

Com relação à granulometria dos pós, praticamente, não houve diferença entre as matérias-primas vegetais, sendo um fato esperado uma vez que todas as amostras foram submetidas ao mesmo processo de cominuição. A análise granulométrica das amostras demonstrou que mais de 20 % das partículas dos lotes 2, 3 e 4 (Figura 5B, 5C e 5D, respectivamente) apresentaram granulometria acima de 1000 μm , com diâmetro médio de partículas em torno de 850 μm (Figura 6B, 6C e 6D, respectivamente). O lote 1 apresentou mais de 20 % partículas na faixa granulométrica compreendida entre 710 a 850 μm com diâmetro médio de partículas de $780,27^b \pm 19,45$ (Figura 5A e 6A, respectivamente). O elevado diâmetro de partícula pode ser justificado pela característica do material vegetal, ou seja, as cascas apresentam rigidez que após o processo de moagem geram partículas de tamanho maior.

Tabela 9. Caracterização físico-química das MPV das cascas do caule da espécie *L. ferrea*

Parâmetros	Dados experimentais			
	$\bar{X} \pm s$			
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Perda por dessecação (g%)	8,48 ^b ± 0,20	8,29 ^b ± 0,11	8,70 ^b ± 0,05	10,57 ^a ± 0,02
Teor de extrativos (g%)	21,70 ^b ± 0,16	23,97 ^a ± 0,57	19,19 ^c ± 0,06	24,97 ^a ± 0,18
Teor de cinzas totais (g%)	5,37 ^c ± 0,09	5,83 ^{bc} ± 0,09	8,08 ^a ± 0,96	7,48 ^{ab} ± 0,87
Diâmetro médio (µm)	780,27 ^b ± 19,45	871,03 ^a ± 43,51	843,80 ^{ab} ± 22,86	839,90 ^{ab} ± 14,32

Médias seguidas da mesma letra na linha não se diferenciam estatisticamente pelo teste de Tukey $\alpha=0,05$

FRASSON, BITTENCOURT & HEINZMANN (2003) realizaram a caracterização físico-química das cascas do caule de *L. ferrea* de uma amostra coletada em Santa Maria/Rio Grande do Sul. Os resultados obtidos no trabalho (Tabela 10) mostram-se inferiores quando comparados com as amostras coletadas em Manaus/Amazonas (Tabela 9). Esses dados são valiosíssimos, uma vez que estudos com o maior número de amostras, de procedências diferentes, possibilitam a obtenção de valores para os parâmetros físico-químicos que sejam representativos para a espécie, corroborando para a elaboração de uma monografia da casca do caule da espécie *L. ferrea*.

Tabela 10. Ensaio de controle de qualidade das MPV das cascas do caule da espécie *L. ferrea* oriunda de Santa Maria/RS (FRASSON, BITTENCOURT & HEINZMANN, 2003)

Parâmetro físico-químico	Dado experimental
Perda por dessecação (g%)	5,54
Teor de cinzas totais (g%)	5,31

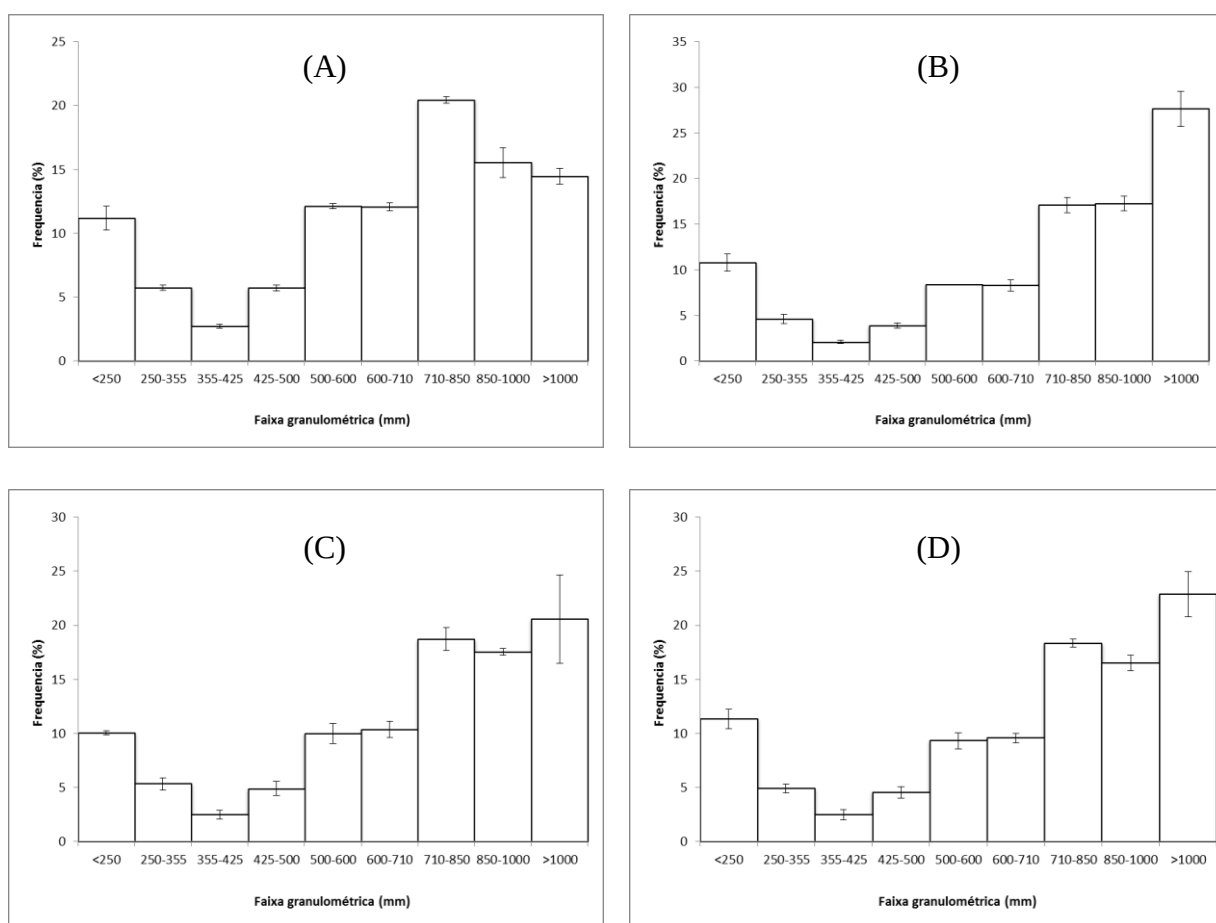


Figura 5. Distribuição granulométrica dos lotes: 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D) da espécie *L. ferrea*.

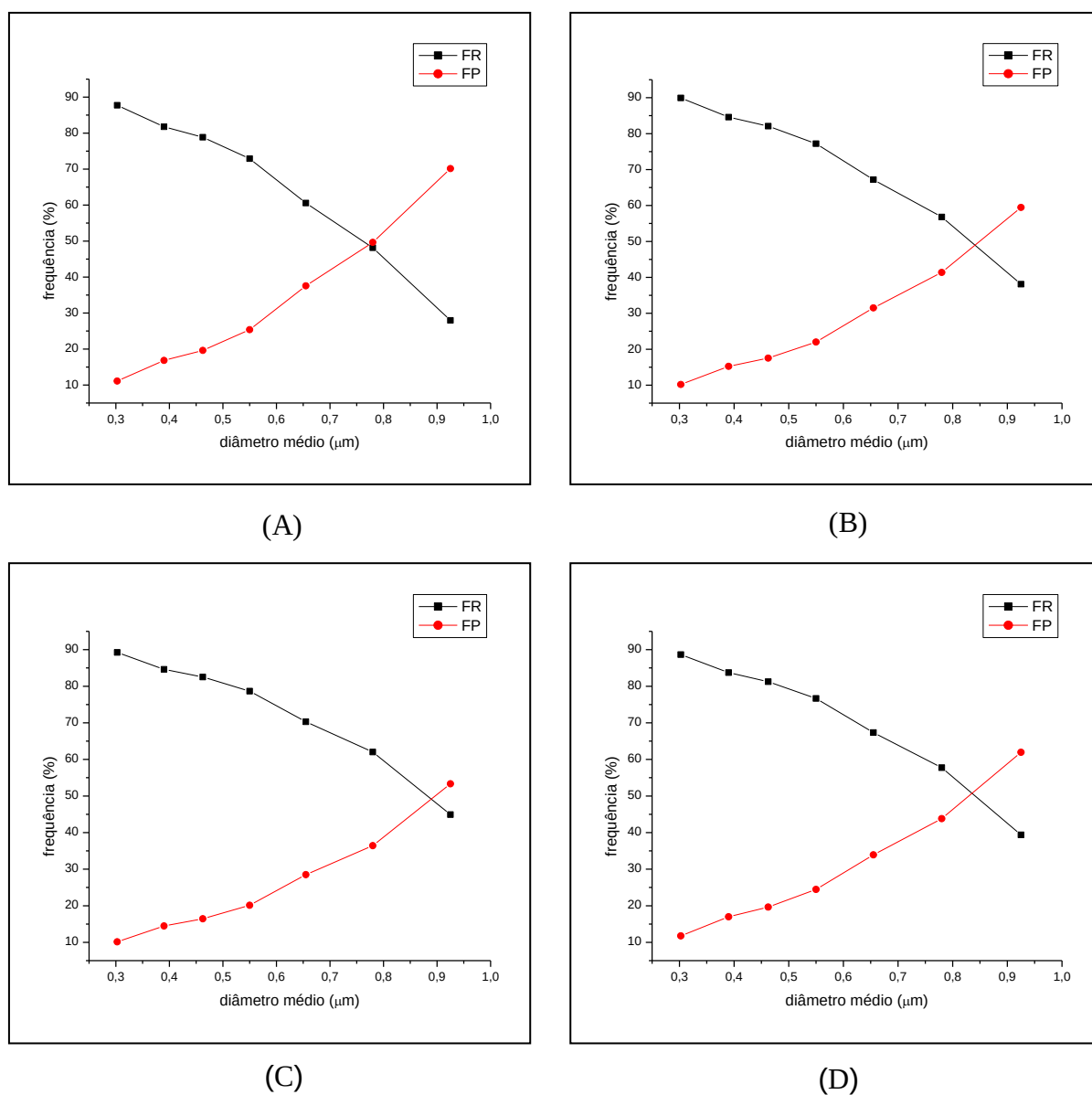


Figura 6. Representação gráfica do diâmetro médio de partícula empregando as curvas de retenção (FR) e passagem (FP) dos lotes: 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D) da espécie *L. ferrea*.

5.2 Desenvolvimento e caracterização da solução extrativa

Os ensaios realizados para a caracterização físico-química da solução extrativa (SE) foram limitados àqueles usualmente empregados em pesquisa tecnológica desta natureza e, exclusivamente, para o lote 2 sendo este selecionado para a produção dos produto secos por aspersão por apresentar características físico-químicas e perfil cromatográfico em CLAE mais favoráveis em relação aos demais lotes.

No que tange a determinação de substâncias de referência do material vegetal, foi investigado o teor de taninos totais, os quais se encontram acima dos valores descritos na literatura para esta espécie, cuja concentração citada na literatura é de, no máximo, 9,2 g% (FRASSON, BITTENCOURT & HEINZMANN, 2003). No entanto, vale ressaltar que os lotes analisados demonstraram teores de taninos totais, estatisticamente, diferentes entre si ratificando a influência das condições de plantio e local de coleta sobre o conteúdo químico da espécie vegetal (tabela 11).

Tabela 11. Análise comparativa do teor de taninos totais das soluções extrativas aquosas oriundas de diferentes lotes de cascas do caule de *L. ferrea*

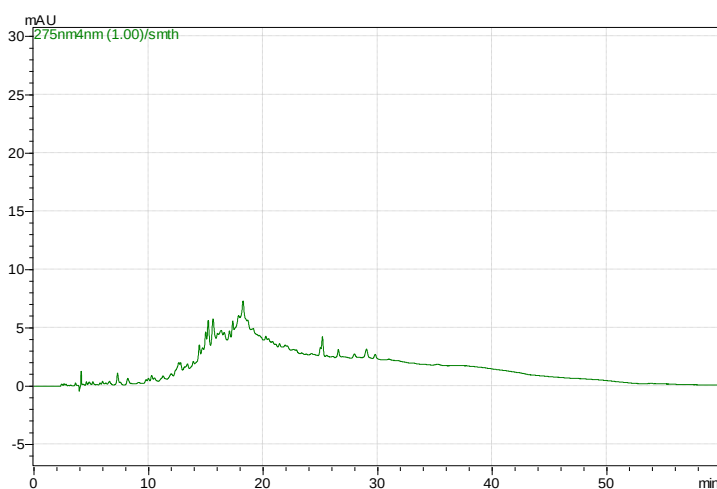
Taninos Totais	Dados experimentais $\bar{X} \pm s$ (CV %)			
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
TT (g%)	7,23 ^d ± 0,007 (0,107)	40,25 ^a ± 0,420 (1,050)	31,76 ^b ± 0,070 (0,240)	10,36 ^c ± 0,010 (0,150)

Médias seguidas da mesma letra não se diferenciam estatisticamente pelo teste de Tuckey $\alpha=0,05$.

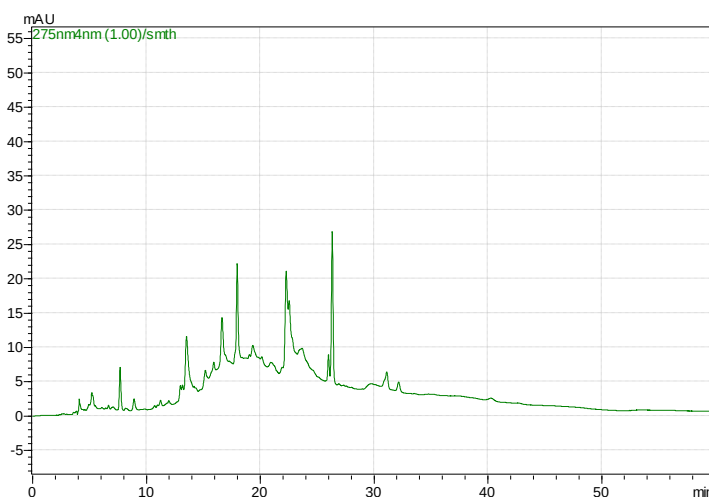
Observa-se, no presente trabalho, valores de teores de taninos totais consideravelmente superiores ao valor encontrado por FRASSON, BITTENCOURT & HEINZMANN (2003), na amostra de Santa Maria, que foi de 0,0208 g%, tal fato pode ser justificado por diferenças na

técnica de análise empregada por cada grupo de pesquisa, bem como, origem do material vegetal.

Nas figuras 7A e 7B podem ser observados os perfis cromatográficos, em 275 nm, das soluções extrativas oriundas de diferentes lotes de material vegetal, ratificando a influência dos fatores edafoclimáticos no perfil das substâncias presentes no material vegetal e maior concentração de conteúdo químico no lote 2.

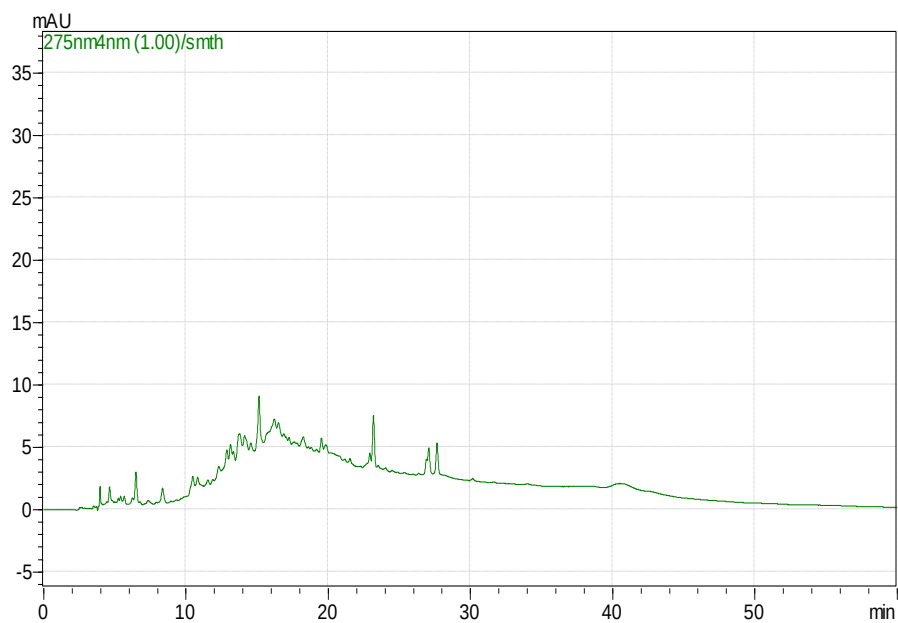


(A)

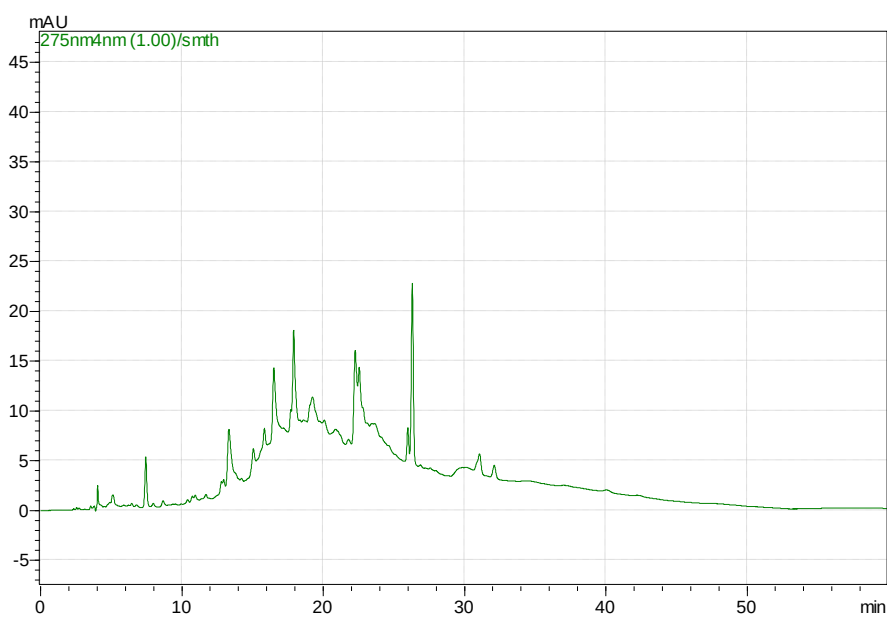


(B)

Figura 7A. Perfil cromatográfico das soluções extrativas oriundas dos lotes 1 (A) e 2 (B).



(C)



(D)

Figura 7B. Perfil cromatográfico das soluções extrativas oriundas dos lotes 3 (C) e 4 (D).

Na tabela 12 estão discriminados os resultados da caracterização físico-química para a solução extrativa aquosa do lote 2.

Tabela 12. Caracterização físico-química da solução extrativa aquosa do lote 2 produzida a partir das cascas do caule de *L. ferrea*

Parâmetro físico-químico	Dados experimentais
	$\bar{X} \pm s$ (CV %)
pH	4,36 $\pm$ 0,020 (0,52)
Densidade	1,007 $\pm$ 0,006 (0,01)
Resíduo seco (g%)	1,175 $\pm$ 0,003 (0,33)
Taninos Totais (g%)	40,25 $\pm$ 0,420 (1,05)

Devido à comprovada influência do pH sobre a estabilidade de soluções extrativas vegetais e sua composição química, a sua determinação é fundamental para inferências sobre a qualidade do produto (SOARES et al., 1998). A solução extrativa aquosa das cascas do caule de *L. ferrea* possui natureza ácida e densidade relativa semelhante à água destilada, o que era esperado, por ser este o solvente de extração.

O valor do resíduo seco é um parâmetro que pode ser empregado como medida para avaliação da eficiência de extração do solvente, sem considerar, geralmente, a extração específica de uma classe de substâncias ou de substâncias isoladas. No caso da preparação de extratos secos, este parâmetro é empregado também para o cálculo das concentrações de adjuvantes a serem empregados na secagem. De acordo com o resultado, a solução extrativa aquosa do lote 2 de *L. ferrea* apresenta um baixo teor de sólidos solúveis (RS = 1,17 g%), o que pode significar baixo rendimento na operação de secagem.

5.3 Obtenção e caracterização do extrato seco (ESA) e dos produtos secos por aspersão (PSA)

Os PSA foram obtidos através da secagem da solução extrativa aquosa das cascas do caule de *L. ferrea* do lote 2 sem e com adjuvantes tecnológicos (Aerosil® 200, Flocel® 101 e goma arábica) realizada em mini *spray-dryer*. Para facilitar o entendimento, convencionou-se

chamar o produto oriundo da solução extrativa sem adjuvante de extrato seco por aspersão (ESA) e com adição de adjuvante de produto seco por aspersão (PSA).

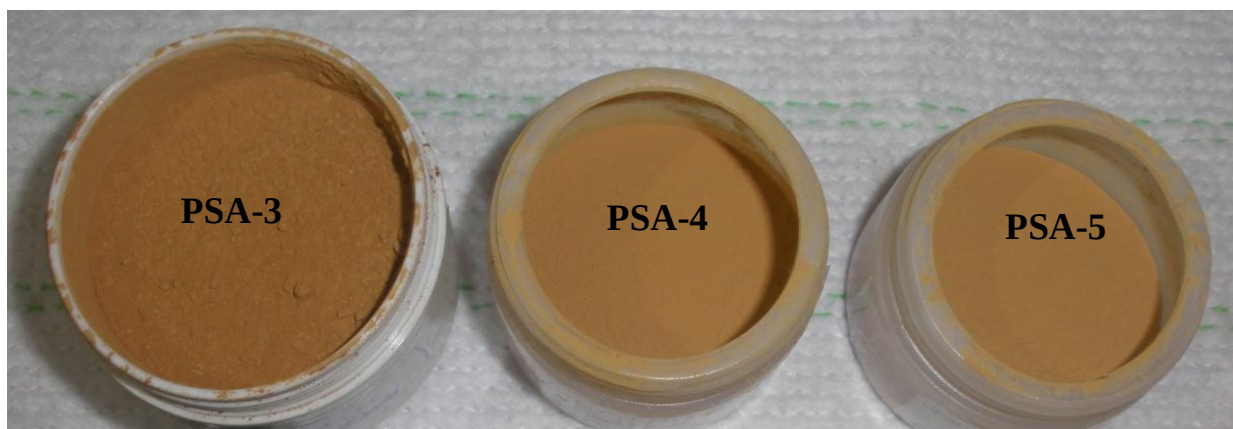
Observou-se que, de um modo geral, os adjuvantes adicionados à solução extrativa proporcionaram uma boa estabilidade física, mantendo o aspecto de pó extremamente fino e solto. Os PSA obtidos mostraram-se diferentes quanto ao aspecto macroscópico (Tabela 13). Os PSA com adição de 20% de Aerosil® 200 e suas combinações apresentaram-se extremamente finos, sem aglomerações e de coloração mais clara em relação ao extrato seco sem adjuvante e aos demais produtos secos, os quais apresentaram, também, tendência à aglomeração (Figura 8).

Tabela 13. Aspectos macroscópicos do ESA e dos PSA

Amostra	Aspecto macroscópico
ESA	fino com aglomerações, de cor marrom médio, com odor bastante característico e levemente adocicado (Figura 8A).
PSA-1	extremamente fino sem aglomerações, de cor marrom escuro, com odor bastante característico e levemente adocicado (Figura 8A).
PSA-2	fino sem aglomerações, de cor marrom clara, com odor bastante característico e levemente adocicado (Figura 8 A).
PSA-3	fino com aglomerações, de cor marrom médio, com odor bastante característico e levemente adocicado (Figura 8 B).
PSA-4	fino sem aglomerações, de cor marrom clara, com odor bastante característico e levemente adocicado (Figura 8 B).
PSA 5	extremamente fino sem aglomerações, de cor marrom clara, com odor bastante característico e levemente adocicado (Figura 8 B).
PSA 6	fino com aglomerações, de cor marrom clara, com odor bastante característico e levemente adocicado (Figura 8 C).
PSA 7	extremamente fino sem aglomerações, de cor marrom clara, com odor bastante característico e levemente adocicado (Figura 8 C).



(A)



(B)



(C)

Figura 8. Aspecto macroscópico dos produtos secos por aspersão obtidos a partir de solução extrativa aquosa das cascas do caule do lote 2 da espécie *L. ferrea*.

Com relação ao rendimento operacional (Tabela 14), o PSA produzido somente com Aerosil® 200 (PSA-2) apresentou rendimento superior quando comparado aos demais

adjuvantes e suas combinações, fato provavelmente relacionado com a menor aderência, proporcionada por esse adjuvante, das partículas às paredes de secagem durante a nebulização. No entanto, de um modo geral, os adjuvantes adicionados à solução extrativa não contribuíram para um rendimento superior quando comparado ao extrato seco sem adjuvante, contradizendo a literatura, uma vez que os adjuvantes de secagem, geralmente, aumentam o rendimento operacional (VASCONCELOS et al., 2005). Fato semelhante foi observado por BARAKAT (2011), constatando que a secagem por aspersão de solução extrativa aquosa, obtida a partir da entrecasca dos frutos secos de *L. ferrea*, sem adjuvante farmacêutico gerou maior rendimento tecnológico quando comparado ao rendimento da solução extrativa adicionada de Aerosil® 200 ou Flocel® 101.

Tabela 14. Rendimento de secagem e umidade residual do ESA e dos PSA obtidos

Tipo de PSA	Rendimento de secagem (%)	Umidade residual (%)
ESA	82,91	6,67 ± 0,26
PSA-1: com Flocel® 101	60,92	6,35 ± 0,07
PSA-2: com Aerosil® 200	67,28	4,27 ± 0,23
PSA-3: com goma rábica	64,31	5,89 ± 0,16
PSA-4: com Aerosil® 200 + Flocel® 101	47,09	5,56 ± 0,01
PSA 5: com Aerosil® 200 + goma arábica	55,11	5,91 ± 0,12
PSA 6: Flocel® 101 + goma arábica	63,16	4,90 ± 0,14
PSA 7: com Aerosil® 200 + Flocel® 101 + goma arábica	45,34	3,72 ± 0,16

No entanto, ao se objetivar a produção de uma forma farmacêutica sólida, tal como comprimidos e cápsulas, com alta carga de componente ativo com características tecnológicas desfavoráveis, como é o caso dos extratos secos vegetais, constata-se a necessidade da adição de adjuvantes na formulação para que esta forma farmacêutica sólida apresente características tecnológicas adequadas. Os adjuvantes são responsáveis pela formação de pontes que

manterão as partículas da formulação unidas após processos físicos como a compressão impedindo aderência do produto às superfícies do maquinário, pelo processo de desintegração e pela cedência dos ativos, entre outras funções (SPANIOL, 2007).

O valor obtido de umidade residual para o ESA e para os PSA (Tabela 14) apresentou-se dentro do preconizado pela literatura de, no máximo, 7% para produtos secos em geral armazenados em condições não herméticas (CARVALHO, 1997; SOARES, 2002; OLIVEIRA, 2008), porém, acima do limite máximo de 5% estabelecido pela Farmacopeia (2010), com exceção dos PSA-2 (com Aerosil® 200), PSA-6 (Flocel® 101 e Goma Arábica) e PSA-7 (com Aerosil® 200, Flocel® 101 e goma arábica) que apresentaram teores de umidade de 4,27; 4,90 e 3,72%, respectivamente. A comparação dos dados obtidos demonstra que a composição dos PSA, com e sem adjuvante de secagem, e a concentração desses podem ser as causas das divergências dos resultados obtidos.

A análise de variância do planejamento fatorial utilizando a umidade residual dos PSA como variável dependente demonstrou que todos os fatores analisados foram significantes (Tabela 15), sendo a presença de Aerosil® (Fator B) o mais importante, uma vez que a presença desse adjuvante culmina com diminuição da umidade residual dos produtos secos, conforme pode ser visualizado no gráfico de Pareto (Figura 9). Além disso, verificam-se interações significativas entre os fatores AC e BC, onde a presença de goma arábica no produto seco contendo Flocel® 101 (PSA-6) diminuiu o teor de umidade, uma vez que a goma arábica possui menor poder sortivo que a celulose microcristalina, enquanto a presença de goma arábica no Aerosil® 200 aumenta o teor de água (PSA-5).

Tabela 15. Análise de variância dos fatores principais e interações para a umidade dos produtos secos

FATORES	GL	QM	Fcalculado	p
A (Avicel ®)	1	1,599535	8,46762*	0,009755
B (Aerosil ®)	1	7,036905	37,25196*	0,000012
C (Goma Arábica)	1	1,990666	10,53819*	0,004750
INTERAÇÃO				
AB	1	0,103317	0,54694	0,469661
AC	1	5,854872	30,99452*	0,000034
BC	1	1,483567	7,85371*	0,012242
Erro	17	0,188900		
Total	23			

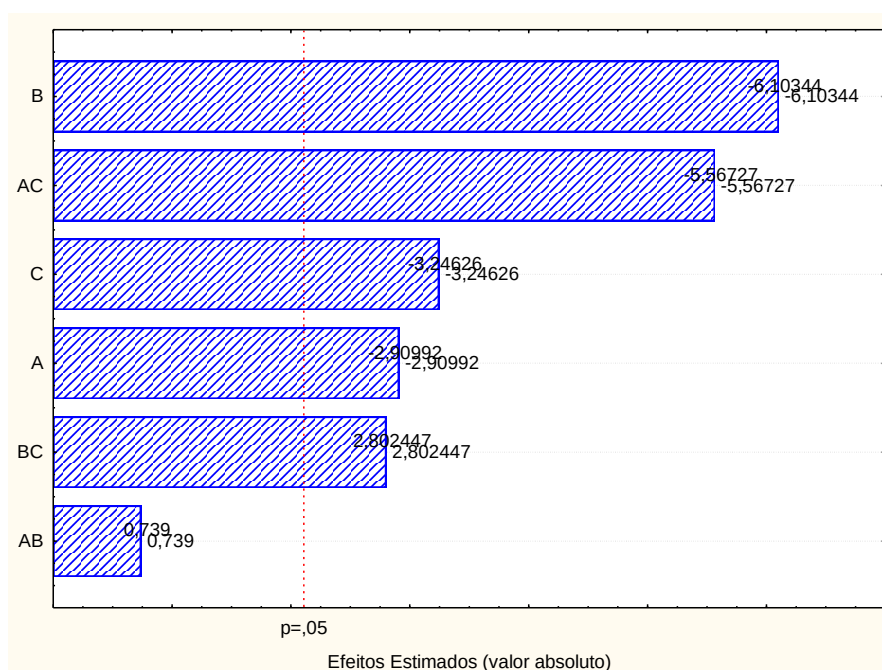


Figura 9. Gráfico de Pareto para a umidade residual dos produtos secos.

A análise de distribuição granulométrica foi determinada por difração a laser. Os diâmetros nas frequências de 10%, 50% e 90% encontram-se discriminados na tabela 16. Os pós do ESA e dos PSA obtidos podem ser caracterizados como finíssimos de acordo com a Farmacopeia (2010), com partículas de pequeno diâmetro e perfil de distribuição granulométrica gaussiana. Observa-se, também, que em todos os casos os produtos secos com adjuvantes (PSA) apresentaram tamanho de partícula maior que o extrato seco (ESA).

Tabela 16. Tamanho de partícula do ESA e dos PSA nas frequências de 10%, 50% e 90%

Tipos de PSA	Frequência granulométrica		
	10%	50%	90%
ESA	1,13	4,89	9,32
PSA-1	2,12	7,68	17,18
PSA-2	1,45	5,10	10,64
PSA-3	1,74	6,77	14,60
PSA-4	1,318	5,09	20,94
PSA 5	1,78	6,57	13,31
PSA 6	1,85	7,19	18,36
PSA 7	2,27	8,01	18,85

A análise por microscopia eletrônica de varredura demonstra que o ESA apresenta partículas com formas esféricas e ocas, sendo esta característica do processo de secagem utilizado, no entanto, estas partículas apresentaram-se colabadas (Figura 10). Por outro lado, é possível perceber nos demais PSA a presença dos adjuvantes.

Na literatura há registros de partículas ocas, porém com a superfície rugosa e sem o aspecto colabado, com exceção de quando se utiliza etanol como solvente de extração (FERREIRA, 2009).

Barakat (2011) obteve extrato e produtos secos por aspersão a partir da entrecasca do fruto de *L. ferrea*, os quais se apresentaram esféricos, ocos e, também, com aspecto colabado. Dessa forma, pode-se inferir que o aspecto colabado das partículas dos PSA obtidos é inerente às características intrínsecas da espécie *L. ferrea*.

No PSA-1 (Figura 10) observam-se longos filamentos inteiros, tortuosos e de forma irregular, devido à influência física do adjuvante de secagem, Flocel® 101, uma vez que o processo de nebulização não modificou a sua forma original. Nas demais formulações (PSA-4, PSA-6 e PSA-7) contendo o adjuvante Flocel® 101 são observadas essas mesmas características.

No PSA-2 (Figura 10) é possível observar as partículas esféricas íntegras e com superfície rugosa, característica do adjuvante de secagem Aerosil® 200, observa-se também que há depósitos desse adjuvante na superfície das partículas colabadas, ocas e rugosas do extrato de *L. ferrea*. Nas demais formulações (PSA-4, PSA-5 e PSA-7, Figura 11) contendo este adjuvante são observadas essas mesmas características, inclusive o depósitos desse adjuvante na superfície das partículas colabadas ao lado de partículas de Flocel® 101 e goma arábica (Figuras 10 e 11 respectivamente).

O PSA-3 (Figura 10), produzido com goma arábica, apresenta-se com partículas esféricas, ocas, quebradas e de superfície lisa. Nas demais formulações (PSA-5, PSA-6 e PSA-7, Figura 12), contendo o mesmo adjuvante são observadas essas mesmas características.

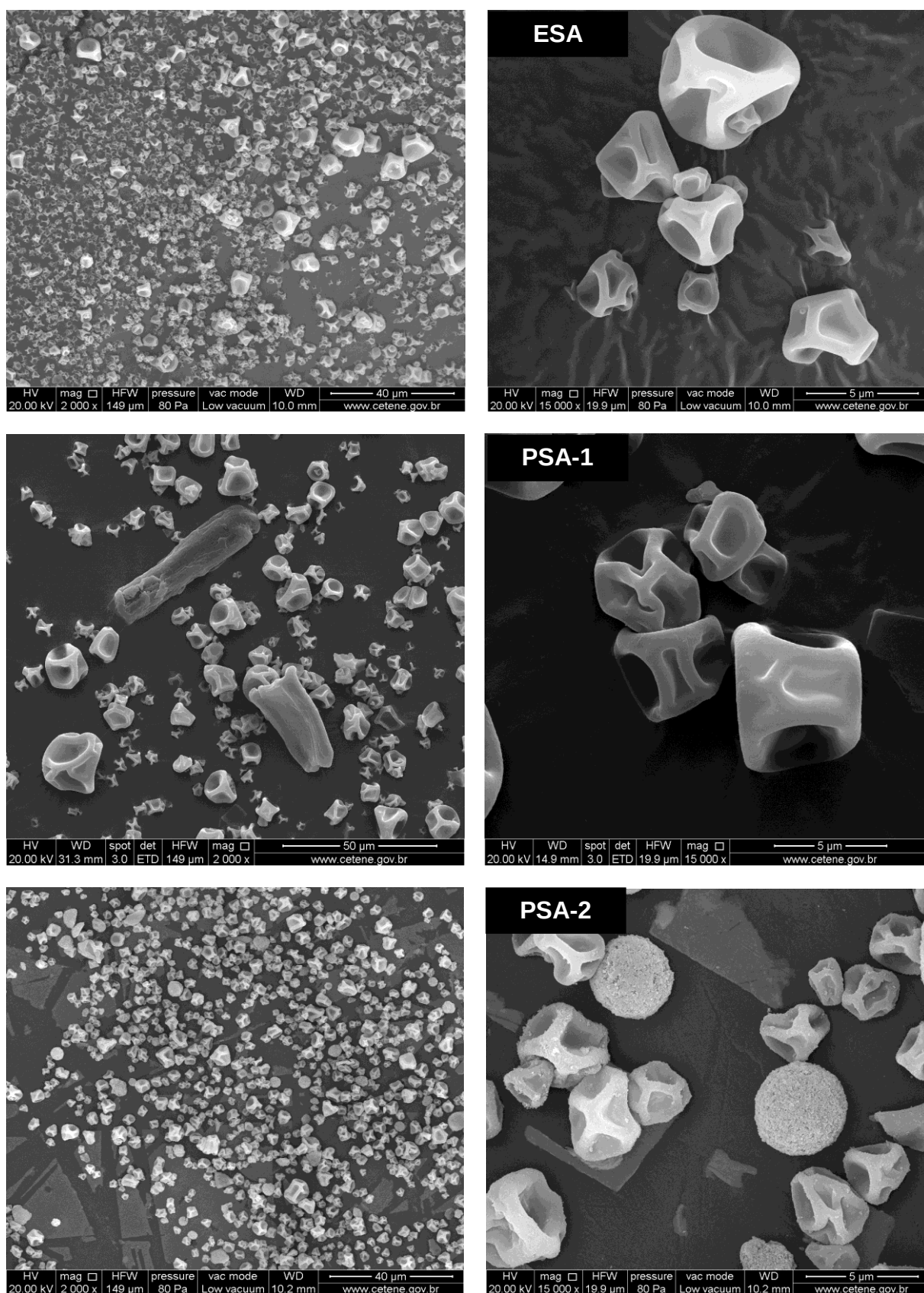


Figura 10. Fotomicrografia eletrônica de varredura de produtos secos por *spray-drying* de *L. ferrea* (aumento de 2000 e 15000x, respetivamente), preparados com diferentes adjuvantes de secagem: ESA (extrato seco), PSA-1 (celulose microcristalina) e PSA-2 (dióxido de silício coloidal).

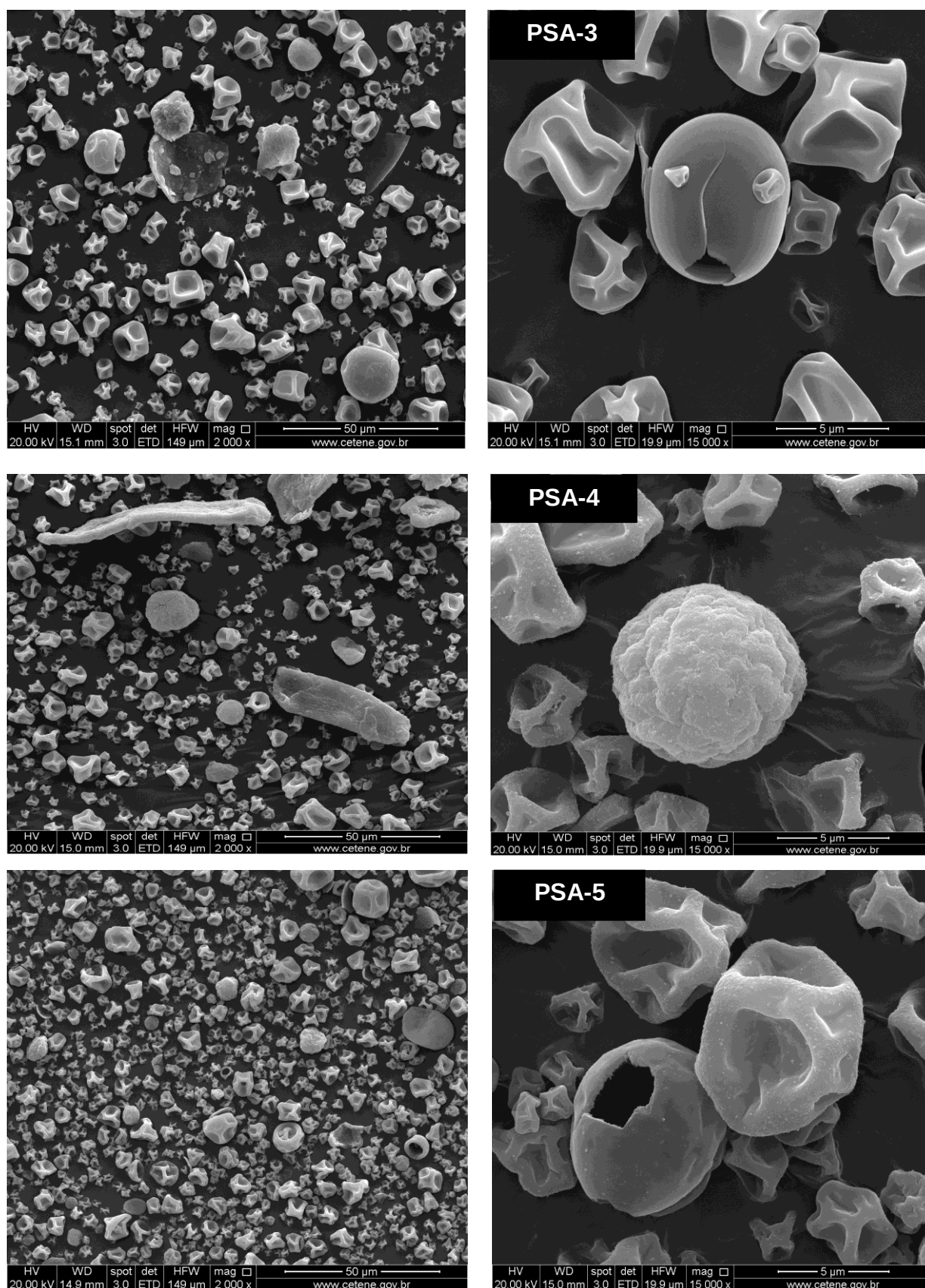


Figura 11. Fotomicrografia eletrônica de varredura de produtos secos por *spray-drying* de *L. ferrea* (aumento de 2000 e 15000x, respectivamente: PSA-3 (goma arábica), PSA-4 (celulose microcristalina + dióxido de silício coloidal) e PSA-5 (dióxido de silício coloidal + goma arábica).

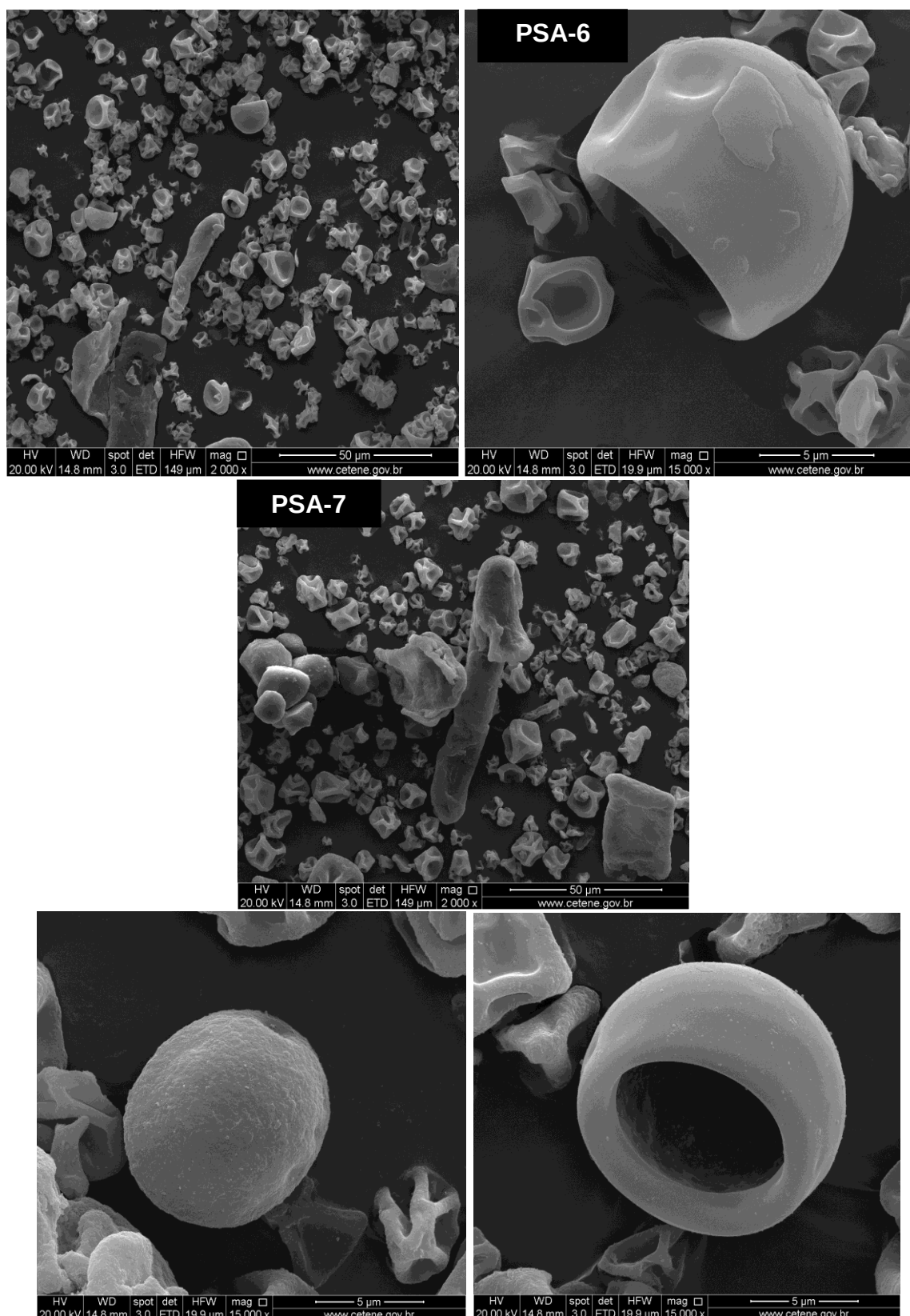


Figura 12. Fotomicrografia eletrônica de varredura de produtos secos por *spray-drying* de *L. ferrea* (aumento de 2000 e 15000x, respetivamente): PSA-6 (goma arábica + celulose microcristalina) e PSA-7 (dióxido de silício coloidal + goma arábica + celulose microcristalina).

A classificação no tocante a tamanho de poros é especificada como a largura média, ou seja, a distância média entre duas paredes opostas, e segue recomendações da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (SING et al., 1985), como sendo:

- Microporos – poros de largura interna menor que 2 nm (20 Å);
- Mesoporos – poros de largura interna entre 2 nm e 50 nm (20 Å e 500 Å);
- Macroporos – poros de largura interna maior que 50 nm (500 Å).

Nas amostras estudadas, observa-se que há uma larga distribuição do tamanho de poros com faixa de distribuição em 39 a 77,6 Å de diâmetro, apresentando porém todos pertencentes à mesma faixa de mesoporosos.

A determinação da área superficial e do tamanho de poros é de fundamental importância para a preformulação de uma forma farmacêutica por está relacionado à solubilidade, à velocidade de dissolução, bem como ao tamanho de partícula das substâncias (PORTE, LEÃO & PORTE, 2011). Os resultados das áreas superficiais encontrados para os PSA variaram de 50,04 a 71,28 m²/g, prevendo assim a elevada solubilidade desses produtos (Tabela 17).

Tabela 17. Caracterização dos poros

Amostra	Área superficial (BET - m²/g)	Diâmetro médio de poro (adsorção BET - Å)
PSA-0: sem adjuvante	59,1089	41,2753
PSA-1: com Flocel® 101	58,2806	40,0835
PSA-2: com Aerosil® 200	56,2600	77,5677
PSA-3: com goma rábica	58,7105	40,1765
PSA-4: com Aerosil® 200 + Flocel® 101	61,5389	58,9567
PSA 5: com Aerosil® 200 + goma arábica	63,7547	51,8292
PSA 6: Flocel® 101 + goma arábica	71,2824	39,2003
PSA 7: com Aerosil® 200 + Flocel® 101 + goma arábica	50,0391	54,3011

Infelizmente, não foi possível correlacionar os dados de porosidade com o tamanho de partícula e umidade dos pós, tal fato pode ser justificado pelos valores relativamente próximos encontrados. O formato da isoterma de adsorção e dessorção, também, é indicativo da porosidade dos insumos farmacêuticos. Várias formas de isoterma são conhecidas, sendo classificadas pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) como tipos I, II, III, IV e V, de acordo com o formato de suas curvas (SING et al., 1985).

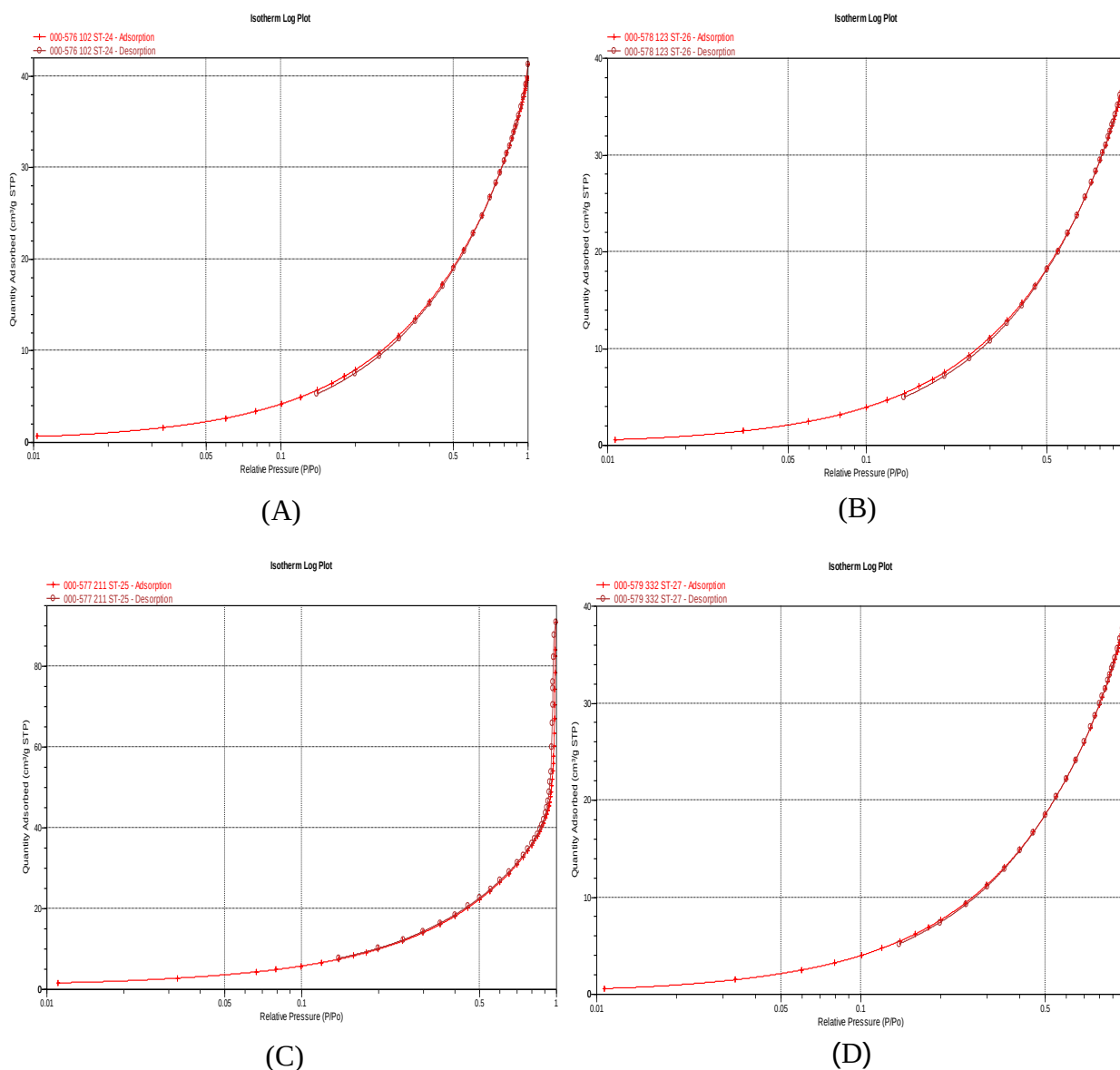


Figura 13A. Isothermas de adsorção-dessorção para o ESA (extrato seco), PSA-1 (celulose microcristalina), PSA-2 (dióxido de silício coloidal) e PSA-3 (goma arábica).

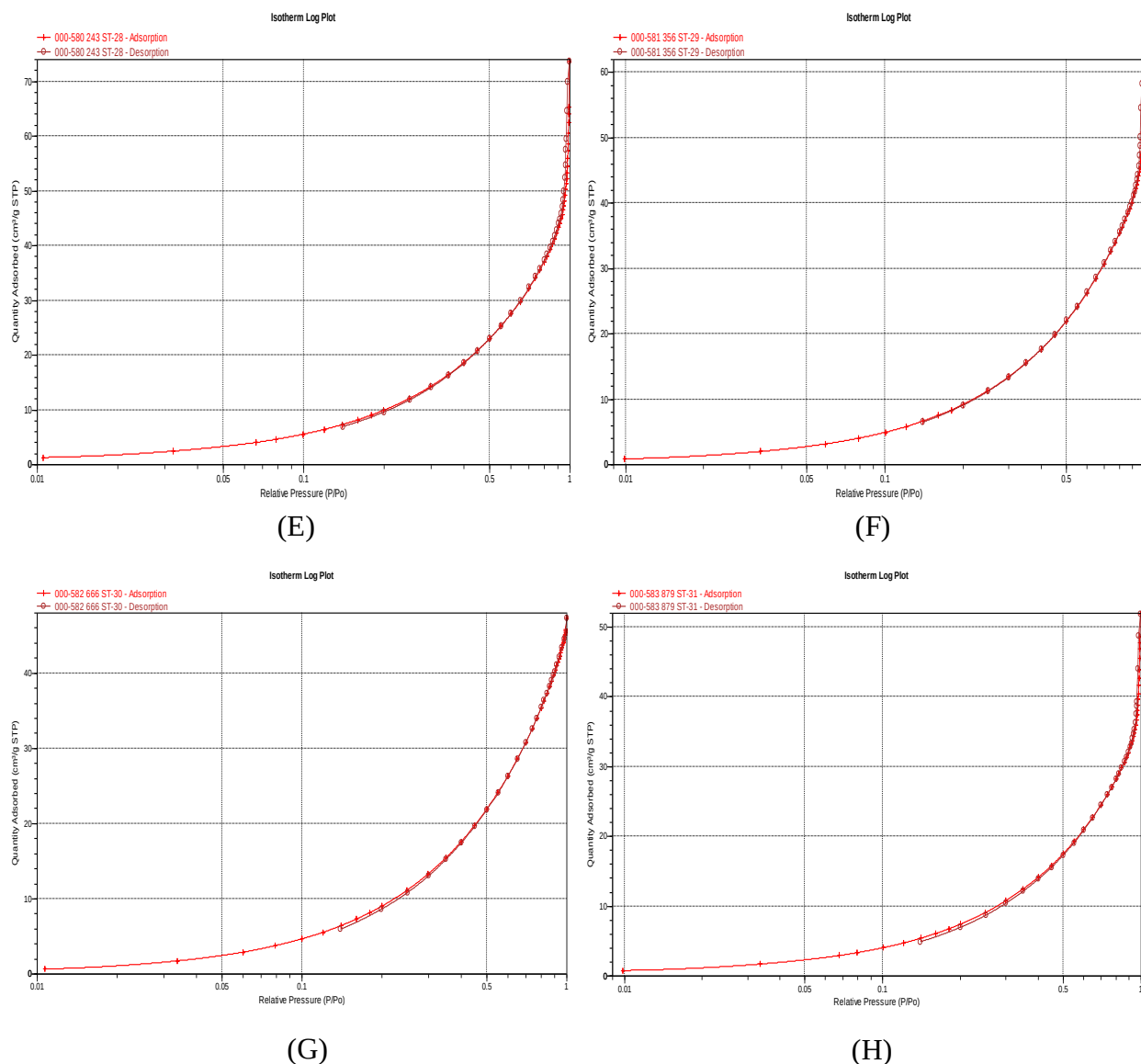


Figura 13B. Isotermas de adsorção-dessorção para PSA-4 (celulose microcristalina + dióxido de silício coloidal), PSA-5 (dióxido de silício coloidal + goma arábica), PSA-6 (goma arábica + celulose microcristalina) e PSA-7 (dióxido de silício coloidal + goma arábica + celulose microcristalina).

As isotermas de adsorção-dessorção dos PSA foram classificadas como sendo do tipo III (Figura 13A e 13B), consideradas típicas de produtos ricos em componentes solúveis em água e com altas concentrações de açúcares, ou seja, características típicas de extratos secos vegetais (CAMPOS et al., 2009).

A definição dos próximos passos do processamento tecnológico de materiais particulados está condicionada ao seu comportamento de fluidez, que é influenciado pelas características de composição e de estrutura desses materiais. Assim, as informações

fornecidas pela análise granulométrica, associadas aquelas que avaliam as propriedades de movimentação e densificação permitem esta avaliação.

A diferença entre densidade bruta (DB) e densidade de compactação (DC) pode dar uma indicação sobre o comportamento de empacotamento e o fluxo de um material sólido particulado. Quanto menor essa diferença, teoricamente, melhor será o fluxo e mais estável será o sistema de empacotamento (HERBELÉ, WEHRMANN & PETROVICK, 2000).

O Fator de Hausner (FH), Índice de Carr (IC) e Índice de densificação (ID) são parâmetros vinculados à capacidade de empacotamento do pó. O FH é um indicador indireto da estabilidade de empacotamento. Quanto mais próximo de 1, mais estável é o sistema de empacotamento (THOMAS e POURCELOT, 1991).

A determinação do IC mede, indiretamente, o fluxo e empacotamento dos pós. Quanto menor for o IC, melhor será o fluxo resultando em uma maior reprodutibilidade de enchimento de câmaras de compressão e receptáculos de cápsulas, por apresentar empacotamento mais definido. Valores de IC de até 15 % caracterizam um escoamento adequado indicando um empacotamento regular (THOMAS e POURCELOT, 1991).

O ID ou Índice de compactabilidade fornece informações sobre a dinâmica do empacotamento do pó, quando submetido à movimentação, indicando maior ou menor facilidade de rearranjo das partículas e ocupação de espaço. Além de inferir a respeito do comportamento compressional do produto. Valores superiores a 20 mL sugerem que o pó apresenta razoável propriedade de fluidez, porém com possíveis dificuldades de empacotamento (SOARES & PETROVICK, 1999).

Quando comparados entre si, de um modo geral, os produtos secos apresentam-se como materiais de características de compactabilidade muito pobres e de fluxo não espontâneo (Tabela 18). No entanto, o PSA-7 apresentou estes parâmetros tecnológicos consideravelmente melhores quando comparado aos demais. Tendo em vista que o valor do

IC para este PSA é o menor quando comparado aos demais PSA, embora sejam requeridos valores menores que 15 % para a obtenção de um escoamento mais adequado e, com isso, um fluxo mais apropriado. Esta observação, também, é corroborada pelo FH que para esta formulação apresenta-se mais próximo de 1, significando maior estabilidade de empacotamento das partículas.

Tabela 18. Características tecnológicas dos PSA das cascas do caule de *L. ferrea*

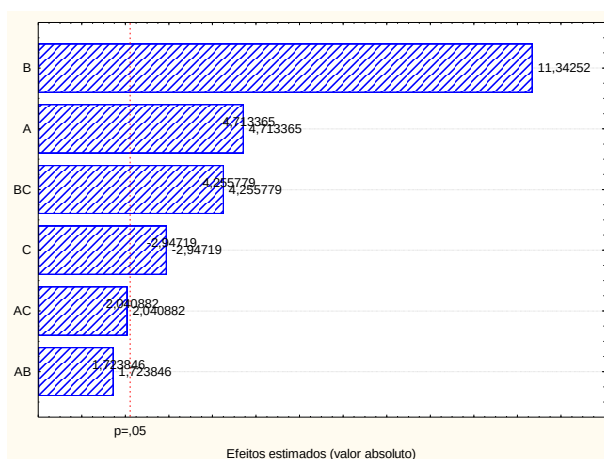
Amostra	db (g/ml) $\bar{X} \pm s$	dc (g/ml) $\bar{X} \pm s$	FH $\bar{X} \pm s$	IC (%) $\bar{X} \pm s$	C (mL) $\bar{X} \pm s$
ESA	0,22 ^c ± 0,01	0,29 ^c ± 0,01	1,33 ± 0,09	24,35 ± 5,05	22,66 ± 8,0
PSA-1	0,23 ^c ± 0,00	0,34 ^{ab} ± 0,00	1,45 ± 0,00	31,25 ± 0,00	84,0 ± 8,0
PSA-2	0,25 ^b ± 0,01	0,35 ^{ab} ± 0,01	1,38 ± 0,02	27,76 ± 1,19	53,3 ± 34,6
PSA-3	0,20 ^d ± 0,01	0,28 ^c ± 0,01	1,41 ± 0,00	29,04 ± 0,00	36,0 ± 8,0
PSA-4	0,26 ^b ± 0,01	0,35 ^a ± 0,01	1,38 ± 0,06	27,24 ± 2,95	40,0 ± 22,6
PSA 5	0,24 ^{bc} ± 0,00	0,34 ^b ± 0,00	1,43 ± 0,00	30,00 ± 0,00	84,0 ± 8,0
PSA 6	0,21 ^{cd} ± 0,00	0,29 ^c ± 0,01	1,43 ± 0,01	29,80 ± 0,01	49,3 ± 16,0
PSA 7	0,28 ^a ± 0,00	0,36 ^a ± 0,01	1,31 ± 0,04	23,46 ± 2,14	66,6 ± 0,00

Médias seguidas da mesma letra não se diferenciam estatisticamente pelo teste de Tukey $\alpha=0,05$

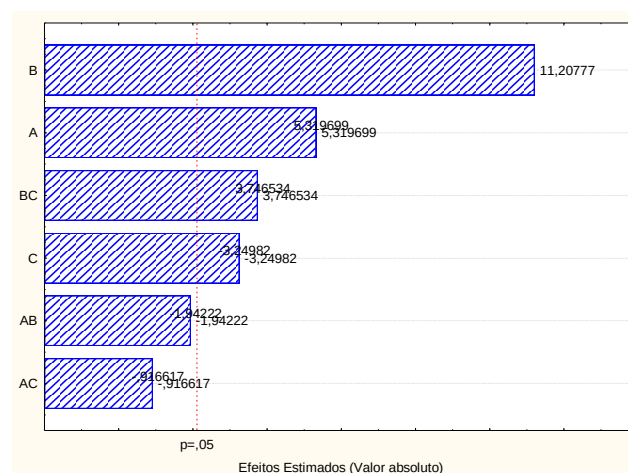
Considerando as densidades aparentes dos PSA, através da análise de variância (Tabela 19) do planejamento fatorial foi possível observar que todos os fatores analisados foram significativamente influentes sobre as densidades brutas e de compactação dos PSA, havendo, interação significativa apenas para os fatores BC, em ambos os casos (Figura 14).

Tabela 19. Análise da variância dos efeitos dos fatores principais e interações para densidades bruta e de compactação dos produtos secos

FATOR ANALISADO	gl	db			dc		
		QM	F _{calculado}	<i>p</i>	QM	F _{calculado}	<i>p</i>
PRINCIPAL							
A (Flocel® 101)	1	0,0017	22,218*	0,00020	0,0032	28,30*	0,00006
B (Aerosil® 200)	1	0,0098	128,66*	0,00000	0,0143	125,61*	0,00000
C (goma arábica)	1	0,0006	8,69*	0,00901	0,0012	10,563*	0,00471
INTERAÇÃO							
AB	1	0,00023	2,97	0,10287	0,00042	3,773	0,06887
AC	1	0,00032	4,16	0,05710	0,00009	0,843	0,37216
BC	1	0,00139	18,11*	0,00053	0,00159	14,033*	0,00161
Erro	17	0,00008			0,00011		
Total	23						



A



B

Figura 14. Gráfico de Pareto para as densidades brutas (A) e de compactação (B).

Os dados da ANOVA para a densidade bruta e de compactação dos produtos secos demonstram que o Aerosil® 200 é o fator mais influente e, neste caso, gerando um efeito positivo, ou seja, a presença deste adjuvante nos PSA ocasiona uma melhora nas características reológicas.

5.4 Ensaio preliminar em ambiente com atmosfera controlada

A avaliação dos PSA frente à umidade relativa (UR) de 65%, em atmosfera controlada, mostrou que o ganho de massa dos produtos secos ocorreu de forma intensa nas primeiras 24 horas de exposição (Figura 15). Este comportamento, possivelmente, pode estar relacionado com as características hidrofílicas e higroscópicas dos compostos extraídos pela água, como açúcares e compostos fenólicos, presentes nesta espécie e aliadas às altas áreas superficiais e porosidade (SIMÕES et al., 2010).

Conforme mostra a figura 21, os PSA-1, PSA-2, PSA-3, PSA-5 e PSA-7 demonstram um ganho de massa brusco com 48 horas de exposição à atmosfera de 65% UR, atingindo um platô após 6 dias de exposição, enquanto que o ESA, PSA-4 e PSA-6 atingiram um platô já com 24 horas de exposição, sugerindo haver um equilíbrio entre a pressão de vapor do material em análise e a pressão de vapor da água da atmosfera.

Quanto aos aspectos físicos dos pós-secos, observou-se comportamentos similares. Os resultados mostraram que o extrato seco e os produtos secos por aspersão obtidos apresentaram enegrecimento na coloração, formação de aglomerados sem alteração na forma física. Durante o período de análise não foi observada colonização fúngica.

Os resultados demonstram que a presença de adjuvantes de secagem não reduziu a higroscopia do ESA, sendo esta inclusive, em alguns casos aumentados, ou seja, o ESA demonstrou a mesma sorção de água quando comparada aos PSA-4 e PSA-5.

Esta análise é importante por representar a estabilidade física do produto obtido, possibilitando conhecer o seu comportamento e as condições ambientais ideais para a produção, armazenamento e transporte (VASCONCELOS et al., 2005; MENDEZ, et al., 2011).

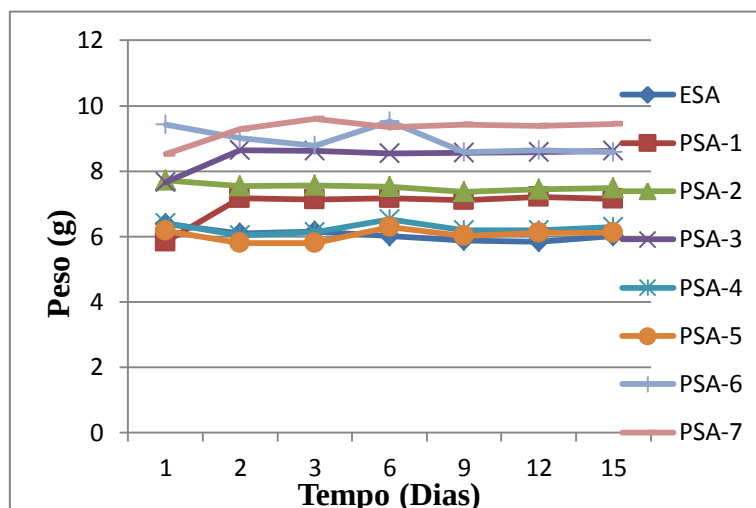


Figura 15. Representação gráfica de curvas de sorção de umidade para o extrato seco por aspersão e produtos secos por aspersão da espécie *L. ferrea* submetidos à atmosfera de 65 % de umidade relativa.

5.5 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para doseamento de constituintes polifenólicos da casca do caule de *L. ferrea* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O perfil cromatográfico da solução extrativa de *L. ferrea* e das substâncias de referência pode ser visualizado nas figuras 16 e 17. Pode ser comprovada a presença de ácido gálico, com tempo de retenção em 6,9 min; e de epicatequina, com tempo de retenção em 15,9 min, os quais foram selecionados como padrões para o desenvolvimento e validação do método analítico em CLAE.

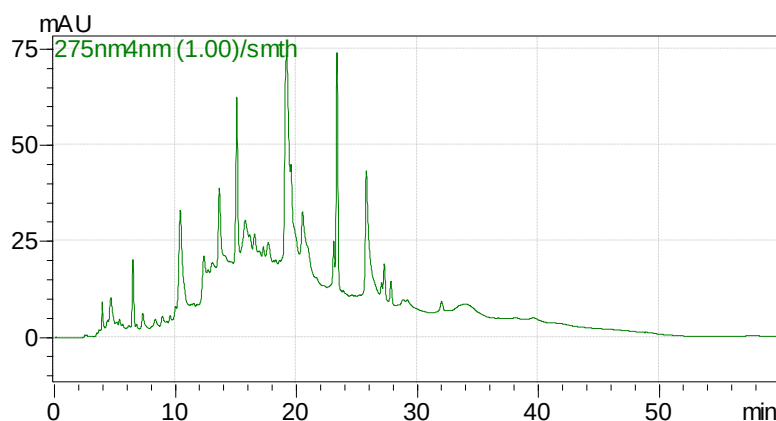


Figura 16. Perfil cromatográfico de solução aquosa das cascas do caule de *L. ferrea*.

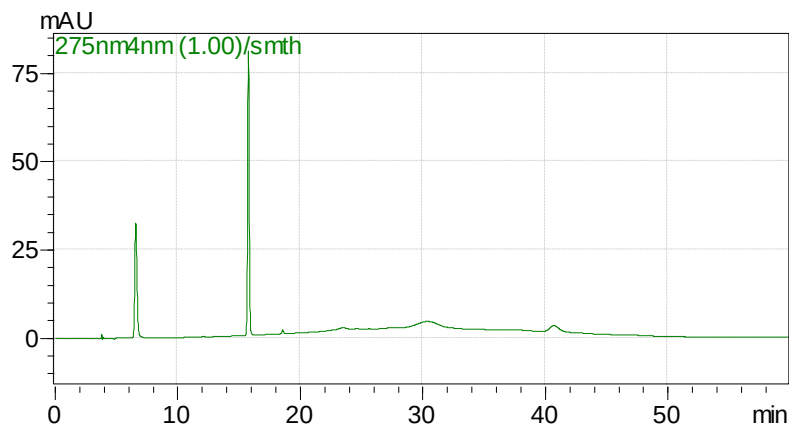


Figura 17. Perfil cromatográfico das substâncias de referência ácido gálico e epicatequina, respetivamente.

A identificação da presença de ácido gálico e epicatequina na solução extrativa da espécie *L. ferrea* foi observada pela sobreposição dos picos quando a solução extrativa foi contaminada com os respectivos padrões (Figura 18), além disso, também foram comparados os espectros de varredura, onde pode ser observada a semelhança dos espectros das substâncias de referência com os picos presentes na solução extrativa (Figura 19).

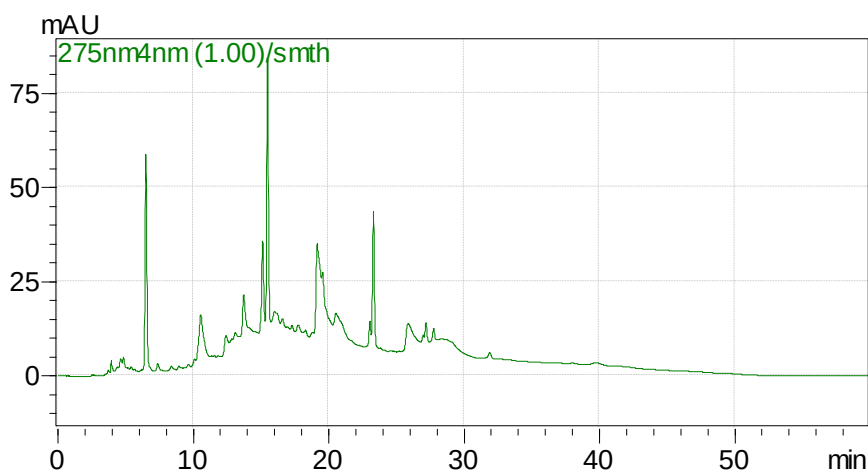


Figura 18. Perfil cromatográfico da sobreposição dos picos após contaminação da solução extrativa com padrões de referência ácido gálico e epicatequina.

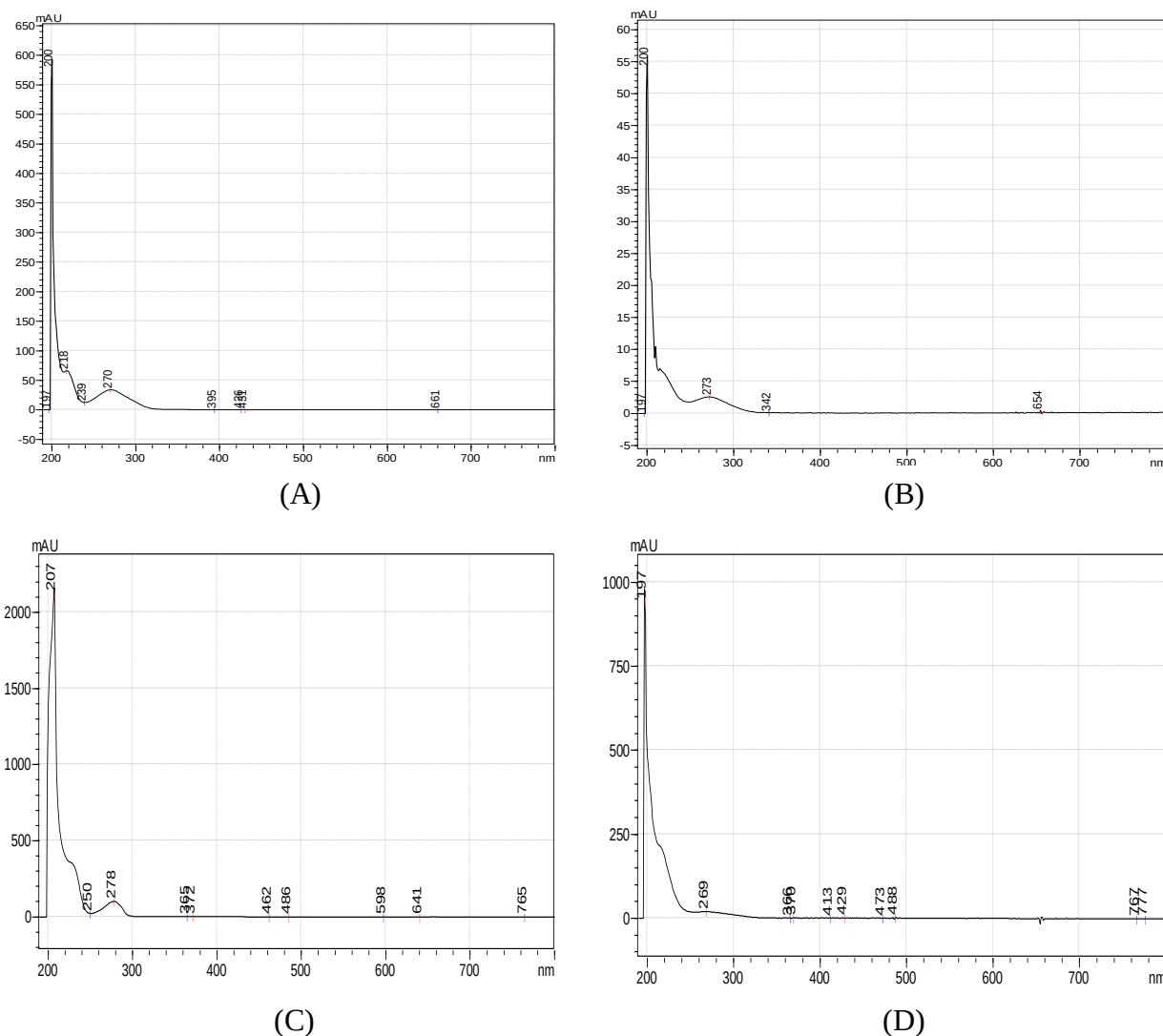


Figura 19. Espectros de varredura das substâncias de referências e picos da solução extrativa (A = ácido gálico – padrão; B = ácido gálico – solução extrativa; C = epicatequina – padrão, D = epicatequina - solução extrativa).

A figura 20 descreve as curvas analíticas das substâncias de referências ácido gálico e epicatequina, considerando, em conjunto, os três dias de análise. A avaliação da dispersão dos valores da inclinação das retas demonstrou um baixo coeficiente de variação percentual para todos os picos analisados. Todas as curvas analíticas analisadas apresentaram comportamento linear, indicando que a resposta é proporcional à concentração do analito, e com coeficiente de regressão (r^2) maior que 0,99 (Tabela 20).

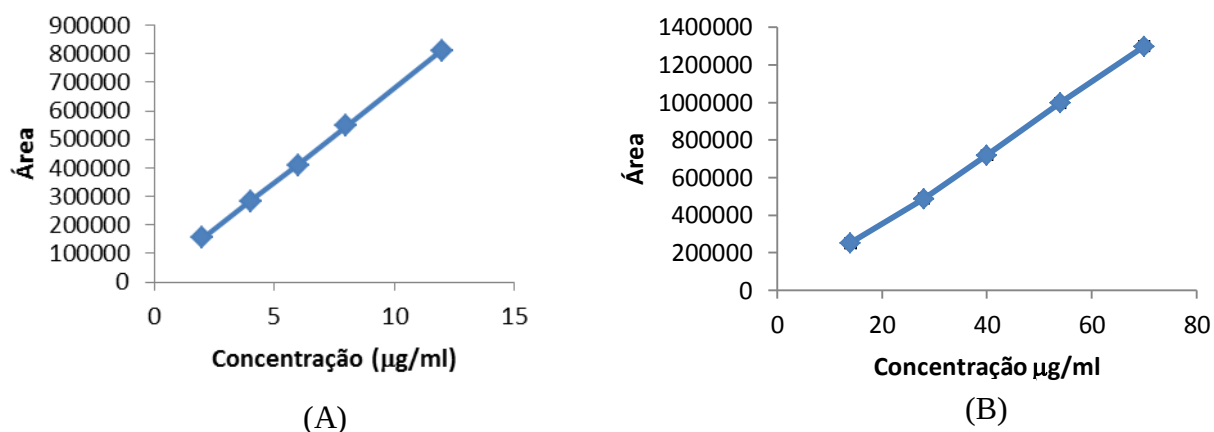


Figura 20. Curvas analíticas das substâncias de referências: ácido gálico (A) e epicatequina (B).

As curvas de regressão para os picos presentes na solução extrativa de *L. ferrea* revelaram um coeficiente de correlação (r^2) maior que 0,99, não apresentando desvio significativo de linearidade (Figura 21 e Tabela 20).

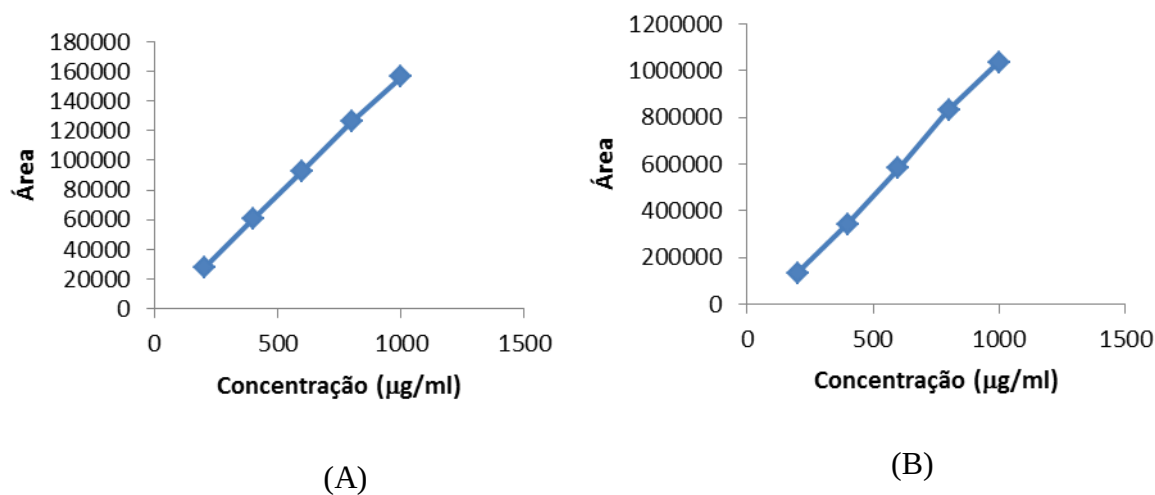


Figura 21. Curvas analíticas dos picos marcadores da solução extrativa da espécie *L. ferrea*: ácido gálico (A) e epicatequina (B).

Tabela 20. Parâmetros de linearidade para substâncias de referência e picos presentes na solução extrativa de *L. ferrea*

Analitos	r²	Equação da reta
Ácido gálico	0,9997	y = 65618,39x + 21.147,27
Epicatequina	0,9993	y = 18877,11x – 26.945,59
Pico 1	0,9998	y = 161,556x – 4.167,65
Pico 2	0,9987	y = 1146,80x -102.511,8

A análise dos resultados dos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária para as substâncias de referência e solução extrativa de *L. ferrea* (Tabela 21) mostrou coeficientes de variação, menores que 15% para ambos os ensaios, limite máximo aceitável para matrizes complexas (FDA, 2001).

Tabela 21. Repetibilidade e precisão intermediária das substâncias de referência e picos presentes na solução extrativa da espécie *L. ferrea* expressos em valores de áreas (m_{AU})

Analitos	Repetibilidade $\bar{X} \pm s$ (CV %)	Precisão intermediária $\bar{X} \pm s$ (CV %)
Ácido gálico (µg/mL)	393761,0 ± 22287,96 (5,66)	410647,5 ± 3945,56 (0,96)
Epicatequina (µg/mL)	696508,8 ± 38830,96 (5,57)	719022,0 ± 4153,00 (0,57)
Pico 1(µg/mL)	161,6± 0,36 (0,21)	92681,5 ± 395,50 (0,42)
Pico 2 (µg/mL)	1146,80 ± 4,70 (0,40)	582621,0 ± 46779,00 (8,02)

Na tabela 22 estão descritos os resultados de recuperação do ácido gálico e epicatequina na solução extrativa de *L. ferrea*. Na concentração analisada, os resultados demonstram uma recuperação de 96,82% para o ácido gálico evidenciando que o método desenvolvido apresenta boa exatidão para este marcador. No entanto, foi observada uma recuperação de apenas 73,55% para epicatequina, não sendo portando adequado para quantificação desse marcador químico.

Tabela 22. Resultado do ensaio de exatidão do ácido gálico e epicatequina

Marcador	Concentração teórica (µg/ml)	Concentração experimental média (µg/ml) $\bar{X} \pm s$	Recuperação (%) $\bar{X} \pm s$ (CV%)
Ácido gálico	7,89	$7,64 \pm 0,11$	$96,82 \pm 1,92$ (1,98)
Epicatequina	65,86	$48,45 \pm 0,41$	$73,55 \pm 0,25$ (0,33)

Os parâmetros limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) estão descritos na tabela 23. Sendo que o LD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com certo intervalo de confiança, correspondendo a um teste limite que especifica se a substância em exame está ou não presente na amostra. Enquanto que o LQ representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser quantificada com certo intervalo de confiança pré-estabelecido (BRASIL, 2003).

Tabela 23. Limites de detecção e de quantificação para as substâncias de referência

Marcador	Limite de quantificação	Limite de detecção
Ácido gálico (µg/mL)	0,195	0,06
Epicatequina (µg/mL)	0,104	0,03

Na tabela 24 está descrita a quantificação do marcador ácido gálico nos diferentes PSA obtidos, o qual variou de 0,86 a 1,35 mg/g de PSA. Observa-se que o extrato seco sem adjuvante (ESA) apresentou maior teor de ácido gálico, justamente pela ausência dos adjuvantes farmacêuticos que funcionam como material inerte.

Tabela 24. Resultado do teor do ácido gálico no ESA e nos PSA obtidos

Amostra	Concentração mg/g $\bar{X} \pm s$ (CV %)	Concentração corrigida mg/g $\bar{X} \pm s$ (CV %)
ESA	1,355 $\pm$ 0,050 (3,69)	-
PSA-1	1,253 $\pm$ 0,005 (0,39)	1,127
PSA-2	0,862 $\pm$ 0,010 (1,16)	0,6896
PSA-3	0,530 $\pm$ 0,040 (7,56)	1,325
PSA-4	1,193 $\pm$ 0,050 (4,19)	0,835
PSA-5	1,212 $\pm$ 0,030 (2,47)	0,909
PSA-6	1,100 $\pm$ 0,010 (0,90)	0,935
PSA-7	0,947 $\pm$ 0,02 (2,11)	0,615

5.6 Avaliação *in vitro* da inibição enzimática da α -glicosidase e da enzima conversora de angiotensina (ECA)

Sem exclusão ou inclusão de qualquer mecanismo de ação possível, foi avaliada a potencial atividade inibitória *in vitro* das enzimas α -glicosidase e conversora de angiotensina pelos produtos secos oriundos da solução extrativa aquosa de *L. ferrea*.

Em um primeiro momento, foi analisada a atividade de extratos secos oriundos de diferentes lotes de material vegetal (Tabela 25).

Tabela 25. Inibição das enzimas α -glicosidase e conversora de angiotensina (ECA) pelos extratos secos oriundos de diferentes lotes

Ensaio de Inibição	IC 50 (μg/mL) $\bar{X} \pm s$			
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
α -glicosidase	1,35 ^b $\pm$ 0,06	0,05 ^d $\pm$ 0,01	3,15 ^a $\pm$ 0,09	0,2 ^c $\pm$ 0,04
ECA	12,02 ^c $\pm$ 2,02	39,97 ^a $\pm$ 0,91	13,32 ^c $\pm$ 0,26	21,03 ^b $\pm$ 2,34

Médias seguidas de mesma letra na linha não se diferenciam estatisticamente segundo o teste de Tukey ($\alpha=0,05$)

De acordo com os dados experimentais (Tabela 25), no ensaio *in vitro* da inibição da α -glicosidase, observou-se que todos os ESA, independente da origem do material vegetal, inibiram significativamente a enzima α -glicosidase, destacando-se o lote 2 que apresentou o melhor resultado, por propiciar inibição enzimática com a menor concentração ($CI_{50} = 0,05 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$), quando comparado aos demais lotes e à arcabose (fármaco padrão), cuja CI_{50} foi de $51,58 \pm 5,60 \mu\text{g/mL}$.

Com relação à inibição da enzima conversora de angiotensina observa-se, de modo geral, reduzida atividade dos extratos secos quando comparada ao captopril (fármaco padrão) que apresentou inibição de $CI_{50} = 0,28 \pm 0,001 \mu\text{g/mL}$.

Independente dos valores de inibição enzimática, os dados demonstram que houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos diferentes lotes analisados, ratificando a influência das condições de plantio, local de coleta e os fatores edafoclimáticos, os quais modificam as propriedades desta espécie e, portanto, podem influenciar na qualidade, eficácia e segurança de um produto derivado desta planta medicinal, conforme demonstrado na caracterização da matéria-prima vegetal.

A tabela 26 destaca os resultados de inibição enzimática dos produtos secos obtidos com diferentes adjuvantes de secagem. Os dados demonstram que embora a presença dos adjuvantes nos produtos secos, exija maior concentração para inibição da enzima α -glicosidase, quando comparada ao extrato seco sem adjuvante, observa-se que não reduzem o elevado poder de inibição destes, uma vez que ainda apresentam CI_{50} , consideravelmente, menor que o fármaco padrão. Além disso, o valor de inibição enzimática dos PSA não foi estatisticamente diferente do ESA, uma vez que quando os dados foram analisados através da ANOVA do planejamento fatorial, foi verificado que não houve diferença estatística significativa entre os diferentes experimentos, demonstrando que sobre a inibição enzimática

não há influência dos fatores estudados, ou seja, a presença ou ausência dos diferentes adjuvantes.

É provável que a atividade hipoglicemiante atribuída a *L. ferrea* esteja relacionada com a presença taninos, uma vez que os principais compostos do extrato aquoso da casca do caule de *L. ferrea* pertencem a esta classe de substâncias.

A atividade hipoglicemiante demonstrada neste ensaio biológico *in vitro* corrobora com os resultados dos testes *in vivo* descritos por Vasconcelos et al. (2011), onde os autores evidenciam que o extrato seco por aspersão, oriundo de solução extrativa aquosa das cascas do caule de *L. ferrea* na dose 450 mg/kg diminuiu de forma significativa a glicemia dos animais estudados.

Tabela 26. Inibição *in vitro* da enzima α -glicosidase e da ECA pelos PSA oriundos de *L. ferrea*

Amostra	Inibição da α -glicosidase (IC ₅₀ = $x \pm s$ μ g/mL)	Inibição da ECA (IC ₅₀ = $x \pm s$ μ g/mL)
ESA	0,05 $\pm$ 0,01	39,97 $\pm$ 0,91
PSA-1	0,41 $\pm$ 0,04	38,74 $\pm$ 1,67
PSA-2	0,22 $\pm$ 0,01	39,65 $\pm$ 1,92
PSA-3	0,22 $\pm$ 0,02	26,06 $\pm$ 2,42
PSA-4	0,23 $\pm$ 0,01	31,11 $\pm$ 1,28
PSA-5	0,25 $\pm$ 0,01	34,53 $\pm$ 1,36
PSA-6	0,21 $\pm$ 0,01	30,80 $\pm$ 2,11
PSA-7	0,22 $\pm$ 0,06	20,64 $\pm$ 1,95

Com relação ao ensaio *in vitro* da inibição enzimática da ECA, os dados experimentais obtidos demonstram que todos os produtos testados não apresentaram atividade inibitória para esta enzima quando comparados ao captopril (fármaco padrão).

Capítulo 6

CONCLUSÕES

- As matérias-primas vegetais das cascas de *L. ferrea*, de acordo com os parâmetros analisados, apresentaram diferenças quantitativas estatisticamente significantes sugerindo que as condições edafoclimáticas alteram as características físico-químicas desta espécie. Considerando todos os resultados de caracterização da matéria-prima vegetal, ficou evidente que o lote 2 foi o que apresentou melhores características físico-químicas para um estudo de obtenção e desenvolvimento de um produto seco por aspersão.
- A solução extrativa oriunda das cascas do caule de *L. ferrea* apresentou baixo resíduo seco e elevado teor de taninos totais, além disso, foi possível evidenciar a presença de ácido gálico e epicatequina.
- O extrato seco por aspersão sem adição de adjuvantes apresentou rendimento operacional superior quando comparado ao rendimento dos produtos secos contendo adjuvantes de secagem. Nesse sentido, o estudo demonstrou que os adjuvantes adicionados à solução extrativa não contribuíram para um rendimento superior e não proporcionaram melhorias nas características tecnológicas quando comparado ao extrato seco sem adjuvante.
- A análise por microscopia eletrônica de varredura demonstrou que as partículas do extrato seco por aspersão apresentaram-se de forma esférica, íntegra, oca e de aspecto colabado e as partículas oriundas dos adjuvantes de secagem utilizados apresentaram aspecto conforme descrito na literatura.

- Todos os produtos secos obtidos foram caracterizados como mesoporosos com isothermas de adsorção–dessorção do tipo III.
- A metodologia analítica desenvolvida e validada em cromatógrafo líquido de alta eficiência mostrou-se eficiente para a quantificação apenas de ácido gálico, contemplando todos os critérios preconizados. O marcador químico epicatequina, apesar de estar presente nos produtos secos não pode ser quantificado.
- Os dados experimentais observados no ensaio *in vitro* da inibição da α -glucosidase demonstraram que todos os ESA bem como os PSA da espécie *L. ferrea* inibiram significativamente a enzima α -glicosidase. Em contrapartida, não houve inibição da enzima conversora de angiotensina.

REFERÊNCIAS

ALBERTINI, B. et al. Effect of Aerosil® 200 on the properties of lipid controlled release microparticles. **Journal of Controlled Release**, v.100, p. 233-246, 2004.

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

BAJDIK, J.; KORBELY, A.; PINTYE-HÓDI, K. Formulation of intelligent tablets with an antacid effect. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 14, n. 5, p. 471-475, 2009.

BARAKAT, Latife. **Avaliação da viabilidade de obtenção de formas farmacêuticas plásticas contendo extrato seco de *Caesalpinia ferrea* Mart.** 2011. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

BARRETTO, A. C. P. Bloqueadores diretos da renina: uma nova arma para combater velhos inimigos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, vol.79, p. 43-45, 2002.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.15, n.1, p.63-72, 2004.

BERGAMASCHI, Keityane Boone. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 2011. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de São Paulo, Piracicaba.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 02 jun. 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 30 de fevereiro de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004. **Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária**. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2011.

BUNDESVEREINIGUNG, Deutscher Apothekerverbände (Hrgsb.). Deutscher Arzneimittel-Codex. Frankfurt: Govi, Stuttgart: Deutscher Apotheker. v. 1. Codex- Probe 4, 1986.

CAMPOS, A. R. N. et al. Isotermas de adsorção e calor isostérico da palma forrageira enriquecida proteicamente. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, n. 6, p. 734-740, 2009.

CARR, R. Evaluation flow proprieties of solids. **Chemical Engineering**, v. 72, n. 2, p. 163-168, 1965.

CARVALHO, Elisabete Barros de. **Estudo da interacção entre proteínas e taninos: influência da presença de polissacarídeos**. 2007. 193f. Tese (Doutorado em Química), Universidade do Porto, Piracicaba.

CARVALHO, E. L. S. **Desenvolvimento de extrato seco nebulizado de *Maytenus ilicifolia Martius ex Reiss.* (espinheira-santa)**. 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CARVALHO, J. C. T. et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of ethnopharmacology**, v. 53, p. 175-178, 1996.

CASADEIBAG, J. L. et al. Physicochemical and pharmacological properties of spray-dried powder from *Fraximus excelsior* leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 26, p. 21-216, 1989.

CAVALCANTI, O. A. Polissacarídeos no desenvolvimento de filmes colo-específicos e de sistemas farmoquímicos e farmacêuticos. **Arquivo de Ciências da Saúde da UNIPAR**; v. 6, n. 1, p. 53-56, 2002.

CAVALHEIRO, M. G. et al. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, 2009.

CETTO, A. A.; JIMÉNEZ J. B.; VÁZQUEZ, R. C. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 27-32, 2008.

CHASE, M. et al. An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.

CHUNG, K. T.; CHENG I. W.; MICHAEL G. J. Are tannins a double-edged sword in biology and health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p.168-175, 1998.

COELHO, R. G. **Estudo químico de *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae), *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) e *Caesalpinia ferrea* (Caesalpinaceae)**. 2004. 198p. Tese (Instituto de Química de Araraquara), Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

COSTA, R. S. et al. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (*spray-drying*) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 90, p. 169-174, 2009.

COUTO, A. G.; GONZÁLEZ ORTEGA, G; PETROVICK, P.R. Granulação. **Caderno de Farmácia**, v. 16, n. 1, p. 13-20, 2000.

CREPALDI, I. C.; SANTANA, J. R. F.; LIMA, P. B. **Quebra de dormência de sementes de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart. Ex tul. – leguminosae, Caesalpinioideae)**. Sitientibus, Feira de Santana, n. 18, p. 19-29, 1998.

DA SILVA, L. C. N. et al. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2222–2228, 2011.

DE SOUZA, Clayton Fernandes. **Galactomanana de sementes de *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*: estrutura, modificação química e caracterização de propriedades**. 2009. 113f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

DEGÁSPARI, C. H. et al. Obtenção de extrato de carqueja (*Baccharis articulata* (Lam.) Pers.) por diferentes processos de concentração. **Ciência e Cultura**, Curitiba, n. 29, p. 119-130, 2002.

EL-SAKKA, M.; AHMAD, J. **Manual of Phytochemistry**. 2010. Disponível em: http://www.alazhar.edu.ps/staff/21/Manual_of_Phytochemistry_1.pdf. Acesso em: 10 fevereiro 2011.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5ª ed., Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p. 263-288.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 ed. 2010. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm >. Acesso em: 5 janeiro 2012.

FERREIRA, Marcel da Silva. **Otimização de solução extrativa e desenvolvimento tecnológico de produto seco por aspersão de *Psidium guajava* L.** 2009. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

FRASSON, A. P. Z.; BITTENCOURT, C. F.; HEINZMANN, B. M. Caracterização físico-química do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 35-39, 2003.

FRIEDLAND, J.; SILVERSTEIN, E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 66, p. 416-24, 1976.

GABAS, V. G. S.; CAVALCANTI, O. A. Influência da adição da goma arábica em filmes isolados de polímero acrílico. Estudo das propriedades de intumescimento e de permeabilidade. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 4, p. 441-448, 2003.

GAUDY, D.; PUECH, A., JACOB, M. Rôle de l'adjuvant dans l'optimisation de la production d'un extrait de Noix vomique. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 66, n.1, p. 5-10, 1991.

GALDINO, G.; MESQUITA, M. R.; KOSSMANN, I. D. F. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 747-749, 2007.

GONZALEZ, F.G.; BARROS, S.B.M.; BACCHI, E.M. Atividade Antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. In: SEMANA DA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 9., 2004, São Paulo. Anais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.40. p.79, 2004.

GUYOT, J. C. et al. Commentaires relatifs aux methods générales d'analyse des formes orales solides récemment introduites dans les pharmacopées française et européenne. Rapport d'une commission SFSTP. S. T. P. **Pharma Pratiques**, v. 5, n. 6, p. 482-494, 1995.

HARTKE, K.; MUTSCHLER, E. **Deutsches Arzneibuch-9 Kommentar**. Ausgabe 1986. Stuttgart: Wissenschaftliche, p. 305-307, 1987.

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

HAUSNER, H. H. Friction conditions in a mass of metal powder. **International Journal of Powder Metallurgy**, v. 3, p. 7-13, 1967.

HEBERLÉ, G.; WEHRMANN, L.; PETROVICK, P. R. Caracterização do Produto Seco por Aspersão de *Cecropia glazioui* Sneth. (Cecropiaceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 19, p. 203-10, 2000.

ICH: Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q6A. In: international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 1999. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6A_Guideline.pdf. Acesso em: 01 de abril de 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 2 ed., v. 1. São Paulo, 1976.

JONAT, S. et al. Investigation of the glidant properties of compacted colloidal silicon dioxide by angle of repose and X-ray photoelectron spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 356–359, 2006.

KHANBABAEE, K.; REE T. V. Tannins: Classification and Definition. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 641-649, 2001.

LANDIM, Eli Maria Camurça. **Obtenção, caracterização e avaliação da estabilidade de pigmentos naturais microencapsulados**. 2008. 90f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

LIMA, H. C. et al., 2010. Fabaceae. In: Forzza, R.C. et al., (Org.): **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 2, p. 989-1102.

LIMA NETO, S. A.; PETROVICK, P. R. A celulose na farmácia. **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 1, p. 19-23, 1997.

LUCINDA, L. M. F. et al. Assessment of sperm production and reproductive organs of Wistar rats to long-term exposure of *Caesalpinia ferrea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 4, p. 907-914, 2010.

MARINHO, J. V. F. et al. **Technological characteristics of fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) as Medicinal Raw Material**. Resumos in: XX SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS, 2008, São Paulo.

MARQUES, L. C. **Produção e comercialização de fitoterápicos no Paraná: uma abordagem de vigilância sanitária**. 1992. 232f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba.

MARTINS, A. G. 1998. **Influência de fatores tecnológicos na avaliação analítica e farmacológica de extratos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss**. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MAURYA, D. K.; NANDAKUMAR, N.; DEVASAGAYAM, T. P. A Anticancer property of gallic acid in A549, a human lung adenocarcinoma cell line, and possible mechanisms. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, n. 1, p. 85-90, 2011.

MELO, E. B.; CARVALHO, I. alfa e beta-glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v.29, n.4, p. 27-32, 2006.

MENDEZ, A. S. L. et al. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 32, p. 105-111, 2011.

MENEZES, I. A. C. et al. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, v. 47, p. 41-47, 2007.

NAKAMURA, E. S. et al. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v.177, p. 119–124, 2002a.

NAKAMURA, E. S. et al. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis . **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 135-137, 2002b.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.

NOGUEIRA, J. C. B. 1977. **Reflorestamento heterogêneo com essências indígenas**. Boletim Técnico do Instituto Florestal. São Paulo, v. 24, 71p.

NOZAKI, H. et al. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 8290-8292, 2007.

OLIVEIRA, A. F. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v.12, n.3, p.302-310, 2010.

OLIVEIRA, A. L. et al. *Achyrocline satureioides* (Lam.) Dc. (marcela), asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração. **Caderno de Farmácia**, v. 17, n. 1, p. 33-38, 2001.

OLIVEIRA, Mirela Araújo de. **Avaliação da influência de adjuvantes de secagem sobre as propriedades de suco de caju atomizado**. 2008b. 63f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

OLIVEIRA, Andréia Freitas de Oliveira. **Avaliação da atividade cicatrizante da *caesalpinia ferrea* (Tul.) Martius (jucá) em lesões cutâneas de caprinos**. 2008a. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró.

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

PACHÚ, Clésia Oliveira. **Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos**. 2007. 117 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos), Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba.

PAIVA, S. R. et al. Taninos condensados de espécies de *Plumbaginaceae*. **Revista Floresta e Ambiente**. v. 9, n.1, p.153 - 157, 2002.

PAPOUTSI, Z. et al. Evaluation of Estrogenic/Antiestrogenic Activity of Ellagic Acid via the Estrogen Receptor Subtypes ER α and ER β . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.7715-7720, 2005.

PEREIRA, M. S. V. et al. Atividade antimicrobiana de extratos de plantas no Semi-Árido Paraibano. **Agropecuária Científica no Semi-árido**, Patos, v.2, n.1, p. 37-43, 2006.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, p. 01-26, 2004.

PETERS, V. M. et al. Evaluation of reproductive toxicity of aqueous extract of the fruits from *Caesalpinia ferrea* Mart. in rats. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 7, n. 5, p. 268-272, 2008.

PETROVICK, P.R.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G.; BASSANI, V.L. From a Medicinal Plant to a Pharmaceutical Dosage Form. A (Still) Long Way for the Brazilian Medicinal Plants. **Ciência e Cultura**, v. 49, n.5/6, p. 364-369, 1997.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. p. 687.

PORTE, L. H. M.; LEAO, M. H. M. R.; PORTE, A. Avaliação da porosidade de microcápsulas contendo proteína bioativa por porosimetria de mercúrio e adsorção de nitrogênio. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 9, p. 1582-1587, 2011.

PRANCE, G.T; SILVA, M.F. 1975. **Árvores de Manaus**. INPA, Manaus, 312p.

PRISTA, L. N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. vol 1. 4 ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1992.

RAHIM, A. A.; KASSIM J. Recent Development of Vegetal Tannins in Corrosion Protection of Iron and Steel. **Recent Patents on Materials Science**, v. 1, p. 223-231, 2008.

RAMOS, Mônica Freiman de Souza. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo da estabilidade e avaliação farmacológica**. 2006. 136f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Ceará.

REBOREDO, M. M. et al. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozóides de ratos *Wistar* submetidos a tratamento subagudo. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 25, p. 17-29, 2006.

REED, J. D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **Journal of Animal Science**. V. 73, p. 1516-1528, 1995.

RIBEIRO, A. B. Papel do sistema renina-angiotensina nas adaptações promovidas pelo exercício físico: contribuição da renina. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 10, n. 2, p. 44-45, 2007.

RODRIGUES, I.C. et al. **Evaluation of alfa-glucosidase inhibitory Activity of Extractive solution from *Caesalpinia ferrea* Martius**. Resumos In: 7 International Congress of Pharmaceutical Science - CIFARP, Ribeirão Preto, 2009.

SAIGAL N. et al. Microcrystalline cellulose as a versatile excipient in drug research. **Journal Young Pharmacists**, v. 1, p. 6-12, 2009.

SAMPAIO, F. C. et al. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of ethnopharmacology**, v. 124, issue 2, p. 289-294, 2009.

SANTOS, S. C. S.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 10^a ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. p. 615-656.

SENNA, E. L. et al. Preparation and characterization of spray dried powders from *Achyrocline satureoides* (Lam) DC extracts. **Phytotherapy Research**, v. 11 (2), p. 123-127, 1997.

SILVA JÚNIOR, J. O. C.; PEREIRA, N. L. Avaliação da permeação in vitro de gel fitoterápico contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytum officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 90, n. 1, p. 03-09, 2009.

SILVA, Ana Carina Cavalcanti. **Avaliação das atividades citotóxica, antitumoral, anti-inflamatória e analgésica do extrato bruto e de uma fração parcialmente purificada da vagem de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. Var. *ferrea***. 2008. 87f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA, Francilene Amaral da. **Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate)**. 2007. 243f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SING, K. S. W. et al. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. **Pure and Applied Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985.

SOARES, L. A. L. et al. Avaliação de complexos formados por catequina e macromoléculas. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, p. 10-16, 2006.

SOARES, L. A. L. et al. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) empregando planejamento fatorial. **Caderno de Farmácia**, v. 14, n. 1/2, p. 21 - 26, 1998.

SOARES, L. A. L.; PETROVICK, P. R. Física da Compressão. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 15, n. 2, p. 65-79, 1999.

SOUZA, C. R. F. et al. The role of colloidal silicon dioxide in the enhancement of the drying of herbal preparations in suspended state. **Chemical Engineering Communications**, v. 196, n. 3, p. 391-405, Mar. 2009.

SOUZA, L. A. G. et al. **Leguminosas da Amazônia**. Jucá - *Caesalpinia ferrea* C. Mart. Manaus: Editora do INPA, 2007. (Folder)

SOUZA; A. B. et al. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 380-383, 2006.

SPANIOL, Bárbara. **Comparação do comportamento compressional de granulado contendo produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. entre máquinas de comprimir alternativa e rotativa**. 2007. 137f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

TEIXEIRA, H. F.; BASSANI, V. L. **Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características químicas, físicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. – Compositae – Marcela**. Caderno de Farmácia, v. 13, n. 2, p. 151-152, 1997.

TOLLER, A. B.; SCHMIDT, C. A. Excipientes à base de celulose e lactose para compressão direta. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 6, n. 1, p. 61-79, 2005.

THOMAS, C.; POURCELOT, Y. Preformulation of five commercial celluloses in drug development: reological and mechanical behavior. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 19, n. 15, p. 1947-1964, 1991.

UEDA, H. et al. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, v. 8 (5), p. 377-381, 2001.

VASCONCELOS, C. F. B. et al. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1533– 1541, 2011.

VASCONCELOS, E. A. F. et al. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil® 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 3, p. 243-249, Jul./Set. 2005.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie**. Q. Uberarb Auf., 2000.

KAMEL, S. et al. Pharmaceutical significance of cellulose: A review. **Polymer Letters** v. 2, n. 11, p. 758-778, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials**. Geneve, 1992.