

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

SAYURI ARAÚJO MIKI

Desenvolvimento de formulações semissólidas contendo extrato seco  
padronizado de *Libidibia ferrea*

MANAUS

2021

SAYURI ARAÚJO MIKI

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS  
CONTENDO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *Libidibia ferrea*

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas na área de concentração de Desenvolvimento, avaliação da qualidade e da utilização de insumos e produtos farmacêuticos e cosméticos.

ORIENTADORA: PROF. DRA. TATIANE PEREIRA DE SOUZA

MANAUS

2021

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M636d Miki, Sayuri Araújo  
Desenvolvimento de formulações semissólidas contendo extrato seco padronizado de Libidibia ferrea / Sayuri Araújo Miki, Tatiane de Souza. 2021  
134 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Tatiane Pereira de Souza  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Extrato seco vegetal. 2. Jucá. 3. Pomada. 4. Formulação. I. de Souza, Tatiane. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

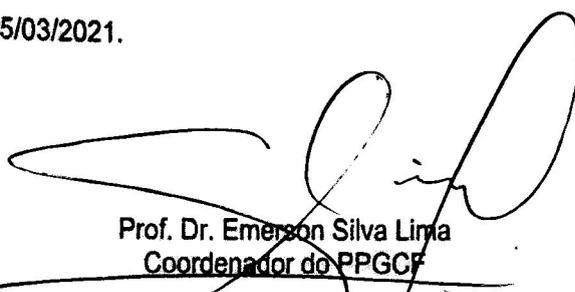
**"Desenvolvimento de formulações semissólidas contendo extrato seco padronizado de *Libidibia ferrea*."**

**DISCENTE: SAYURI ARAÚJO MIKI**

**PARECER:**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 25/03/2021.

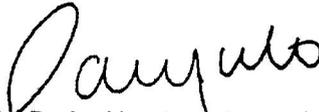


Prof. Dr. Emerson Silva Lima  
Coordenador do PPGCF

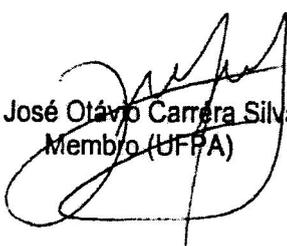
A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



Profa. Dra. Tatiane Pereira de Souza  
Orientadora e Presidente da Banca (UFAM)



Prof. Dr. Pedro Henrique Campelo Felix  
Membro (UFAM)



Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Júnior  
Membro (UFPA)

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado força e sabedoria nos momentos difíceis a superar todas as dificuldades, pela saúde e permitir finalizar este trabalho em tempos de pandemia.

À minha família, meus pais Satoshi e Eliana, meus irmãos Tiaki e Takashi por todo apoio e incentivo, por terem sido essenciais na minha formação pessoal e profissional. Ao meu namorado Rodrigo pelo apoio, carinho e incentivo.

Aos meus amigos de estrada Arine Heloíse, Cibele Viana, Kamilla Sousa, Janaína Barroncas, Samir Carvalho, Guilherme Bindá e Rodrigo Silva.

À minha orientadora Profa Dr<sup>a</sup> Tatiane Pereira de Souza, muito obrigada pela oportunidade, orientação e ensinamentos.

À CAPES pelo financiamento da bolsa.

À Universidade Federal do Amazonas e à Coordenação e Secretaria do PPGCF pela oportunidade.

Aos professores e funcionários da UFAM, aos colegas do programa de pós-graduação e aos laboratórios parceiros. Especialmente ao LIDETEF - Prof<sup>a</sup> Tatiane P. de Souza, Prof. Jesus, técnico Newton, Kamilla, Fernanda, Patrícia, Newton, Diego, Fabrício, Jandira, Serafim, Rana e Laíse; À Prof<sup>a</sup> Ellen Paes, Prof. Antônio Batista e técnica Doroth Couto (Laboratório de Cosmetologia e Farmacotécnica – FCF/UFAM); À Prof<sup>a</sup> Ariane, Cibele, Janaína e Samir (Laboratório Necta - FCF/UFAM); Ao Prof. Emerson, Prof<sup>a</sup> Marne Vasconcellos, Bárbara Janaína e Leonard (Laboratório BIOPHAR-FCF/UFAM); À Prof<sup>a</sup> Kátia Solange e técnico Roberto (Laboratório de CQ-QF - FCF/UFAM); À Prof<sup>a</sup> Karen e técnica Adriana (Laboratório de Bacteriologia - FCF/UFAM); Ao Prof. João Vicente, Prof<sup>a</sup> Ana Cortez, Vanessa, Kelvin, Walter e Valéria (Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA); Ao Prof. José Otávio, Fernanda Brito, Kamila Leal (Laboratório P&D Farmacêutico e Cosmético - UFPA). Agradeço a todos aqueles que contribuíram de algum modo diretamente ou indiretamente ao meu trabalho.

“Substâncias nas mãos dos farmacêuticos transformam-se em medicamentos, em cura, em saúde, assim como a pedra nas mãos dos ourives se transforma em joia, em brilho e em luz”

Autor Desconhecido

## RESUMO

As plantas medicinais são usadas na prevenção e no combate às várias doenças, e nos últimos anos, seu uso tem sido intensificado na medicina tradicional, sendo um deles no tratamento de cicatrização de feridas. O Brasil, frente à sua rica biodiversidade e detentor de um terço da flora mundial, possui um enorme potencial na geração de produtos e processos na área de medicamentos de origem natural. Uma promissora candidata para o desenvolvimento de produto fitoterápico é a espécie *Libidibia ferrea*, conhecida popularmente como jucá, empregada popularmente para diversas finalidades, dentre elas como agente cicatrizante, anti-inflamatória, antimicrobiana e analgésica. Visto que medicamentos elaborados à base de extratos secos vegetais são de grande relevância, possuindo diversas vantagens como exatidão de dosagem, facilidade de manuseio, armazenagem e estabilidade, inclusive facilitando a incorporação em formulações farmacêuticas, podem ser utilizados para obtenção de produtos para terapia tópica. O objetivo desse estudo foi desenvolver uma formulação fitoterápica semissólida estável empregando como agente ativo o extrato seco vegetal padronizado de jucá. A matéria-prima vegetal (MPV) de *L. ferrea* foi caracterizada e apresentou valores dentro do preconizado, com perda por dessecação de 10,64%, o teor de cinzas totais de 2,39%, teor de extrativos de 51,09%, diâmetro médio das partículas de 655 µm e classificada como pó moderadamente grosso. Quanto à caracterização química, mostrou teor de polifenóis totais de 5,67%, teor de taninos totais acima do mínimo de 9,0% estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (2019) com valor de 11,70% e quantificação de ácido gálico de 6,40%, preconizado o conteúdo de no mínimo 1%. A Solução Extrativa (SE) de jucá a 7,5% apresentou-se com densidade relativa de 1,01, resíduo seco de 2,83%, levemente ácida (pH=3,72) indicando um produto estável para constituintes fenólicos, com teor de 17,03% de polifenóis totais (151,16 ± 3,19 µg Eq Ác gálico/mL), obtendo-se pela análise em CLAE o valor de 1,3776 mg/g de teor de ácido gálico e 11,9394 mg/g para ácido elágico, além de bandas vibracionais características de compostos fenólicos pela análise de FTIR. O rendimento operacional da secagem do extrato seco por aspersão (ESA) foi satisfatório de 76,26%, umidade residual de 6,80% e baixa atividade de água (0,19) podendo se manter estável com baixos riscos de desenvolvimento de microrganismos. Foi classificado macroscopicamente como um pó fino com aglomerações de cor marrom claro e odor característico da espécie e em MEV mostrou partículas com formato esférico, oca e de superfície rugosa. Foi observado que a secagem em *Spray Dryer* influenciou no aumento da concentração de polifenóis totais, com teor de 40,6% (382,61 µg eq. Ác. gálico/mL), fato também observado em FTIR. O perfil cromatográfico mostrou presença de 4,0392 mg/g de ácido gálico e 9,1529 mg/g de ácido elágico. O ESA manteu a viabilidade celular de fibroblastos até um período de 72h, um bom varredor de radicais livres nos testes *in vitro* pelo método DPPH• com IC<sub>50</sub> de 8,84 µg/mL e ABTS•+ de 5,23 µg/mL. O ESA mostrou potencial atividade antimicrobiana frente à *S. aureus* CBAM 0324 com halo de inibição de 20 mm na concentração de 75 mg/mL, semelhante ao padrão vancomicina. Não houve diferenças significativas (p>0,05) entre as concentrações de 2,5%, 5% e 7,5% de ESA frente à *S. aureus* ATC 29213 e ATCC 43300 e para ambas, foi obtido uma CIM = 400 µg/mL. Testes preliminares mostraram que as formulações B30 e B40 foram compatíveis com o ESA de jucá, até uma concentração de 5%. A formulação otimizada B40 contendo adição de lanolina se mostrou estável e dentro das expectativas iniciais de melhorar a sua espalhabilidade, sugerindo um veículo com potencial para incorporação do extrato seco de jucá. A formulação B43 apresentou o melhor perfil reológico, maior capacidade antioxidante e de fenóis totais e apresentou melhor estabilidade com armazenamento em temperatura ambiente até 30 dias.

**Palavras-chave:** Extrato Seco Vegetal; Jucá; Pomada.

## ABSTRACT

Medicinal plants are commonly used in the prevention and fight against various diseases. In recent years, its use has been intensified in traditional medicine mainly as wound healing treatment. In face of a rich biodiversity and being the holder of a third of the world's flora, Brazil has an enormous potential in the generation of products and processes of natural origin medicines. A promising candidate for the development of an herbal product is the species *Libidibia ferrea*, popularly known as “jucá”, commonly used for several purposes, among them as a healing treatment, anti-inflammatory, antimicrobial and analgesic agent. Since drugs are based on dry plant extracts, it has great relevance and possess several advantages such as: dosage accuracy, ease handling, storage, and stability. It also facilitates the incorporation in pharmaceutical formulations so they can be used to obtain products for topical therapy. The objective of this study was to develop a stable semi-solid phytotherapeutic formulation using standardized “jucá” dry plant extract as an active agent. The vegetable raw material of *L. ferrea* was characterized and presented values within the recommended range: loss on drying of 10.64%, the total ash content of 2.39%, the extractive content of 51.09%, average particle diameter of 655  $\mu\text{m}$  and the classification of a moderately coarse powder. The chemical characterization showed a total polyphenol content of 5.67%, total tannin content above the minimum of 9.0% established by the Brazilian Pharmacopeia (2019) with a value of 11.70% and quantification of gallic acid of 6.40% against the recommending content of at least 1%. The 7.5% “jucá” Extractive Solution presented a relative density of 1.01, a dry residue of 2.83%, slightly acidic (pH = 3.72) indicating a stable product for phenolic constituents, with content of 17.03% of total polyphenols (151.16  $\pm$  3.19  $\mu\text{g}$  Eq Gallic acid/mL), acquired by HPLC and with values of 1.3776 mg/g of gallic acid content and 11.9394 mg/g for ellagic acid. In addition, vibrational bands characteristic of phenolic compounds was found by FTIR analysis. The operational efficiency of drying the spray dried extract (76.26%) was satisfactory, residual humidity of 6.80% and low water activity (0.19) establish that it can remain stable with low risks of microorganism development. It was classified macroscopically as a fine powder with agglomerations of light brown color and characteristic odor of this species. The scanning electron microscope showed particles with spherical, hollow shape and rough surface. It was observed that the drying in Spray Dryer influenced the increase in the concentration of total polyphenols, with a content of 40.6% (382.61  $\mu\text{g}$  eq. Gallic acid/mL), a fact also observed in FTIR. The chromatographic profile showed the presence of 4.0392 mg/g of gallic acid and 9.1529 mg/g of ellagic acid. The spray dried extract (SPE) maintained the cell viability of fibroblasts for a period of 72 hours, a good free radical scavenger in *in vitro* tests by the DPPH method • with an IC<sub>50</sub> of 8.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and ABTS • + of 5.23  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The SPE showed potential antimicrobial activity against *S. aureus* CBAM 0324 with a 20 mm inhibition zone at a concentration of 75 mg/mL, like the vancomycin standard. There were no significant differences (p > 0.05) between the concentrations of 2.5%, 5% and 7.5% of SPE compared to *S. aureus* ATC 29213 and ATCC 43300 and for both, an MIC = 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was obtained. Preliminary tests showed that formulations B30 and B40 were compatible with the SPE of “jucá”, up to a concentration of 5%. The optimized formulation B40 containing the addition lanolin proved to be stable and within the initial expectations of improving its spreadability, suggesting it as vehicle with the potential to incorporate dry “jucá” extract. Formulation B43 had the best rheological profile, highest antioxidant capacity and total phenol, and showed best stability with storage at room temperature for up to 30 days.

**Keywords:** Dry Vegetable Extract; Jucá; Ointment.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>15</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 Fitoterápicos</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2 <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul.) L.P. QUEIROZ</b> .....	<b>19</b>
3.2.1 Aspectos botânicos gerais .....	19
3.2.2 Aspectos Fitoquímicos e Farmacológicos .....	20
3.2.3 Aspectos tecnológicos .....	27
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1 Obtenção e tratamento do material vegetal</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2 Caracterização da Droga Vegetal</b> .....	<b>29</b>
4.2.1 Determinação do teor de umidade.....	29
4.2.2 Análise granulométrica por tamisação .....	29
4.2.3 Determinação de teor de extrativos .....	30
4.2.4 Determinação do teor de cinzas totais .....	30
4.2.5 Cromatografia de líquida de alta eficiência (CLAE).....	31
4.2.6 Quantificação do teor de taninos totais .....	32
<b>4.3 Obtenção e caracterização físico-química da solução extrativa (SE)</b> .....	<b>33</b>
4.3.1 Determinação do pH.....	34
4.3.2 Determinação da densidade relativa.....	34
4.3.3 Determinação do resíduo seco.....	34
4.3.4 Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	35
4.3.5 Determinação do teor de fenois totais .....	35
<b>4.4 Obtenção e caracterização do Extrato Seco por Aspersão (ESA)</b> .....	<b>35</b>
4.4.1 Avaliação das características macroscópicas .....	36
4.4.2 Rendimento Operacional .....	36
4.4.3 Análise do teor de umidade em balança com infravermelho .....	36
4.4.4 Análise das partículas em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	37
4.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho .....	37

4.4.6	Determinação do perfil cromatográfico do ESA por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	37
4.4.7	Validação da metodologia analítica para a quantificação de ácido gálico e ácido elágico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	37
4.4.7.1	Linearidade.....	37
4.4.7.2	Precisão .....	38
4.4.7.3	Exatidão.....	38
4.4.8	Determinação de polifenóis totais .....	38
4.4.8.1	Método <i>Folin-Denis</i> .....	38
4.4.8.2	Método <i>Folin-Ciocalteu</i> em leitor de ELISA.....	39
4.4.9	Sequestro de radicais DPPH• .....	39
4.4.10	ABTS•+ .....	40
4.4.11	Ensaio de Citotoxicidade.....	40
4.4.12	Atividades biológicas <i>in vitro</i> .....	41
4.4.12.1	Inibição de $\alpha$ -glucosidase .....	41
4.4.12.2	Inibição de $\alpha$ -amilase .....	42
4.4.12.3	Inibição de lipase.....	42
4.4.12.4	Atividade antimicrobiana .....	43
4.4.12.4.1	Teste difusão em ágar.....	43
4.4.12.4.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	43
<b>4.5</b>	<b>Desenvolvimento de formulações semissólidas pomadas.....</b>	<b>44</b>
4.5.1	Estudos de estabilidade .....	45
4.5.2	Estudo de pré-estabilidade.....	45
4.5.3	Estabilidade preliminar .....	45
4.5.3.1	Estresse térmico.....	45
4.5.3.2	Ciclo gelo-degelo .....	45
4.5.4	Teste de estabilidade acelerada .....	46
4.5.5	Testes organolépticos .....	46
4.5.6	Testes físico-químicos.....	46
4.5.6.1	Determinação do pH aparente .....	46
4.5.6.2	Determinação da densidade.....	46
4.5.6.3	Teste de Espalhabilidade .....	47
4.5.7	Comportamento reológico.....	47
4.5.7.1	Viscosidade .....	47
4.5.8	Atividade antimicrobiana .....	48
4.5.8.1	Teste difusão em ágar.....	48

4.5.8.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	48
4.5.9	Sequestro de radicais DPPH• .....	49
4.5.10	Avaliação do teor de princípios ativos nas pomadas.....	50
4.5.11	Espectroscopia da Região do Infravermelho.....	50
4.5.12	Citotoxicidade .....	50
<b>4.6</b>	<b>Análise dos dados .....</b>	<b>50</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização da matéria-prima vegetal (MPV) vagens de <i>Libidibia ferrea</i>.....</b>	<b>51</b>
5.1.1	Tratamento, perda por dessecação e granulometria da MPV vagens de <i>Libidibia ferrea</i> .....	51
5.1.2	Teor de cinzas totais, Índice de Intumescência e Teor de extrativos da MPV vagens de <i>Libidibia ferrea</i> .....	53
5.1.3	Caracterização química da MPV vagens de <i>Libidibia ferrea</i> .....	54
<b>5.2</b>	<b>Caracterização química, física e físico-química da solução extrativa (SE) das vagens de <i>Libidibia ferrea</i> .....</b>	<b>57</b>
5.2.1	Densidade relativa, pH e resíduo seco da solução extrativa de <i>L. ferrea</i> .....	57
5.2.2	Caracterização química da solução extrativa de <i>L. ferrea</i> .....	58
5.2.3	Espectroscopia na Região do Infravermelho da solução extrativa de <i>L. ferrea</i> .....	59
<b>5.3</b>	<b>Caracterização química, física e físico-química do extrato seco (ESA) das vagens de <i>Libidibia ferrea</i>.....</b>	<b>60</b>
5.3.1	Características macroscópicas, rendimento operacional, umidade residual e atividade de água (Aw) do ESA das vagens de <i>Libidibia ferrea</i> .....	60
5.3.2	Microscopia Eletrônica de Varredura do ESA .....	62
5.3.3	Polifenóis totais (PT) e Atividade antioxidante do ESA de vagens de <i>L. ferrea</i> .....	64
5.3.4	Espectro na Região do Infravermelho (FTIR) do ESA padronizado de <i>L. ferrea</i> .....	66
5.3.5	Validação da análise quantitativa do ácido gálico e ácido elágico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extrato seco de vagens de <i>L. ferrea</i> ...	67
5.3.5.1	Linearidade.....	68
5.3.5.1.1	Linearidade para o padrão de ácido gálico .....	68
5.3.5.1.2	Linearidade para o padrão de ácido elágico .....	70
5.3.5.2	Precisão (Repetibilidade e Reprodutibilidade).....	71

5.3.5.3	Exatidão.....	72
5.3.6	Determinação do perfil cromatográfico do extrato seco (ESA) de <i>L. ferrea</i> .....	74
5.3.7	Atividade biológica do extrato seco de vagens de <i>L. ferrea</i> .....	76
5.3.7.1	Atividade enzimática do ESA de vagens de <i>L. ferrea</i> .....	76
5.3.7.2	Atividade antimicrobiana do ESA frente à <i>S. aureus</i> .....	77
5.3.8	Viabilidade celular do ESA.....	82
<b>5.4</b>	<b>Desenvolvimento de formulações semissólidas pomadas contendo extrato seco por aspersão (ESA) de vagens de <i>L. ferrea</i>.....</b>	<b>83</b>
5.4.1	Desenvolvimento das formulações.....	83
5.4.2	Testes de centrifugação .....	92
5.4.3	Estresse térmico.....	93
5.4.4	Testes físico-químicos.....	94
5.4.4.1	Análises de pH, espalhabilidade e viscosidade .....	94
5.4.5	Polifenóis totais e Atividade antioxidante.....	100
5.4.6	Atividade antimicrobiana frente à <i>Staphylococcus aureus</i> .....	101
5.4.7	Ciclo gelo-degelo (estudo de estresse) .....	103
5.4.7.1	pH.....	103
5.4.7.2	Espalhabilidade .....	104
5.4.7.3	Densidade aparente .....	105
5.4.7.4	Viscosidade .....	105
5.4.8	Estabilidade acelerada .....	106
5.4.8.1	pH, espalhabilidade e viscosidade.....	106
5.4.8.2	Avaliação de fenóis totais .....	111
5.4.9	Espectroscopia na Região do Infravermelho das formulações contendo ESA de <i>L. ferrea</i> .....	113
5.4.10	Citotoxicidade .....	114
5.4.11	Adaptações do método analítico para o doseamento da formulação semissólida de <i>L. ferrea</i> por CLAE.....	115
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>117</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>118</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, fatores como o aumento da capacitação das universidades e dos centros de pesquisa, e com a evolução de estudos científicos em descobertas da eficácia de plantas medicinais, trouxeram a possibilidade de desenvolvimento de fitoterápicos nacionais para uso nos programas de saúde pública. A fim de fortalecer a fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS), diversas políticas governamentais de incentivo, mecanismos de regulamentação e implementação das políticas foram elaborados. Este processo de implantação iniciou em 1988 pela Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação (CIPLAN), através da Resolução nº 8/1988. Esta aponta que uma vantagem é a possibilidade de baratear custos para os cofres públicos, implicando em uma maior autossuficiência e menor necessidade de importação de matéria-prima (BRASIL, 1988; BRASIL, 2006b; FIGUEIREDO, 2014).

As plantas medicinais são usadas na prevenção e combate às várias doenças, e, nos últimos anos, seu uso tem sido intensificado, sendo um deles no tratamento de cicatrização de feridas. Muitos estudos vêm contribuindo para o desenvolvimento de novos produtos cicatrizantes, visando eficácia equivalente e menor custo que os disponíveis no mercado. Geralmente, os produtos tópicos existentes apresentam custo ainda muito elevado, impossibilitando principalmente o acesso de usuários do sistema público de saúde que possuem baixo poder aquisitivo (RODRIGUES et al., 2015; SOUZA et al., 2017).

Com a necessidade de ampliação das opções terapêuticas a estes usuários, pode-se pensar nos fitoterápicos, que inclui o aproveitamento e uso sustentável da biodiversidade brasileira e valorização dos conhecimentos tradicionais de plantas medicinais. Um exemplo de medicamento fitoterápico registrado, indicado como agente cicatrizante para lesões de pele, é o FITOSCAR®. Esta pomada é composta pelo extrato seco de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville), uma leguminosa do cerrado brasileiro que possui cascas espessas rica em taninos, flobafenos e outros compostos fenólicos, que possuem ação farmacológica cicatrizante e antimicrobiana de feridas e úlceras (COELHO et al., 2010; PAPANAS & MALTEZOS, 2011 apud SILVA, L.L. et al., 2015).

Dentro desse contexto, encontra-se a espécie *Libidibia ferrea*, conhecida como jucá. Suas cascas, folhas, sementes e frutos são empregados popularmente para diversas finalidades, dentre elas cicatrizante, anti-inflamatória, antimicrobiana e analgésica. Devido ao seu potencial terapêutico e valor etnofarmacológico, o Ministério da Saúde do Brasil a incluiu na Lista Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), que apresenta 71 espécies vegetais de importância para saúde pública. Um dos objetivos do RENISUS é auxiliar as pesquisas científicas estimulando a produção nacional de produtos derivados de espécies nativas e a introdução de práticas complementares de assistência à saúde pelo SUS (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2009; SANTOS et al., 2018).

Sendo assim, essa espécie vegetal é uma promissora candidata para o desenvolvimento de produto. Diante disso, cabe ressaltar que na área farmacêutica, medicamentos elaborados à base de extratos secos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância e seu uso vem sendo empregado em larga escala até hoje. Isso porque apresentam diversas vantagens desde a exatidão de dosagem e facilidade de manuseio, transporte e armazenagem, além de demonstrarem, em geral, maior estabilidade química, física e microbiológica (BENINI et al., 2010; BERNARDES et al., 2017; PACHÚ, 2007). Estes podem ser utilizados para obtenção de produtos para terapia tópica, através da incorporação em formas farmacêuticas semissólidas, como géis, emulsões e pomadas.

GIL, E.S. (2010) aponta que aproximadamente 80% dos fitoterápicos são comercializados na Alemanha sob a forma de extratos secos. Frente à necessidade de alcançar homogeneidade entre lotes de produção de fitoterápicos, acredita-se que o uso de extratos secos vegetais padronizados tende a ser uma característica importante no desenvolvimento de formulações fitoterápicas de qualidade e eficazes.

É importante salientar que a incorporação de extratos vegetais em formulações está associada à presença de adjuvantes tecnológicos os quais podem variar em sua composição e consistência. Cada componente (ativo ou não) e variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte podem influenciar na estabilidade de um produto. Essas variáveis podem ser de caráter extrínseco, como temperatura, umidade, luz, oxigênio, material de acondicionamento; e de caráter intrínseco, como incompatibilidades físicas (inversão de fases, cremagem, floculação e coalescência) e químicas (pH, reações de hidrólise e óxido-redução, interações). No desenvolvimento de produtos farmacêuticos,

tais como fitoterápicos e cosméticos, são necessários estudos de compatibilidade entre os componentes da formulação/ embalagem e estabilidade para garantir características de qualidade que deverão ser mantidas durante o tempo de armazenamento e uso (ALLEN, POPOVICH & ANSEL, 2007; BRASIL, 2004; BRASIL, 2006a; ISAAC et al., 2008).

Diante destes fatos, visando o aproveitamento do potencial terapêutico da espécie, o presente trabalho tem por finalidade o de desenvolver um fitoterápico tópico que preserve suas atividades biológicas, com segurança e eficácia, e que possibilite uma futura proposta terapêutica e uso diário na prática ambulatorial.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma formulação fitoterápica semissólida para aplicação tópica, utilizando como agente ativo o extrato seco vegetal por aspersão de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. QUEIROZ.

### 2.2 Objetivos Específicos

1ª etapa:

- Obter e caracterizar a matéria-prima vegetal de *Libidibia ferrea*;
- Obter e caracterizar a solução extrativa de *L. ferrea*;
- Obter e caracterizar o extrato seco padronizado de *L. ferrea*;
- Quantificar o teor de compostos fenólicos (ácido gálico e elágico) na MPV, SE e ESA de jucá;
- Avaliar a atividade citotóxica, antioxidante e biológica dos extratos secos obtidos;

2ª etapa:

- Desenvolver formulações semissólidas a partir da incorporação de extrato seco de *L. ferrea*;
- Realizar estudos de estabilidade e compatibilidades entre os componentes de diferentes formulações e verificar sua influência na caracterização físico-química;
- Obter uma formulação semissólida estável, caracterizar do ponto de vista físico-químico, reológico e biológico.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Fitoterápicos

A Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, considera o fitoterápico o medicamento obtido exclusivamente de matéria-prima de origem vegetal, exceto substâncias isoladas, com fins profiláticos, preventivos e curativos (BRASIL, 2014). Podem ser encontrados em diversas formas farmacêuticas, tais como xaropes, comprimidos, cápsulas ou sachês para uso oral e na forma de cremes e pomadas para aplicação tópica. Este produto constitui uma opção terapêutica de custo mais acessível ao paciente e para indústria farmacêutica, uma vez que o custo no desenvolvimento nacional de fitoterápico é relativamente menor e acessível se comparada com a maioria dos medicamentos sintéticos (BRASIL, 2014; MARQUES & SOUZA, 2012; OLIVEIRA & ROPKE, 2016).

O Brasil, frente à sua rica biodiversidade e detentor de um terço da flora mundial, possui enorme potencial na geração de produtos e processos na área de medicamentos de origem natural. Um ponto que ainda cabe a ser destacado é a sua rica diversidade étnica e cultural relacionadas ao conhecimento tradicional de plantas medicinais. Entretanto, países desenvolvidos como Japão e Estados Unidos e países europeus são os que mais manufaturam e comercializam produtos naturais (KLEIN et al., 2010). Poucos medicamentos fitoterápicos genuinamente brasileiros foram desenvolvidos e são comercializados no país, havendo a necessidade de incrementar a sua pesquisa e desenvolvimento (BRASIL, 2016; SIMÕES, 2007).

KLEIN et al. (2010) afirma que nos primeiros dez anos do processo de criação de um produto, em geral, os custos estão vinculados à pesquisa e desenvolvimento (P&D) que inclui estudos básicos e de transposição de escala. Após este período, os custos de P&D caem e são desviados para produção e vendas, quando começam a surgir os lucros. Enquanto a descoberta e o desenvolvimento de um novo fármaco envolvem investimentos altíssimos, cujo custo de pesquisa pode variar entre 300 a 500 milhões de dólares, o desenvolvimento de um novo fitoterápico pode ser obtido a custos muito menores, principalmente, porque pode estimular e fomentar arranjos produtivos locais, através do cultivo das espécies vegetais, que resulta em emprego para população. Nesse contexto, estimula-se a pesquisa para obtenção de produtos a partir de espécies nativas, e para atingir esses objetivos, a obtenção de fitoterápicos, envolve um processo multidisciplinar

que requerem estudos prévios relativos aos aspectos botânicos, agrônômicos, ecológicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, e de desenvolvimento tanto de metodologias analíticas como tecnológicas (TOLETO et al., 2003; YUNES, PEDROSA & CHECHINEL, 2001).

Segundo HASENCLEVER et al. (2017) vive-se um paradoxo no século XXI, pois o conhecimento da ciência e da tecnologia é cada vez mais veloz, oferecendo infinitas possibilidades tecnológicas de tratar variadas formas de doenças. Entretanto, nem sempre essas possibilidades têm sido aproveitadas para melhorar o acesso das populações aos medicamentos que continuam com seus preços incompatíveis com os orçamentos de saúde dos países.

Para SANTOS, VIEIRA & KAMADA (2009) o uso de fitoterápicos na última década expandiu-se globalmente, tornando-se tão popular que a Organização Mundial da Saúde (OMS) elaborou uma série de guias e protocolos com o objetivo de definir metodologias e avaliação da medicinal tradicional, de forma que a biodiversidade não seja perdida ou venha a findar com seu uso excessivo sem um manejo adequado. GARROS et al., (2006) destacam que mesmo com a predominância de substâncias sintéticas no arsenal terapêutico, que ocorre nestes últimos anos, há uma retomada da valorização de práticas terapêuticas consideradas por muitos profissionais de saúde como populares ou não científicas, com uma lenta reincorporação de fitoterápicos como alternativas ou como uma complementação terapêutica a pacientes.

CARRERAS E GONZALEZ (2011) aponta que existe um número estimado de 70.000 espécies de plantas medicinais utilizadas em todo mundo. O Brasil detém a maior variabilidade genética do mundo, são cerca de 55 mil espécies conhecidas, além das inúmeras outras não catalogadas. Na Amazônia, cerca de 14 mil já foram catalogadas e suas propriedades terapêuticas continuam sendo estudadas. Ao levar em consideração esta perspectiva, é importante situar que cerca de 25% dos medicamentos são de origem vegetal, sendo que as plantas medicinais sempre foram objeto de estudo, buscando-se novas fontes para obtenção de princípios ativos, responsáveis por sua ação farmacológica ou terapêutica (CARDOSO et al., 2017; CARRERAS & GONZALEZ, 2011; VARELLA, 1997).

No Brasil, o Ministério da Saúde criou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos por meio do Decreto nº 5.813/2006, com determinações e diretrizes, que garantam o acesso seguro e uso racional sustentável de plantas medicinais e fitoterápicos

da cadeia produtiva nacional à população (BRASIL, 2006a). O Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos propõe que sejam inseridas as plantas medicinais, fitoterápicos e os serviços relacionados a ele via SUS, desde que feito com segurança, eficácia e qualidade em consonância com as diretrizes da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (SANTOS, VIEIRA e KAMADA, 2009).

Tendo consciência dessa complexidade, ressalta-se ainda um dos objetivos da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos que é de inserir os fitoterápicos na prática clínica, ampliando as opções terapêuticas e melhorando a atenção à saúde dos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), sem deixar de valorizar e preservar o conhecimento das comunidades e povos tradicionais. Em 2009, foi criada a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS (Rennisus) com plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS (BRASIL, 2006a; YUNES *et. al.*, 2001).

A indústria de fitoterápicos está em franco desenvolvimento no mundo e pode representar uma oportunidade de desenvolvimento para o setor farmacêutico no Brasil. De acordo com os “Objetivos de Desenvolvimento Sustentável”, com metas a serem atingidas até 2030, é assegurar o acesso a medicamentos seguros, eficazes, de qualidade e a preços acessíveis para todos (KIRK *et al.*, 2016), o desenvolvimento de fitoterápicos pode ser uma alternativa de na ampliação de opções terapêuticas na perspectiva de melhoria da atenção à saúde e de inclusão social aos usuários do SUS (EVANGELISTA *et al.*, 2013; HASENCLEVER *et al.*, 2017; PETRY *et al.*, 2012).

A transformação de uma planta medicinal em um medicamento deve visar a preservação da integridade dos constituintes químicos e por consequência a sua ação farmacológica, caracterizando-se em um fitocomplexo (KLEIN *et al.*, 2010; TOLEDO *et al.*, 2003). Alguns princípios ativos, no entanto, apresentam elevada toxicidade, devendo-se ter o cuidado de usá-los em concentrações estritamente indicadas. Para atender aos critérios de qualidade inerentes aos fitoterápicos, a padronização de medicamentos é um pré-requisito para a constância dos efeitos terapêuticos e segurança do usuário (KLEIN *et al.*, 2010).

Ao considerar os referidos aspectos é importante ressaltar que para a obtenção de registro de um medicamento fitoterápico dentro dos padrões requeridos pela legislação faz-se necessário, da realização de diferentes testes de forma a garantir sua eficácia e segurança no uso, que podem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos

de utilização, publicações tecnocientíficas ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos, além de ensaios que comprovam a identidade da planta e a ausência de contaminantes. Por fim, outro fator é a qualidade do produto, mediante o controle das matérias-primas, do produto acabado, materiais de embalagem, formulação farmacêutica e estudos de estabilidade (KLEIN et al., 2010; NETTO et al., 2006).

Do cultivo de plantas medicinais à distribuição de produtos acabados, as Boas Práticas de Fabricação (BPF) integrando com os procedimentos relacionados com a Garantia de Qualidade devem ser implantadas em toda a cadeia produtiva de fitoterápicos. Para garantir qualidade, eficácia e segurança, as avaliações devem ser feitas em todas as etapas do processo, começando pela matéria-prima vegetal (MPV), antes do uso na produção, bem como nas etapas intermediárias do processo para garantir a qualidade no desenvolvimento de um produto acabado. É realizada a comparação dos dados obtidos do material em estudo com os que estão descritos nos compêndios oficiais, como a Farmacopeia Brasileira e, para os vegetais não descritos, devem ser fornecidos métodos validados (BRASIL, 2018; GIL, E.S, 2010).

### **3.2 *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. QUEIROZ**

#### **3.2.1 Aspectos botânicos gerais**

*Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. QUEIROZ pertencente à família Fabaceae da subfamília Caesalpinioideae (basiônimo *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul) é uma espécie arbórea nativa e endêmica da flora brasileira encontrada principalmente nas regiões Norte e Nordeste e Sudeste, distribuindo-se predominantemente em áreas de caatinga. Esta espécie vegetal é popularmente conhecida na região amazônica como Jucá e em outras regiões do Brasil como Pau-ferro (COSTA, GUILHON-SIMPLICIO & SOUZA, 2015; FERREIRA & SOARES, 2015).

O porte de árvore do Jucá pode atingir até 10 metros de altura, com 10 a 30 cm de diâmetro, tendo um revestimento por cascas acinzentadas com ritidoma escamoso e em placas finas e lisas, seus ramos são pouco lenticelados. Sua copa é baixa e densa, com folhas alternas e espiraladas, tendo a face adaxial coloração verde escuro e a face abaxial verde-claro, seus frutos são legumes bacoides (vagens), com formato alongado indeiscente, levemente achatado e sinuoso com sutura ventral saliente, de base arredondada a curvada, são rígidos e com coloração marrom, apresentando poucas

sementes subelípticas a ovais por fruto (BRASIL, 2017; COSTA et al., 2016; MAIA, 2004).

Segundo SANTOS et al. (2018), a espécie *L. ferrea* produz anualmente uma moderada quantidade de sementes. As sementes são separadas em cavidades individuais distintamente visíveis e apresenta disposição unisseriada e transversal. As sementes germinam em amplitude térmica de 15 a 40°C, pode ser armazenada por até oito meses (GALDINO, MESQUITA & KOSSMANN, 2007).

Suas flores são pequenas e de cor amarela. A floração ocorre na estação seca até o início da estação chuvosa, com frutificação no final desta estação se prolonga pela estação das chuvas. De acordo COSTA et al. (2016) florescem majoritariamente nos meses de abril a junho coincidindo com o período chuvoso, sendo que a maior média de dias de frutificação ocorre nos meses de fevereiro, março, agosto e setembro.

Sabe-se que os metabólitos secundários presentes na espécie vegetal podem variar de acordo com a época da colheita, sendo o conhecimento da floração e maturação das plantas e frutos de grande importância. É necessário que se defina o momento ideal de colheita, pois a composição química pode alterar conforme o tipo de cultivo e época da colheita e, portanto, influencia na qualidade final de um fitoterápico (SANTOS & ALMEIDA, 2016). Quanto aos frutos desta espécie, devem ser coletados diretamente da árvore quando adquirirem coloração escura ou colhidos após a queda espontânea, ou seja, o ideal é ser coletado quando estiverem maduros (AMORIM et al., 2009; COSTA et al., 2016; LORENZI, 1998).

### **3.2.2 Aspectos Fitoquímicos e Farmacológicos**

Com relação aos estudos fitoquímicos de Jucá (*L. ferrea*), há uma variabilidade de classes de metabólitos que podem estar relacionados às ações terapêuticas, como a presença de flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas, esteroides e outros compostos fenólicos das cascas do caule e folhas (GONZALES, BARROS & BACCHI 2004).

Estudos sugerem que os taninos são seus metabólitos majoritários. Os taninos são classificados como hidrolisáveis, que se dividem em dois grupos: os galotaninos e os elagitaninos; condensados; pseudo-taninos. Taninos hidrolisáveis apresentam em sua estrutura ésteres de um açúcar (ou poliol), normalmente  $\beta$ -D-glicose, conectadas a um

número variável de moléculas de ácidos fenólicos que podem ser moléculas de ácido gálico, no caso de galotaninos ou ácido hexahidroxidifênico (HHDP) e seus derivados oxidados, classificados como elagitaninos. Taninos condensados ou proantocianidinas são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Já os pseudo-taninos são os precursores dos taninos verdadeiros com menor peso molecular (MONTEIRO, 2005; BITTENCOURT, 2017).

Estudos comprovam a presença de flavonoides e taninos nos frutos de *L. ferrea*. Como exemplos de taninos desta espécie estão o ácido gálico e ácido elágico (SOARES et al., 2015). A referida planta foi inserida na Farmacopeia 2º suplemento que define ambas as substâncias como os marcadores químicos para esta espécie vegetal. Segundo a monografia da droga vegetal consistida de cascas secas do caule deverá conter no mínimo, 8% de taninos totais e, no mínimo, 0,02% de ácido gálico e para os frutos secos, no mínimo, 9% de taninos totais e, no mínimo, 1,0% de ácido gálico (BRASIL, 2017).

Em técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) desta planta, observada por GALVÃO (2015), detectou-se a presença de flavonoides, derivados cinâmicos, açúcares redutores e taninos hidrolisáveis tanto em frutos como cascas do caule, porém taninos condensados apenas em cascas do caule. VASCONCELOS e colaboradores (2011) utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para identificação química dos constituintes do extrato aquoso 7,5% das cascas de *L. ferrea* e revelou a presença de taninos condensados (catequinas) e taninos hidrolisáveis (ácido gálico e elágico), sendo o teor total de taninos da *L. ferrea* de 266 mg/g.

PRAZERES et al. (2019) analisaram o extrato seco por aspersão de vagens de *L. ferrea*, submetidas à maceração a frio com solvente hidroalcolico 40% por 3 dias. E os resultados em CLAE/MS mostraram que os principais constituintes do extrato foram taninos hidrolisáveis e compostos fenólicos, como ácido gálico e ácido elágico, sendo o teor total de compostos fenólicos de 951,39 mg equivalente ao ácido gálico/g.

No extrato metanólico bruto dos frutos de jucá em CLAE-DAD-EM foram identificadas substâncias fenólicas tais como o ácido galoilquínico, o ácido galoilsinápico, o ácido metilgaloilquínico, elagitaninos, ácido dehidrohexahidroxifenico e ácido clorogênico. Outros trabalhos, utilizando etanol como líquido extrator, isolaram ácido gálico, metil galato e o ácido elágico (NAKAMURA et al., 2002; UEDA et al., 2001).

Outra classe de metabólitos presente em *L. ferrea* são as saponinas. Este grupo de substâncias é solúvel em água e apresentam em suas estruturas glicosídeos constituídos por uma aglicona (triterpênico ou esteroide) com característica lipofílica, ligada por meio de ligações glicosídicas a uma ou mais cadeias de açúcares, de caráter hidrofílico. Deste modo, por suas características anfifílicas, possuem aplicação na indústria farmacêutica como emulgentes e tensoativos naturais. Outros empregos destacados são como adjuvantes para aumentar absorção de medicamentos mediante aumento da solubilidade ou interferência nos mecanismos de absorção. A atividade antibacteriana descrita para estas substâncias está relacionada aos triterpenos e esteroides, acreditando-se que estejam envolvidos na ruptura de substâncias lipofílicas das membranas microbianas ou formando complexos com esteroides (SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. & ATHAYDE, M. L., 2007; SIMÕES et al., 2007).

Na medicina tradicional, as cascas do caule, os frutos, as folhas e as sementes de *L. ferrea* são bastante utilizadas devido, principalmente, suas atividades anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante (FERREIRA & SOARES, 2015). Pesquisas realizadas demonstraram que o jucá possui atividade antifúngica e antibacteriana (DE ARAÚJO et al., 2014; FERREIRA et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2015), cicatrizante (KOBAYASHI et al., 2015), anti-inflamatórias e antinociceptivas (CARVALHO, 1996; FALCÃO, 2017; FREITAS et al., 2012), antidiabética, antioxidante e hepatoprotetora (BARROS, et al., 2014; HASSAN et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2011), larvicida (CAVALHEIRO et al., 2009) e anti-leishmania (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI et al., 2017).

Vários estudos atribuem às substâncias fenólicas, tais como os taninos como majoritários nesta espécie vegetal e relacionam a atividade cicatrizante a esse grupo de moléculas bioativas. Em processos de cicatrização de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados. As atividades dos taninos estão relacionadas, com suas propriedades adstringentes, que é a sua eficiência como precipitantes de proteínas (da saliva, sanguíneas, bacterianas, parasitárias, enzimas, entre outros). Por via externa, podem agir impermeabilizando as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes e favorecendo a cicatrização (BATE-SMITH, 1973 apud KOBAYASHI, 2015; MELLO & SANTOS, 2007; SIMÕES et al., 2007). De acordo com PAIVA et al. (2002) devido sua capacidade de precipitar as

proteínas das células, formam uma barreira protetora composta pelo complexo tanino-proteína ou por meio do polissacarídeo sobre a pele ou mucosa danificada, evitando também a proliferação de microrganismos.

Estudos indicam que a *L. ferrea* possui atividade antimicrobiana. Quando se compara estudos antimicrobianos entre diferentes partes da planta, não foram relatadas atividades utilizando extratos de sementes de jucá (CAVALHEIRO et al., 2009). No entanto, utilizando diferentes extratos alcoólicos das cascas do caule, avaliadas por PEREIRA et al. (2010) frente a cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterobacter gergoviae*, apresentaram ação antimicrobiana relevante frente à cepa de *S. aureus*, com halo superior à 17mm.

A atividade antibacteriana de frutos *L. ferrea* foi avaliada por métodos de difusão em ágar e microdiluição por DE ARAÚJO et al. (2014), a extração foi realizada empregando a técnica de turbo-extração utilizando como líquidos extratores água (10%; p/v) e acetona:água (7:3, v/v). A quantificação de polifenóis totais do extrato aquoso foi de 30,47% e para acetona:água de 32,50%. No geral, os extratos acetona-água foram mais ativos frente bactérias gram positivas como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e negativa frente *Shigella flexneri*. Outro estudo realizado por NASCIMENTO et al. (2015) demonstrou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positiva do extrato etanólico de vagens de *L. ferrea* com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 50 a 125µg/ ml.

BARAKAT et al. (2011) desenvolveu formas farmacêuticas a base de Carbopol®, a partir de extrato aquoso dos frutos de *L. ferrea* nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% (m/V) frente a *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e verificou que a formulação contendo 5% de extrato teve melhor inibição frente às cepas testadas.

Os frutos e as cascas também são de interesse antimicrobiano contra patógenos bucais (SAMPAIO et al., 2009). OLIVEIRA (2013) comparou extratos obtidos através da infusão da casca do fruto e do caule com uma relação droga:solvente de 7,5% (m/V) frente à patógenos bucais. Frente ao *Lactobacillus casei*, o extrato dos frutos mostrou-se mais efetivo, com concentração inibitória mínima (CIM) de 9,3 mg/ml comparado à CIM da casca que foi 37,5 mg. Os dois extratos apresentaram CIM de 18,7 mg/mL frente à *Candida albicans*. Frente à cepa de *Streptococcus salivarius*, somente o extrato obtido da

casca do caule apresentou atividade com (CIM) de 37,5 mg/mL, tal fato foi confirmado por MATOS (2016), apresentando a mesma concentração frente à *S. oralis*.

Quanto ao potencial cicatrizante do jucá, KOBAYASHI et al. (2015) avaliaram o extrato etanólico dos frutos de *L. ferrea* em ratos. No extrato foram detectados saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenois e taninos, sesquiterpenolactonas e outras lactonas e antraquinonas. O extrato à 12,5% foi superior ao de 50% para o tratamento de feridas em ratos, que foi acompanhado durante 9 dias, o que indica que a concentração do extrato pode influenciar no resultado do tratamento. Na dose testada, o extrato não apresentou toxicidade aguda.

A atividade cicatrizante do pó oriunda das vagens de jucá *in natura* ou em associação com açúcares, e ainda na forma de pomada em feridas cutâneas de coelhos foi avaliada por BATISTA et al. (2017). Após o tratamento, observou-se que não houve diferenças significativas entre as formulações em relação ao tempo médio de cicatrização (14 a 17 dias). No entanto, o tratamento tópico com a pomada do pó das vagens de jucá, com e sem adição de açúcar, promoveu um processo cicatricial esteticamente mais organizado, menos hiperêmico e exsudativo.

Pesquisas envolvendo a atividade cicatrizante do jucá vêm sendo realizadas também na área veterinária. A eficiência de uma pomada de *L. ferrea* na cicatrização de feridas cutâneas de caprinos foi avaliada do ponto de vista clínico, bacteriológico, morfológico e histopatológico em um estudo por OLIVEIRA et al. (2010). Houve completa reepitelização das feridas ao 21º dia, enquanto o grupo controle composto de pomada feita apenas à base de vaselina necessitou de mais tempo, sendo que no momento da biópsia foram identificadas *S. aureus*, após o tratamento observou-se *S. aureus* apenas para o grupo controle. Em outro trabalho por OLIVEIRA et al. (2014), realizou-se a comparação de atividade cicatricial entre o extrato aquoso (30%) da vagem e a casca de *L. ferrea* em lesões cutâneas de asininos. A evolução macroscópica foi acompanhada durante 9 semanas, com total cicatrização e não houve diferenças significativas entre os grupos tratados com a casca e a vagem.

Outro estudo mostrou a potencial atividade cicatrizante, DOS SANTOS AMÉRICO et al (2020) avaliaram duas formulações distintas contendo 5% de extrato de jucá para cicatrização de feridas em cães, uma à base de carbopol e outro à base de manteiga de *Astrocaryum murumuru* Mart., e utilizando uma pomada comercial como controle. Os resultados demonstraram que houve maior cicatrização e maior retração de

feridas para os grupos tratados com as formulações fitoterápicas do jucá, com aumento de 15,4% do jucá à base de carbopol e 16,2% do grupo à base de manteiga em comparação com o controle.

A *L. ferrea* possui ainda potencial uso no combate da *Leishmania* spp. Como mostra no estudo de COMANDOLLI-WYREPKOWSKI (2017) que utilizou hidrogel tópico com extrato obtidos com hexano e metanol a 10% de folhas, galhos e frutos de jucá (50 mg) e aplicados em hamsters infectados durante 40 dias. Os resultados demonstraram que as lesões cutâneas dos animais que receberam tratamento com extrato de jucá adicionado ao hidrogel apresentaram redução significativa de 42,78% do volume da lesão, diminuição da inflamação, menor ulceração e alterações histopatológicas, além de menor carga parasitária detectada por RT-qPCR quando comparados aos animais infectados não tratados, ou que receberam apenas o gel sem o extrato na região da lesão.

Além de boas propriedades cicatrizantes, os flavonoides e os taninos são relatados como bons antioxidantes (NASCIMENTO et al., 2018). Os compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos, derivados da cumarina, taninos e flavonoides, podem atuar como agentes redutores, sequestrantes de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete (LARCHER, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2013 apud FERRERA et al., 2016). Esses mecanismos de atividade antioxidante auxiliam em processos cicatrizantes, já que os radicais livres são um fator importante na formação de lesões ulcerativas e erosivas do trato gastrointestinal, e podem ter efeitos positivos no estresse oxidativo desencadeado por hiperglicemias e hiperlipidemias (BORRELLI & IZZO, 2000; CARBONEZI et al., 2007; SILVA & FERRARI, 2011).

Taninos também são considerados as possíveis substâncias químicas responsáveis pela atividade antidiabética (UEDA et al., 2011; VASCONCELOS, 2011). VASCONCELOS et al. (2011) investigaram as propriedades hipoglicemiantes do extrato aquoso das cascas do caule de *L. ferrea*. O extrato foi administrado por via oral a ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ). Apesar de não ser estatisticamente diferente entre o grupo tratado com metformina, a amostra reduziu os níveis de glicose no sangue dos animais e melhorou o seu estado metabólico em comparação ao grupo controle.

Em um estudo *in vivo* semelhante ao de VASCONCELOS et al. (2011), foi avaliada a atividade hipoglicemiante do extrato das folhas de *L. ferrea* por HASSAN et al. (2015). Após a administração oral do extrato durante 30 dias, houve melhora do quadro de hiperglicemia de ratos diabéticos, com redução significativa da glicose sérica,  $\alpha$ -amilase e aumento de insulina sérica, além da inibição da progressão do stress oxidativo e melhora do perfil lipídico.

O possível mecanismo das propriedades hipoglicêmicas do extrato aquoso da casca de jucá pode estar ligado à atuação na regulação da captação de glicose no fígado e nos músculos esqueléticos por meio da ativação de Akt, com consequente inibição da ativação da AMPK, que são enzimas que contribuem para a redução da glicemia (VASCONCELOS C.; MARANHÃO, H. M.; BATISTA, T. M.; CARNEIRO, E. M.; FERREIRA, F.; COSTA, J.; SOARES; SÁ, M.; T.P, SOUZA & A.G. WANDERLEY, 2011). UEDA et al. (2001) aponta que o ácido elágico, que foi isolado da *L. ferrea*, tem a capacidade de inibir a aldose redutase de um modo não-competitivo, enzima envolvida no metabolismo do diabetes.

Atividades de inibição para enzimas envolvidas no metabolismo do diabetes ainda foram relatadas a partir de extratos de sementes de jucá. CAVALHEIRO et al. (2009) detectaram a atividade amilásica no extrato aquoso de sementes de jucá. A hipótese seria a de que a semente possui, em seu interior, enzimas amilolíticas que estejam relacionadas ao processo de mobilização de nutrientes para germinação da semente ou a presença de microrganismos endofíticos no interior da semente que sejam capazes de degradar o amido. Fato observado por LIMA et al. (2013), que avaliaram a amilase de extratos aquosos de sementes de *L. ferrea* quanto à estabilidade térmica e massa molecular. Neste estudo, os resultados mostraram que a amilase presente no extrato possuía estabilidade até 60°C, pois a temperatura pode ser um fator que influencia na atividade biológica de uma proteína, sendo que temperaturas acima de 40°C causam desnaturação proteica em muitas enzimas.

Na medicina popular, o jucá é muito utilizado para uso em terapias da dor e da inflamação, sendo seu uso confirmado por CARVALHO et al. (1996) e LIMA et al. (2012). Em um teste de contorção abdominal induzidas por ácido acético em camundongos, o extrato bruto de frutos de *L. ferrea* nas doses de 10 e 20 mg/kg reduziu o número de contorções, respectivamente em 51% e 88%. Comparativamente, a indometacina (20 mg/kg) reduziu 92% das contrações (CARVALHO et al., 1996).

Em outro estudo, LIMA et al. (2012) avaliaram utilizando extrato etanólico das vagens de *L. ferrea* (50 mg/kg) no teste de contorções induzidas por ácido acético. O extrato nas doses 12,5; 25 e 50 mg/kg reduziu significativamente o número de contorções em 24,9%; 46,9% e 74,2%, respectivamente. No teste do edema de orelha reduziu significativamente (66,6%) em relação ao controle indometacina (83,9%). No teste da permeabilidade vascular induzida por ácido acético houve atividade inibitória, e na avaliação da migração leucocitária foi observada a redução do número de leucócitos polimorfonucleares para o sítio da inflamação, tal fato também foi investigado por FALCÃO et al. (2017).

### 3.2.3 Aspectos tecnológicos

Ao longo destes anos, pesquisas envolvendo a espécie *Libidibia ferrea* foram realizadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica (LIDETEF) da Faculdade de Farmácia da UFAM. Em 2009, MARINHO (2009) verificou a influência de métodos extrativos (15 min para decocção e infusão e 72h para maceração), utilização de etanol e água destilada como solvente e da proporção de droga vegetal (2,5% e 7,5%) no teor de taninos de soluções extrativas de jucá. De acordo com o estudo, o melhor líquido extrator foi a água e quanto ao teor de taninos totais, obteve-se maior concentração de taninos (9,49g%) utilizando decocção 2,5%, seguido de 7,99g% para infusão 2,5% e 7,24g% com decocção 7,5%.

BARAKAT (2011) utilizou solução extrativa aquosa 7,5% de frutos de *L. ferrea* e avaliou diferentes adjuvantes farmacêuticos (dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina) para obtenção de extratos secos por aspersão, e observou que o extrato seco sem adjuvante apresentou maior rendimento operacional (76,36%) em comparação com o extrato seco com a adição de 15% de dióxido de silício coloidal (50,62%). Neste mesmo estudo, BARAKAT (2011) trabalhou no desenvolvimento de formas pseudoplásticas utilizando o extrato seco de *L. ferrea*, e avaliou diferentes polímeros derivados do ácido poliacrílico (Carbopol® 940 e Permulen® TRI) e derivado de celulose (Natrosol®) para obtenção das formulações, sendo formulação de Carbopol® selecionada como melhor base semissólida para incorporação de extrato seco de jucá.

COSTA (2012) avaliou a influência dos adjuvantes: dióxido de silício coloidal (Aerosil®), celulose microcristalina e goma arábica sobre as características dos produtos secos produzidos a partir da solução extrativa aquosa obtida das cascas do caule de *L. ferrea*, através de um delineamento fatorial qualitativo do tipo 2<sup>3</sup>. Com relação ao rendimento operacional, os adjuvantes não contribuíram para um rendimento superior (45,34% a 67,28%), sendo o melhor com adjuvante Aerosil® (67,28%), quando comparado ao extrato seco sem adjuvante (82,91%). Quanto à quantificação do marcador químico ácido gálico nos diferentes produtos secos por aspensão (PSA) estudados por COSTA (2012), houve variação de 0,530 a 1,355 mg/g de ácido gálico, sendo que o extrato seco produzido com o adjuvante aerosil® apresentou um teor médio de 0,862 ±0,01 mg/g, enquanto o extrato seco sem adjuvante (ESA) apresentou o maior teor de 1,355 mg/g quando comparado aos demais produtos secos.

Visando a produção de formas farmacêuticas sólidas com extrato seco de superiores características reológicas, MARINHO (2016) otimizou a padronização de BARAKAT (2011) a partir de um planejamento fatorial com diferentes concentrações de dióxido de silício coloidal e variação nos parâmetros de *spray dryer* como fatores de fluxo de alimentação e fluxo de aspiração. O produto seco com adição de 15% de adjuvante dióxido de silício coloidal, fluxo de alimentação de 10 mL.min<sup>-1</sup> e fluxo de aspiração de 100% gerou maior rendimento tecnológico (83,4%) quando comparado aos demais.

Logo mais, o ESA de frutos de jucá foi objeto de estudo no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas granulados e cápsulas por MARINHO (2016). Foi utilizado o método de granulação via úmida para a preparação dos granulados com diferentes agentes aglutinantes (Opadry e Eudragit E) e líquidos de granulação (água, acetona e álcool isopropílico). Não houve diferença estatística significativa entre os testes de dissolução, desintegração e o teor de polifenóis totais entre as formulações, sendo o granulado escolhido contendo 15% de Eudragit E. Sendo assim, MARINHO (2016) avaliou a influência de diferentes reguladores de fluxo na formulação (estearato de magnésio, lauril sulfato de sódio e dióxido de silício coloidal) para a preparação de cápsulas. O perfil de dissolução mostrou que a formulação utilizando dióxido de silício coloidal apresentou um maior percentual de PSA dissolvido no decorrer de 90 minutos.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção e tratamento do material vegetal**

O material vegetal constituído de vagens de *Libidibia ferrea* foi coletado no município de Manaus/AM em 2019. O material vegetal foi pesado e amostras retiradas para a análise do teor de umidade. Em caso do material com umidade acima de 14%, foi submetido a secagem em estufa de ar circulante a 45°C, até estabilização da umidade residual. Após a secagem, o material foi submetido à moagem em moinho de facas para redução do tamanho de partícula. O material cominuído resultante foi armazenado, constituindo assim a matéria-prima vegetal (MPV) (BRASIL, 2010).

### **4.2 Caracterização da Droga Vegetal**

Para as análises de caracterização, todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.2.1 Determinação do teor de umidade**

O teor de umidade foi determinado por meio de uma balança eletrônica de umidade da Shimadzu MOC-120H®, ajustada com secador de infravermelho, através da secagem em cerca de 1 g da amostra a temperatura de 105°C.

#### **4.2.2 Análise da distribuição granulométrica por tamisação**

Conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010), cerca de 50g da amostra foram pesados e submetidos à passagem através de tamises, com abertura de malha de 1000; 850; 710; 600; 500; 425; 355; 250 µm e mais o coletor previamente tarado. A tamisação foi realizada em agitador de peneiras granulométricas, utilizando-se 60 vibrações por minuto, durante 15 minutos. Após esse processo, as frações retidas, nos tamises e no 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 amplitude granulométrica do pó. Os resultados obtidos corresponderam à média de três determinações.

### 4.2.3 Determinação de teor de extrativos

Cerca de 1,5 g da amostra foi submetida à extração com 150 mL de água destilada por decocção em um período de 10 minutos. Após o arrefecimento, o volume foi reconstituído e filtrado, desprezando os primeiros 20 mL do filtrado. Cerca de 20 g do filtrado foram colocados em pesa-filtros, previamente tarados, e evaporados até secura em banho-maria, com agitação ocasional. Logo após, os pesa-filtros foram colocados em estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 horas, e após esse tempo, os pesa-filtros foram transferidos para o dessecador a fim de arrefecer por 20 minutos, pesando em seguida. Esse procedimento foi repetido de uma em uma hora até atingir peso constante (BUNDESVEREINIGUNG, 1986). O cálculo do teor extrativo foi determinado de acordo com a equação abaixo:

$$TE = \frac{g \times FD}{m - pd} \times 100$$

Cujo, TE = teor extrativo (%m/m); g = massa do resíduo (g); FD = fator de diluição; m = massa da amostra (g); pd = perda por dessecação (%m/m).

### 4.2.4 Determinação do teor de cinzas totais

Os cadinhos de porcelana foram previamente acondicionados em mufla a  $550^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. A seguir foram resfriados em dessecador, por 30 minutos e pesados em balança analítica, correspondendo ao valor (P1). Cerca de 3 g da MPV foram pesados (P2) e transferidos para os cadinhos de porcelana. As amostras foram aquecidas gradativamente, então carbonizadas em chama direta e incineradas. Após completa combustão (ausência de fumaça), foram colocadas em mufla a  $550^{\circ}\text{C}$  por 2 h (eliminação total do carvão). A seguir, foram levadas para o resfriamento em dessecador sob vácuo, e as amostras foram pesadas em balança analítica, repetindo-se este procedimento até a obtenção de peso constante (P3). A porcentagem de cinzas foi calculada em relação à droga seca, pela média de três determinações (BRASIL, 2010). O cálculo foi realizado conforme a equação abaixo:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{(P3 - P1)}{(P2 - P1)} \times 100$$

#### 4.2.5 Cromatografia de líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise de CLAE foi realizada no Laboratório BIOPHAR da FCF/UFAM. Para o preparo da amostra foi pesado 1,0 g da droga pulverizada e transferido para um balão de fundo redondo de 250 mL com boca esmerilhada, após foi adicionado 150 mL de água destilada e aquecido em banho-maria sob refluxo durante 30 minutos à temperatura de 80-85 °C. A amostra foi resfriada em água corrente e transferida para um balão volumétrico de 250 mL. O balão foi lavado e as águas de lavagem foram transferidas com todo conteúdo de droga vegetal para o mesmo balão volumétrico, sendo o volume aferido com água destilada. Em seguida foi esperado o material decantar e o líquido sobrenadante foi filtrado em papel de filtro, desprezando os primeiros 50 mL do filtrado (4 mg/mL).

As análises foram conduzidas em Cromatógrafo Líquido (LC 20A Prominence, Shimadzu®). Para a análise e processamento dos dados, o software LC Solutions® foi utilizado. O comprimento de onda foi fixado em 280 nm para detecção do ácido elágico e ácido gálico. A separação cromatográfica foi realizada com coluna C18 (250 mm x 4.6 mm d.i., tamanho de partícula 5 µm) da Dionex® equipada com pré-coluna (C18, 4 mm x 3.9 µm, Phenomenex®). As separações foram realizadas com temperatura do forno da coluna a 24°C. A fase móvel utilizada foi água ultrapura (A) e metanol (B) ambos acidificados com 0,05% de ácido trifluoracético, com fluxo ajustado para 0,8 mL/min. O seguinte gradiente foi utilizado: 0–10 min, 12,5–25% B; 10–15 min, 25–40% B; 15–25 min, 40–75% B; 25–30 min, 75–75% B; 30–33 min, 75-12,5% B (FERREIRA et al., 2016).

Foi injetado 20 µL da solução amostra, filtrada previamente com filtro de Seringa PVDF de 0,22 µm. O resultado foi expresso em %m/m de ácido elágico e de ácido gálico, de acordo com a equação da reta dos respectivos padrões. Para os cálculos foram considerados a perda por dessecação da amostra e a pureza dos padrões, 99% para ácido elágico e ácido gálico (Sigma Aldrich®).

#### 4.2.6 Quantificação do teor de taninos totais

A quantificação do teor de taninos totais (TT) foi realizada por método espectrofotométrico com a utilização do reagente colorimétrico fosfomolibdotúngstico (*Folin-Denis*), em meio alcalinizado com carbonato de sódio anidro a 29%. Foram realizados os procedimentos a seguir (GALVÃO, 2015; BRASIL, 2010):

- a) Preparo de Folin-Denis: foram adicionados a 75 mL de água destilada, 10,0 g de tungstato de sódio, 2,0 g de ácido fosfomolibdico e 5,0 mL de ácido fosfórico. A mistura foi fervida sob refluxo durante 2h, resfriada e diluída a 100 mL com água destilada. A solução apresentou uma coloração esverdeada.
- b) Solução de carbonato de sódio 20% (m/V): foram dissolvidos 200g de carbonato de sódio anidro em 1000 mL de água destilada a  $70 \pm 10^\circ\text{C}$ . A solução foi filtrada após 24 horas e sempre que apresentou precipitação.
- c) Preparo da solução estoque: foram pesados 0,500 g de MPV e transferidos para um erlenmeyer de 250 mL com a boca esmerilhada e foi adicionado 150 mL de água destilada. A preparação foi mantida sob refluxo durante 30 minutos à temperatura de  $85^\circ\text{C}$ , e, em seguida, resfriada à temperatura ambiente. O conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 250 mL e o volume, completado com água destilada. A solução foi deixada em repouso para decantar e em seguida, foi filtrada em papel de filtro, desprezando os primeiros 50 mL, e o restante do filtrado constituiu a solução estoque.
- d) Preparo da solução amostra para PT: Foram diluídos 5 mL da solução estoque para balão volumétrico de 25 mL com água destilada. Em seguida, foram transferidos, volumetricamente, 2 mL desta solução, 1 mL de reagente *Folin-Denis* e 10 mL de água destilada para um balão volumétrico de 25 mL, e então o volume foi completado com solução de carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 29% (p/v). A análise foi realizada em espectrofotômetro UV visível, em comprimento de onda de 760 nm (A1), após 30 minutos, sendo utilizado o pirogalol como substância de referência.

- e) Solução amostra para polifenóis não adsorvidos por caseína (FNT): cerca de 10,0 mL da SE foi adicionada ao agente precipitante (caseína) e submetida a agitação em erlenmeyer de 125 mL durante 60 minutos. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro e 5,0 mL do filtrado foi diluído com água destilada em balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, 2,0 mL desta solução, 1,0 mL de reagente *Folin-Denis* e 10 mL de água destilada foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com solução de carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 29% (m/v). Após 30 minutos, absorvância correspondente a fração não-tanante (FNT) foi mensurada em 760 nm ( $A_2$ ) utilizando água destilada para ajuste do zero.
- f) Preparo da Solução padrão: cerca de 50,0 mg do padrão de referência (pirogalol) foi dissolvido em 100 mL de água destilada. Em seguida, 5,0 mL da solução padrão foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com o mesmo solvente. Por fim, 2,0 mL dessa solução, 1,0 mL de reagente *Folin-Denis* e 10,0 mL de água destilada foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com solução de carbonato de sódio a 29% (m/v). Após 30 minutos, a absorvância da solução padrão foi mensurada em 760 nm ( $A_3$ ) utilizando água destilada para ajuste do zero.

O teor de taninos totais foi calculado em porcentagem de taninos, expressos em g% de padrão, segundo a equação abaixo:

$$TT = \frac{62,5 \times (A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$$

Cujo, TT = teor de taninos totais em g% de pirogalol;  $A_1$  = absorvância da solução amostra para polifenóis totais;  $A_2$  = absorvância da solução amostra para polifenóis não adsorvidos em pó de pele;  $A_3$  = absorvância da solução padrão;  $m_1$  = massa da amostra utilizada no ensaio, em gramas, considerando a determinação de água;  $m_2$  = massa do padrão, em gramas.

### 4.3 Obtenção e caracterização físico-química da solução extrativa (SE)

A SE foi obtida por infusão a partir da MPV, durante um período de 15 minutos, em uma relação droga:solvente de 7,5% p/v, utilizando água destilada como solvente de

extração e posteriormente filtrada (COSTA, 2012). A SE foi caracterizada conforme os ensaios discriminados a seguir.

#### 4.3.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada utilizando cerca de 10 mL da solução extrativa de *L. ferrea* em potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão de seis determinações independentes (BRASIL, 2010).

#### 4.3.2 Determinação da densidade relativa

A análise da densidade relativa foi realizada em picnômetro de 25 mL, previamente tarado através da aferição do mesmo vazio e contendo água destilada. Em seguida foi determinada a massa do picnômetro contendo a solução extrativa. A densidade foi calculada em relação a densidade da água de acordo com a equação abaixo (BRASIL, 2010).

$$d \text{ relativa} = \frac{mSE - mp}{mH_2O - mp}$$

Cujo,  $d$  = densidade relativa;  $mSE$  = massa de solução extrativa;  $mH_2O$  = massa da água;  $mp$  = massa do picnômetro vazio.

#### 4.3.3 Determinação do resíduo seco

Uma alíquota de 20,0 g de solução extrativa foi pesada em pesa-filtro previamente tarado. Em seguida, foi evaporada, até secura total, em banho-maria. O pesa-filtro contendo o resíduo sólido foi colocado em estufa a  $105^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por 2 horas, em seguida foi colocado em dessecador para arrefecimento por 20 minutos e pesado. Esse procedimento foi repetido de uma em uma hora até atingir peso constante. O resultado foi expresso em relação a 100 g da solução extrativa (BUNDESVEIREINIGUNG, 1986; BRASIL, 2010).

#### 4.3.4 Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Este ensaio foi realizado em parceria com o Laboratório P&D Farmacêutico e Cosmético da Universidade Federal do Pará (UFPA). Na análise por espectroscopia da região do infravermelho da SE, os espectros foram obtidos por meio do equipamento de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) *Attenuated total reflectance* (ATR-acoplado) (Shimadzu IRPrestige-21), equipado com detector DLATGS (sulfato de triglicina deuterado dopado com L-alanina), através do software de aquisição IR Solution<sup>®</sup>. As leituras foram realizadas na faixa de absorção em comprimento de onda de 600 a 4000 cm<sup>-1</sup> (SAMPAIO et al., 2015).

#### 4.3.5 Determinação do teor de fenois totais

A concentração de fenois totais da SE foi quantificada pelo método descrito por BONOLI et al. (2004) com algumas modificações. Foram realizados cálculos de diluição a fim de obter uma solução à 1 mg/mL. Uma alíquota de 10 µL do extrato (1mg/mL) mais 50µL da solução *Folin-Ciocalteu* (1:10) foram adicionados em microplacas de 95 poços e incubadas, durante 8 minutos no escuro, passado este tempo, 240 µL de carbonato de sódio a 0,4% foi adicionado e novamente incubado por 3 minutos. Como controle negativo foi utilizado o reagente de *Folin-Ciocalteu* juntamente com Carbonato de Sódio e para padrão inibitório foi utilizado o ácido gálico. Em seguida, foi realizada a mensuração da absorbância em 620 nm no leitor de ELISA, modelo DTX800, marca Beckman Coulter. Os resultados foram obtidos utilizando-se o cálculo a seguir:

$$\text{Determinação de fenois totais} = \frac{[(\text{abs do extrato} - \text{abs do branco}) \times 100]}{\text{abs do padrão}}$$

#### 4.4 Obtenção e caracterização do Extrato Seco por Aspersão (ESA)

O ESA foi obtido através da secagem por aspersão da solução extrativa aquosa das vagens de *L. ferrea* em equipamento *Mini Spray Dryer* (modelo MSD 1.0 da Labmaq). O Extrato Seco por Aspersão (ESA) que foi utilizado no experimento foi

desenvolvido e padronizado previamente por COSTA (2012) e otimizado por MARINHO (2016). Sua obtenção foi realizada em condições similares conforme a Tabela 1.

**Tabela 1** - Parâmetros de secagem no Mini *Spray Dryer*.

Parâmetros	Valores
Temperatura de Entrada	120° C
Fluxo de alimentação	6,5 mL/min
Diâmetro do aspersor	1,0 mm

#### 4.4.1 Avaliação das características macroscópicas

As características macroscópicas foram avaliadas pela observação visual da cor e aspecto do produto (DE SOUZA, 2005).

#### 4.4.2 Rendimento Operacional

O rendimento operacional foi determinado pela pesagem do produto seco obtido no final da secagem e comparação com o teor de sólidos contidos na solução extrativa a ser seca, incluindo o percentual de adjuvante de secagem adicionado, conforme a fórmula descrita abaixo:

$$\text{Rendimento operacional (\%)} = \frac{RT}{Msd} \times 100$$

Cujo, RT = rendimento teórico (%); Msd= massa coletada no coletor do spray (g);

#### 4.4.3 Análise do teor de umidade em balança com infravermelho

Seguindo a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010) com modificações, a umidade residual foi determinada em balança de secagem por infravermelho. Previamente foi retirada a umidade do aparelho e cerca de 0,5 g de ESA foram pesados e distribuídos uniformemente no coletor de alumínio contido no aparelho. O aparelho foi acionado e o valor da umidade foi anotado em percentual.

#### **4.4.4 Análise das partículas em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

O extrato seco foi previamente depositado e montado de modo adequado em suporte porta-amostras do MEV (“*stub*”) com fita dupla face e submetidos a um processo de metalização com um filme de ouro. Após, foi realizada a análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para obtenção das microfotografias.

#### **4.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho**

Na análise por espectroscopia da região do infravermelho do ESA, os espectros foram obtidos por meio do equipamento de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (Shimadzu IRPrestige-21). As leituras foram realizadas na faixa de absorção em comprimento de onda de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Cerca de 1 mg das amostras foram comprimidas com 99 mg de KBr (SAMPAIO et al., 2015).

#### **4.4.6 Determinação do perfil cromatográfico do ESA por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

As análises de CLAE foram realizadas no Laboratório BIOPHAR (FCF/UFAM). Para o preparo do extrato seco, foram pesados 250 mg e diluídos com água ultrapura para balões volumétricos de 25 mL, obtendo soluções a 10 mg/mL. Uma alíquota de 2,5 mL das soluções obtidas foi transferida para balões volumétricos de 25 mL e o volume aferido com água ultrapura, obtendo solução a 1 mg/mL.

As análises foram conduzidas em mesmo equipamento e condições cromatográficas conforme descrito no item 4.2.5 para quantificação dos marcadores químicos na droga vegetal.

#### **4.4.7 Validação da metodologia analítica para a quantificação de ácido gálico e ácido elágico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

##### **4.4.7.1 Linearidade**

A faixa de trabalho foi determinada através de duas curvas utilizando as soluções padrões com seis níveis de calibração (2,4,8,16,32,64  $\mu\text{g/mL}$  para ácido gálico e ácido

elágico). A análise foi realizada em triplicata. A linearidade foi realizada através da análise das curvas de ambos os padrões e calculada a partir da equação de regressão linear:

$$y = ax + b$$

cujo, y = a resposta medida; x = concentração; a = inclinação da curva de calibração; b = interseção com o eixo y.

#### 4.4.7.2 Precisão

A precisão foi determinada a partir da repetitividade de resultados (6 injeções de cada padrão a 100% de sua concentração), utilizando a curva da faixa de trabalho. A análise foi realizada em triplicata.

#### 4.4.7.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada a partir do cálculo de recuperação média através da adição de quantidades conhecidas de ácido gálico e ácido elágico em triplicata em três níveis de concentração baixa (2 µg/mL), média (16 µg/mL) e alta (64 µg/mL) no extrato seco de *L. ferrea*. A análise foi realizada em triplicata.

A equação recuperação dos analitos é dada por:

$$Rec = \frac{Co}{Ct} \times 100$$

em que, Rec: é a recuperação (%); Co: concentração obtida (µg/mL); Ct: concentração teórica (µg/mL);

### 4.4.8 Determinação de polifenóis totais

#### 4.4.8.1 Método Folin-Denis

A determinação de PT foi realizada por método espectrofotométrico (Adaptado de ARAÚJO et al, 2014; FARMACOPEIA BRASILEIRA V, 2010):

- a) Preparação da solução estoque: Foram diluídos cerca de 50 mg de PSA em 100 mL de água destilada.

- b) Preparação da solução amostra para PT: Foram diluídos 5 mL da solução estoque para balão volumétrico de 50 mL com água destilada. Foram transferidos, volumetricamente, 2 mL dessa solução, 1 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 10 mL de água destilada para balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com solução de carbonato de sódio anidro a 29% (m/v). As medidas foram realizadas em espectrofotômetro UV visível, em comprimento de onda de 760 nm, após 30 minutos, sendo utilizado o pirogalol como substância de referência e utilizando água destilada para ajuste do zero. Os PT foram calculados de acordo com a Equação 3:

$$PT = \frac{A1.FD}{A\%1cm.(m - p)}$$

cujo, PT= Percentual de Polifenóis Totais (g%); A1= Absorbância de PT; FD=Fator de diluição; m= massa da MPV (g); p= perda por dessecação da MPV (g%); A%1cm = Coeficiente de absorção do pirogalol (6611,1). O ensaio foi realizado em triplicata e o resultado expresso como média e desvio padrão.

#### 4.4.8.2 Método *Folin-Ciocalteu* em leitor de ELISA

A concentração de fenóis totais do ESA foi quantificada pelo método descrito por BONOLI et al. (2004) com algumas modificações seguindo a mesma metodologia conforme descrito no item 4.3.5 na determinação da solução extrativa.

#### 4.4.9 Sequestro de radicais DPPH•

Para avaliar o potencial antioxidante do ESA sobre o DPPH•, foi avaliada a reação entre diferentes concentrações do extrato seco e a solução alcoólica de DPPH• segundo o método descrito por MOLYNEUX (2004) adaptado para microplacas. Foram pesados 2 mg de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH, Sigma Co., USA) e dissolvidos em 12 mL de álcool etílico absoluto, e as soluções teste dos derivados a 50 µg/mL. A fim de conhecer a absorbância dos brancos específicos, em uma placa de 96 poços foram adicionados 30 µL das diluições dos derivados e 270 µL de álcool etílico. Para o teste, foram adicionados 30µL da diluição do ESA e 270µL da solução de DPPH e a placa foi incubada ao abrigo da luz à temperatura ambiente durante 30 minutos, decorridos os quais, foi realizada a leitura e, mensurada a redução do radical livre DPPH• a 517 nm no Leitor de Elisa,

modelo DTX800, marca BeckmanCoulter. Como controle negativo foi utilizado 30µL de DMSO e 270µL de solução de DPPH•. Os resultados foram expressos em porcentagem de captura do radical DPPH•. O cálculo da porcentagem de inibição do DPPH• foi realizado de acordo com a equação:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - \frac{(\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco})}{(\text{Absorbância do controle})} \times 100$$

#### 4.4.10 ABTS•+

A atividade antioxidante do ESA sobre o ABTS•+ [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] foi determinada utilizando-se o método de RE *et al.* (1999), modificado. Inicialmente, uma mistura aquosa de ABTS•+ (7 mmol. L<sup>-1</sup>) e persulfato de potássio (2,45 mmol.L<sup>-1</sup>) foi incubada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 16h. A solução formada de ABTS•+ foi diluída em etanol a uma absorbância de 0,70 (734 nm). O ensaio foi realizado com 1000µL da solução de ABTS•+ para 10 µL de cada concentração de extrato (200 a 0,10 µg/mL). Após 10 min, alíquotas de 200 µL foram transferidas para microplacas de 96 orifícios e incubadas por 30 min à temperatura ambiente e a redução do ABTS•+ pelos extratos foi observada no comprimento de onda 750 nm em leitor de microplaca. A partir dos valores das absorbâncias obtidos foi calculada a CI50. O Trolox® foi a substância utilizada como controle antioxidante. O ensaio foi realizado em triplicata. O cálculo da porcentagem de inibição do ABTS•+ foi realizado de acordo com a equação:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - \frac{(\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco})}{(\text{Absorbância do controle})} \times 100$$

#### 4.4.11 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método Alamar Blue® conforme a metodologia de AHMED; GOGAL & WALSH (1994) a fim de verificar a viabilidade celular de linhagens MRC-5 após exposição por 24, 48 e 72h de extrato seco das vagens de *L. ferrea*. O alamar blue, identificado como resazurina, é um indicador fluorescente/ colorimétrico com propriedades redox, que como ocorre com os sais de

tetrazólio, reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). Em placa de 96 poços, as células de MRC-5 foram plaqueadas na concentração de  $0,5 \times 10^4$  células por poço. Após 24 horas de incubação e aderência das células, elas foram tratadas com o ESA nas concentrações de 100 µg/mL. Passados os tempos de tratamento, foram adicionados 10µL da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4% 1:20 em meio de cultura), ou seja, da resazurina na respectiva triplicata de tratamento. Após o tempo de metabolização da resazurina (3h), foi realizada a leitura da fluorescência. A viabilidade foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{Média da Absorbância da amostra}}{\text{Média de Absorbância do controle negativo}} \times 100$$

#### 4.4.12 Atividades biológicas *in vitro*

Esses ensaios foram realizados apenas com fins de caracterização e confirmação das atividades biológicas descritas para o ESA de *L. ferrea*.

##### 4.4.12.1 Inibição de $\alpha$ -glucosidase

A atividade inibitória de  $\alpha$ -glucosidase foi baseada na metodologia de ANDRADE-CETTO et al. (2008). O extrato seco foi diluído (1mg/mL) em dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO), e foi realizada a reação em microplaca com a solução de enzima preparadas do extrato cetônico de intestino de mamífero. Após, seguirão para o Leitor de Elisa para obter os valores das absorbâncias a 405 nm. Com a adição do reagente de cor, foram realizadas leituras a cada 5 minutos, até o tempo de 30 minutos. Os valores obtidos em leitor de microplaca foram convertidos em percentual de inibição, conforme a equação a seguir:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \left( \frac{\text{abs final} - \text{abs inicial da amostra}}{\text{abs final} - \text{abs inicial do controle}} \right) \times 100$$

cujo, abs = absorbância.

#### 4.4.12.2 Inibição de $\alpha$ -amilase

Para o teste de  $\alpha$ -amilase foi utilizada a metodologia de SUBRAMANIAM et al. (2008), com adaptações. O ESA foi diluído (1mg/mL) em dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO), e a reação das substâncias diluída com a enzima foi realizada em microplaca. Foi adicionado 30 $\mu$ L do inibidor na concentração de 1mg/mL, após incubação durante 5 min à 37°C, foi adicionado 170 $\mu$ L do substrato (Amilase CNPG Liquiform®). A primeira leitura foi realizada em absorvância (abs) de 405nm. Em seguida, a microplaca foi homogeneizada e incubada a 37°C de 20-40 minutos, até que a absorvância do controle alcance 0,8 a 1,00  $\pm$ 0,1. Após a incubação, a segunda leitura foi realizada em leitor de ELISA em absorvância de 405 nm. Os resultados foram expressos em % de inibição e a  $CI_{50}$  calculada por meio da seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \left( \frac{\text{abs final} - \text{abs inicial da amostra}}{\text{abs final} - \text{abs inicial do controle}} \right) \times 100$$

#### 4.4.12.3 Inibição de lipase

O ensaio foi realizado segundo a metodologia de SLANC et al. (2009), adaptado. A substância isolada foi diluída em dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO), partindo de 1 mg/mL e seguindo-se em diluições seriadas. Foi adicionado 30  $\mu$ L do inibidor na concentração de 1mg/mL. Posteriormente, foi adicionado 250  $\mu$ L da solução da enzima de lipase pancreática de suíno, e foi incubado por 5min a 37 °C. Após a adição do reativo de cor p-nitrophenyl palmitate substrate (PNP) e incubação foi realizada a primeira leitura dos testes em leitor de ELISA (*Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*) em absorvância (abs) de 405nm. A microplaca foi incubada (20min – 40min, 37°C, 120 rpm) acompanhando-se com leituras sucessivas até que a absorvância do controle alcance a faixa de 0,8-1,00 $\pm$ 0,1. A segunda leitura foi realizada após a incubação. A atividade foi expressa em concentração necessária para inibir 50% ( $IC_{50}$ ).

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \left( \frac{\text{abs final} - \text{abs inicial da amostra}}{\text{abs final} - \text{abs inicial do controle}} \right) \times 100$$

#### 4.4.12.4 Atividade antimicrobiana

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e no Laboratório de Micologia Médica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

##### 4.4.12.4.1 Teste difusão em ágar

A atividade antimicrobiana foi avaliada frente às cepas de (CBAM 0324), obtida da coleção de bactérias da Amazônia (CBAM), do laboratório de Biodiversidade da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Daêne e *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* resistente à meticilina ATCC 43300 (MRSA) da coleção do Laboratório de Micologia Médica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

O ensaio da técnica de difusão em ágar foi realizado de acordo com a norma M7-A6 (CLSI, 2003), com modificações. As colônias foram ressuspensas em solução fisiológica (0,9%) até atingir uma turbidez equivalente 0,5 na escala de McFarland, em que cerca de 50 µL de amostra foi pipetado em poços através da técnica de difusão em ágar proposto por SAMPAIO et al. (2009), testando diferentes concentrações do extrato. No ensaio foram utilizados como controle os antibióticos vancomicina e oxacilina. Os resultados foram expressos através do halo de inibição. A análise estatística, ANOVA seguida do Teste de Tukey foi realizada utilizando o *software* Statistica (Statsoft®).

##### 4.4.12.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição segundo a metodologia de diluição em caldo pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). As colônias foram ressuspensas em solução fisiológica (0,9%) até atingir uma turbidez equivalente 0,5 na escala de McFarland. As placas de 96 poços estéreis foram preparadas com 150 µL de caldo BHI e 150 µL do produto a ser testado seguido de diluições seriadas, cada inóculo de bactéria foi transferido para poços e levados à estufa a 35°C por 24 horas. A CIM foi a menor concentração da solução onde não houve crescimento bacteriano visível.

#### 4.5 Desenvolvimento de formulações semissólidas pomadas

As formulações foram estabelecidas de acordo com um estudo piloto. Foram elaborados diferentes tipos de base de pomadas com fundamento na Farmacopeia Americana (USP, 2006) e Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), a fim de verificar a base mais apropriada para a incorporação de diferentes concentrações (2,5%, 5% e 7,5%) do ESA de *Libidibia ferrea*. Foram testados diferentes tipos de incorporações, como a dissolução do ingrediente sólido (extrato seco de *L. ferrea*) em um solvente (aquoso) para subsequente incorporação da solução à base para pomada e pelo método de levigação utilizando diferentes tipos de agentes (propilenoglicol, glicerina).

Antes da preparação do produto, todos os cuidados relacionados às boas práticas de manipulação foram providenciados, para evitar possíveis contaminações da formulação. As matérias-primas que foram utilizadas na manipulação das bases de pomadas estão dispostas na tabela 3.

**Tabela 3** – Matérias-primas utilizadas para obtenção das bases-pilotos.

Matéria-prima	Função
Vaselina sólida	Agente de consistência
Óleo mineral	Emoliente
Álcool cetosteárilico	Agente emulsificante, tensoativo
Lanolina	Agente emulsificante
Cera branca	Agente de consistência
Cera de abelha	Agente de consistência
BHT	Antioxidante
Propilenoglicol	Agente de levigação Umectante
Lauril sulfato de sódio	Tensoativo
Parabenos	Conservante
Água	Veículo

#### **4.5.1 Estudos de estabilidade**

A fim de selecionar a base apropriada, foram realizados estudos para verificar a influência do ESA na consistência e estabilidade da pomada. Os testes foram realizados conforme o Guia de Estabilidade para Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004) e Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos, seguindo normas preconizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

#### **4.5.2 Estudo de pré-estabilidade**

Todas as formulações desenvolvidas foram submetidas ao teste de centrifugação, as quais foram pesados 5g da pomada de *L. ferrea*, acondicionadas em tubos de ensaio de vidro e levados à centrífuga (modelo 80-2B, CENTRIBIO<sup>®</sup>, Brasil) a 3000 rpm durante 30 minutos, à temperatura ambiente, para observação de uma possível separação das fases. As amostras que se mantiverem estáveis seguirão para os próximos testes de estabilidade (BRASIL, 2004).

#### **4.5.3 Estabilidade preliminar**

##### **4.5.3.1 Estresse térmico**

Para este teste foram pesados 5 gramas de cada amostra em tubos de ensaio de vidro e submetidas ao aquecimento em banho-maria (modelo Q334M, QUIMIS<sup>®</sup>), na faixa de temperatura de 40° C a 80° C, com aumento da temperatura de 5 em 5°C, e mantidos nestas temperaturas por 30 minutos (MARUNO, 2009). As amostras foram avaliadas macroscopicamente a cada aumento de temperatura e ao término, à 80° C.

##### **4.5.3.2 Ciclo gelo-degelo**

No ciclo gelo-degelo, as amostras em tubos de metal foram armazenadas em temperaturas alternadas, de 40°C ± 2°C durante 24 horas e 8°C ± 2°C, também por 24 horas durante o período de 4 semanas. Foram realizados testes físico-químicos (espalhabilidade, densidade e pH) nos tempos (T), em dia, 0, 1, 7, 14, 21 e 28, totalizando 4 semanas (BRASIL, 2004).

#### **4.5.4 Teste de estabilidade acelerada**

As formulações que se mantiveram estáveis durante os testes de estabilidade preliminar, foram divididas em três partes. A primeira foi acondicionada em temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), e foi o controle do teste; a segunda, em estufa ( $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e a terceira, em geladeira ( $8^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) (BRASIL, 2004). Este estudo terá duração de 90 dias, onde foram realizados testes organolépticos (aspecto, odor e cor) e físico-químicos (espalhabilidade, viscosidade e pH) nos tempos (T), em dia, 0, 1, 7, 15, 30, 60 e 90.

#### **4.5.5 Testes organolépticos**

Foram observados visualmente o estado em que se encontrará a amostra em estudo por meio de análises comparativas com uma amostra considerada padrão, ainda a ser definida, com o objetivo de verificar alterações como: separação de fases, aspecto, aparência, consistência, cor e odor (BRASIL, 2008).

#### **4.5.6 Testes físico-químicos**

##### **4.5.6.1 Determinação do pH aparente**

O pH foi aferido através de um pHmetro digital (modelo 2a58629 HANNA<sup>®</sup>, Alphaville, SP, Brasil) calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 (PróQuímios, Brasil). Por tratar-se de formulação semissólida, as amostras foram diluídas em água destilada na proporção de 1:10, em seguida homogeneizadas por meio do vortex, transferidas para o tubo de ensaio e levados para a análise no pHmetro. Este procedimento foi realizado semanalmente durante 30 dias e o resultado foi expresso através da média de três determinações sucessivas (BRASIL, 2008; LEONARDI et al., 2002).

##### **4.5.6.2 Determinação da densidade**

Para a realização do teste foi utilizado um picnômetro metálico limpo, seco e previamente calibrado. A calibração foi realizada a partir da determinação da massa do picnômetro vazio e da massa com seu conteúdo com água, recentemente destilada e fervida a  $20^{\circ}\text{C}$ . Em seguida as amostras foram transferidas para o picnômetro, feito o ajuste da temperatura  $20^{\circ}\text{C}$  e quando necessário remover o excesso do produto antes de

ser pesado. O peso das amostras foi determinado através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio (BRASIL, 2010).

#### 4.5.6.3 Teste de Espalhabilidade

Para a determinação da espalhabilidade, foi empregado método das placas paralelas, proposta por KNORST (1991). No equipamento utilizado, uma placa molde circular de vidro foi colocada sobre uma placa-suporte de vidro posicionada sobre uma escala milimetrada e uma fonte luminosa. A amostra foi introduzida no orifício da placa molde e a superfície nivelada com uma espátula. A placa molde foi cuidadosamente retirada e sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro de peso conhecido. Após um minuto, foi realizada a leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra, em duas posições opostas, com auxílio da escala do papel milimetrado. Posteriormente, foi calculado o diâmetro médio. O procedimento foi repetido acrescentando-se sucessivamente outras placas, em intervalos de um minuto, registrando-se a cada determinação a superfície abrangida e o peso da placa aplicado. A espalhabilidade máxima foi considerada como o ponto no qual a adição do peso não ocasionou alterações significativas nos valores da espalhabilidade. Os resultados foram expressos de acordo com a equação abaixo, pela média de três determinações.

$$Ei = d^2 \times \frac{\pi}{4}$$

Cujo,  $Ei$  = espalhabilidade da amostra para um determinado peso ( $\text{mm}^2$ );  $d$  = diâmetro médio (mm).

### 4.5.7 Comportamento reológico

#### 4.5.7.1 Viscosidade

A determinação da viscosidade aparente e do comportamento reológico foi realizado utilizando um reômetro Brookfield® R/S-SST Plus™ acoplado a um banho-maria. O comportamento reológico das formulações contendo extrato seco de *L. ferrea* e das formulações brancas (sem conter o ativo) foram analisados em triplicata. O tempo de corrida, para cada ensaio, foi programado para dois minutos para a corrida ascendente e dois minutos para a corrida descendente, obtendo-se 20 pontos de taxa de deformação

*versus* taxa de cisalhamento constante, sendo o ensaio realizada à temperatura de  $24 \pm 2$  °C. Utilizou-se o *spindle* do tipo placa-placa P25/30. Os dados fornecidos pelo equipamento foram referentes a tensão de cisalhamento e taxa de deformação através do software Rheo 3000.

#### **4.5.8 Atividade antimicrobiana**

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Micologia Médica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

##### **4.5.8.1 Teste difusão em ágar**

A atividade antimicrobiana foi avaliada frente às cepas de (CBAM 0324), obtida da coleção de bactérias da Amazônia (CBAM), do laboratório de Biodiversidade da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Daêne e *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* resistente à meticilina ATCC 43300 (MRSA) da coleção do Laboratório de Micologia Médica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

O ensaio da técnica de difusão em ágar foi realizado de acordo com a norma M7-A6 (CLSI, 2003), com modificações. As colônias foram ressuspendidas em caldo salina estéril (0,9%) ou Mueller-Hinton (MH) até atingir uma turbidez equivalente 0,5 na escala de McFarland. Após ajuste, foi realizada a diluição do inóculo bacteriano em meio Mueller-Hinton (1:100) a fim de se obter a concentração bacteriana de  $1,5 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Cerca de 100 uL de amostra foi pipetado em poços através da técnica de difusão em ágar. No ensaio foram utilizados como controle os antibióticos vancomicina e oxacilina. Após a absorção do líquido pelo meio de cultura, as placas foram invertidas e incubadas a 37°C durante 18 horas. Após, foi verificado a possível formação de halo de inibição de crescimento. Os resultados foram expressos como a menor concentração necessária para a formação do halo de inibição. A análise estatística, ANOVA seguida do Teste de Tukey foi realizada utilizando o *software* Statistica (Statsoft®).

##### **4.5.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição segundo a metodologia de diluição em caldo pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*

(CLSI, 2013). As colônias foram ressuspensas em solução salina estéril (0,9%) até atingir uma turbidez equivalente 0,5 na escala de McFarland.

Para o preparo dos poços a fim de avaliar a atividade antimicrobiana das formulações. A solução do extrato preparada em concentração dobrada (3200 µg/ mL) caindo no primeiro poço para 800 µg/mL, em relação à concentração inicial definida em volumes de 100 µL foi diluída seriadamente 1:2 em caldo Müeller-Hinton (MH) e depois colocados 10 µL da suspensão de bactérias, sendo que, desta forma, as diluições finais dos extratos variaram entre 800 e 0,196 µg.mL<sup>-1</sup> e a concentração final de bactéria ficou em 7,5 x 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Para o controle negativo foi utilizado somente o caldo MH e para o controle positivo caldo MH e 10 µL da suspensão de bactérias. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas.

Para o preparo dos antibióticos, as concentrações de oxacilina e vancomicina testadas foram 0,19 à 50 µg/mL, com um inóculo na concentração de 5x10<sup>5</sup> UFC/mL. Utilizou-se como controle de qualidade cepas American Type Culture Collection (ATCC), a oxacilina é o agente de preferência para testes de resistência a metilina/oxacilina, como controle resistente à oxacilina foi utilizada a cepa *S. aureus* ATCC 43300. Segundo as normas do CLSI, cepas com MIC para oxacilina nas concentrações de ≤ 2 µg/mL são consideradas sensíveis à toda classe de fármacos beta-lactâmicos enquanto em MIC ≥ 4 µg/mL, as cepas são consideradas resistentes à classe.

#### **4.5.9 Sequestro de radicais DPPH•**

Para avaliar o potencial antioxidante do ESA sobre o DPPH•, foi avaliada a reação entre diferentes concentrações do extrato seco e a solução alcoólica de DPPH• segundo o método descrito por MOLYNEUX (2004) adaptado para microplacas. Foram pesados 2 mg de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH, Sigma Co., USA) e dissolvidos em 12 mL de álcool etílico absoluto, e as soluções teste dos derivados a 50 µg/mL. A fim de conhecer a absorvância dos brancos específicos, em uma placa de 96 poços foram adicionados 30 µL das diluições dos derivados e 270 µL de álcool etílico. Para o teste, foram adicionados 30µL da diluição do ESA e 270µL da solução de DPPH e a placa foi incubada ao abrigo da luz à temperatura ambiente durante 30 minutos, decorridos os quais, foi realizada a leitura e, mensurada a redução do radical livre DPPH• a 517 nm no Leitor de Elisa,

modelo DTX800, marca BeckmanCoulter. Como controle negativo foi utilizado 30µL de DMSO e 270µL de solução de DPPH•. Os resultados foram expressos em porcentagem de captura do radical DPPH•. O cálculo da porcentagem de inibição do DPPH• foi realizado de acordo com a equação:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - \frac{(\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco})}{(\text{Absorbância do controle})} \times 100$$

#### 4.5.10 Avaliação do teor de princípios ativos nas pomadas

A fim de determinar a quantidade de polifenóis totais (PT) foi realizado pelo método de BONOLI et al. (2004) conforme o item 4.3.5 com as adaptações necessárias levando em consideração se tratar de uma formulação semissólida.

#### 4.5.11 Espectroscopia da Região do Infravermelho

Este ensaio foi realizado em parceria com o Laboratório P&D Farmacêutico e Cosmético da Universidade Federal do Pará (UFPA). Na análise por espectroscopia da região do infravermelho do ESA, os espectros foram obtidos por meio do equipamento de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (Shimadzu IRPrestige-21). As leituras foram realizadas na faixa de absorção em comprimento de onda de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Cerca de 1 mg das amostras foram comprimidas com 99 mg de KBr (SAMPAIO et al., 2015).

#### 4.5.12 Citotoxicidade

As amostras foram solubilizadas na proporção 1:1 em DMSO e tampão fosfato para preparo da solução estoque e separadas em concentrações teste de 1,5625, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL, tendo a doxorrubicina como controle positivo e DMSO como controle negativo. Esse ensaio foi realizado conforme item 4.4.10.

### 4.6 Análise dos dados

Os dados obtidos nos experimentos foram interpretados com auxílio de ferramentas estatísticas aplicáveis em cada caso, tais como ANOVA e teste de Tukey, com auxílio de software Microsoft Excel® e Statistica®.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

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

#### 5.1.1 Tratamento, perda por dessecação e granulometria da MPV vagens de *Libidibia ferrea*

As propriedades do material vegetal são determinantes para que a produção de derivados seja bem-sucedida, devendo-se atentar para diversos aspectos, incluindo o manuseio e armazenamento da matéria-prima, aspectos físico-químicos, tais como teor de umidade, teor de extrativos, teor de princípios ativos ou de marcador químico, quando definido. Estes ensaios além de garantirem a qualidade, são importantes na elaboração e padronização de produtos intermediários como extratos e dos produtos acabados (BRASIL, 2018; GIL, E.S, 2010; SIMÕES, 2003). Para avaliar a MPV (vagens de *L. ferrea*) utilizada no desenvolvimento deste trabalho, a caracterização foi realizada e os resultados estão descritos a seguir.

**Tabela 3** – Caracterização da matéria-prima vegetal (MPV) vagens de *L. ferrea*.

Análise	Resultados $\bar{X} \pm s$ (CV%)	Literatura
Perda por dessecação (%)	10,64 ± 0,375 (3,53)	10,6% (MARINHO, 2014); <14% (BRASIL, 2019).
Granulometria	Pó moderadamente grosso	Classificado de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2019).
	655 µm	200 µm < x < 800 µm (VOIGT & BORNSCHEIN, 1982).

Após o devido tratamento de limpeza e separação de qualquer material estranho que não fazem parte da droga vegetal, foi realizada o processo de secagem do material em estufa de ar circulante a 45°C até estabilização da umidade residual, etapa que pode ser crítica para a sua estabilidade e uniformidade, pois uma umidade elevada pode favorecer o crescimento microbiano, degradação de princípios ativos e decomposição do material vegetal. Na análise do teor de umidade foi obtido o valor de 10,64% ± 0,38 (< 14%) que se encontrou de acordo com a faixa de 8 a 14% estabelecida para drogas vegetais (BRASIL, 2019), fator determinante para sua conservação adequada.

Em seguida, foi realizada a moagem em moinho de facas, com o objetivo de reduzir mecanicamente o material vegetal em fragmentos e, assim, prepará-lo para o estágio de extração, o qual o grau de particionamento tem um efeito direto (SIMÕES et al., 2010). Então, as vagens trituradas de *L. ferrea* foram submetidas a tamisação em agitador mecânico para a determinação da distribuição granulométrica, os resultados observados através do histograma (Figura 1) demonstraram que as partículas do material estão distribuídas predominantemente no tamis com abertura de malha de 250  $\mu\text{m}$ , representando 25,93% de todo material. De acordo a Farmacopeia Brasileira, as vagens pulverizadas de *L. ferrea* foram classificadas como pó moderadamente grosso (BRASIL, 2010).

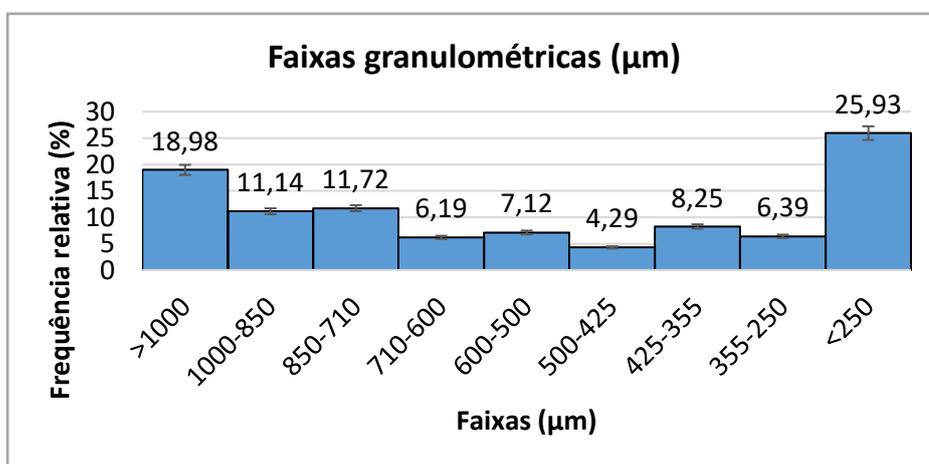


Figura 1 – Histograma de distribuição da MPV.

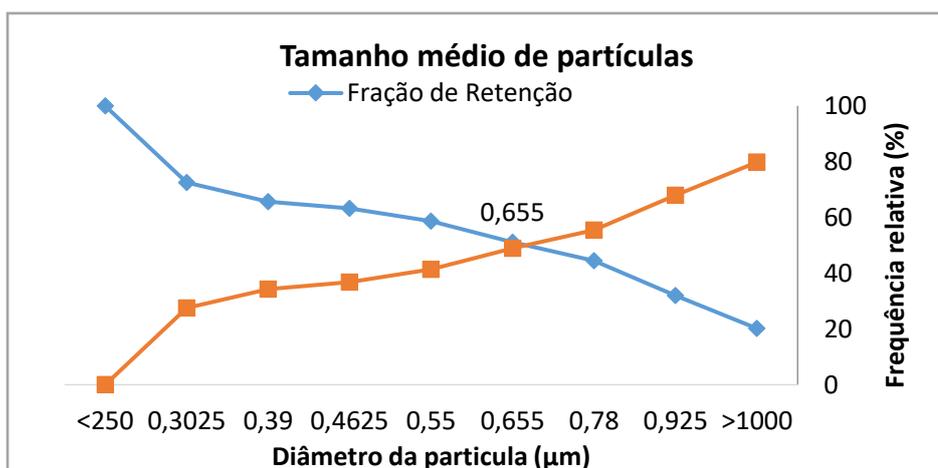


Figura 2 – Curva de retenção e passagem da MPV.

O tamanho médio de partícula é importante para garantir a reprodutibilidade do processo extrativo, uma vez que a superfície de contato entre o líquido extrator e a droga

vegetal influencia na extração (LIST e SCHMIDT, 1989). Ao plotar as curvas de retenção e passagem das vagens de *L. ferrea* (Figura 2), obteve-se o tamanho médio de partículas de 655  $\mu\text{m}$ . De acordo com VOIGT & BORNSCHEIN (1982), quando a droga rasurada tem diâmetro médio de partícula muito pequeno (menor que 200  $\mu\text{m}$ ), a filtração e conseqüentemente, o conteúdo das substâncias ativas pode ser comprometido. Da mesma forma, um diâmetro médio de partícula muito grande (acima de 800  $\mu\text{m}$ ) pode dificultar a extração, impedindo que o líquido extrator penetre em todas as células do material, o que pode comprometer a qualidade dos extratos obtidos.

### 5.1.2 Teor de cinzas totais, Índice de Intumescência e Teor de extrativos da MPV vagens de *Libidibia ferrea*.

**Tabela 4** – Teor de cinzas totais e teor de extrativos da matéria-prima vegetal (MPV).

Análise	Resultados $x \pm s$	Literatura
Teor de cinzas totais (%)	$2,39 \pm 0,003$	No máximo 4% (BRASIL, 2010a)
Índice de Intumescência	$1,6 \pm 0,058$	-
Teor de extrativos (g%)	$51,09 \pm 0,559$	-

A MPV está dentro do limite especificado de 4% para o teor de cinzas totais pelo compêndio oficial da monografia de Jucá (frutos). Este teste tem como objetivo determinar a porcentagem de substâncias inorgânicas, oriundos de impurezas que incluem as cinzas fisiológicas, derivadas de tecido vegetal, e as não-fisiológicas, como materiais estranhos, tais como resquícios de pedra, areia ou terra aderidos à superfície da droga. O teor de cinzas totais na MPV *L. ferrea* apresentou o percentual de  $2,39\% \pm 0,003$  ( $< 4\%$ ).

A MPV *L. ferrea* também foi caracterizada quanto ao Índice de Intumescência da Droga vegetal, que está geralmente relacionado à presença de gomas, mucilagens, pectina ou hemicelulose. Este parâmetro relaciona a medida do aumento do volume em mL ocupado pelo material vegetal em água, obtendo-se o valor de  $1,6 \pm 0,058$ , ou seja, é ocupado um volume de 1,6 mL a cada 1 g de material vegetal, indicando baixa presença quando comparada a espécie rica de mucilagem como a *Malva sylvestris* L, recomendada com índice de no mínimo 15 (BRASIL, 2019; GIL, 2010).

O teor de extrativos (TE) é um teste utilizado para verificar a capacidade da água em extrair as substâncias hidrossolúveis como aminoácidos, açúcares, mucilagens e flavonoides presentes no material vegetal. Apesar de que não há um parâmetro definido para esta espécie, o resultado obtido de 51,09% indica que a água é um eficiente solvente para extração destas substâncias. Ao comparar com outra espécie, como por exemplo, a planta *Endopleura uchi* nos estudos de LIMA (2009), esta atingiu valores de TE considerados baixos de 6,54% e 8,70%, sugerindo a necessidade de seleção de um solvente mais adequado à extração de substâncias, como o etanol, utilizado em seu estudo.

Vale ressaltar que o método de extração para *L. ferrea* utilizando água como líquido extrator possibilita que os taninos, substâncias fenólicas majoritárias e de grande importância na atividade biológica desta espécie, sejam devidamente extraídos, uma vez que apresentam solubilidade em água e em solventes orgânicos polares (MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. & ARAÚJO, E, 2005).

### 5.1.3 Caracterização química da MPV vagens de *Libidibia ferrea*.

Uma etapa essencial para a segurança e eficácia de sua utilização na elaboração de produtos farmacêuticos fitoterápicos é a análise do teor dos principais componentes biologicamente ativos em matérias-primas de origem vegetal. A caracterização química da MPV *L. ferrea* foi realizada quanto ao teor de polifenóis totais, teor de taninos totais e quantificação do marcador químico ácido gálico. A monografia oficial da droga vegetal, que consiste em frutos secos de *Libidibia ferrea*, preconiza o conteúdo de no mínimo 9,0% de taninos totais, e, no mínimo, 1,0% de ácido gálico (BRASIL, 2019). Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

**Tabela 5** – Caracterização química da matéria-prima vegetal (MPV).

Análise	Resultados $\bar{x} \pm s$	Literatura
Polifenóis totais (PT) (%)	5,67% $\pm$ 0,59	5,10% $\pm$ 0,06 (MARINHO, 2016) 7,3% (SAMPAIO et al., 2009)
Taninos Totais (TT) (%)	11,70% $\pm$ 0,88	Mínimo de 9,0% (BRASIL, 2019)
Teor de Ácido Gálico (%) (p/p)	6,40% $\pm$ 0,08	Mínimo de 1,0% (BRASIL, 2019)

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários mais abundantes nas plantas, caracterizados com uma estrutura química comum que compreende um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxila e exercem um amplo espectro de bioatividades, como efeitos antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatórios, anticancerígenos, entre outros (XU, C.C. et al, 2017). Com base nesse aspecto, foi realizado a análise do teor de PT da MPV de *L. ferrea* pelo método farmacopeico obtendo-se o percentual de 5,67% polifenóis totais expressos em pirogalol, valor semelhante foi encontrado MARINHO (2016) que obteve o valor de 5,10% para a mesma espécie e metodologia aplicada. No estudo de SAMPAIO et al. (2009), utilizando extrato hidrometanólico bruto de *L. ferrea*, foi obtido valor ligeiramente superior de 7,3%.

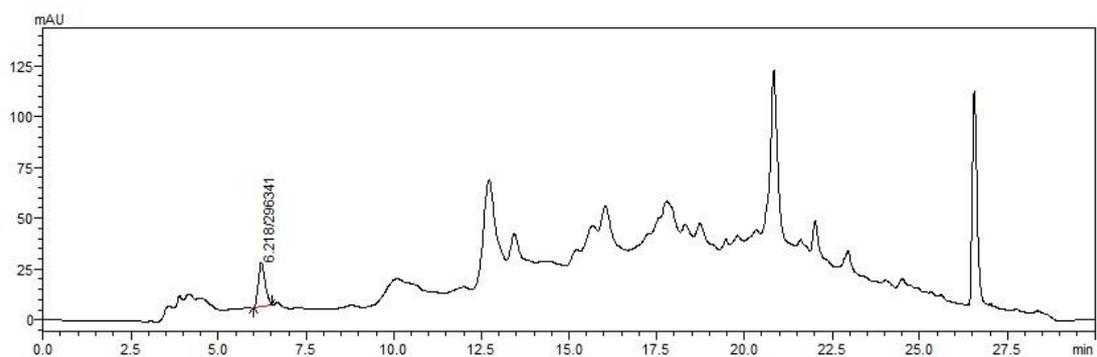
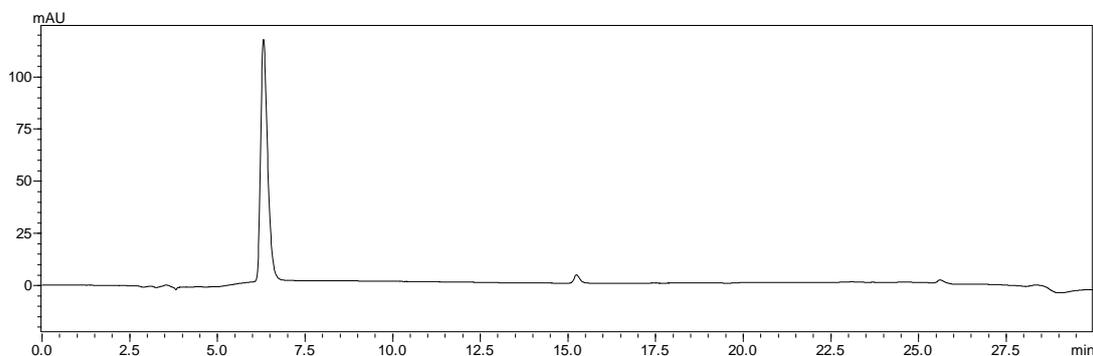
Em relação ao teste de taninos totais, o agente precipitante pó-de-pele (100 mg) utilizado na fase de preparação da solução de polifenóis não-adsorvidos, designado pela Farmacopeia Brasileira (2019), foi substituído pela caseína, devido ao seu menor custo e por apresentar maior interação com taninos se utilizado em uma concentração maior de 200 mg, como demonstrados nos estudos de GALVÃO (2018). A caseína com a função de precipitar os taninos contidos na amostra de *L. ferrea* possibilitou a quantificação por diferença de absorbância dos polifenóis totais, demonstrando um resultado satisfatório (Tabela 5). É de importância ressaltar que os taninos possuem esta habilidade de precipitar proteínas e outras macromoléculas, e, esta capacidade está relacionada com seus efeitos biológicos antimicrobiano e cicatrizante, por formar um complexo tanino-proteína sobre tecidos epiteliais lesionados (MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. & ARAÚJO, E, 2005).

Em síntese, a partir de diferentes tomadas de amostras, foi realizado o doseamento de Taninos Totais por espectrometria UV/Vis, obtendo-se valores na faixa de 10,55 a 12,09% (Tabela 4), concluindo que há 11,70% de taninos totais expressos em pirogalol encontrado na amostra de vagens de *L. ferrea*, acima do mínimo de 9,0% estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (2019). Valores semelhantes foram encontrados no estudo de GALVÃO (2018), que obteve a quantificação de taninos entre as vagens ( $13,55 \pm 0,047$  até  $14,59 \pm 0,148$  g%) e cascas de caule (de  $12,07 \pm 0,199$  até  $12,67 \pm 0,070$  g%) de *L. ferrea*.

**Tabela 6** – Teor de Taninos da matéria-prima vegetal (MPV).

Identificação	Absorbância $x \pm s$				Teor de Taninos Totais (g%)
Polifenóis totais (g%)	0,591±0,005	0,607±0,005	0,723±0,007	0,711±0,005	
Polifenóis não adsorvidos (g%)	0,1126±0,005	0,098±0,002	0,145±0,002	0,175±0,001	11,70 ± 0,88 (7,53)
TT (g%)	10,55	11,54	12,62	12,09	

O perfil cromatográfico em 275 nm da MPV vagens de *L. ferrea* pode ser visualizado na figura 3. O pico de ácido gálico apresentou o tempo de retenção ( $T_R$ ) em torno de 6,21 min, semelhante ao  $T_R$  do padrão de 6,31 min (figura 4). A partir da equação farmacopeica foi possível determinar o teor de 6,40% de ácido gálico para a amostra, estando dentro da especificação na monografia de *L. ferrea* a ser cumprida, cujo valor mínimo deve ser de 1% (BRASIL, 2019).

**Figura 3** – Perfil cromatográfico da MPV vagens de *L. ferrea*.**Figura 4** – Cromatografia da substância de referência ácido gálico ( $T_R = 6,31$  min).

## 5.2 Caracterização química, física e físico-química da solução extrativa (SE) das vagens de *Libidibia ferrea*

### 5.2.1 Densidade relativa, pH e resíduo seco da solução extrativa de *L. ferrea*

A SE das vagens de *L. ferrea* foi caracterizada e os resultados obtidos para densidade aparente, pH e resíduo seco estão descritos na tabela 7.

**Tabela 7** – Densidade relativa, pH e resíduo seco da SE de vagens de *L. ferrea*.

Análise	Resultados $x \pm s$	Literatura
Densidade relativa	$1,0138 \pm 0,0003$	1,01 (BARAKAT, 2011) 1,01 (MARINHO, 2016)
pH	$3,7156 \pm 0,0299$	3,35 a 3,42 (BARAKAT, 2011) 3,5 (MARINHO, 2016)
Resíduo seco (g%)	$2,8308 \pm 0,0293$	2,32 a 2,77 g% (BARAKAT, 2011) 2,1 g% (MARINHO, 2016)

A SE de *L. ferrea* apresentou pH ácido de 3,72, semelhante ao obtido por MARINHO (2016) = 3,5 e BARAKAT (2011) = 3,35 a 3,42. Este resultado indica um produto estável, já que os constituintes fenólicos, substâncias majoritárias, possuem estabilidade em pH ácido (SIMÕES et al., 2007). A densidade relativa foi de 1,01, fato esperado, visto que o solvente de extração utilizado foi água destilada, de natureza ácida e a densidade igual a 1.

A partir do valor de resíduo seco é possível inferir no rendimento da operação de secagem, calculado em relação à massa teórica de sólidos totais presentes. O resultado do resíduo seco obtido 2,83g%, significando que 100g da solução extrativa origina uma solução com 2,83g de substâncias sólidos solúveis. Valor semelhante foi encontrado para SE de vagens de jucá no estudo de BARAKAT (2016), no qual obteve teor de sólidos solúveis igual a 2,32g% a 2,77g% e apresentou um rendimento satisfatório de 76,36% na operação de secagem sem adjuvante.

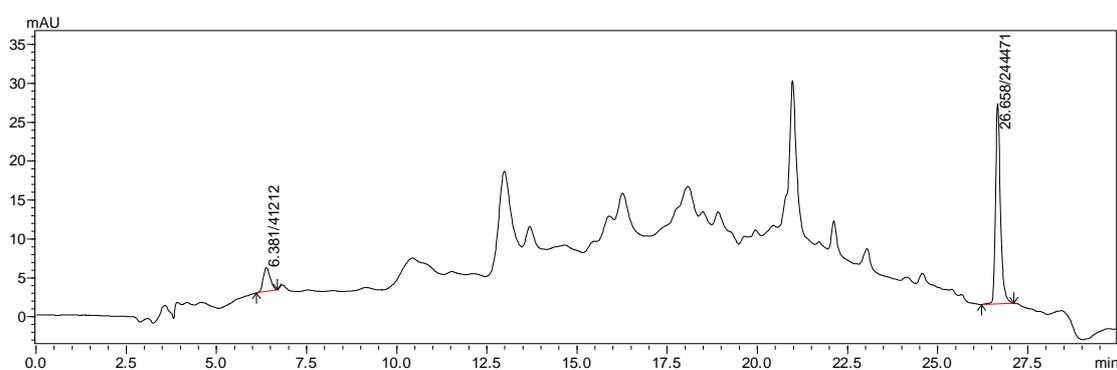
### 5.2.2 Caracterização química da solução extrativa de *L. ferrea*.

**Tabela 8** - Caracterização química da SE vagens de *L. ferrea*.

Análise	Resultados $\bar{x} \pm s$
Teor de Polifenóis Totais (PT)	17,03% $\pm$ 0,11 151,16 $\pm$ 3,19 $\mu\text{g Eq \u00c1c g\u00e1lico/mL}$
Teor de \u00c1cido G\u00e1lico	0,1378 g% $\pm$ 0,0191 1,3776 mg/g $\pm$ 0,1907
Teor de \u00c1cido El\u00e1gico	1,1939 g% $\pm$ 0,0999 11,9394 mg/g $\pm$ 0,9988

O teor de PT da SE de *L. ferrea* encontrado foi de 17,03% e 151,16  $\mu\text{g}$  equivalentes de \u00e1cido g\u00e1lico por mL de solu\u00e7\u00e3o extrativa. Valor considerado semelhante foi encontrado nos resultados de FERREIRA et al. (2019), na faixa de 10,75 a 37,85 %, que utilizou extrato aquoso vagens de juc\u00e1 coletadas em diferentes regi\u00f5es do Brasil. Essa vari\u00e2ncia de PT encontrada pode ser justificada por diferen\u00e7as nas t\u00e9cnicas de an\u00e1lise empregadas, assim como as diferentes propor\u00e7\u00f5es de subst\u00e2ncias qu\u00edmicas que dependem da origem de cada material vegetal, segundo influ\u00eancias edafoclim\u00e1ticas, tais como habitat, pluviosidade, luminosidade, solo, entre outros (GOBBO-NETO & LOPES, 2007; KLEIN, 2010).

A quantifica\u00e7\u00e3o dos marcadores qu\u00edmicos em HPLC, como pode ser observado no perfil cromatogr\u00e1fico em 275 nm (Figura 5), foi identificada a presen\u00e7a do \u00e1cido g\u00e1lico ( $T_R = 6,3$  min) e \u00e1cido el\u00e1gico ( $T_R = 26,6$  min) na solu\u00e7\u00e3o extrativa. Obtendo-se o teor de 1,3776 mg/g para \u00e1cido g\u00e1lico e maior teor para o \u00e1cido el\u00e1gico, com 11,9394 mg/g.

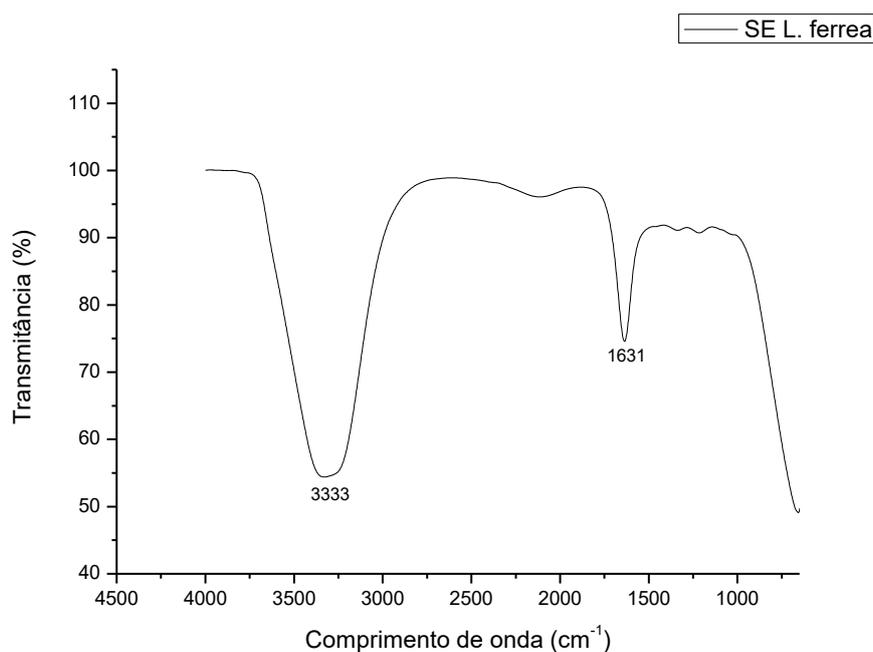


**Figura 5** – Perfil cromatogr\u00e1fico da SE de *L. ferrea*.

Valor consideravelmente maior ao encontrado na quantificação de ácido gálico nos estudos de DE ARAÚJO, SOARES & FERREIRA et al (2014), utilizando as cascas de *L. ferrea* coletadas no estado de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. Foram testados o método de turbo-extração por acetona:água (7:3, v/v) e água a 10% (p/v) por um período de 20 minutos, obtendo-se respectivamente os valores de  $0,013 \pm 1,31$  e  $0,010 \pm 0,49$  expressos em  $\mu\text{g/g}$  de ácido gálico para os extratos.

### 5.2.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho da solução extrativa de *L. ferrea*

O espectro de absorção obtido para SE de vagens de *L. ferrea* está apresentada na figura 6, e as interpretações referentes às bandas de absorção estão na Tabela 9.



**Figura 6** – Espectro na região do infravermelho correspondente a solução extrativa de vagens de *L. ferrea*.

A análise de FTIR revelou um forte sinal na região de  $3333 \text{ cm}^{-1}$ , devido a um estiramento de ligações hidroxilas (O-H), característico de álcoois, compostos fenólicos, ou por ligações de hidrogênio da água, solvente extrator utilizado na preparação da SE. A banda vibracional observada em  $1631 \text{ cm}^{-1}$ , sugere a presença de ligações duplas, pelas vibrações de alongamentos dos grupos C=O. Este fato pode estar relacionado a

deformações de anéis aromáticos, ou aos flavonóides (GIL, E. S., 2010; OLIVEIRA et al, 2016). Essas bandas também foram identificadas por GRISI et al (2020) ao analisar o extrato das vagens de jucá, estando alinhado ao fato de que apresentam um alto teor de compostos fenólicos.

**Tabela 9** – Bandas de absorção na região do Infravermelho da SE vagens de *L. ferrea*.

Bandas de absorção (cm <sup>-1</sup> )	Vibrações características
3333	C-H
1631	C = C

### 5.3 Caracterização química, física e físico-química do extrato seco (ESA) das vagens de *Libidibia ferrea*.

#### 5.3.1 Características macroscópicas, rendimento operacional, umidade residual e atividade de água (Aw) do ESA das vagens de *Libidibia ferrea*.

O ESA padronizado foi caracterizado e os resultados estão descritos a seguir. Em relação às características macroscópicas (Figura 7), o extrato seco por aspersão se apresentou de cor marrom claro e odor característico da espécie, sendo um pó fino com aglomerações. De acordo com BHANDARI, DATTA & HOWES (2013), a recirculação de partículas finas recuperadas do separador de ciclone para a zona de atomização no equipamento de *Spray dryer* pode causar esse fenômeno de aglomeração.



**Figura 7** - ESA de vagens de *L. ferrea* (Fonte: O autor).

**Tabela 10** – Rendimento operacional, Umidade residual e Atividade de água ( $A_w$ ) do ESA de vagens de *L. ferrea*.

Análise	Resultados $\bar{x} \pm s$	Literatura
Rendimento (%)	76,26 $\pm$ 8,36	82,91% (COSTA, 2012) 76,1% (MARINHO, 2016)
Umidade residual (%)	6,80 $\pm$ 0,79	< 8% (PRISTA, 2003) 6,7% (COSTA, 2012) 7,6% (MARINHO, 2016)
Atividade de água ( $A_w$ )	0,19 $\pm$ 0,02	< 0,75 (BRASIL, 2019)

O rendimento de secagem obtido foi de 76,26%. Segundo BHANDARI, DATTA & HOWES (2013) *apud* VIDOVIĆ et al. (2014), a recuperação de 50% ou mais no processo de secagem por *Spray dryer* é considerado eficiente em escala laboratorial. No entanto, considerando o valor teórico esperado de 100%, pode-se avaliar diversas variáveis interferentes que ocasionam em perdas do rendimento operacional. Um fator relevante é a perda do produto durante o processo por “*sticking*”, ou seja, aderência de partículas nas paredes da câmara de secagem e ainda, mais especificamente, devido às características do extrato de jucá, uma matriz biológica complexa que apresenta substâncias dentre as quais são glicosiladas, e que conseqüentemente podem aumentar a adesão do extrato ao equipamento, além de influenciar na higroscopia do produto seco (BHANDARI, DATTA & HOWES, 2013; OLIVEIRA & PETROVICK, 2010).

Quanto ao teor de umidade, o ESA de jucá apresentou valor de umidade residual de 6,8%, semelhante ao de COSTA (2012) = 6,7% e MARINHO (2016) = 7,6% que utilizaram cascas e vagens de jucá, respectivamente. De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2019), em geral, um extrato seco possui uma perda por dessecação não superior a 5% (p/p). E conforme PRISTA (2003), um pó deve apresentar valores inferiores a 8%, uma vez que teores de umidade acima do especificado possibilitam o desenvolvimento de fungos e bactérias, hidrólise e atividade enzimática com conseqüente deterioração de constituintes químicos, sugerindo desta maneira que o ESA se mantenha bem acondicionado e armazenado. No entanto, este parâmetro não é suficientemente informativo em relação à sua estabilidade. Outro critério que pode ser considerado quanto à susceptibilidade de contaminação microbiana, seria o resultado de determinação de atividade de água ( $a_w$ ).

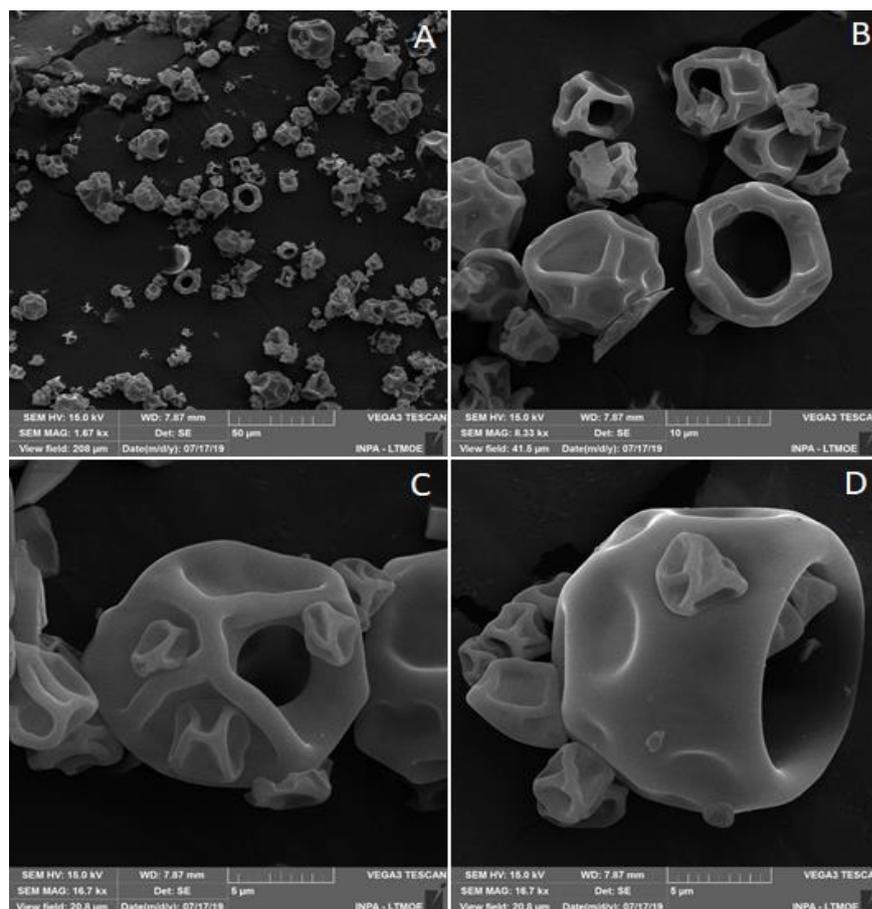
Conforme PENA & FERREIRA (2003), o teor de umidade é expresso pelo valor obtido na determinação da água total contida em uma amostra e esse valor não fornece indicações de como está a distribuição da água nesse material. É a atividade de água ( $a_w$ ), uma medida da quantidade de moléculas de água livre com valores que variam numericamente de 0 a 1, que fornece informação sobre: crescimento microbiano, estabilidade química e bioquímica, propriedades físicas e vida útil (DAMODARAN, PARKIN & FENNEMA, 2010).

A água livre refere-se à umidade de superfície, presente nas macromoléculas como amido, pectina, celulose e proteína por forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio. Esta está disponível para o crescimento microbiano e reações químicas, e pode ser evaporada com facilidade no processo de secagem. À vista disso, a secagem por *Spray Dryer* apresenta uma tecnologia promissora por reduzir a taxa de sobrevivência de culturas sensíveis quando submetidas ao calor (MARTINS et al., 2019). Já a água ligada, é encontrada no interior, associada quimicamente com outras substâncias da amostra e é mais difícil de ser eliminada. Por meio dessa disponibilidade de água podem ser previstas reações químicas, enzimáticas e atividade microbiológica podendo afetar diretamente na conservação e vida de prateleira. Contudo, a velocidade de crescimento dos microrganismos diminui com a atividade de água, podendo até sofrer paralisação completa em  $A_w < 0,6$ , variando com o tipo de microrganismo (CELESTINO, 2010; DAMODARAN, PARKIN & FENNEMA, 2010). Segundo a Farmacopeia Brasileira (2019), a baixa atividade de água, igual ou menor que 0,75, ajuda a prevenir a contaminação microbiana. Portanto, pode-se considerar o valor de  $A_w = 0,19$  para o extrato seco padronizado de jucá satisfatório, pois sugere baixa quantidade de água encontrada na forma livre, e em função disso, o produto pode se manter estável com baixos riscos de desenvolvimento de microrganismos.

### 5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura do ESA

A morfologia das partículas foi avaliada por Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e as fotomicrografias obtidas do extrato seco de vagens de *L. ferrea* mostraram partículas com formato esférico, oca e de superfície rugosa (Figura 8). Essas características também foram descritas por BARAKAT (2011) e COSTA (2014) que obtiveram extratos secos a partir dos frutos e cascas da mesma espécie.

Dependendo da espessura e propriedades da crosta, são produzidos diferentes tipos de materiais secos, como esferas intactas, com superfície imperfeita ou fragmentada, sólidas ou ocas. A formação de esfera oca e rugosa acontece durante a evaporação do solvente do interior da gotícula. Isso ocorre porque a água restante é difundida através da casca ou evaporada por meio das aberturas, levando a partícula oca a entrar em colapso ou enrugar (PETROVICK & OLIVEIRA, 2010; VEHRING & LECHUGA-BALLESTEROS, 2007). De acordo com LOCH-NECKEL et al. (2018), este evento pode ocorrer em temperaturas de secagem mais baixas, quando a superfície das partículas permanece úmida e flexível por um maior tempo, fazendo com que dessa maneira, as partículas fiquem murchas e enrugadas, ao contrário de quando a temperatura é alta o suficiente para a umidade evaporar rapidamente. Outro fator importante é a viscosidade do líquido de alimentação, que está relacionada à concentração de sólidos e influenciam na formação de gotas esféricas.



**Figura 8** – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato seco (ESA) de vagens de *L. ferrea* no aumento de 1670x (A), 8330x (B) e 16700x (C e D).

### 5.3.3 Polifenóis totais (PT) e Atividade antioxidante do ESA de vagens de *L. ferrea*.

**Tabela 11** – Polifenóis totais do ESA de vagens de *L. ferrea*.

Resultados $\bar{x} \pm s$	Método
40,6% $\pm$ 2,96 382,61 ug eq. AG/mL $\pm$ 3,19	BONOLI et al (2004)
10,57% $\pm$ 0,012 16,66 mg/g eq. AG $\pm$ 0,65	Farmacopeia Brasileira (2010)

A partir do extrato seco foram realizadas diferentes análises de polifenóis totais. No método de BONOLI et al (2004), foi obtido o teor de PT em percentual = 40,6% e expresso como equivalente ao ácido gálico = 382,61  $\mu$ g eq. ácido gálico/mL a partir da curva de calibração do padrão (Anexo A) nas concentrações de 7,8125; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000  $\mu$ g/mL ( $y = 0,0014x - 0,1115$  e  $R^2 = 0,9996$ ). Observa-se um aumento da concentração de PT ao comparar o teor do ESA (382,61 ug Eq. Ácido gálico/mL) com o teor da SE de 151,16 ug eq. Ác gálico/mL, a partir do qual foi obtido, indicando que não houve degradação de princípios ativos após o processo de secagem por aspersão.

Inclusive o aumento da concentração de compostos fenólicos após secagem, pode ser justificado, tanto pela polimerização quanto pela síntese de polifenóis em altas temperaturas de secagem, o que aumenta o conteúdo de polifenóis totais do pó (MISHRA, MISHRA & MAHANTA, 2014; CHONG & WONG, 2017). O efeito da temperatura na extensão da polimerização e complexação de compostos fenólicos inicialmente livres também foi relatado por LANG et al. (2019). Outro motivo pode ser devido ao processo de secagem mais rápido em temperatura mais elevada, o que causa menor tempo de exposição e, portanto, menor degradação nos compostos fenólicos termossensíveis (DEMARCHI, RUIZ & CONCELLON, 2013; CHONG & WONG, 2017). Esse fato corrobora com a literatura, em que a temperatura de secagem pode impactar positivamente na composição química, bem como atividade antioxidante (MULTARI, 2018).

Utilizando o método farmacopeico *Folin-Ciocalteu* com leitura em espectrofotômetro de absorção UV-Visível a 760 nm (BRASIL, 2010) e pirogallol com

substância de referência, foi encontrado o teor de PT de 10,57%. Valor aproximado ao comparar com o resultado de MARINHO (2016), no valor de 10,95% para o ESA de vagens de *L. ferrea* que utilizou a mesma metodologia. A Determinação do Conteúdo de Fenóis Totais (*Total Phenolic Conten* - TPC) (ABDELHADY, MOTAAL & BEERHUES, 2011) foi calculada utilizando a curva de ácido gálico (Anexo B), nas concentrações de 1; 2; 4; 8; 16; 32 µg/mL ( $y = 0,0354x - 0,0389$  e  $R^2 = 0,9975$ ), estimando que haja 18,255 miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco de *L. ferrea*.

Os compostos fenólicos estão associados ao potencial antioxidante em várias espécies de plantas. Atuam por diferentes mecanismos, a inativação de espécies reativas de oxigênio e neutralização de estruturas radicalares, doando um átomo de hidrogênio ou um elétron. Essa capacidade é devida principalmente às suas propriedades de oxido-redução, e, pela sua estrutura química formada por pelo menos um anel aromático com grupamentos hidroxilas, que podem desempenhar papel na absorção e neutralização dos radicais livres (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004; SOARES, 2002).

Visto isso, a capacidade antioxidante do ESA foi avaliada pelos métodos dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), baseado na doação de elétrons de uma substância para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir, perde sua coloração púrpura e muda para o amarelo e pela estabilização do radical 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico (ABTS•+), que ocorre através de reação de oxidação entre o sal de persulfato de potássio ( $K_2SO_5$ ), mediante a descoloração da solução (RUFINO et al., 2007). Os resultados estão descritos na tabela 12.

**Tabela 12** – Ensaio de inibição ( $CI_{50}$ ) para DPPH• e ABTS•+.

Análise	Inibição (%) $x \pm s$	$IC_{50}$ (µg/mL) $x \pm s$	Literatura
DPPH•	$80,04 \pm 1,94$	$8,84 \pm 0,22$	4,4 µg/mL (NASCIMENTO et al., 2015) 8,7 µg/mL (BARROS, 2012)
ABTS•+	$99,26 \pm 0,07$	$5,23 \pm 0,11$	2,5 µg/mL (NASCIMENTO et al., 2018)

O potencial antioxidante está correlacionado com a capacidade dos compostos fenólicos de sequestrar radicais livres pela doação de um átomo de hidrogênio ou elétron, e redutor de compostos. Os resultados mostraram que o ESA possui a capacidade antioxidante pelos dois métodos, e que, mesmo em baixas concentrações, os extratos têm

boa capacidade de varrer radicais livres, sendo a capacidade antioxidante pelo método de ABTS•+ mais significativo. No ensaio do radical DPPH• obteve-se  $CI_{50} = 8,84 \mu\text{g/mL}$  e para o ABTS•+, de  $CI_{50} = 4,71 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 12).

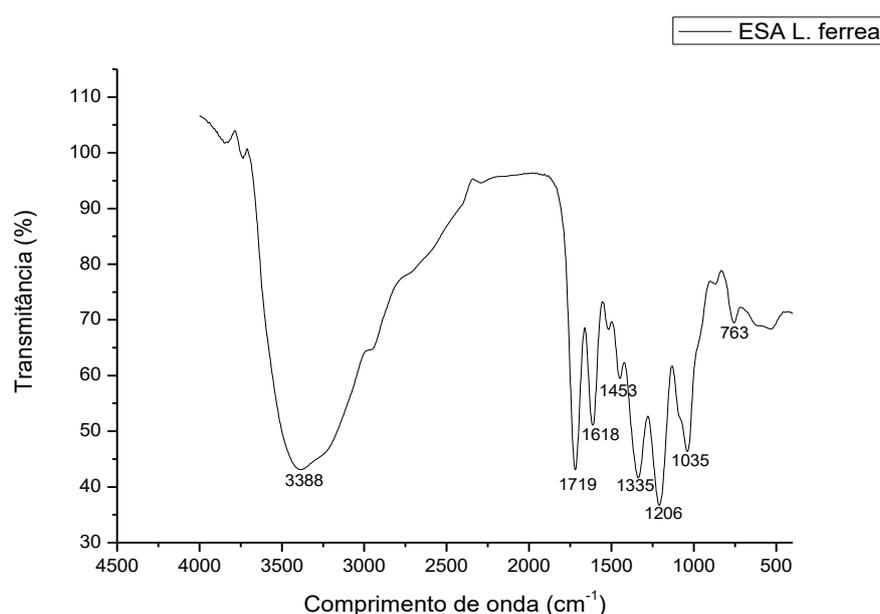
Esses dados corroboram com o estudo de BARROS et al. (2014), que investigaram a atividade antioxidante por DPPH• do extrato seco aquoso 7,5% das cascas e vagens de *L. ferrea* obtendo valores de  $CI_{50}$  de  $7,9 \mu\text{g/mL}$  e  $8,7 \mu\text{g/mL}$  respectivamente. NASCIMENTO et al. (2015), utilizou o extrato etanólico de vagens de *L. ferrea* e demonstrou valores de DPPH• de  $4,4 \pm 0,05$ , e ABTS•+ de  $2,5 \pm 0,06$ , demonstrando alta atividade sequestradora de radicais comparando com o controle.

GRISI et al (2020) apresentou resultados promissores para frutos de jucá, no entanto obtendo pelo método de extração à  $40^{\circ}\text{C}$  durante 2h sob agitação constante e posterior concentração em rota-evaporador, apresentando valor de sequestrador de radical DPPH• de  $2,27 \pm 0,01$  e  $2,91 \pm 0,01$ , respectivamente, para o extrato aquoso 10% e etanol/água 50% (v/v). Portanto, em estudos anteriores a espécie *L. ferrea* se mostrou um bom varredor de radicais livres nos testes *in vitro*.

#### **5.3.4 Espectro na Região do Infravermelho (FTIR) do ESA padronizado de *L. ferrea***

O espectro de FTIR do ESA de jucá é mostrado na figura 9. A análise de FTIR no ESA de *L. ferrea* revelou uma forte absorção na região de  $3388 \text{ cm}^{-1}$ , devido a um estiramento de ligações O-H de álcool, fenóis ou água, utilizada na secagem por aspersão do extrato vegetal. Na absorção na faixa de  $1719 \text{ cm}^{-1}$ , sugere-se a presença de ligações duplas, referente a grupos carbonilas (C=O) de compostos ácidos. A banda em  $1618 \text{ cm}^{-1}$ , sugere vibrações de alongamentos dos grupos C=C devido a deformações do anel aromático ou aos flavonóides. A banda vibracional em  $1453 \text{ cm}^{-1}$  pode estar relacionada a  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ , flavonóides e anéis aromáticos (COOH), e, a absorção na faixa de  $1335 \text{ cm}^{-1}$  que pode referir a vibrações de C-N de aminas, sugerindo a presença de alcalóides, além da banda em  $1206 \text{ cm}^{-1}$  referente a glicosídeos (C-O). Além da absorção ao redor de  $1035 \text{ cm}^{-1}$  a  $763 \text{ cm}^{-1}$  provavelmente correspondente a vibrações do grupo C-O de ésteres, álcoois e ácidos carboxílicos. Tais fatos foram semelhantes ao observados por GRISI et al (2020) e por JOZALA et al (2020), ao analisar extrato das vagens de jucá. A

interpretação do espectro sugere a presença de uma ampla classe de metabólitos secundários, atribuídos a grupos fenólicos em extratos vegetais (ALJAFF, RASHEED & OMER, 2013; DA COSTA et al, 2020; OLIVEIRA et al, 2016). Ao comparar com a SE de jucá, foram detectadas novas bandas vibracionais, que pode estar relacionado ao aumento da concentração de compostos fenólicos após a secagem, pelo efeito da temperatura na extensão da polimerização e complexação de compostos fenólicos inicialmente livres como relatado por LANG et al. (2019).



**Figura 9** – Espectro na região do infravermelho correspondente ao extrato seco de vagens de *L. ferrea*.

### 5.3.5 Validação da análise quantitativa do ácido gálico e ácido elágico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extrato seco de vagens de *L. ferrea*

A validação da metodologia analítica foi realizada visando confirmar e evidenciar que o método produz resultados confiáveis e é adequado a finalidade que se destina (BRASIL, 2017). No presente trabalho, a validação parcial envolveu a quantificação de dois marcadores químicos, ácido gálico e ácido elágico, no ESA padronizado das vagens de *L. ferrea*, produto intermediário ao qual foi utilizado para a formulação final.

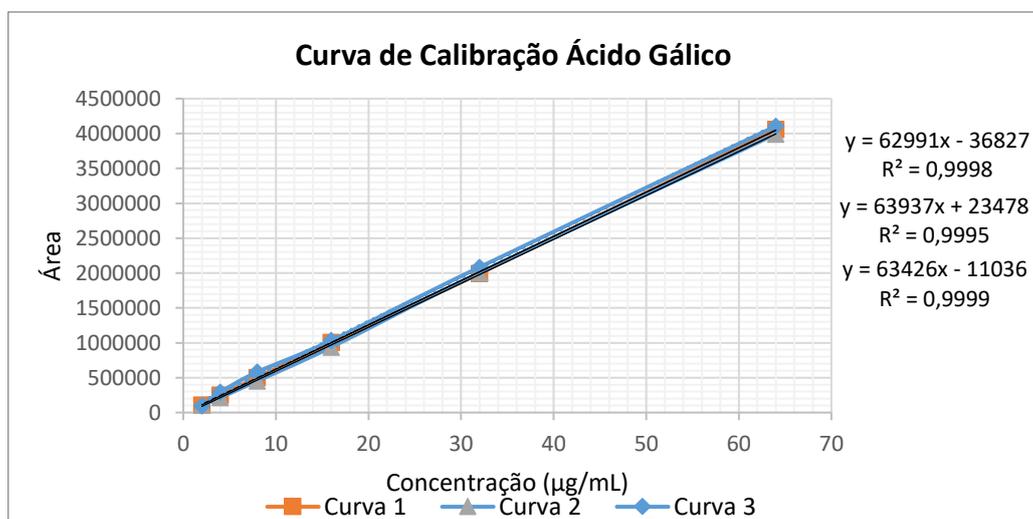
Quando se trata de obtenção de fitoterápicos padronizados, estes dependem da qualidade e uniformidade das matérias-primas vegetais, assim os métodos analíticos

permitem a avaliação da qualidade desses produtos, garantindo a constância de ação terapêutica e segurança. De acordo com KLEIN (2010), os produtos intermediários, como extratos vegetais, são considerados matrizes complexas, e podem ser tratados como bioanalíticos, ou seja, sua composição é tão complexa quanto a composição de matrizes biológicas. Sendo oriundos de um produto natural, oscilações de concentração de ativos são corriqueiras, sendo requerida, portanto, a padronização por meio de marcadores químicos. GIL (2010) aponta que diversas empresas farmacêuticas, como Sanrisil, Centroflora e Herbarium produzem extratos secos padronizados em marcadores específicos, como cáscara-sagrada, passiflora, espinheira-santa e kava kava.

### 5.3.5.1 Linearidade

#### 5.3.5.1.1 Linearidade para o padrão de ácido gálico

A linearidade foi determinada mediante análise do coeficiente de correlação linear (R), obtido pela curva de calibração, foi possível apresentar resultados diretamente proporcionais às concentrações de ácido gálico com  $R > 0,990$  (Figura 10).

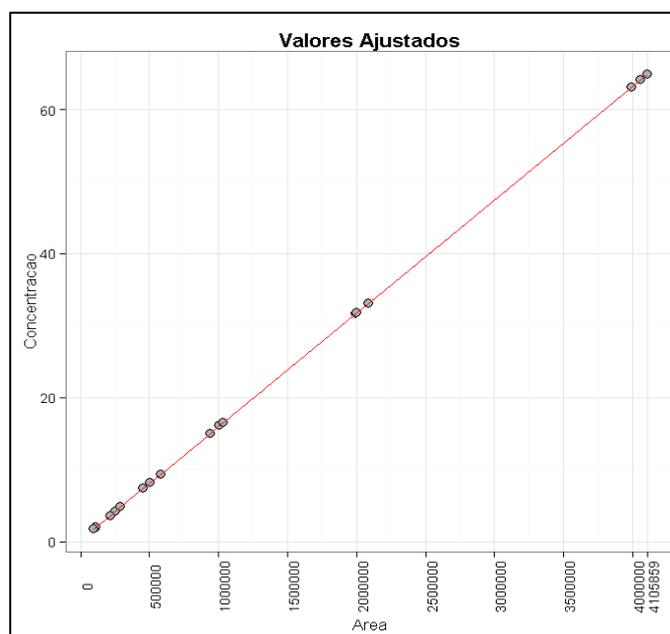


**Figura 10** – Linearidade do padrão de ácido gálico.

**Tabela 13** – Valores referentes à triplicata da curva padrão do ácido gálico.

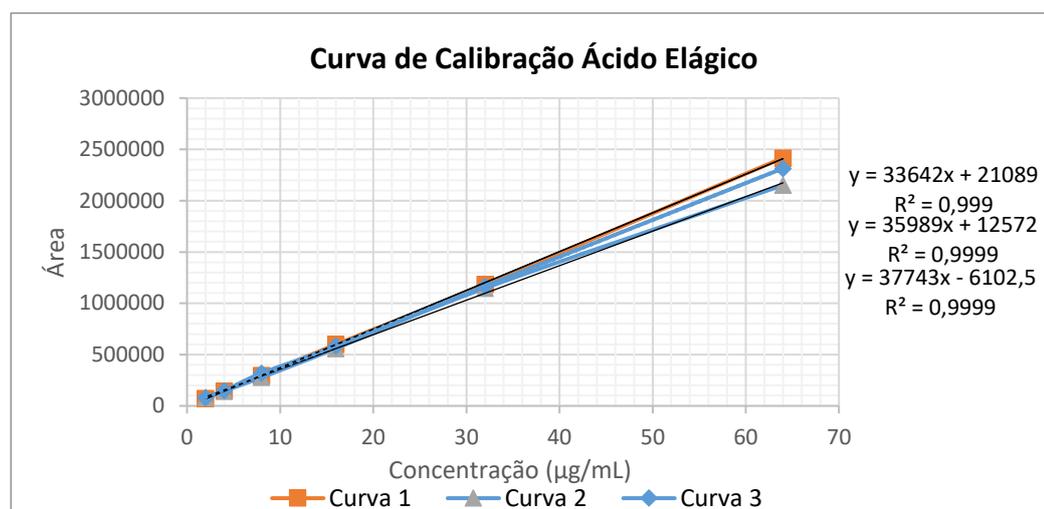
Concentração teórica (µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Média das Áreas	DP	CV (%)
2	108577	112101	97625	106101	7549	33,63461
4	251380	216461	292006	253282	37808	2,203507
8	505717	454400	582798	514305	64628	5,835526
16	1007508	938874	1033976	993453	49084	1,806639
32	1994315	2002368	2084610	2027098	49970	1,255799
64	4057923	3991647	4105859	4051810	57351	0,240595

De acordo com o Diagrama de dispersão (Figura 11) que permite a visualização de uma possível associação entre as variáveis quantitativas, há uma correlação positiva, visto que há uma aglomeração dos pontos em tendência crescente pois conforme a área dos picos aumenta, a outra variável concentração também aumenta.

**Figura 11** – Linearidade do padrão de ácido gálico.

### 5.3.5.1.2 Linearidade para o padrão de ácido elágico

A partir da triplicata da curva de calibração do segundo padrão analisado ácido elágico (Figura 12) foi possível medir o grau de proporcionalidade entre as variáveis. Como o coeficiente de correlação linear (0,999) foi maior que 0,990 (conforme especificado), conclui-se que existe uma relação linear adequada.

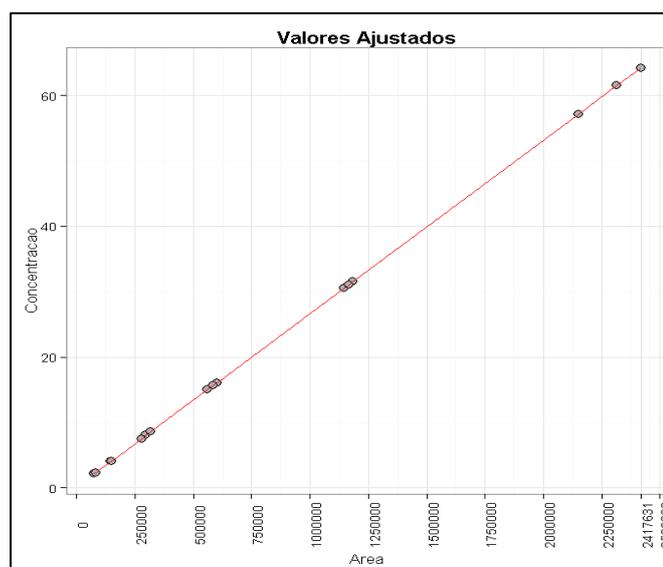


**Figura 12** – Linearidade do padrão de ácido elágico.

**Tabela 14** – Conjunto de dados para Linearidade de Ácido Elágico.

Concentração teórica (µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Média das Áreas	DP	CV (%)
2	74687	82341	80280	79103	3960	5,01
4	145791	146245	147726	146587	1012	0,69
8	297725	277653	318347	297908	20348	6,83
16	599738	560318	583009	581022	19785	3,41
32	1183471	1147506	1165818	1165598	17984	1,54
64	2417631	2151320	2314866	2294606	134307	5,85

Pode-se visualizar que o gráfico do diagrama de dispersão (Figura 13) mostra uma correlação positiva entre as variáveis, em que conforme a área dos picos aumenta, a concentração também aumenta.



**Figura 13** – Linearidade do padrão de ácido elágico.

### 5.3.5.2 Precisão (Repetibilidade e Reprodutibilidade)

A análise dos resultados mostrou precisão do método utilizado tanto a nível de repetibilidade quanto a nível de reprodutibilidade, visto que o coeficiente de variação entre os resultados foram <5%, conforme especificação da ANVISA (BRASIL, 2009; BRASIL, 2017). Os dados de repetibilidade do ácido gálico (tabela 15) e ácido elágico (tabela 16) estão dispostos a seguir, e a estatística resumida na tabela 16.

**Tabela 15** – Dados da reprodutibilidade do método analítico para doseamento de ácido gálico.

A= Dia 1, Analista 1 e B = Dia 2, Analista 2.

Laboratório	Área	Concentração teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração obtida ( $\mu\text{g/mL}$ )
A	2002368	32	31,7441
A	2184537	32	34,6163
A	2084610	32	33,0408
A	2150803	32	34,0844
A	2133415	32	33,8103
A	2106854	32	33,3915
B	4282671	32	32,9401
B	4184432	32	32,2105
B	4180228	32	32,1793
B	4150638	32	31,9595
B	4149443	32	31,9507
B	4305098	32	33,1066

**Tabela 16** – Dados da reprodutibilidade do método analítico para doseamento de ácido elágico. A= Dia 1, Analista 1 e B = Dia 2, Analista 2.

Laboratório	Área	Concentração teórica (µg/MI)	Concentração obtida (µg/mL)
A	1143306	32	30,4536
A	1110823	32	29,5929
A	1177882	32	31,3696
A	1143952	32	30,4707
A	1138368	32	30,3227
A	1166464	32	31,0671
B	2564523	32	31,2508
B	2732774	32	33,2822
B	2488587	32	30,3340
B	2554537	32	31,1302
B	2717190	32	33,0941
B	2728753	32	33,2337

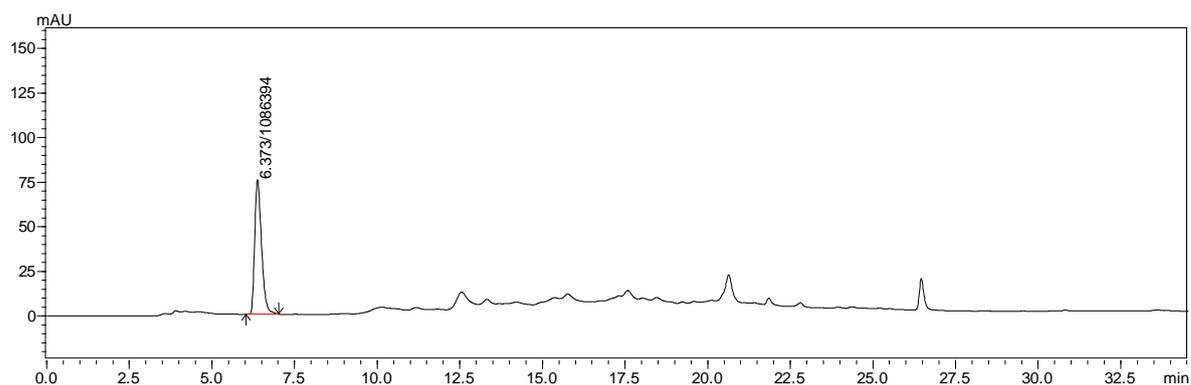
**Tabela 17** – Repetibilidade e Reprodutibilidade do método analítico para doseamento de ácido gálico e ácido elágico; CMD = concentração média experimental; DP= desvio padrão; CV= coeficiente de variação.

	Repetibilidade CMD ± DP (CV)	Reprodutibilidade CMD ± DP (CV)
Ácido gálico	33,4479 ± 0,9973 (2,9817)	32,91951 ± 0,8941 (2,7162)
Ácido elágico	30,5461 ± 0,6200 (2,0299)	31,30013 ± 1,2498 (3,9931)

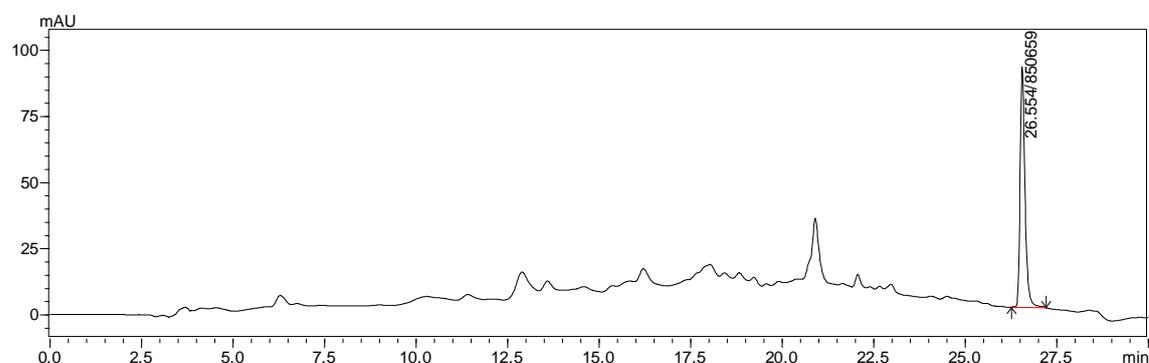
Visto que a reprodutibilidade deve ser obtida por meio da proximidade dos resultados obtidos em laboratórios diferentes, foi realizado o Teste de ANOVA, não encontrando diferenças significativas entre as variáveis, com p-valor > 0,05.

### 5.3.5.3 Exatidão

Para a determinação da exatidão foi utilizado concentrações conhecidas dos padrões de referência adicionadas na amostra de ESA de *L. ferrea*. A tendência foi expressa como recuperação analítica, ao comparar valores medidos (observados) com valores verdadeiros (esperados). Os resultados obtidos pelo teste da recuperação são mostrados nas tabelas 18 e 19 e visualizados nas figuras 14 e 15.



**Figura 14** – Perfil cromatográfico da exatidão, sobreposição dos picos após a contaminação do ESA com o padrão ácido gálico.



**Figura 15** – Perfil cromatográfico da exatidão, sobreposição dos picos após a contaminação do ESA com o padrão ácido elágico.

**Tabela 18** – Resultado do ensaio de exatidão do ácido gálico.

Concentração teórica do padrão (ug/ml)	Valor esperado (padrão + ESA) (ug/mL)	Valor observado (padrão + ESA) $x \pm s$ (ug/ml)	Recuperação (%) $x \pm s$ (CV)
4	5,1445	4,9848 $\pm$ 0,0046	96,8948 $\pm$ 0,0903 (0,0932)
16	16,8143	17,3668 $\pm$ 0,1656	103,2855 $\pm$ 0,9850 (0,9537)
64	65,0337	65,0016 $\pm$ 1,3034	99,9507 $\pm$ 2,0042 (2,0052)

**Tabela 19** – Resultado do ensaio de exatidão do ácido elágico.

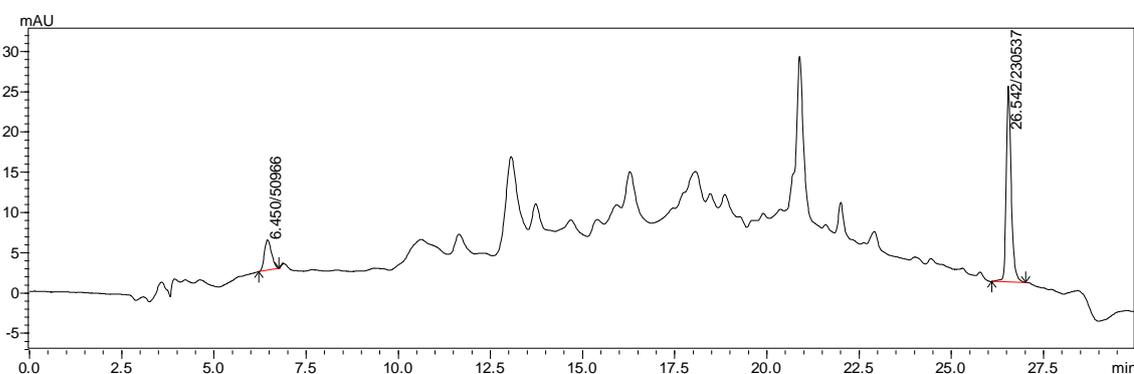
Concentração incorporada do padrão (ug/ml)	Valor esperado (padrão + ESA) (ug/mL)	Valor observado (padrão + ESA) $x \pm s$ (ug/ml)	Recuperação (%) $x \pm s$ (CV)
4	10,3153	10,1384 $\pm$ 0,1526	98,2852 $\pm$ 1,4794 (1,5052)
16	21,8256	22,2933 $\pm$ 0,7460	102,1430 $\pm$ 3,4178 (3,3461)
64	67,2270	65,8912 $\pm$ 0,6046	98,0131 $\pm$ 0,8993 (0,9175)

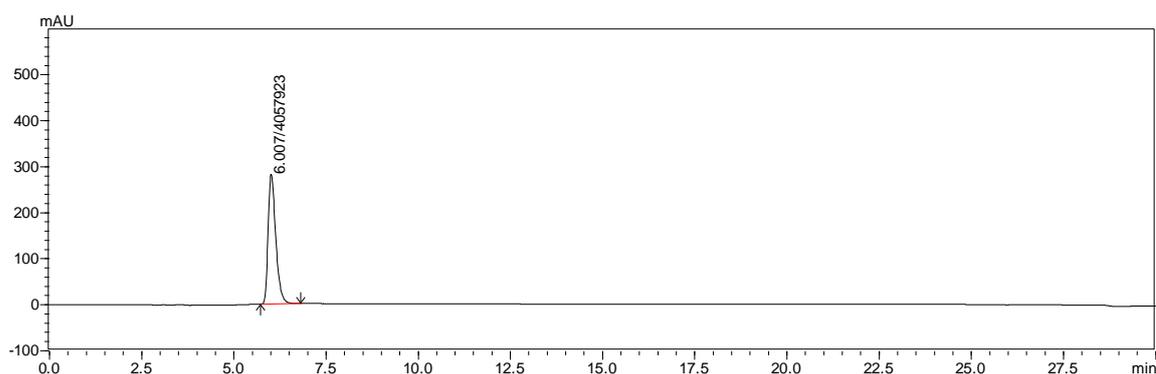
Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, podem ser admitidos valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata. Conforme os dados obtidos, a recuperação ficou entre 98,89 e 103,29% para ácido gálico e 98,01 e 102,14% para o ensaio utilizando ácido elágico, dentro dos critérios de aceitação para matrizes complexas, que exigem taxas de recuperação entre 80 a 120% (BRASIL, 2003).

Logo, o método validado mostrou-se adequado e confiável para a quantificação de ácido gálico e ácido elágico no ESA.

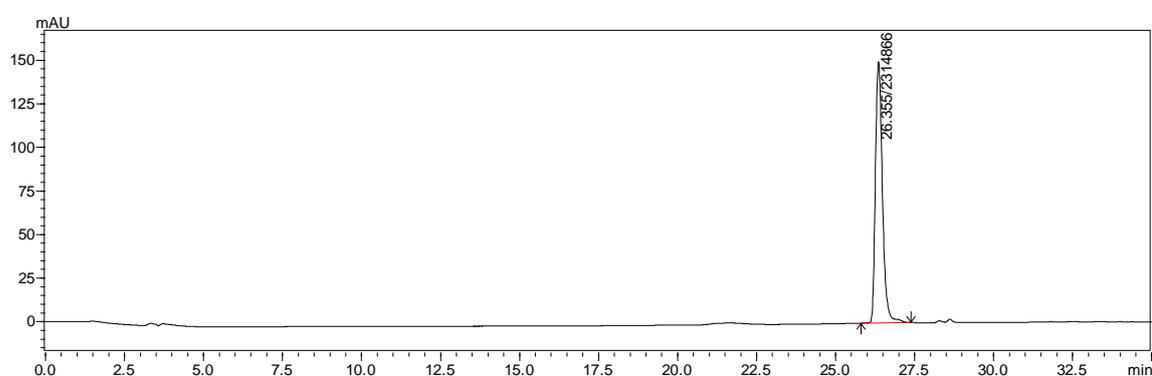
### 5.3.6 Determinação do perfil cromatográfico do extrato seco (ESA) de *L. ferrea*.

O perfil cromatográfico do ESA de *L. ferrea* pode ser visualizado na figura 16, esta apresentou os picos das substâncias de referência ácido gálico e ácido elágico, como pode ser observado separadamente nas figuras 17 e 18.

**Figura 16** – Perfil cromatográfico a 275 nm do extrato seco por aspersão das vagens de *L. ferrea*.



**Figura 17** – Perfil cromatográfico da substância de referência ácido gálico.



**Figura 18** – Perfil cromatográfico da substância de referência ácido elágico.

A quantificação do teor de ácido gálico e elágico o ESA de vagens de *L. ferrea* foi, respectivamente, de 4,04 mg/g e 9,15 mg/g com tempo de retenção médio de 6,10 e 26,17 minutos (Tabela 20). O ESA se mostrou um material rico em ácido elágico, este fato semelhante foi observado nos estudos de FERREIRA et al (2016). Valor consideravelmente maior ao se comparar os resultados de COSTA (2014), que quantificou o teor de ácido gálico no extrato seco por aspersão de cascas de *L. ferrea* obtendo-se o valor de 1,355 mg/g.

**Tabela 20** – Resultado do teor de ácido gálico e ácido elágico e o tempo de retenção ( $T_R$ ) médio para os compostos fenólicos analisados no ESA vagens de *L. ferrea*.

Composto fenólico	Concentração (mg/g) $\bar{x} \pm s$	$T_R$ (minutos) $\bar{x} \pm s$
Ácido gálico	4,0392 $\pm$ 0,1385	6,1002 $\pm$ 0,2376
Ácido elágico	9,1529 $\pm$ 0,3499	26,1672 $\pm$ 0,4148

### 5.3.7 Atividade biológica do extrato seco de vagens de *L. ferrea*.

#### 5.3.7.1 Atividade enzimática do ESA de vagens de *L. ferrea*.

A fim de caracterizar e incluir possíveis mecanismos de ações, foi avaliada a atividade enzimática do ESA e os resultados estão descritos na tabela 21.

**Tabela 21** - Atividade enzimática do ESA vagens de *L. ferrea*.

Análise	Resultados de inibição (%) $\bar{x} \pm s$
$\alpha$ -amilase	2,39 $\pm$ 1,4
$\alpha$ -glucosidade	4,19 $\pm$ 2,2
Lipase pancreática	6,10 $\pm$ 3,78

Algumas enzimas desempenham um papel importante na digestão de carboidratos provenientes da dieta, que necessitam ser hidrolisados antes de serem absorvidos. Uma delas é a  $\alpha$ -glicosidase, enzima da membrana de células intestinais, que é capaz de hidrolisar oligossacarídeos e dissacarídeos em monossacarídeos. Há também a ação pelas  $\alpha$ -amilase que é uma enzima secretada pelas glândulas salivares e pelo pâncreas que podem hidrolisar moléculas de amidos em oligossacarídeos como dissacarídeos e monossacarídeos absorvíveis. A inibição dessas enzimas pode retardar a digestão de carboidratos, causando uma redução na taxa de absorção de glicose no sangue, portanto é uma atividade de interesse à antidiabética e antiobesidade. Outra enzima de interesse é a lipase pancreática, a inibição desta possui a finalidade de reduzir a absorção lipídica, por inibir a digestão e absorção de triglicerídeos, e de proteger o pâncreas que permitirá as células- $\beta$  a produção normal de insulina. Portanto, a inibição dessas enzimas pode ser uma das melhores estratégias para nivelar as excursões glicêmicas pós-prandiais, mimetizar os efeitos da dieta sobre hiperglicemia, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia e, assim, ajuda a evitar o aparecimento de complicações diabéticas tardias. A procura por substância ativa presente em plantas que possa inibir essas enzimas tem sido o alvo de pesquisas (BISCHOFF, H. B. A. G, 2010; KALITA et al., 2018; ZORZIN, F. M., 2014; YOU, QI et al., 2012)

No Brasil, o chá das cascas de *L. ferrea* é usado popularmente no tratamento de diabetes a fim de controlar níveis glicêmicos (OLIVEIRA & SAITO, 1989;

MADALENO, 2011). Em literatura, há relatos que as partes das cascas do caule apresentam esse potencial. Como visto no estudo de COSTA (2012) que avaliou a atividade do extrato seco sem adjuvante de jucá em frente ao ensaio *in vitro* da inibição da  $\alpha$ -glicosidase, e observou que houve inibição significativa da enzima  $\alpha$ -glicosidase ( $CI_{50}= 0,05$  ug/mL) em comparação com extrato seco com adjuvante ( $CI_{50} = 0,21$  a  $0,41$ ). VASCONCELOS et al. (2011) também comprovaram as propriedades hipoglicemiantes do extrato da casca do caule de *L. ferrea* em testes *in vivo*. Outros estudos relatam a atividade de inibição dessas enzimas a partir de extratos de sementes (CAVALHEIRO et al., 2009; LIMA et al., 2013) e folhas de jucá (HASSAN et al, 2015).

Sabe-se que compostos fenólicos são potentes inibidores enzimáticos, mediante sua capacidade de se complexar com proteínas (SIMÕES et al., 2010). No entanto, o extrato seco dos frutos de *L. ferrea* foi avaliado quanto à atividade de inibição da enzima  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase e lipase, não se obtendo resultados satisfatórios (Tabela 18). O ESA de vagens de *L. ferrea* alcançou a percentagem de inibição de 2,39%, 4,19% e 6,10% respectivamente. Resultado possivelmente devido a influência de fatores tecnológicos no processo de extração de substâncias químicas. Um estudo realizado em 2010, com o objetivo de padronizar a solução extrativa de entrecasca dos frutos da *L. ferrea* para uma melhor atividade de inibição da enzima  $\alpha$ -glucosidase, constatou que 7,5% de matéria-prima vegetal e etanol 50% como líquido extrator apresentou o maior percentual de inibição (RODRIGUES, LIMA & DE SOUZA, 2010).

#### 5.3.7.2 Atividade antimicrobiana do ESA frente à *S. aureus*.

Percebendo-se o potencial farmacológico dos frutos de *L. ferrea* e visando um produto fitoterápico, inicialmente a atividade antimicrobiana foi realizada no intuito de padronizar a concentração do extrato seco perante a um microrganismo relevante para o tratamento de feridas, no caso, o *Staphylococcus aureus*. O *S. aureus* é uma bactéria presente na microbiota humana, principalmente da pele, que pode se tornar patogênico e causar infecção quando há quebra da barreira cutânea ou diminuição da imunidade (MENEQUIN, TORRES & POLLO, 2020).

Segundo SADER & DURAZZO (2003), as úlceras normalmente são colonizadas por bactérias da microbiota da pele, incluindo principalmente cocos Gram positivos,

aeróbios e, eventualmente, anaeróbios. Tanto as feridas agudas quanto as crônicas possuem microrganismos no seu leito, GOMES, CARVALHO & LIMA (2009) analisaram a microbiota de feridas crônicas de membros inferiores utilizando um protocolo de cobertura oclusiva. O gênero isolado das feridas com maior frequência foi *Staphylococcus* (antes e após do tratamento). Resultados semelhantes foram relatados por BOWLER & DAVIES (1999) em estudo sobre microbiota de úlceras de membros inferiores infectadas e não infectadas. Estes autores encontraram o *Staphylococcus aureus* como a espécie mais frequente nos dois tipos de feridas. Quando apresenta resistência à meticilina, é denominado MRSA (*Methicillin resistant Staphylococcus Aureus*). O ambiente hospitalar é um dos lugares mais comuns de colonização e infecção por MRSA, principalmente quando o paciente apresenta fatores de risco como diabetes, hospitalização prolongada, exposição a equipamentos ou procedimentos invasivos, entre outros (MENEQUIN, TORRES & POLLO, 2020).

MORAES (2006) destaca a importância do estudo da atividade antimicrobiana na caracterização de extratos vegetais, visto o número de doenças infecciosas que podem acometer o homem. AMPARO et al. (2018), realizou uma análise dos artigos indexados na biblioteca SciELO, abrangendo os últimos dez anos, e verificou que somente 4,4% das pesquisas com plantas medicinais estão relacionadas com atividade antimicrobiana.

Visando essa problemática e a fim de avaliar a ação antimicrobiana do ESA das vagens de *L. ferrea*, inicialmente, foi realizada a triagem na inibição de crescimento utilizando a cepa *S. aureus* (CBAM 0324) pelo Método de Difusão em Ágar até a diluição 1:64 (Tabela 22), demonstrando atividade antibacteriana contra a espécie. Os halos de inibição variaram entre 8 mm e 20mm (Figura 19), sendo o maior halo semelhante ao padrão vancomicina.

Atribuem-se a atividade antimicrobiana aos compostos fenólicos, um importante grupo de substâncias ativas em ervas que possuem as propriedades bem conhecidas e documentadas. Eles podem atuar rompendo a parede celular da bactéria, interferindo no pool de ATP e alterando seu potencial de membrana, resultando na morte da bactéria (TIWARI, V.R. & TIWARI, M., 2015). Outro mecanismo conhecido é dos taninos que devido suas habilidades de precipitar proteínas e formar complexos taninos-proteínas, evita a proliferação de microrganismos (PAIVA et al., 2002). Uma série de bactérias é sensível aos taninos, dentre elas *Staphylococcus aureus*,

*Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* (MONTEIRO, ALBUQUERQUE & ARAÚJO, 2005).

**Tabela 22** – Atividade antimicrobiana do ESA em diluição logarítmica e halo de inibição.

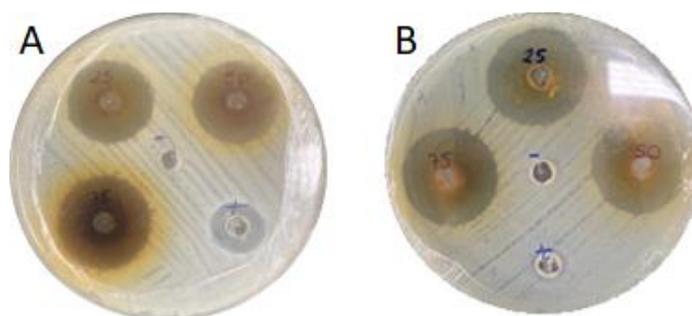
		Frente à <i>Staphylococcus aureus</i>						
ESA (mg/mL)	Puro (75)	1:2 (37,5)	1:4 (18,7)	1:8 (9,3)	1:16 (4,6)	1:32 (2,3)	1:64 (1,1)	Controle Vancomicina
Halo de inibição (mm)	20	18	18	14	12	12	8	20



**Figura 19** – Halos de inibição do extrato seco das vagens de *L. ferrea* frente à *S. aureus* CBAM 0324 (Fonte: O autor).

Após os estudos de triagem, devido à importância de utilização de cepas de referência de acordo com a norma M7-A6 (CLSI, 2003), foi dado prosseguimento do estudo com as cepas de bactérias da *American Type Culture Collection* da coleção do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* resistente à metilina ATCC 43300 (MRSA).

A atividade antimicrobiana do ESA de *L. ferrea* foi testada nas concentrações de 2,5%, 5% e 7,5%. As duas cepas testadas demonstraram sensibilidade ao extrato das vagens de jucá, como visualizado na Figura 20, confirmando seu potencial apontado em outros estudos. Sendo eficaz até mesmo contra a espécie *S. aureus* resistente à oxacilina (MRSA) o qual o antibiótico desenvolveu resistência, com crescimento confluyente dentro do halo de inibição.



**Figura 20** – Extrato seco das vagens de *L. ferrea* frente à *S. aureus* ATCC 29213 (A) e *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 (B) (Fonte: O autor).

Os resultados observados apontaram que as diferentes concentrações testadas não revelaram efeitos significativos ( $p > 0,05$ ) nos halos de inibição do crescimento das espécies conforme a Tabela 23. Deste modo, considerando a obtenção de uma formulação, tanto do ponto de vista biológico e econômico, pode ser viável utilizar menor quantidade de extrato seco (2,5%) para atender a mesma eficácia da atividade antimicrobiana de um produto acabado.

**Tabela 23** – Atividade antimicrobiana do ESA nas concentrações 2,5, 5 e 7,5%.

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, segundo o teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Concentração (mg/mL)	Diâmetros dos halos de inibição (mm)	
	Média ± DP	
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> (MRSA) ATCC 43300
25	25,33 <sup>a</sup> ± 0,52	25,33 <sup>a</sup> ± 1,37
50	26,33 <sup>a</sup> ± 1,03	25,67 <sup>a</sup> ± 0,52
75	25,67 <sup>a</sup> ± 1,03	26,33 <sup>a</sup> ± 0,52
Vancomicina	16 mm ± 1,00	-
Oxacilina	-	< 10 mm

Posteriores ensaios do método de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Figura 21) foram realizados a fim de identificar qual a concentração mínima necessária do extrato seco capaz de inibir 50% de isolados. Os resultados dos ensaios de CIM estão apresentados na tabela 24.

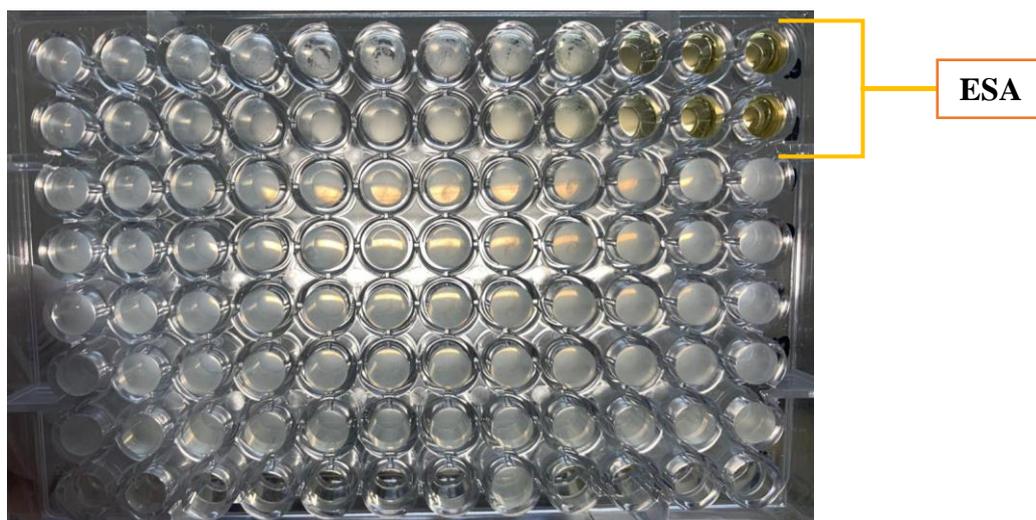
**Tabela 24** – Teste de concentração inibitória mínima (CIM) do ESA de vagens de *L. ferrea*.

Concentração (mg/mL)	Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	
	Média	
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> ATCC 43300
ESA	400	400
Vancomicina	50	-
Oxacilina	-	400

As CIM para as duas cepas testadas mostram que o extrato seco de vagens de *L. ferrea* apresentaram concentração mínima de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para inibir ambas as espécies (Tabela 24). Esse resultado foi semelhante ao relatado por JOZALA et al. (2020) que utilizou extrato hidroalcolico de cascas de *L. ferrea* obtendo-se uma CIM = 390  $\mu\text{g}/\text{mL}$  frente à *S. aureus*, e halo de inibição de aproximadamente 36 mm.

Os resultados foram satisfatórios ao comparar com os estudos de DE ARAÚJO et al. (2014) ao utilizar o extrato liofilizado das cascas de *L. ferrea*, obtida por turbo-extração (10%, p/v) e acetona:água (7:3, v/v). A atividade antimicrobiana do extrato frente a bactérias gram positivas como *S. aureus* pelos métodos de difusão em ágar e microdiluição, obtiveram o halo de inibição de 11 mm e Concentração Inibitória Mínima (CIM) = 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

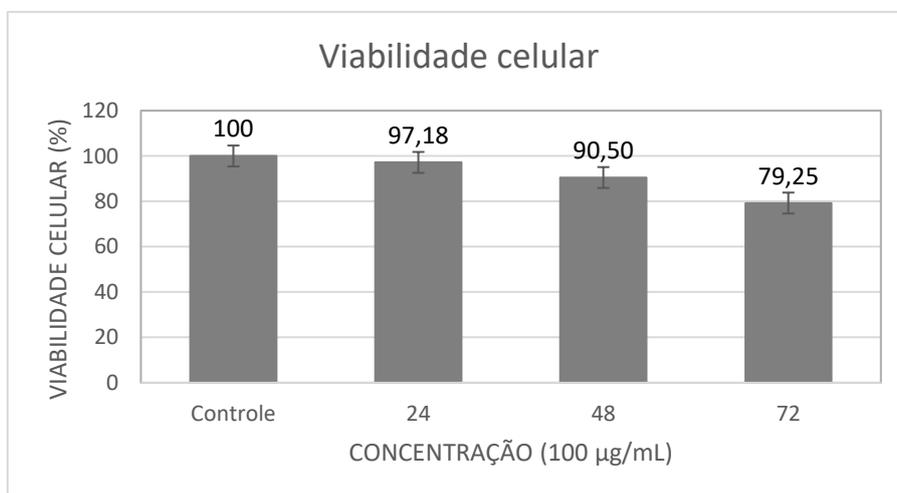
Nos estudos de LUNA et al (2020) utilizando diferentes solventes para extratos de folhas de *L. ferrea*, mostrou uma CIM na faixa entre 390 a 780  $\mu\text{g}/\text{mL}$  frente a *S. aureus*: ciclohexano (CIM: 390  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), clorofórmio (CIM: 780  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), etil acetato (CIM: 780  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), metanol (CIM: 390  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). NASCIMENTO et al. (2015) mostrou uma melhor atividade antimicrobiana utilizando o extrato hidroetanólico de vagens de *L. ferrea*, no qual obteve uma CIM de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Este fato pode estar associado ao teor de polifenóis totais de 32,6 mg EAG/g extrato, cerca de duas vezes mais ao PT encontrado para o ESA deste trabalho de 16,6 mg EAG/g.



**Figura 21** – Concentração Inibitória Mínima do extrato seco das vagens de *L. ferrea* frente à *S. aureus* (Fonte: O autor).

### 5.3.8 Viabilidade celular do ESA

A figura 22 mostra a viabilidade celular em fibroblastos da linhagem MRC-5 após 24, 48 e 72 horas de exposição das células ao ESA de vagens de *L. ferrea*.



**Figura 22** – Viabilidade celular do ESA de vagens de *L. ferrea*.

Foi possível observar que a viabilidade celular apresentada no período de 24h é mais elevada que a de outros períodos, mostrando um comportamento tempo-dependente. Contudo, para a concentração estudada (100 µg/mL), a viabilidade se manteve elevada

até o período de 72h de exposição das células MRC-5 ao extrato (79,246%), considerando uma viabilidade maior que 50%.

Este resultado corrobora com os estudos de BARROS (2012), que avaliou o ESA das vagens de *L. ferrea* sobre a viabilidade celular de fibroblastos NIH3T3, apresentando o mesmo comportamento e a viabilidade sempre maior que 50%. As concentrações estudadas não afetaram a viabilidade celular na maior concentração estudada (60 µg/mL), e apresentou 96,2% de viabilidade no período agudo (24h) e até 68,3% com o extrato da vagem para o período crônico (72h).

#### 5.4 Desenvolvimento de formulações semissólidas pomadas contendo extrato seco por aspersão (ESA) de vagens de *L. ferrea*.

##### 5.4.1 Desenvolvimento das formulações

A fim de selecionar a melhor base para a incorporação do ESA de jucá, inicialmente, foram testadas duas bases de pomada descritas na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019) e Farmacopeia Americana (USP, 2006), com algumas modificações. Estas foram denominadas respectivamente B20 e B30, cujas composições estão descritas na tabela a seguir:

**Tabela 25** – Fórmula das bases denominadas B20 e B30.

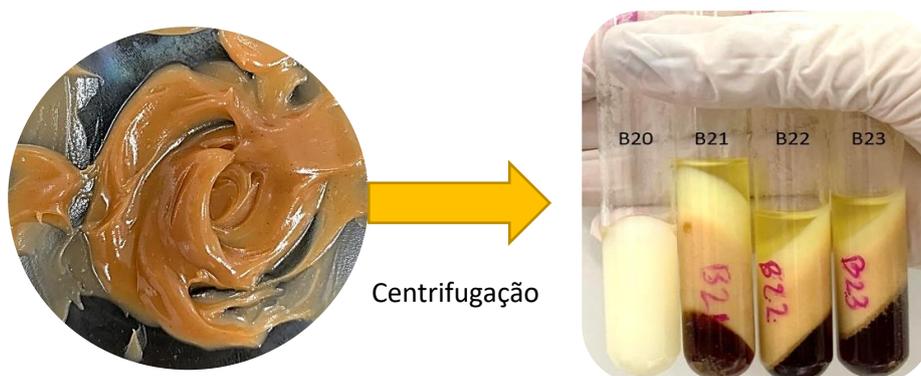
Componentes (%)	B20	B30
Vaselina	qsp 100	25
Cera de abelha	10	-
Lanolina	5	-
Álcool estearílico	-	25
Propilenoglicol	-	12
Lauril Sulfato de Sódio	-	1
Água destilada	-	qsp 100
BHT	0,02	-
Parabenos	0,2	0,4

Na primeira etapa, as bases foram devidamente manipuladas e testados dois métodos de incorporação do ESA de jucá, por dissolução (água destilada) ou levigação (propilenoglicol). As pomadas com a adição do extrato seco foram analisadas

macroscopicamente e em seguida, levadas ao teste de centrifugação para observar possíveis sinais de instabilidade.

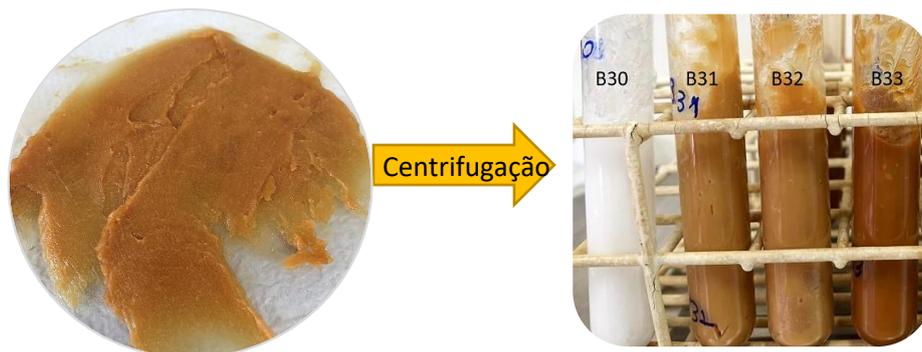
Foi observado que o método de incorporação que mais se adequou foi por levigação com propilenoglicol. De acordo com THOMPSON, E. J. & DAVIDOW, W. L. (2013) como é desejado uma preparação homogênea e não arenosa, os sólidos incorporados devem estar no estado mais fino de subdivisão possível, o qual foi possível observar com a levigação. A dissolução do ESA com água destilada e posterior incorporação nas bases B20 e B30 não foi eficaz, pois foi visualizada a presença de grânulos e aspecto arenoso. Sendo assim, a levigação por propilenoglicol foi o método de incorporação de escolha.

A primeira base de pomada testada denominada B20 apresentou-se macroscopicamente heterogêneo após incorporação do ESA, observando a presença de grânulos tanto pelo método de dissolução e por levigação (figura 23). A instabilidade foi confirmada após o primeiro teste de centrifugação, em que o extrato seco se mostrou imiscível na base. Este fato se deve à característica do extrato seco de jucá, que possui maior afinidade por compostos hidrossolúveis, contra a base composta em sua maioria por hidrocarbonetos lipofílicos que possui como componente principal a vaselina.



**Figura 23** – Formulação B20 contendo ESA vagens de *L. ferrea* antes e depois do processo de centrifugação.

Deste modo, prosseguiu-se para o teste com a pomada hidrofílica USP (USP, 2006), denominada B30. Esta base de pomada contém o laurilsulfato de sódio como emulsificante primário e álcool esteárico como emulsificante auxiliar, que facilitaria a adição do extrato seco com propriedades hidrofílicas em uma base contendo aditivos lipofílicos. Após a adição do ESA, a amostra apresentou-se como uma formulação estabilizada antes e após o teste de centrifugação (Figura 24).



**Figura 24** – Formulação B30 contendo ESA vagens de *L. ferrea* antes e depois do processo de centrifugação.

No entanto, a base se demonstrava aparentemente muito consistente, sendo necessária uma otimização da formulação a fim de melhorar suas características reológicas, de maneira que sua função terapêutica fosse mantida, e que o produto fosse mais agradável no momento da aplicação. Para isso, verificou-se a viabilidade de adicionar na base hidrossolúvel USP, um componente bastante utilizado como agente emulsificante em pomadas, como a lanolina.

A lanolina possui potente ação emulsificante com propriedades penetrantes, apresentam composição semelhante às secreções sebáceas da pele, por isso são bastante utilizadas em bases de absorção. A literatura cita que produtos graxos da lã, quando misturados com óleos vegetais ou com vaselina, fornecem pomadas emolientes que penetram na pele e aumentam a absorção de substâncias ativas (SCHLOSSMAN & MCCARTHY, 1978; THOMPSON, E. J. & DAVIDOW, W. L, 2013). Além do mais, a lanolina pode atuar como um modificador de reologia, como mostrado no estudo de FIGIEL, TAL-FIGIEL & PLOCICA (2013) que investigaram o efeito da lanolina em emulsões cosméticas, mostrando alta influência reológica.



As formulações mostraram-se homogêneas com aspecto branco à amarelo-claro (Figura 25). As amostras foram conduzidas para o teste da consistência por espalhabilidade, pH e viscosidade, a fim de avaliar a influência da substituição de ácido esteárico e vaselina pela lanolina nas diferentes concentrações. Os resultados estão dispostos na tabela 27.



**Figura 25** – Formulações do planejamento experimental.

**Tabela 27** – Resultados do planejamento experimental aplicado à formulação protótipo.

Base	Variáveis independentes			Variáveis dependentes			
	Vaselina (%)	Lanolina (%)	Ácido Esteárico (%)	Espalhabilidade ( $\chi$ )	Viscosidade ( $\chi$ ) (Pa·s)	pH ( $\chi$ )	Estabilidade e após adição do ESA
<b>Protótipo</b>	25	0	25	298,6925 <sup>bc</sup>	23,4218 <sup>bc</sup>	5,90 <sup>ab</sup>	E
<b>1</b>	25	10	20	379,9400 <sup>b</sup>	27,1400 <sup>a</sup>	5,95 <sup>a</sup>	E
<b>2</b>	20	15	15	471,1963 <sup>a</sup>	22,9981 <sup>bc</sup>	5,85 <sup>abc</sup>	I
<b>3</b>	20	10	15	530,6600 <sup>a</sup>	14,5792 <sup>d</sup>	5,84 <sup>abc</sup>	I
<b>4</b>	25	10	15	471,1963 <sup>a</sup>	20,9877 <sup>c</sup>	5,75 <sup>bc</sup>	I
<b>5</b>	20	15	20	314,0000 <sup>bc</sup>	28,7685 <sup>a</sup>	5,76 <sup>bc</sup>	E
<b>6</b>	25	15	20	283,3850 <sup>c</sup>	21,3176 <sup>ab</sup>	5,73 <sup>c</sup>	E
<b>7</b>	25	15	15	346,1850 <sup>bc</sup>	25,3482 <sup>ab</sup>	5,77 <sup>bc</sup>	E
<b>8</b>	20	10	20	379,9400 <sup>b</sup>	27,3715 <sup>a</sup>	5,72 <sup>c</sup>	E

\*Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, segundo o teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Legenda: E = estável; I = instável.

Diante os resultados, foi observado que as formulações 2, 3 e 4 possuíram maior capacidade de espalhabilidade em comparação às outras formulações, podendo estar relacionado com a menor quantidade de ácido esteárico. No entanto, após a incorporação do ESA, elas se demonstraram instáveis, sendo excluídas do processo de escolha. Isso pode estar relacionado às propriedades da base, que possui um certo limite de absorção de água na fase externa sem que faça perder a consistência (THOMPSON, E. J. & DAVIDOW, W. L., 2013). Logo, as formulações 1 e 8 foram consideradas boas candidatas de escolha por sua maior capacidade de espalhabilidade.

Foi possível representar a influência das variáveis na espalhabilidade pelo gráfico de superfície de resposta (Figura 26), demonstrando que há diminuição da espalhabilidade à medida que a concentração de ambas as variáveis diminui. Tal fato corrobora com o estudo de FIGIEL, TAL-FIGIEL & PLOCICA (2013), que o aumento da concentração de lanolina na emulsão cosmética a torna mais pesada, justificativa que também pode ser aplicada ao ácido esteárico, podendo influenciar na viscosidade e afetar a facilidade de espalhamento. Quanto ao gráfico de superfície de resposta da viscosidade (Figura 27), apresentou tendência de resposta semelhante em relação à espalhabilidade. Pode-se notar a elevação dos valores de viscosidade à medida em que a concentração das variáveis independentes aumenta.

O teste de análise de variância indicou que apenas a variação da concentração de ácido esteárico afetou consideravelmente sobre a espalhabilidade com  $p = 0,0480$  ( $p < 0,05$ ), não havendo influência estatisticamente significativa para a variação de vaselina ( $p = 0,1024$ ) e lanolina ( $p = 0,0638$ ), além do efeito em conjunto entre eles. A partir dos testes estatísticos foi demonstrado também que não houve efeitos significativos das variáveis sobre o pH (Figura 28) e sobre a viscosidade.

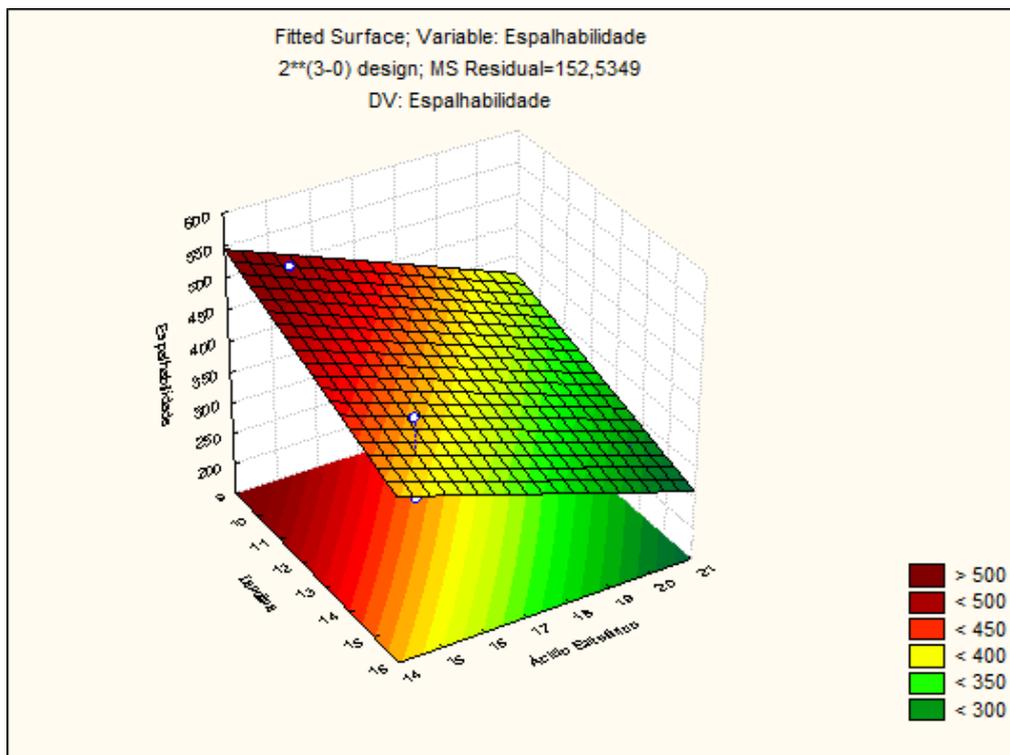


Figura 26 – Gráfico de superfície de resposta tridimensional em função da espalhabilidade.

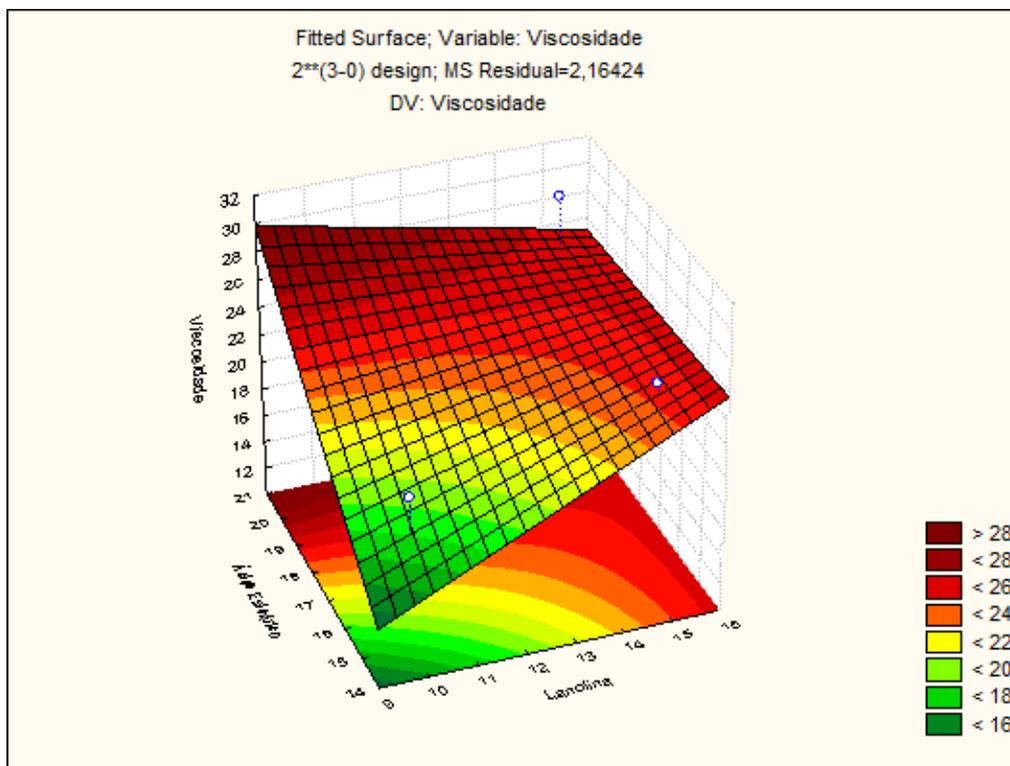
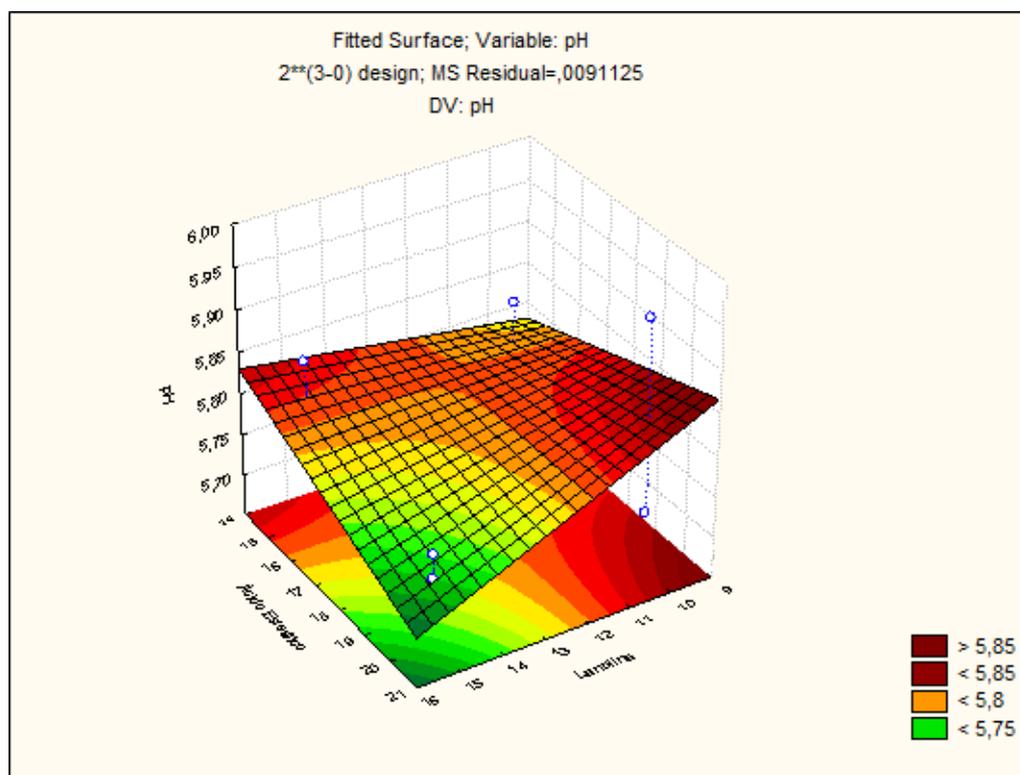


Figura 27 – Gráfico de superfície de resposta tridimensional em função da viscosidade.



**Figura 28** – Gráfico de superfície de resposta tridimensional em função do pH.

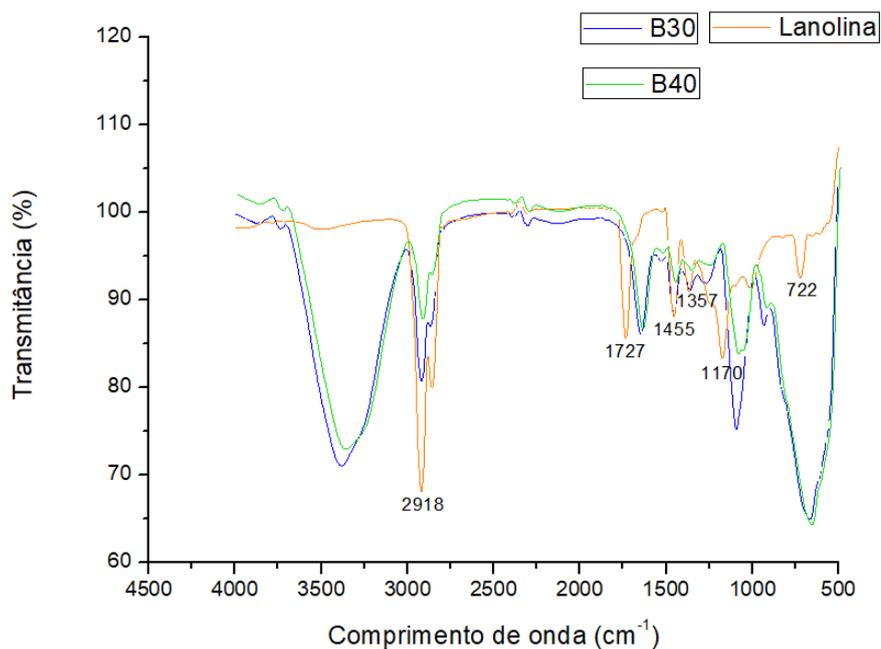
Pode-se visualizar ainda na tabela 27 que as formulações obtidas mostraram valores de pH que variaram entre 5,72 a 5,95. A pele apresenta um pH levemente ácido (4,0 – 6,0). Garantir o pH de um produto próximo a essa faixa evita irritações e reduz a colonização bacteriana, pois substâncias que alteram esse pH podem danificar a barreira da epiderme que servem como auxílio na proteção bactericida e fungicida, além de promover o ressecamento da pele e facilitar a entrada de substâncias alérgicas (MENDES, 2016; SCHNEIDER et al., 2007). Portanto, o total de 100% das formulações preencheu o requisito de pH semelhante ao da pele e, portanto, adequadas à administração cutânea.

Entre as bases de pomada, a número 8 foi escolhida, com a redução de 5% de vaselina e de ácido esteárico e a adição de 10% de lanolina. Esta foi denominada como B40 para dar a continuidade nos testes de estabilidade. Além de melhorar as características reológicas em relação à base protótipo, essa base chamou atenção nos aspectos visuais. A lanolina deixou a base com características mais elegantes, passando de uma apresentação opaca para uma com brilho. Fato bem observado após a adição do ESA, em que a coloração ficou mais intensa (Figura 29).



**Figura 29** – Formulação protótipo (antes) e após a sua otimização (base nº 8).

A fim de comparar e identificar as diferenças da base protótipo B30 e a otimizada B40, e elucidar uma possível interação entre a lanolina e os outros componentes utilizados na formulação, foi realizado Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR) (Figura 30).



**Figura 30** – Espectros na região do infravermelho de B30, B40 e lanolina.

A análise do espectro do infravermelho da lanolina isolada mostra principais bandas em 2918 (alongamento de hidroxilas O-H), 1727 (alongamento de carbonilas C=O), 1455 (relacionada a CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> e anéis aromáticos COOH), 1357 (vibrações C-N de aminas), 1170 a 722 possivelmente relacionados a vibrações do grupo C-O de ésteres,

álcoois e ácidos carboxílicos. As principais bandas características da lanolina foram observadas na respectiva formulação B40 (mistura B30 + lanolina). Os achados foram sugestivos de ausência de incompatibilidade.

#### 5.4.2 Testes de centrifugação

A tabela 28 a seguir reúne os dados do teste de centrifugação das bases de pomada que foram estudadas B20, B30 e B40 (otimizada) utilizando diferentes concentrações de ESA (2,5%, 5% e 7,5%), além dos dois métodos de incorporação (dissolução e levigação) utilizados.

**Tabela 28** – Eventos ocorridos após centrifugação das bases-teste.

<b>Base</b>	<b>Concentração de ESA</b>	<b>Incorporação</b>	<b>Evento</b>
<b>B21</b>	2,5	Dissolução	SF
<b>B22</b>	2,5	Levigação	SF
<b>B23</b>	5	Dissolução	SF
<b>B24</b>	5	Levigação	SF
<b>B25</b>	7,5	Dissolução	SF
<b>B26</b>	7,5	Levigação	SF
<b>B30</b>	2,5	Dissolução	E
<b>B31</b>	<b>2,5</b>	<b>Levigação</b>	<b>E</b>
<b>B32</b>	5	Dissolução	E
<b>B33</b>	<b>5</b>	<b>Levigação</b>	<b>E</b>
<b>B34</b>	7,5	Dissolução	CR
<b>B35</b>	7,5	Levigação	CR
<b>B40</b>	2,5	Dissolução	E
<b>B41</b>	<b>2,5</b>	<b>Levigação</b>	<b>E</b>
<b>B42</b>	5	Dissolução	E
<b>B43</b>	<b>5</b>	<b>Levigação</b>	<b>E</b>
<b>B44</b>	7,5	Dissolução	PR
<b>B45</b>	7,5	Levigação	PR

Legenda: CR = Cremação; E = Estável; PR = Precipitação; SF = Separação de Fases.

Na incorporação pelo método de levigação, o propilenoglicol foi usado como cossolvente a fim de facilitar a incorporação do extrato seco. As formulações com concentração de 7,5% de ESA precisaram de maior quantidade de cossolvente para serem incorporados na formulação e, com isso, a pomada apresentou características mais líquidas e menos estáveis. No processo de dissolução, foi usado água como agente de incorporação do extrato seco, porém, pelo mesmo motivo citado acima, não houve estabilidade da formulação e sua consistência se tornou líquida.

Após a centrifugação, observou-se que a adição de 7,5% de concentração do ESA não foi viável, pois ainda ocorreu precipitação do extrato seco e o evento de cremação nas diferentes bases testadas, sendo assim excluídos do estudo. As formulações B31, B33, B41 e B43 contendo 2,5% e 5% de ESA, usando propilenoglicol na incorporação, apresentaram as melhores propriedades organolépticas e estabilidade preliminar.

### 5.4.3 Estresse térmico

O teste de estresse térmico foi realizado a fim de acompanhar o surgimento de possíveis instabilidades físicas nas formulações quando expostas ao calor. As alterações apresentadas foram leves, moderadas ou intensas (Tabela 29).

**Tabela 29** – Eventos ocorridos após aumento gradual de temperatura das bases B30 e B40 e as formulações contendo 2,5 % e 5% de ESA de vagens de *L. ferrea*.

Bases	Temperatura				
	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C
B30	E	E	E	E	E
B31	E	E	E	LA	IA
B33	E	E	LA	IA	IA
B35	E	LA	LA	IA	IA
B40	E	E	E	E	IA
B41	E	E	E	E	LA
B43	E	E	LA	IA	IA
B45	LA	LA	IA	IA	IA

Legenda: E= estável; LA= levemente alterado; IA= intensamente alterado.

De acordo com os dados obtidos, foi possível observar que a formulação B45 foi a primeira que apresentou instabilidade à 40°C, seguido da B35 a 45°C, ambas contendo ESA a 7,5%. Os eventos de desestabilização observados foram: a sedimentação, para as formulações B35 e B45, que é um fenômeno resultante da diferença de densidade entre as duas fases e consiste na migração de uma das substâncias para o fundo; e a cremação, com as substâncias que migraram para o topo das formulações, para as demais formulações (LEITE; SILVA & DE SOUZA, 2018).

As bases B30, B40, B41 foram as que apresentaram maior resistência em maiores temperaturas. Porém, se formos considerar que a temperatura máxima de um

local seja cerca de 45°C podemos acrescentar, ainda, a B31, B33 e B43. Dentre as formulações contendo a adição de ESA, a B41 (2,5% de ESA) foi a mais estável, cuja resistência permaneceu até 55°C. Diferentemente da B31, esta formulação contém lanolina, o que pode ter favorecido a emulsificação do extrato seco na base. A fim de comparação, foram selecionadas as formulações B31, B33, B41 e B43 para o prosseguimento dos estudos.

#### 5.4.4 Testes físico-químicos

##### 5.4.4.1 Análises de pH, espalhabilidade e viscosidade

As pomadas que se permaneceram estáveis nos testes de centrifugação e de estresse térmico foram avaliadas e comparadas através de análises de pH, espalhabilidade e viscosidade. Os resultados estão descritos na tabela 30.

**Tabela 30** – Valores de pH, espalhabilidade e viscosidade obtidos no momento após as formulações.

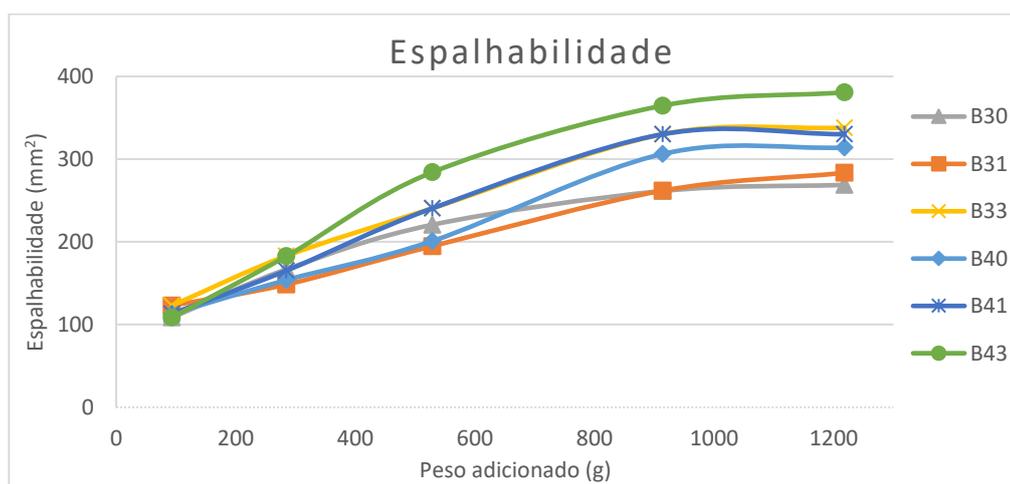
Formulação	% ESA	pH x ± s	Espalhabilidade (Ei) (mm <sup>2</sup> ) x ± s	Viscosidade x ± s
B30	Branco	6,00 ± 0,18 <sup>a</sup>	2,69 ± 0,21 <sup>b</sup>	23,4218 ± 3,30 <sup>e</sup>
B31	2,5%	5,46 ± 0,08 <sup>b</sup>	2,83 ± 0,00 <sup>b</sup>	55,5520 ± 3,84 <sup>b</sup>
B33	5,0%	5,03 ± 0,04 <sup>c</sup>	3,38 ± 0,12 <sup>ab</sup>	64,9118 ± 1,84 <sup>a</sup>
B40	Branco	5,63 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,14 ± 0,00 <sup>ab</sup>	27,8263 ± 5,18 <sup>de</sup>
B41	2,5%	5,19 ± 0,07 <sup>c</sup>	3,30 ± 0,23 <sup>ab</sup>	39,0705 ± 1,03 <sup>c</sup>
B43	5,0%	5,06 ± 0,01 <sup>c</sup>	3,81 ± 0,49 <sup>a</sup>	34,2148 ± 3,34 <sup>cd</sup>

\*Médias seguidas das mesmas letras não se diferem entre si, segundo o teste de Tukey (p<0,05).

Quanto às formulações apresentadas na tabela acima, indicam pH dentro da faixa adequada para pele. Ao comparar a base B30 com a B40, a adição de lanolina causou um efeito significativo na redução do pH, mas ainda assim manteve-se dentro da faixa ideal. Entre as formulações B41 e B43 não houve diferença significativa (p>0,05) ao aumentar a quantidade de ESA, porém nota-se que entre a formulação B31 (2,5% ESA) e B33 (5% ESA) quanto maior a concentração do agente ativo, o pH tende a diminuir. Pode-se justificar esse acontecimento se devido ao fato de que a *L. ferrea* possui uma grande quantidade de taninos, que são compostos fenólicos – substâncias com um ou mais anéis aromáticos ligados a um radical hidroxila, de caráter ácido (FRIEDMAN & JURGENS, 2000; OLIVEIRA, 2011).

Visto que a eficácia da terapia tópica está relacionada à aplicação do medicamento em camada uniforme sobre a pele lesada para garantir a dose padrão do princípio ativo e visto que essas áreas lesionadas costumam ser doloridas e sensíveis, uma formulação desenvolvida para tratar lesões não pode exigir muita força para se espalhar. Portanto, a determinação do fator de espalhabilidade é um parâmetro importante para o desenvolvimento de um produto semissólido tópico, uma vez que indica a facilidade que a formulação tem de espalhar e abranger determinada área (GARG, A; AGGARWAL; GARG & SINGLA, 2002).

Pela visualização no gráfico (Figura 31), nota-se que a preparação que se destaca com a melhor espalhabilidade é a B43 com o  $E_i = 3,81$  ( $p < 0,05$ ), cuja formulação possui lanolina e 5% de ESA incorporado com uma maior quantidade de propilenoglicol, entregando maior emoliência para formulação, seguido da B33 que também possui maior quantidade de propilenoglicol. A formulação B41, com o peso a partir de 600g, se mostra tão espalhável quanto a B33. A B31 com 2,5% de ESA se mostrou com menor espalhabilidade entre todas. Em se tratando dos brancos, a B40 se demonstrou melhor significativamente ( $p < 0,05$ ) que a base B30, cuja formulação não possui adição de lanolina. Assim, a referida base otimizada atendeu as expectativas iniciais do benefício da lanolina de melhorar a sua espalhabilidade.



**Figura 31** – Espalhabilidade das formulações (por 100g) em função do peso adicionado.

No que se refere a viscosidade, esta é a medida da resistência do fluxo de um sistema após a aplicação de um estresse (THOMPSON, E. J. & DAVIDOW, W. L., 2013). Diante da tabela 25, identificou-se que a adição de ESA de jucá na base protótipo B30

conferiu maior grau de viscosidade para as formulações B31 e B33, tendendo a uma maior consistência para uma maior quantidade de extrato seco. No entanto, nota-se que este problema foi contornado na formulação otimizada B40 contendo lanolina, ao observamos que a viscosidade foi consideravelmente menor mesmo após a incorporação do ESA.

Para o estudo reológico, foram plotados valores da deformação ao longo do tempo para uma tensão constante. As amostras exibiram comportamento de fluxo não-newtoniano, não obedecendo às leis de Newton para o comportamento dos fluidos, na qual a viscosidade é constante. Nesse caso, em todas as amostras ocorreu uma diminuição da viscosidade através da aplicação da força de tensão, o que corrobora com a literatura, em que THOMPSON, E. J. & DAVIDOW, W. L, (2013), aponta que a viscosidade desses sistemas não é constante e depende da tensão de cisalhamento ou força aplicada. Entre os fluidos não-newtonianos, pode-se distinguir dois grupos de comportamentos reológicos: comportamentos dependentes da variação de taxa de cisalhamento e comportamento dependente do tempo. Quando, na execução de um reogramas, a curva de fluxo de aumento da tensão de cisalhamento não coincide com a curva de fluxo de diminuição de tensão de cisalhamento, temos um comportamento tipicamente dependente de tempo (FRANCO, 2014).

A partir dessa relação, pode-se ainda avaliar o tipo de fluido em questão, como o tixotrópico e o reopético. Os fluidos tixotrópicos apresentam uma diminuição da viscosidade com o tempo, enquanto os fluidos considerados reopéticos apresentam um comportamento oposto, com o aumento da viscosidade (FERREIRA et al., 2005).

Produtos que apresentam características tixotrópicas tendem a ter maior vida de prateleira, pois durante o armazenamento, estes apresentam viscosidade constante, o que impede que os constituintes da formulação se separem. Especula-se ainda que a tixotropia pode favorecer a penetração das substâncias ativas na pele. Além disso, essa característica é de grande interesse na obtenção de um produto, pois as formulações se deformam durante a aplicação, se tornando mais fluidas e facilitando o espalhamento. Este fenômeno, conhecido por histerese, pode ser quantificado como a área entre as curvas de fluxo, e, quanto maior a área compreendida entre as curvas, maior o efeito tixotrópico. No entanto, esta condição pode ou não ser benéfica, visto que uma área de histerese muito baixa pode acarretar uma baixa espalhabilidade do produto não permitindo uma distribuição uniforme sobre a pele, ou muito elevada para que o produto

não escorra após a aplicação (GONÇALVES & CAMPOS, 2009; MARTIN, 1993; MENDONÇA et al., 2009).

A figura 32 mostra o comportamento da viscosidade em função do tempo, sob taxa de cisalhamento constante. Pode-se observar que todas as formulações apresentaram comportamento tixotrópico, sendo que as formulações com a adição de lanolina se mostraram mais estáveis durante o processo, ao contrário das demais que apresentaram medições oscilatórias. De acordo com os resultados da média das áreas de histerese na tabela 31, conclui-se que a amostra que se apresentou menos tixotrópica foi a B30 (protótipo) e ao comparar com a base otimizada B40, observou-se que a adição de lanolina na formulação, alterou a área de histerese significativamente, contribuindo para um aumento da tixotropia, e conferindo, portanto, o aumento de espalhabilidade e logo consequentemente estabilidade.

A concentração influenciou diretamente no comportamento dependente do tempo. A amostra B41 se demonstrou com maior área de histerese (Figura 33) e estatisticamente diferente em relação a todas as formulações.

**Tabela 31** – Área de histerese das formulações.

Amostra	Área de loop de histerese (x) (Pa/s)
B30	3724 <sup>c</sup>
B31	16601 <sup>ab</sup>
B33	24042 <sup>ab</sup>
B40	15282 <sup>abc</sup>
B41	30527 <sup>a</sup>
B43	10054 <sup>ac</sup>

\*Médias seguidas das mesmas letras não se diferem entre si, segundo o teste de Tukey (p<0,05).

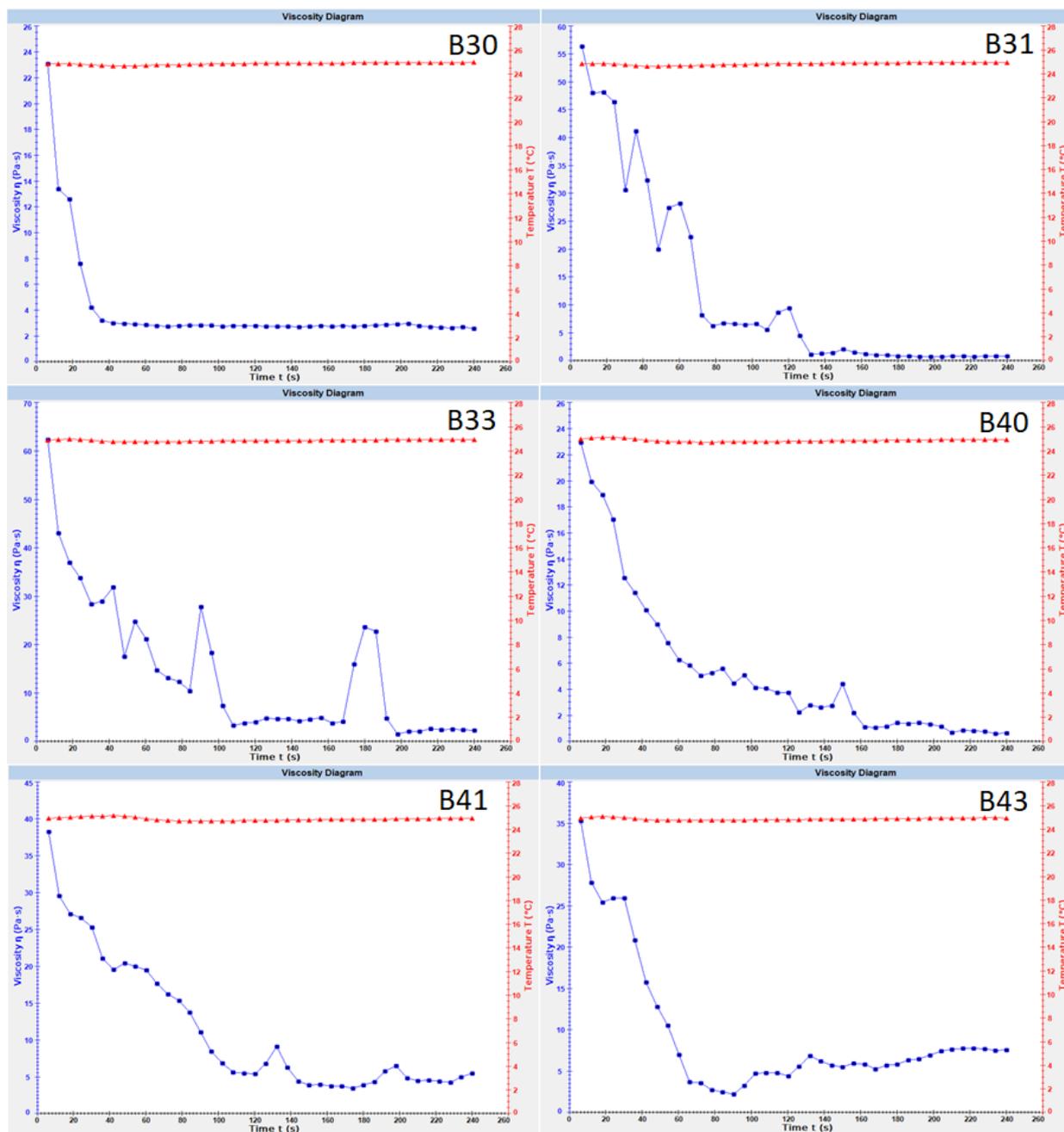


Figura 32 – Viscosidade versus velocidade de deformação das amostras.

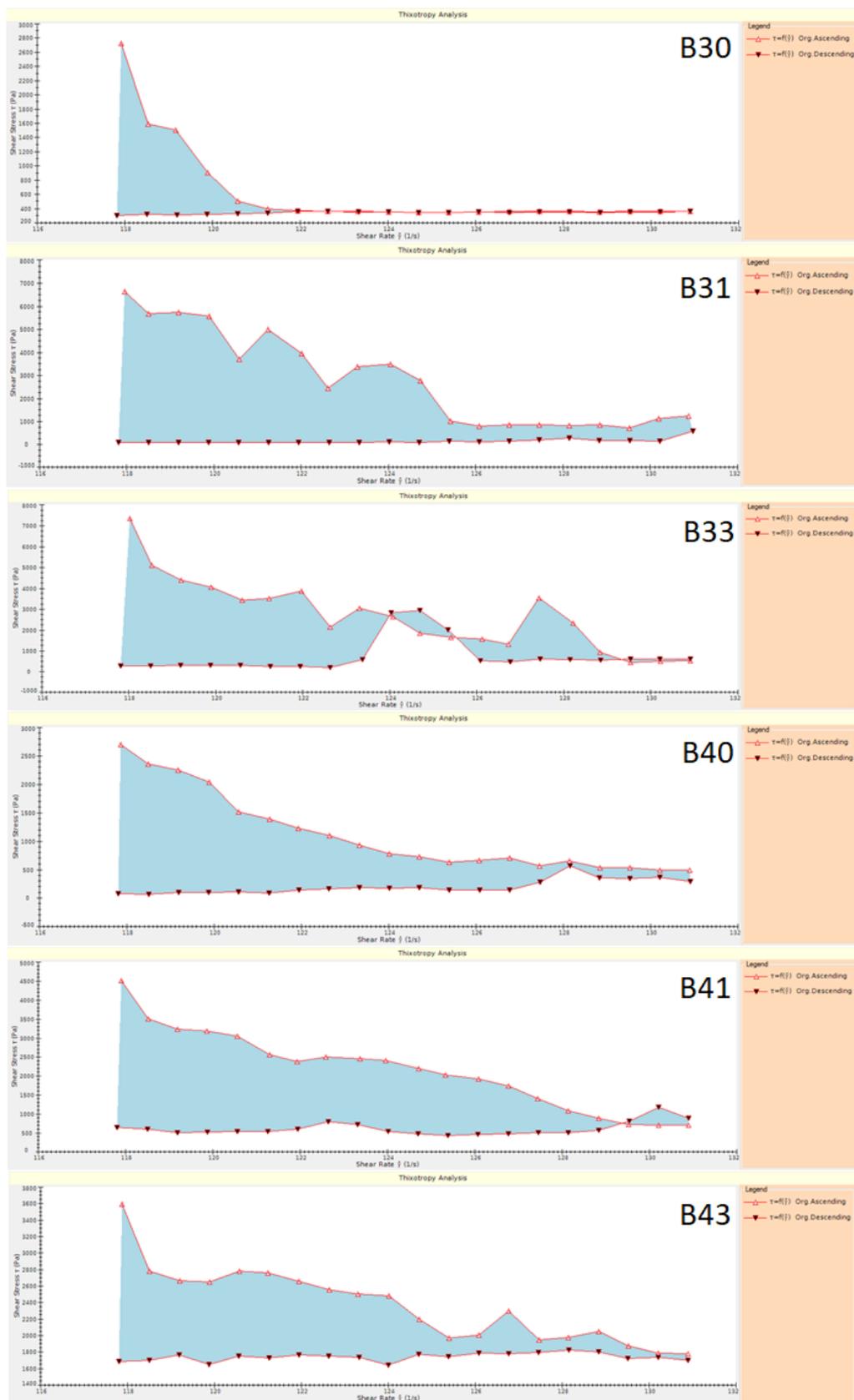


Figura 33 – Tixotropia das formulações.

### 5.4.5 Polifenóis totais e Atividade antioxidante

Extratos com potencial antioxidante podem ser benéficos como componentes bioativos em produtos tópicos, uma vez que o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos para o envelhecimento da pele. Os radicais livres estão envolvidos na estimulação de metaloproteínas matriciais que ativam enzimas que causam a degradação do colágeno e da elastina no tecido, alguns estudos mostram que compostos fenólicos, tal como o ácido gálico, presente no jucá, possui a atividade anti-colagenase e anti-elastase (MOREIRA et al, 2019). Espécies radicalares podem causar outros distúrbios dermatológicos, como perda de água na barreira epidérmica causando ressecamento, e ainda inflamação epitelial pela perodixação lipídica. Logo, como solução para estes problemas, os compostos fenólicos podem contribuir significativamente para tratar ou prevenir essas condições, além de participarem na atividade protetora solar, pois possuem cromóforos em sua estrutura que impedem a absorção de radiação ultravioleta (UV) (BARROSO et al., 2014; DE LIMA CHERUBIN FIGUEROA-ROBLES; ANTUNES-RICARDO & GUAJARDO-FLORES, 2020). Tendo em vista a atuação dos radicais livres na pele e a importância dos compostos fenólicos no processo, as formulações foram comparadas quanto ao teor de polifenóis totais e atividade antioxidante (radical DPPH) e os resultados estão dispostos na tabela 32.

**Tabela 32** – Valores de fenóis e atividade antioxidante.

Formulação	% ESA	Fenóis totais (%) ( $\mu\text{g eq Ác. gálico/mL}$ ) $x \pm s$	DPPH $x \pm s$
B31	2,5%	$2,47 \pm 0,13^{bc}$ $31,14 \pm 1,24^{bc}$	$28,58 \pm 5,47^{ab}$
B33	5,0%	$2,84 \pm 0,16^{ab}$ $34,61 \pm 1,49^{ab}$	$38,99 \pm 2,80^a$
B41	2,5%	$2,40 \pm 0,26^c$ $30,48 \pm 2,37^c$	$23,90 \pm 3,80^b$
B43	5,0%	$3,18 \pm 0,15^a$ $37,75 \pm 1,41^a$	$38,15 \pm 3,68^a$
Fitoscar®	5,0%	$2,20 \pm 0,10^c$ $28,67 \pm 0,89^c$	$24,86 \pm 4,08^b$

\*Médias seguidas das mesmas letras não se diferem entre si, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

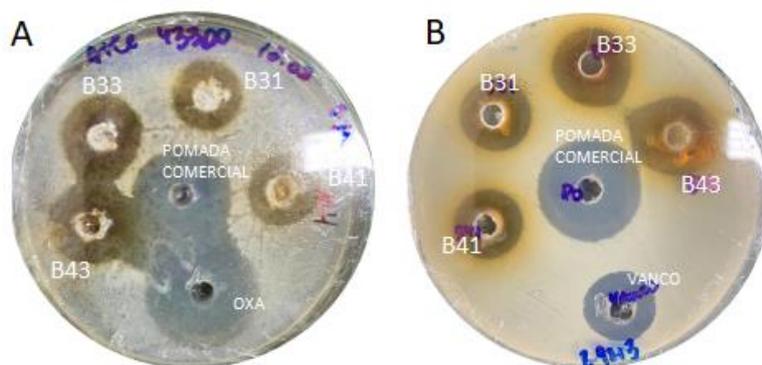
De acordo com os dados obtidos, a formulação B43 contendo 5% de extrato seco destacou-se por apresentar o maior teor de fenóis totais, cerca de  $37,75 \mu\text{g}$  equivalentes ao ácido gálico/mL. Ao comparar com B33 ( $34,61 \mu\text{g eq ác. gálico/mL}$ ) que não contém

lanolina, notou-se que houve efeitos significativos ( $p < 0,05$ ), concluindo-se o possível efeito benéfico do adjuvante na formulação, apesar de não demonstrar diferenças significativas na atividade antioxidante.

No ensaio DPPH, todas as formulações demonstraram capacidade antioxidante *in vitro*, podendo ter ação para proteger a pele contra danos causados pelo estresse oxidativo, sequestrando cerca de 23,90 a 38,99% dos radicais livres quando empregado na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$ . As formulações com ESA de jucá a 5% tiveram valores superiores do que as contendo 2,5%, inclusive da pomada comercial Fitoscar® utilizada como controle no experimento.

#### 5.4.6 Atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus*.

Diante dos possíveis eventos de colonização bacteriana e infecção que podem ocorrer e comprometer o processo de cicatrização no tratamento de feridas, foi investigada a atividade antimicrobiana das diferentes formulações contendo ESA de jucá. As formulações B31, B33, B41, B43, bem como uma pomada comercial para tratamento de feridas foram testadas e capazes de inibir as duas espécies de *S. aureus* (Figura 34).



**Figura 34** – Zona de inibição das formulações contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (A) e *Staphylococcus aureus* (B).

**Tabela 33** – Atividade antimicrobiana das formulações contra *Staphylococcus aureus*.

Formulação	Diâmetros dos halos de inibição (mm)			
	Média ± DP			
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>S. aureus</i> (MRSA) ATCC 43300	
	Halo de inibição (%)	CIM (µg/mL)	Halo de inibição (%)	CIM (µg/mL)
B31	17,33 ± 0,52 <sup>a</sup>	50	18,33 ± 0,52 <sup>a</sup>	100
B33	19,00 ± 0,89 <sup>ab</sup>	25	20,33 ± 0,52 <sup>b</sup>	50
B41	17,33 ± 0,52 <sup>a</sup>	100	18,67 ± 0,52 <sup>a</sup>	100
B43	20,00 ± 0,89 <sup>b</sup>	25	22,33 ± 0,52 <sup>bc</sup>	25
Pomada comercial	25,33 ± 0,58 <sup>c</sup>	0,78125	25,33 ± 0,52 <sup>d</sup>	25
Vancomicina	17,50 ± 0,71	0,78125	-	-
Oxacilina	-	-	<10 mm	25

\*Médias seguidas das mesmas letras na linha não diferem entre si, segundo o teste Tukey (P<0,05).

Considerando as formulações com lanolina e sem lanolina, observou-se que o adjuvante não causou efeito significativo ( $p>0,05$ ) entre as formulações contendo 2,5% de ESA de jucá (B31 e B41) para as duas espécies. Entretanto, notou-se um possível efeito benéfico da lanolina entre as formulações contendo 5%, apresentando assim maior atividade antibacteriana para a formulação B43 (contendo lanolina) com halo de inibição de 20 mm e CIM de 25 µg/mL frente à *S. aureus* ATCC 29213.

Frente à espécie *Staphylococcus aureus resistente à meticilina* (B) ATCC 43300, foi detectado a resistência à oxacilina característico da espécie. De acordo com a CLSI M100-S15 (2005), qualquer crescimento discernível dentro do halo de inibição é indicativo de resistência. Ao testar a pomada comercial, bem como as formulações contendo extrato seco de *L. ferrea* foram identificados ainda crescimentos leves dentro do halo de inibição, deste modo a ação antibacteriana das formulações foi mais efetiva contra o *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

A base utilizada nesse estudo apresentou melhor performance *in vitro* ao comparar com o estudo de BARAKAT (2011), com as formulações em gel Carbopol® que foram preparadas com 2,5%, 5% e 7,5% de ESA de jucá e apresentaram halos de inibição de 8 mm, 7 mm e 5 mm respectivamente para as concentrações durante 24h de incubação.

### 5.4.7 Ciclo gelo-degelo (estudo de estresse)

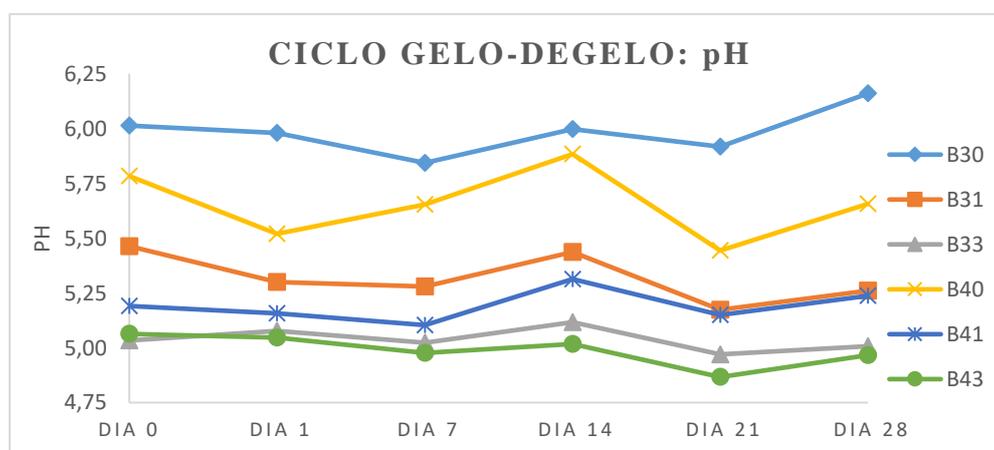
As formulações B30, B31, B33, B40, B41 e B43 se mantiveram em variação de temperatura durante 28 dias. De acordo com as características organolépticas, no final do ciclo, as formulações B30, B40, B41 e B43 apresentaram-se aparentemente homogêneas, com odor característico e aspecto brilhoso durante todo o período de armazenamento. Já as amostras sem a adição de lanolina, B31 e B33, apresentaram precipitados de coloração marrom provenientes do ESA de vagens de jucá, sugerindo instabilidade.

#### 5.4.7.1 pH

De acordo com os resultados (Tabela 34; Figura 35), foi possível observar que a maioria das amostras estiveram com o pH dentro da faixa adequada para pele (4,0 – 6,0) durante todo o período do teste, exceto a base B30 (sem o ativo) no 28º dia.

**Tabela 34** – Análise de pH das formulações durante 28 dias de armazenamento.

Formulações	pH ( $x \pm s$ ) / Dias					
	D0	D1	D7	D14	D21	D28
B30	6,00 ± 0,17	5,98 ± 0,11	5,84 ± 0,27	6,00 ± 0,31	5,92 ± 0,19	6,16 ± 0,10
B31	5,46 ± 0,08	5,30 ± 0,07	5,28 ± 0,04	5,44 ± 0,03	5,17 ± 0,14	5,26 ± 0,07
B33	5,03 ± 0,04	5,08 ± 0,05	5,02 ± 0,03	5,12 ± 0,08	4,97 ± 0,05	5,01 ± 0,04
B40	5,78 ± 0,77	5,52 ± 0,21	5,65 ± 0,06	5,88 ± 0,04	5,44 ± 0,16	5,66 ± 0,19
B41	5,19 ± 0,07	5,16 ± 0,08	5,10 ± 0,02	5,31 ± 0,01	5,15 ± 0,09	5,24 ± 0,04
B43	5,06 ± 0,01	5,05 ± 0,05	4,98 ± 0,07	5,02 ± 0,09	4,87 ± 0,04	4,97 ± 0,08



**Figura 35** – Variação do pH das formulações durante o ciclo gelo-degelo.

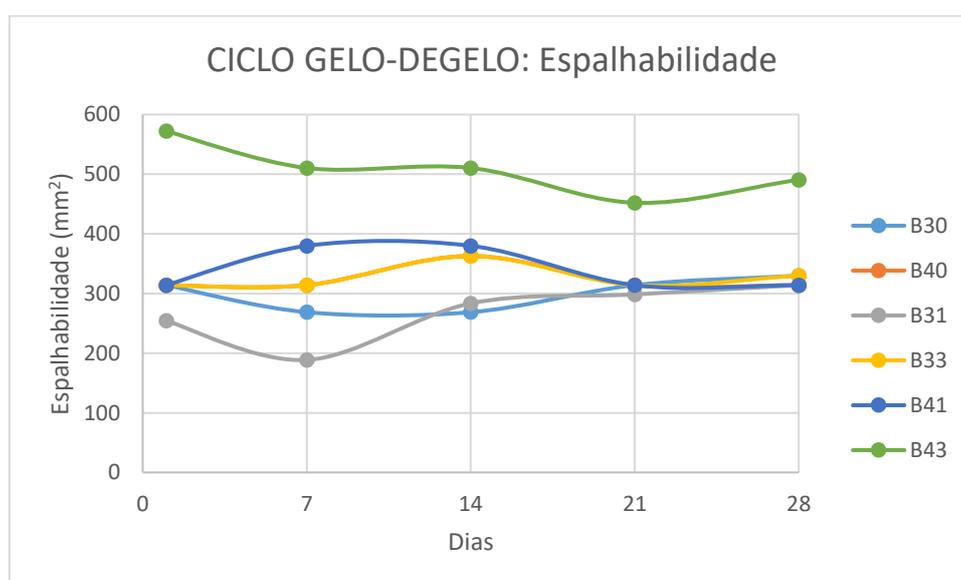
### 5.4.7.2 Espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi realizada a fim de acompanhar possíveis alterações na capacidade do espalhamento das formulações durante o período de 28 dias e os resultados estão dispostos na tabela 35.

**Tabela 35** – Análise de espalhabilidade das formulações durante 28 dias de ciclo.

Formulação	Espalhabilidade (mm <sup>2</sup> )				
	Inicial	7	14	21	28
B30	314,0000	268,6663	268,6663	314,0000	329,8963
B40	314,0000	314,0000	362,8663	314,0000	314,0000
B31	254,3400	188,5963	283,385	298,4963	314,0000
B33	314,0000	314,0000	362,8663	314,0000	329,8963
B41	314,0000	379,9400	379,9400	314,0000	314,0000
B43	572,265	510,4463	510,4463	452,1600	490,6250

Como observado na figura 36, as formulações tiveram a tendência de perder a capacidade de espalhamento a partir do 14º dia, no entanto, após esse evento, mantiveram-se com um comportamento constante, essa variação se deve às diferenças bruscas de temperaturas durante o ciclo. As formulações contendo ESA de jucá com maiores valores de espalhabilidade durante todo o ciclo gelo-degelo foram a B43, seguido da B41 e B33, o que pode possibilitar, entre as outras, melhor espalhamento sobre o tecido cutâneo.



**Figura 36** – Variação da espalhabilidade das formulações durante o ciclo gelo-degelo.

### 5.4.7.3 Densidade aparente

A densidade é representada pela relação entre a massa de uma substância e o volume que ela ocupa, e está relacionada à capacidade do recipiente (BRASIL, 2004). As formulações foram caracterizadas quanto à densidade e os resultados estão dispostos na Tabela 36, mostrando que esse parâmetro não apresentou variações expressivas mesmo sob situação de estresse. As formulações se mantiveram dentro de um padrão, entre a faixa de 0,22 a 0,24 g/cm<sup>3</sup>. Visto isso, o teste não foi continuado na estabilidade acelerada.

**Tabela 36** – Análise da densidade das formulações durante 28 dias de ciclo.

Formulação	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )				
	Inicial	7	14	21	28
B30	0,2330	0,2407	0,2373	0,2152	0,2311
B40	0,2263	0,2200	0,2263	0,2275	0,2246
B31	0,2241	0,2299	0,2292	0,2308	0,2285
B33	0,2214	0,2397	0,2166	0,2175	0,2308
B41	0,2241	0,2308	0,2241	0,2168	0,2234
B43	0,2242	0,2322	0,2242	0,2405	0,2264

### 5.4.7.4 Viscosidade

As formulações B31 e B33 apresentaram os maiores valores de viscosidade, apresentando uma maior consistência no início e ao fim do ciclo. Em geral, a maioria das formulações apresentaram diminuição da viscosidade após o ciclo. As formulações B40, B41, B43 mostraram valores próximos aos iniciais (Tabela 37). Essa condição pode estar relacionada à adição de lanolina, um emulsificante capaz de absorver água, além de possuir propriedades lubrificantes e de emoliência, e que pode ter resultado na sustentação do efeito de hidratação durante o armazenamento e prevenido o ressecamento das pomadas (SCHLOSSMAN & MCCARTHY, 1978; THOMPSON, E. J. & DAVIDOW, W. L, 2013).

**Tabela 37** – Análise da viscosidade das formulações início e após os 28 dias de ciclo.

Formulação	Viscosidade (Pa.s)	
	Inicial	Final
B30	20,195 ± 2700	18,701 ± 381
B31	57,619 ± 1772	51,635 ± 5883
B33	65,445 ± 2259	51,257 ± 426
B40	36,294 ± 1981	36,106 ± 412
B41	37,462 ± 1742	38,571 ± 748
B43	40,071 ± 2924	33,384 ± 1653

#### 5.4.8 Estabilidade acelerada

##### 5.4.8.1 pH, espalhabilidade e viscosidade

As três formulações (B40, B41 e B43) que passaram na estabilidade preliminar, seguiram para a estabilidade acelerada a fim de selecionar uma formulação estável e estimar seu tempo de prateleira. A base branca B40, sem o agente ativo, foi utilizada como controle.

Com o objetivo de detectar possíveis alterações no aspecto, cor e odor das amostras, foram realizadas as análises dos aspectos organolépticos (Tabela 32). Durante a realização do teste de estabilidade, a cor e odor e aparência de todas as amostras mantiveram-se inalterados para até 30 dias em temperatura ambiente. O armazenamento à temperatura mais elevada em estufa mostrou que o aquecimento afetou as características do controle e das pomadas com o ESA de jucá, apresentando uma leve modificação da aparência com liquefação da base, não sendo recomendada o armazenamento nessas condições. Além disso, observou-se que para a formulação B43, ocorreu leve modificação no aspecto (liquefação) tanto para à temperatura ambiente quanto à estufa.

**Tabela 38** – Aspectos organolépticos das formulações durante período de 90 dias.

<b>B40</b>																				
Condição	<b>Temperatura Ambiente</b>						<b>Geladeira</b>						<b>Estufa</b>							
Dias	0	7	15	30	60	90	0	7	15	30	60	90	0	7	15	30	60	90		
Aparência	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>B41</b>																				
	<b>Temperatura Ambiente</b>						<b>Geladeira</b>						<b>Estufa</b>							
Dias	0	7	15	30	60	90	0	7	15	30	60	90	0	7	15	30	60	90		
Aparência	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>B43</b>																				
Condição	<b>Temperatura Ambiente</b>						<b>Geladeira</b>						<b>Estufa</b>							
Dias	0	7	15	30	60	90	0	7	15	30	60	90	0	7	15	30	60	90		
Aparência	N	N	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
Cor	N	N	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM
Odor	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM

Legenda: N – normal; LM – levemente modificado.

Visto que o manto ácido da pele é importante tanto para a formação de barreira de permeabilidade quanto para a defesa antimicrobiana cutânea, e, fatores exógenos como aplicação de produtos tópicos podem influenciar no pH da pele, foi avaliada a variação de pH das formulações em função do tempo de 3 meses de estocagem. Diante os dados da tabela 39 e a partir das figuras 37 a 39 observa-se que o pH de todas as formulações se manteve mais estabilizado em geladeira (8°C). Quando armazenadas em temperatura ambiente (25°C) e principalmente em estufa (40°C), a partir do período de 30 dias ocorreu queda contínua do pH. Porém, ainda assim, esteve dentro da faixa adequada para pele (4,0 – 6,0). O pH da formulação B40 variou de 4,72 a 5,81, para B41 de 4,65 a 5,23 e para B43 de 4,47 a 4,90 durante 3 meses, o que ainda pode ser adequada para aplicação tópica.

Isto pode ser benéfico do ponto de vista antimicrobiano, visto que um pH da pele mais alcalino, geralmente acima de 6,0, facilita a colonização de bactérias patogênicas humanas e as chances de seu desenvolvimento é reduzido por um valor de pH inferior. O mesmo se aplica aos fungos, como a *Candida albicans*, cujo valores de pH mais altos

promovem um supercrescimento na pele (SCHMID-WENDTNER & KORTING, 2006; SCHNEIDER et al., 2007). Além disso, as amostras permaneceram em pH ácido, sugerindo que a base é ideal para a estabilidade dos compostos fenólicos presentes no ESA de jucá.

**Tabela 39** – Análise físico-químico de pH e espalhabilidade das formulações durante período de 90 dias.

Análises físico-químicas das formulações durante período de 90 dias.

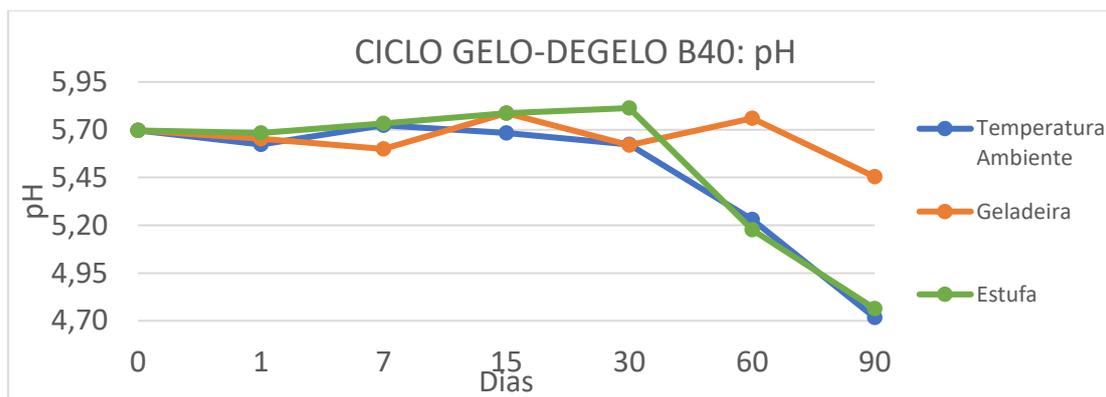
Duração (média)																				
Parâmetro	Dia 0	Dia 1				Dia 7			15 dias			30 dias			60 dias			90 dias		
Temperatura	25°C	25°C	8°C	40°C	25°C	8°C	40°C	25°C	8°C	40°C	25°C	8°C	40°C	25°C	8°C	40°C	25°C	8°C	40°C	

pH

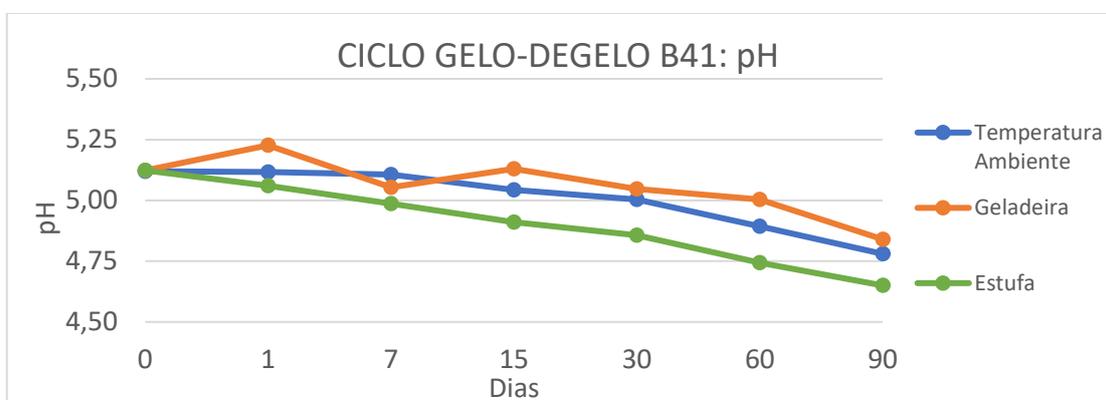
B40	5,70	5,62	5,65	5,68	5,72	5,60	5,73	5,68	5,79	5,62	5,62	5,62	5,81	5,23	5,76	5,18	4,72	5,45	4,76
B41	5,12	5,12	5,23	5,06	5,11	5,05	4,99	5,04	5,13	4,91	5,00	5,05	4,86	4,89	5,00	4,74	4,78	4,74	4,65
B43	4,90	4,83	4,89	4,83	4,76	4,82	4,76	4,84	4,86	4,73	4,75	4,85	4,66	4,72	4,81	4,53	4,67	4,69	4,47

Espalhabilidade (mm<sup>2</sup>)

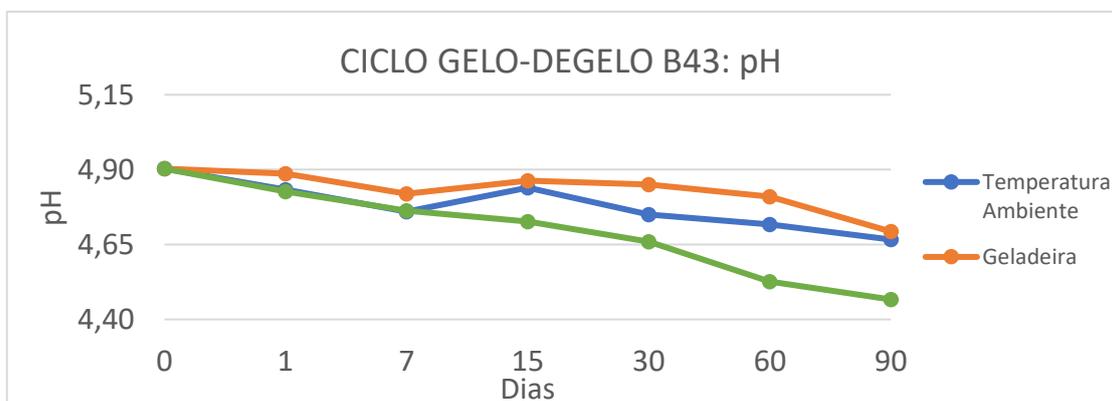
B40	362,86	314,00	314,00	397,41	346,19	346,19	362,87	329,90	329,90	379,94	346,19	346,19	314,00	314,00	268,67	471,20	452,1 6	314,00	490,63
B41	314,00	362,87	314,00	379,94	379,94	346,19	362,87	362,87	346,19	346,19	346,19	362,87	314,00	283,39	268,67	329,90	283,3 9	329,90	329,90
B43	452,16	433,52	433,52	452,16	397,41	397,41	433,52	452,16	490,63	452,16	346,19	362,87	314,00	314,00	268,67	471,20	452,1 6	314,00	490,63



**Figura 37** – Variação do pH da formulação B40 durante a estabilidade acelerada de 90 dias.



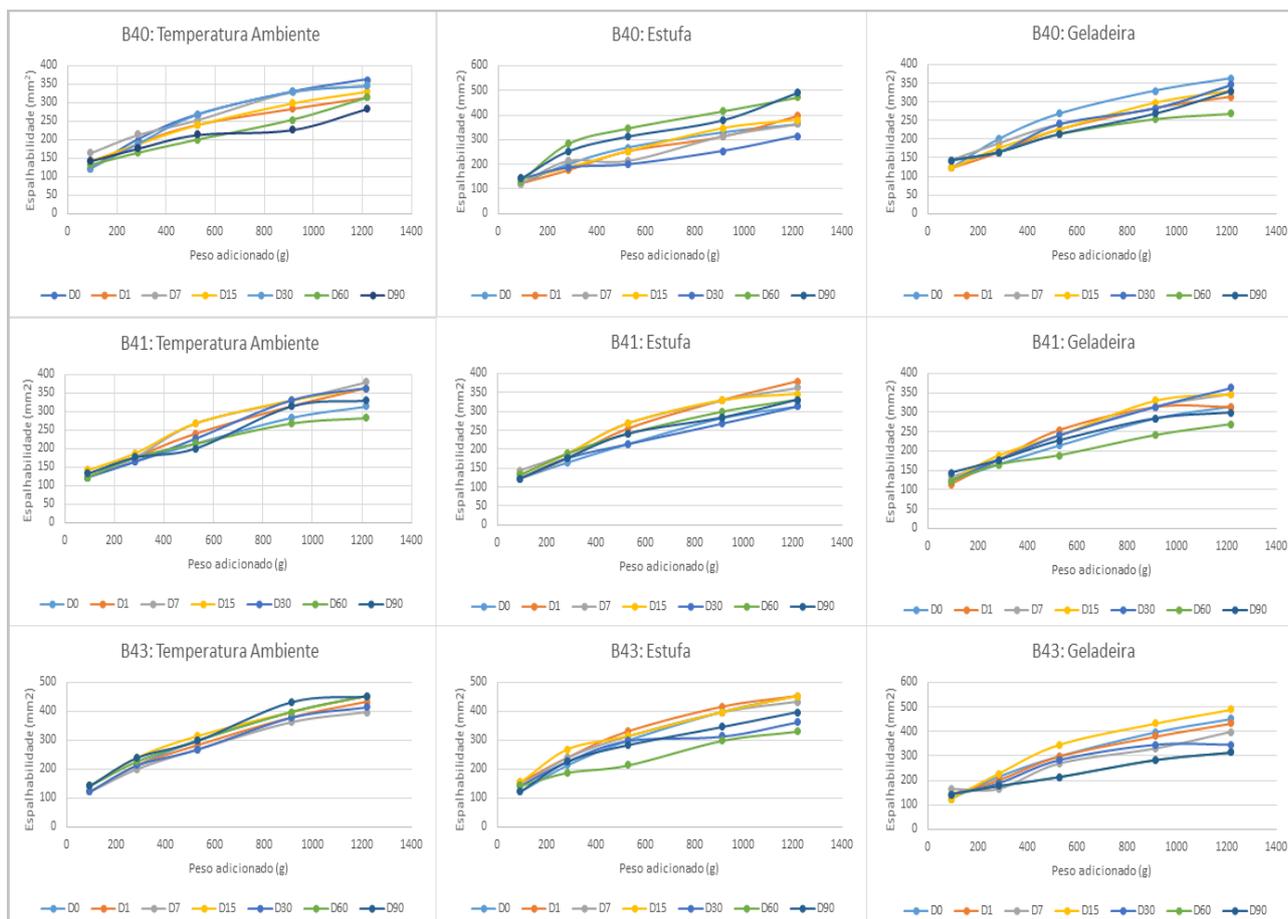
**Figura 38** – Variação do pH da formulação B41 durante a estabilidade acelerada de 90 dias.



**Figura 39** – Variação do pH da formulação B43 durante a estabilidade acelerada de 90 dias.

A fim de avaliar possíveis alterações nas características reológicas das formulações foram realizados testes de espalhabilidade e viscosidade. Quanto à espalhabilidade, a representação gráfica em função do peso aplicado revelou comportamentos distintos das formulações nas diferentes condições a que foram submetidas (Figura 40). Conforme a tabela 39, para a base B40, houve redução da

espalhabilidade à temperatura ambiente do dia 0 ( $362,86 \text{ mm}^2$ ) ao período de 90 dias ( $283,3550 \text{ mm}^2$ ), percebe-se que apresentou uma melhor estabilidade até o dia 30 ( $346,19 \text{ mm}^2$ ). Quando armazenada à temperatura ambiente, a formulação B41 também apresentou melhores características de espalhabilidade até 30 dias ( $362,86 \text{ mm}^2$ ). A formulação B43 manteve espalhabilidade em temperatura ambiente, porém apresentou queda de espalhabilidade a partir de 30 dias para condição em estufa e geladeira. Em geral, o armazenamento à temperatura mais elevada (estufa) mostrou que o aquecimento a partir de 30 dias afetou as características iniciais, apresentando ressecamento da base e influenciando diretamente na espalhabilidade. Quando armazenadas em geladeira, houve caimento da espalhabilidade devido a mudança nos aspectos das pomadas, com perda de emoliência e endurecimento.



**Figura 40** – Avaliação da espalhabilidade das formulações B40, B41 e B43 armazenadas em diferentes condições (temperatura ambiente, estufa e geladeira) durante a estabilidade acelerada de 90 dias.

Diante da tabela 40, pode ser observado que a viscosidade da formulação B40 que manteve numa faixa estável à temperatura ambiente de 27,83 até 31,62 Pa/s, na geladeira à 8°C de 29,83 a 31,53 Pa/s, e houve uma perda de viscosidade quando armazenada à 40°C do 15° (28,63 Pa/s) ao 30° dia (24,59 Pa/s), porém após tratamento estatístico não houve diferenças significativas para nenhum dos dias e condições analisadas. Para a B41, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de viscosidade somente quando submetida na condição de temperatura à 40°C (estufa). Quanto à formulação B43, durante os 30 dias não houve diferença significativa da viscosidade nas diferentes condições estudadas (8°C, 25°C e 40°C), pode ser devido à lanolina e o propilenoglicol em maior quantidade nesta formulação, agindo na sustentação do efeito de hidratação e induzindo viscosidade. Os ativos hidratantes que agem por umectação, como o propilenoglicol, é responsável por diminuir a perda transepidermal de água e garantir maior estabilidade (THOMPSON, E. J. & DAVIDOW, W. L., 2013).

**Tabela 40** – Viscosidade das formulações durante período de 30 dias.

Viscosidade (Pa.s)	Dia 0		Dia 1		Dia 7			Dia 15			Dia 30		
	25°C	25°C	8°C	40°C									
B40	27,83 <sup>a</sup> ±5,18	31,62 <sup>a</sup> ±2,77	29,83 <sup>a</sup> ±2,58	31,59 <sup>a</sup> ±1,61	26,34 <sup>a</sup> ±3,46	30,38 <sup>a</sup> ±0,66	30,63 <sup>a</sup> ±4,14	28,39 <sup>a</sup> ±1,39	30,25 <sup>a</sup> ±1,66	28,63 <sup>a</sup> ±3,98	27,14 <sup>a</sup> ±1,18	31,53 <sup>a</sup> ±1,55	24,59 <sup>a</sup> ±1,60
B41	40,17 <sup>a</sup> ±1,85	42,52 <sup>a</sup> ±1,07	39,88 <sup>a</sup> ±1,91	46,91 <sup>b</sup> ±2,79	38,62 <sup>a</sup> ±1,90	39,82 <sup>a</sup> ±1,92	47,49 <sup>b</sup> ±3,23	36,35 <sup>a</sup> ±1,80	39,03 <sup>a</sup> ±0,31	45,88 <sup>b</sup> ±1,98	36,06 <sup>a</sup> ±2,03	34,93 <sup>a</sup> ±2,40	50,97 <sup>b</sup> ±4,82
B43	34,21 <sup>a</sup> ±3,34	36,87 <sup>a</sup> ±1,27	37,12 <sup>a</sup> ±3,22	38,94 <sup>a</sup> ±3,29	34,68 <sup>a</sup> ±0,93	36,31 <sup>a</sup> ±3,46	31,90 <sup>a</sup> ±0,70	35,26 <sup>a</sup> ±1,33	36,92 <sup>a</sup> ±4,62	32,69 <sup>a</sup> ±3,28	33,98 <sup>a</sup> ±0,52	35,79 <sup>a</sup> ±2,01	38,86 <sup>a</sup> ±2,49

#### 5.4.9 Avaliação de fenóis totais

Conforme GIL (2008) entre os principais problemas que ocorrem durante a estabilidade de formulações semissólidas, além da perda de consistência e endurecimento, é a decomposição química. A caracterização química é fundamental na criação de estratégias de desenvolvimento tecnológico, nos quais o processo requer a conservação

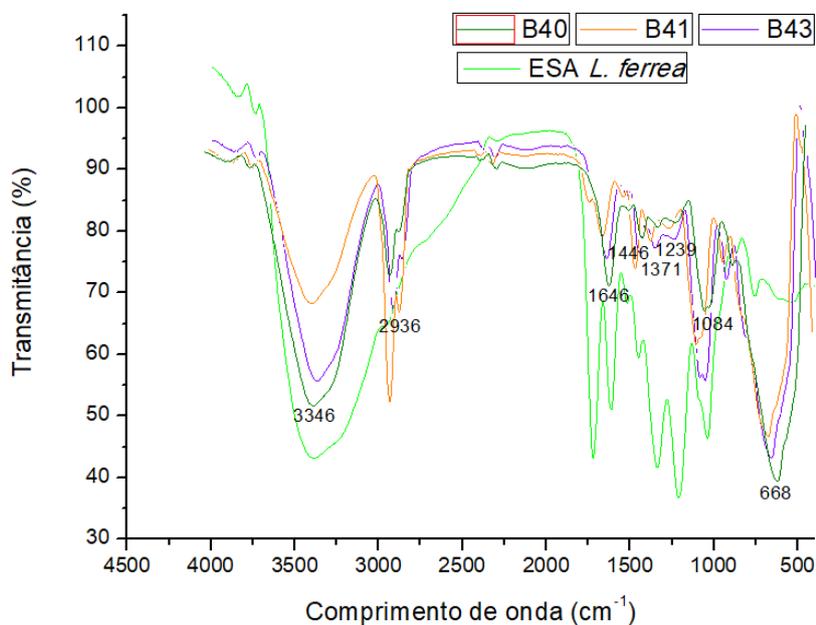
da composição química e, indispensável para o planejamento e monitoramento das ações de transformação tecnológicas e para estudos de estabilidade dos produtos intermediários e final. Isto permite a avaliação da qualidade do produto fitoterápico e a garantia da constância da ação terapêutica (KLEIN, 2010; SONAGLIO, D. et al., 2001).

Visando verificar a concentração de ativos ao final das diferentes condições de armazenamento, foi realizada o teor de polifenóis no final de 3 meses. Observou-se a redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) do conteúdo de compostos fenólicos para todas as condições impostas sobre a B41, com redução de 16,94% do teor em temperatura ambiente, 14,11% em estufa e 16,41% em geladeira. Já para a B43, não houve diferença significativa quando armazenada em temperatura ambiente, com perda de 1,71% em relação ao valor inicial. O estudo evidenciou que o armazenamento sob 8°C a 15°C (perda de 21,69%) e sob 40°C (perda de 20,28%) interferiram na estabilidade dos compostos, este fato pode estar relacionado a alterações químicas como hidrólises, oxidação ou polimerização de fenóis livres (SIMÕES et al., 2010).

**Tabela 41** – Teor de polifenóis totais (PFT) em mg/g eq. Ác. Gálico das formulações no início e fim da estabilidade de 90 dias.

Teor de polifenóis totais (PFT)		
Dia da análise / Condição	B41 x ± s	B43 x ± s
Dia 0 (Temperatura ambiente)	6,06 ± 0,05 <sup>a</sup>	7,13 ± 0,19 <sup>a</sup>
Dia 90 (Temperatura ambiente)	5,03 ± 0,07 <sup>c</sup>	7,01 ± 0,06 <sup>a</sup>
Dia 90 (Geladeira)	5,06 ± 0,08 <sup>bc</sup>	5,58 ± 0,05 <sup>b</sup>
Dia 90 (Estufa)	5,21 ± 0,09 <sup>b</sup>	5,68 ± 0,09 <sup>b</sup>

#### 5.4.10 Espectroscopia na Região do Infravermelho das formulações contendo ESA de *L. ferrea*



**Figura 41** – Espectro na região do infravermelho das formulações contendo ESA de jucá.

Na análise do espectro do infravermelho (Figura 41) da pomada B40 mostra principais bandas em 3346 (vibrações de hidroxila O-H e estiramento C-H), uma forte absorção em 2936 (alongamento de carbonila C-H), 1646 (alongamento de carbonilas C=C), 1455 (relacionada a CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> e anéis aromáticos COOH), 1446 (vibrações C-N de aminas) e 1371 a 668 possivelmente relacionados a vibrações do grupo C-O de ésteres, álcoois e ácidos carboxílicos. Tais grupos podem ser atribuídos a presença de adjuvantes derivados de hidrocarbonetos na formulação, característico da vaselina, lanolina, álcool cetosteárilico e propilenoglicol.

Além disso, o espectro de FTIR mostra que não houve alteração nos picos principais do ESA de *L. ferrea* puro e após sua mistura com os componentes da base de pomada B40, como observa-se em B41 e B43, contendo respectivamente 2,5 e 5% de ESA de jucá.

### 5.4.11 Citotoxicidade

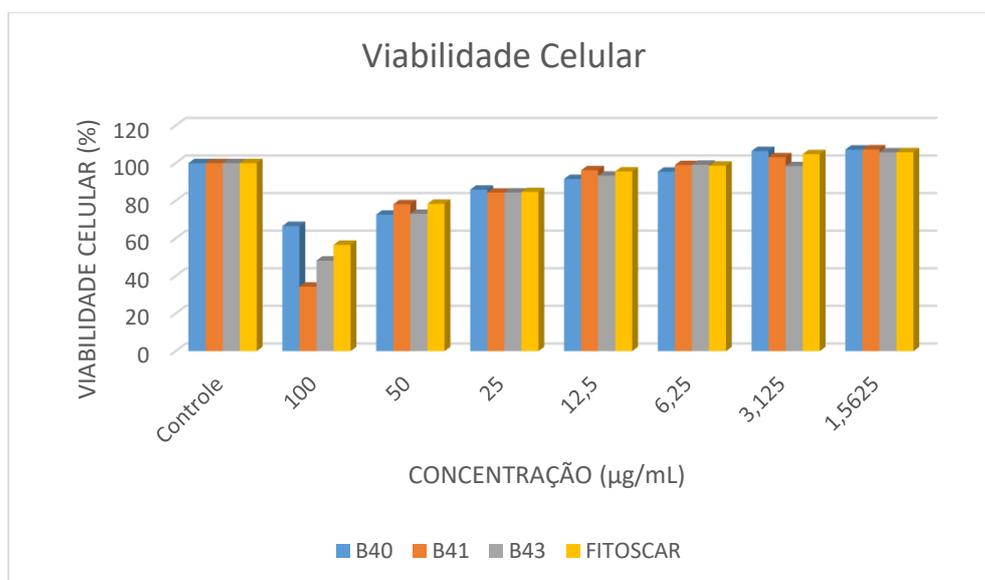
As formulações que seguiram estáveis durante o teste de estabilidade B40, B41 e B43 foram avaliadas perante teste de citotoxicidade e comparadas com um fitoterápico cicatrizante comercial Fitoscar®. A pomada foi avaliada a partir de testes em cultura de células com fibroblastos humanos MRC-5. Os dados obtidos estão dispostos na tabela a seguir.

**Tabela 42** – Viabilidade celular das formulações.

Concentração (µg/mL)	B40 x ± s	B41 x ± s	B43 x ± s	FITOSCAR® x ± s
100	66,5774 ± 2,72 <sup>a</sup>	34,3394 ± 3,60 <sup>b</sup>	48,1633 ± 2,70 <sup>b</sup>	56,5536 ± 3,74 <sup>c</sup>
50	72,6133 ± 3,04 <sup>a</sup>	78,1350 ± 3,12 <sup>a</sup>	73,0467 ± 5,43 <sup>a</sup>	78,3771 ± 1,06 <sup>a</sup>
25	85,9070 ± 3,01 <sup>a</sup>	84,3360 ± 3,81 <sup>a</sup>	84,3619 ± 3,19 <sup>a</sup>	84,6586 ± 5,89 <sup>a</sup>
12,5	91,5926 ± 1,21 <sup>a</sup>	96,2341 ± 3,51 <sup>a</sup>	93,3540 ± 3,88 <sup>a</sup>	95,5937 ± 4,28 <sup>a</sup>
6,25	95,4691 ± 3,48 <sup>a</sup>	98,9945 ± 1,26 <sup>a</sup>	99,1514 ± 1,23 <sup>a</sup>	98,6447 ± 5,09 <sup>a</sup>
3,125	106,4453 ± 2,17 <sup>a</sup>	103,1460 ± 3,21 <sup>a</sup>	98,4354 ± 2,74 <sup>a</sup>	104,7838 ± 4,91 <sup>a</sup>
1,5625	107,1896 ± 3,82 <sup>a</sup>	107,3350 ± 1,19 <sup>a</sup>	105,7455 ± 3,08 <sup>a</sup>	105,8068 ± 4,37 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas das mesmas letras na linha não diferem entre si, segundo o teste Tukey (P<0,05).

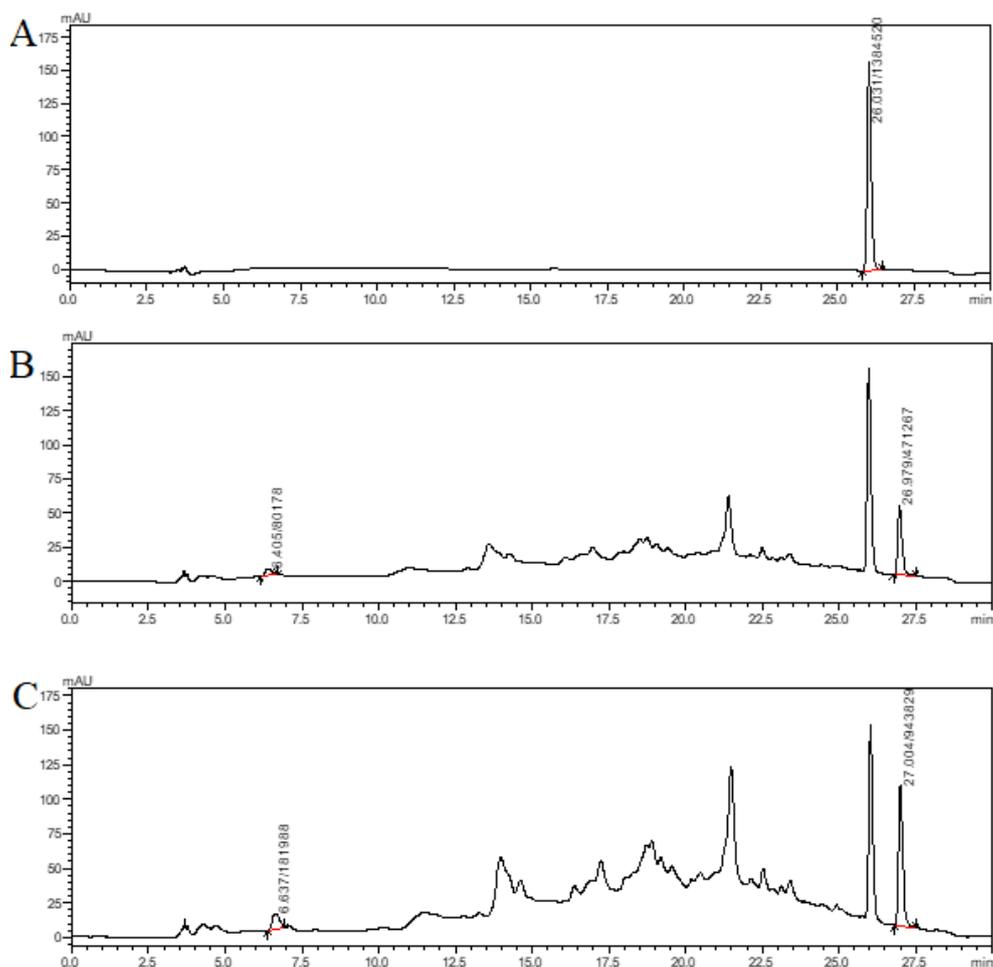
De acordo com os dados obtidos na tabela 42, houve diferenças significativas somente das amostras na maior concentração (100 µg/mL), sendo a viabilidade do branco maior que os sem o agente ativo. Porém, observa-se que em todas as demais concentrações não houve diferenças significativas entre as formulações e o controle. A figura 42 mostra que o branco e as formulações contendo ESA de jucá apresentaram valores satisfatórios nas concentrações inferiores a 25 µg/mL, pois não foram capazes de induzir dano em MRC-5, apresentando viabilidade celular superior a 80%.



**Figura 42** – Viabilidade das formulações contendo ESA de jucá.

#### 5.4.12 Adaptações do método analítico para o doseamento da formulação semissólida de *L. ferrea* por CLAE

A presença dos marcadores químicos nas pomadas foi avaliada apenas qualitativamente, onde foi identificado os picos do ácido gálico e elágico nos cromatogramas. A figura 43 mostra a presença de um pico em torno de 6 minutos para o ácido gálico e de um grande pico em torno de 27 min., mesmo  $T_R$  do ácido elágico. Ao comparar o cromatograma obtido do branco, formulação sem a adição do extrato, e o cromatograma da formulação contendo o ativo, observa-se a presença de algum dos componentes da base utilizada para a produção da pomada ( $T_R= 26$  min).



**Figura 43** - Perfil cromatográfico da base da pomada (A), pomada contendo 2,5% (B) e 5,0% (C) de extrato seco padronizado de *L. ferrea*.

Com base no exposto e por se tratar de uma forma farmacêutica semissólida, esta pode possuir muitos interferentes que podem influenciar na sua quantificação, sendo preciso garantir que os resultados obtidos sejam confiáveis e seguros. Logo, é necessária a continuidade dos estudos com uma avaliação sistemática relacionada ao desenvolvimento e validação de um método analítico que leve em consideração as características físico-químicas desta forma farmacêutica. A validação deve garantir que os componentes presentes na amostra não interfiram na quantificação do analito quando o método desenvolvido for aplicado na rotina, uma vez que um produto acabado (fitoterápico) deva atender a todos os requisitos necessários no que se refere à eficácia, segurança e qualidade, e, ainda, apresentar níveis mais severos de aceitação para as análises quantitativas, com determinação exata da sua composição (GIL, E. S, 2010; KLEIN, 2010).

## 6. CONCLUSÃO

- ✓ Diante da avaliação físico-química da MPV foi evidenciado que o lote em estudo estava em condições de ser utilizado como matéria-prima e dentro dos parâmetros mínimos preconizados pela Farmacopeia Brasileira. A caracterização físico-química da solução extrativa e extrato seco apresentaram resultados satisfatórios se comparado com estudos já realizados com a espécie vegetal.
- ✓ A análise de Espectroscopia do Infravermelho mostrou a presença de compostos fenólicos na SE, sugeriu que o processo de secagem aumentou a concentração de ativos na transformação para o extrato seco. Fato comprovado após análise do teor de polifenóis totais e quantificação de marcadores químicos.
- ✓ Perante estudos de atividade biológica, o ESA não mostrou inibição da atividade de enzimas que desempenham papel na digestão de carboidratos e lipídeos. O ESA mostrou potencial atividade antioxidante e antimicrobiana frente à *S. aureus*, e manteu uma viabilidade celular frente a fibroblastos satisfatória até o período de 72h na maior concentração estudada (100 ug/mL).
- ✓ Testes preliminares mostraram que as formulações B30 e B40 foram compatíveis com o ESA de jucá, até uma concentração de 5% e apresentaram boa estabilidade em relação ao pH. Sendo que a formulação otimizada contendo adição de lanolina se mostrou estável e dentro das expectativas iniciais de melhorar a sua espalhabilidade, sugerindo um veículo com potencial para incorporação do extrato seco de jucá.
- ✓ A pomada B43 apresentou o melhor perfil reológico, maior capacidade antioxidante e de fenóis totais, além de demonstrar significativamente maior atividade antibacteriana *in vitro* contra *S. aureus*. Os dados gerados contribuíram para direcionar seu tempo de prateleira, o qual apresentou melhor estabilidade com armazenamento em temperatura ambiente até 30 dias.
- ✓ O prosseguimento de estudos deve ser realizado a fim de garantir a eficácia e segurança da formulação, como à quantificação de marcadores químicos. A avaliação da permeação cutânea e da eficácia *in vivo* das formulações adicionadas ao extrato vegetal são necessárias para confirmar seu uso para proteção e cicatrização da pele.

## REFERÊNCIAS

- ABDELHADY, Mohamed IS; MOTAAL, Amira Abdel; BEERHUES, Ludger. Total phenolic content and antioxidant activity of standardized extracts from leaves and cell cultures of three *Callistemon* species. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 6, p. 847, 2011
- AHMED, S.A.; GOGAL JR., R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.
- ALLEN, J.R; L.V., POPOVICH, N.G & ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ALVES, M. P. **Formas Farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea *in vitro***. 166 p. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- AMORIM, I. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; ARAÚJO, E. L. Fenologia de espécies lenhosas da caatinga do Seridó, RN. **Revista Árvore - Brazilian Journal of Forest Science**, Lisboa, v. 33, p. 491-499, 2009.
- AMPARO, T. R., BRAGA, V. C. D. C., SEIBERT, J. B., SOUZA, G. H. B. D., & TEIXEIRA, L. F. D. M. Métodos para avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 50-59, 2018.
- ALJAFF, Parekhan; RASHEED, Banaz O.; OMER, Trifa Attar. A comparison between natural and synthetic food flavoring extracts using infrared spectra and optical activity. **Journal of Applied Physics**, v. 5, n. 3, p. 1-6, 2013.
- ANDRADE-CETTO, A; BECERRA-JIMÉNEZ, J. & CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R. Alpha glicosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p.27-32, 2008.
- ARAÚJO, Aurigena Antunes de et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone-water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88-96, 2014.
- BARAKAT, L. **Avaliação da viabilidade de obtenção de formas farmacêuticas plásticas contendo extrato seco de *Caesalpinia ferrea* Mart.** 100f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, 2011.
- BARROS, Aline Oliveira. **Avaliação das atividades antioxidantes e inibitória sobre as enzimas elastase e colagenase e hialuronidase da *Libidibia ferrea* MART.** 68f.

Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 2012.

BARROS, A. O.; SOUZA, S. R.; ARANHA, E. S. P.; DA COSTA, L. M.; SOUZA, T. P.; VASCONCELLOS, M. N.; LIMA, E. S. Antioxidant and hepatoprotective activities of *Libidibia ferrea* bark and fruits extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. vol. 6, n. 11. 2014.

BARROSO, Marisa R. et al. Exploring the antioxidant potential of Helichrysum stoechas (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications: Chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer. **Industrial crops and products**, v. 53, p. 330-336, 2014.

BATE-SMITH, E. C. Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. **Phytochemistry**, v. 12, n. 4, p. 907-912, 1973.

BATISTA, E. K. F., DA TRINDADE, H. I., DOS SANTOS FARIAS, I., MARTINS, F. M. M., DA SILVA FILHO, O. F., & DE SOUZA BATISTA, M. D. C. Avaliação da atividade cicatrizante de preparados à base de jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart.). **Archives of Veterinary Science**, v. 22, n. 3, 2017.

BENINI, E. B., SARTORI, M. A. B., BUSCH, G. C., REMPEL, C., SCHULTZ, G., & STROHSCHOEN, A. A. G. Valorização da flora nativa quanto ao potencial Fitoterápico. **Revista Destaques Acadêmicos**. ano 2, n. 3, 2010.

BERNARDES et al. Produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos. In: SIMÕES C. M. O., SCHENKEL, E. P., DE MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., & PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, p. 129-145. 2017.

BISCHOFF, H. B. A. G. Pharmacology of  $\alpha$ -glucosidase inhibition. **European Journal of Clinical Investigation**, n. 24, 3–10. 2010.

BITTENCOURT, Paulo Senna Taylor. Perfil químico, atividade anti-inflamatória e antioxidante das cascas dos frutos de *Libidibia ferrea*. 103f. Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal do Amazonas, 2017.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F.; J. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Food Chem**. p. 52, 2004.

BORRELLI, FRANCESCA; IZZO, ANGELO A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 14, n. 8, p. 581-591, 2000.

BOWLER, PHILIP G.; DAVIES, BARRY J. The microbiology of infected and noninfected leg ulcers. **International journal of dermatology**, v. 38, n. 8, p. 573-578, 1999.

BRASIL. Resolução CIPLAN N° 8/88, de 8 de mar.1988. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília**, v. 126, n. 48, p. 3.999-4.000, 11 mar. Seção I, 1988.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RE n° 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília: ANVISA, 2003. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1ª edição. Brasília: ANVISA, 52 p. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde; 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2ª edição. Brasília: ANVISA, 120 p., 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília: Anvisa, p. 59-73, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 26, de 13 de maio de 2014. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília: Anvisa, 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 192 p, 2016.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). BRASIL. Resolução RE n° 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília: ANVISA, 2017.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira v. II – Monografias de Plantas Mediciniais. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília: Anvisa, 2019.

BUNDESVEREINIGUNG, Deutscher Apothekerverbände (Hrsg.). Deutscher Arzneimittel – *Codex*. Frankfurt. v.1; Codex – Probe 4,9, 1986.

CARBONEZI, C. A., HAMERSKI, L., GUNATILAKA, A. A., CAVALHEIRO, A., CASTRO-GAMBOA, I., SILVA, D. H. S. & BOLZANI, V. D. S. Bioactive flavone dimers from *Ouratea multiflora* (Ochnaceae). **Rev. bras. Farmacogn**, João Pessoa, v. 17, n. 3, p. 319-324, 2007.

CARDOSO, D., SÄRKINEN, T., ALEXANDER, S., AMORIM, A. M., BITTRICH, V., CELIS, M. & GOLDENBERG, R. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 40, p. 10695-10700, 2017.

CARRERAS, R. DE LA T. & GONZALEZ, J. L. Las plantas aromáticas y medicinales: futuro y potencialidad en Extremadura. In: MARTÍNEZ, J. M. C.; PARDO, E DE M.; BLANCO, R. G.; GARCÍA, F. P. (Coord.). **La agricultura y la ganadería extremeñas**: Espanha, p. 139-152, 2011.

CARVALHO, J.C.T.; TEIXEIRA, J.R.M.; PERGENTINO, J.C.S.; BASTOS, J.K.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.53, p.175-178. 1996.

CAVALHEIRO, M. G.; FARIAS, D. F.; FERNANDES, G. S.; NUNES, E. P.; CAVALCANTI, F. S.; VASCONCELOS, I. M.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. (2009). Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 586-591, 2009.

CELESTINO, S. M. C. Princípios de secagem de alimentos. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 51 p. 2010.

CHVAPIL, Milos; GAINES, John A.; GILMAN, Thomas. Lanolin and epidermal growth factor in healing of partial-thickness pig wounds. **The Journal of burn care & rehabilitation**, v. 9, n. 3, p. 279-284, 1988. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jbcr/article-abstract/9/3/279/4786243>> Acesso em Maio de 2020.

CHONG, S. Y.; WONG, C. W. Effect of spray dryer inlet temperature and maltodextrin concentration on colour profile and total phenolic content of Sapodilla (*Manilkara zapota*) powder. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 6, p. 2543-2548, 2017.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana**: 15 suplemento informativo. Tradução: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 15. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, [2005]. 177 p. (CLSI document M100-S15). 2005.

CLSI. M100-S23: **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania, USA, v. 33, n.1, p.1-199, jan. 2013.

COCA, Kelly Pereira; ABRAO, Ana Cristina Freitas de Vilhena. Uma avaliação do efeito da lanolina na cicatrização de lesões mamilares. **Acta paul. enferm.** São Paulo, v. 21, n. 1, p. 11-16, março de 2008.

COELHO, J. M.; ANTONIOLLI, A. B., NUNES E SILVA, D.; CARVALHO, T.; PONTES, E. R. & ODASHIRO, A. N. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 37, n. 1, p. 45-51, 2010.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; JENSEN, B. B., GRAFOVA, I., SANTOS, P. A. D., BARROS, A. M. C., SOARES, F. V. & FRANCO, A. M. R. Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of *in vitro* and *in vivo* tests. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 47, n. 4, p. 331-340, 2017.

COSTA, K. J. A.; LAMEIRA, O. A.; ASSIS, R. M. A. de; MOURA, R. C.; ALMEIDA, L. da S. S. de; FERNANDES, V. S. **Aspectos fenológicos do jucá-*Caesalpinia ferrea* Martius ex Tul. (Fabaceae)**. In Embrapa Amazônia Oriental - Artigo em anais de congresso (ALICE). In: ENCONTRO AMAZÔNICO DE AGRÁRIAS, 8., 2016, Belém, PA. Anais. Belém, Pará, 2016.

COSTA, Leidyana Moraes. **Desenvolvimento de produto seco por aspersão obtido a partir das cascas do caule de *Libidibia ferrea* Martius var. *ferrea* (Fabaceae)**. 127f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, 2012.

COSTA, Leidyana Moraes; GUILHON-SIMPLICIO, FERNANDA; SOUZA, T. P. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz var. *ferrea*: pharmacological, phytochemical and botanical aspects. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 48-53, 2015.

DA COSTA, Russany Silva et al. Thermoanalytical and phytochemical study of the cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) seed by-product in different processing stages. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1-10, 2020.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. Química de Alimentos de Fennema. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DE ARAÚJO, A. A.; SOARES, L. A. L.; FERREIRA, M. R. A.; DE SOUZA NETO, M. A.; DA SILVA, G. R.; DE ARAÚJO JR, R. F.; DE MELO, M. C. N. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 156, p. 88-96, 2014.

DEGÁSPARI, Cláudia Helena; WASZCZYNSKYJ, Nina. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.

DE LIMA CHERUBIM, D. J., BUZANELLO MARTINS, C. V., OLIVEIRA FARIÑA, L., & DA SILVA DE LUCCA, R. A. et al. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 1, p. 33-37, 2020.

DEMARCHI, S. M., RUIZ, N. A. Q. & CONCELLON, A. Effect of temperature on hot-air drying rate and on retention of antioxidant capacity in apple leathers. **Food and Bioproducts Processing** 91: 310-318, 2013.

DE SOUZA T. P.; PETROVICK P. R.; SPANIOL B. Avaliação de comprimidos revestidos por película contendo alta concentração de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri*. **Acta Farm Bonaerense** 24: 61-67, 2005.

DOS SANTOS AMÉRICO, Á., NUNES, K. M., DE ASSIS, F., DIAS, S. R., PASSOS, C., MORINI, A. C., DE ARAÚJO, J. A., CASTRO, K., DA SILVA, S., BARATA, L., & MINERVINO, A. Efficacy of Phytopharmaceuticals from the Amazonian Plant *Libidibia ferrea* for Wound Healing in Dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, 2020.

EVANGELISTA, S. S., SAMPAIO, F. C., PARENTE, R. C., & BANDEIRA, M. F. C. L. Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. **Rev. Bras. Plantas med.**, Botucatu v. 15, n. 4, p. 513-519, 2013.

FALCÃO, Tamires Rocha. **Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva dos extratos brutos e frações de Eugenia uniflora e Libidibia ferrea in vivo**. 2017. 136f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.

FERREIRA, Cristiane D.; PENA, Rosinelson S. Comportamento higroscópico da farinha de pupunha (*Bactris gasipaes*). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 251-255, 2003.

FERREIRA, Eliomar Evaristo et al. Reologia de suspensões minerais: uma revisão. **Rem: Rev. Esc. Minas**, Ouro Preto, v. 58, n. 1, p. 83-87, Mar. 2005.

FERREIRA, J. V., FERREIRA DE LIMA, L., GOMES FIGUEREDO, F., FERREIRA MATIAS, E. F., SOBRAL DE SOUZA, E., COSMO ANDRADE, J. & BEZERRA DA CUNHA, F. A. Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora do extrato etanólico de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 1, set. 2015.

FERREIRA, M. R. A.; & SOARES, L. A. R. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. **Journal of Medicinal Plants Research**, 9(5), 140- 150. 2015.

FERREIRA, M. R., FERNANDES, M. T., DA SILVA, W. A., BEZERRA, I. C., DE SOUZA, T. P., PIMENTEL, M. F., & SOARES, L. A. Chromatographic and spectrophotometric analysis of phenolic compounds from fruits of *Libidibia ferrea* Martius. *Pharmacognosy magazine*, v. 12, n. Suppl 2, p. S285, 2016.

FERRERA, T.S., HELDWEIN, A.B., DOS SANTOS, C.O., SOMAVILLA, J.C., & SAUTTER, C.K. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em ervaíras sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Rev. bras. plantas med.** Botucatu, v. 18, n. 2, supl. 1, p. 588-596, 2016.

FIGUEREDO, C.A.; GURGEL, I.G.D.; GURGEL JUNIOR, G.D. The National Policy on Medicinal Plants and Phytotherapy: building, perspectives and challenges. **Physis**, v.24, n.2, p.381- 400, 2014.

FIGUEROA-ROBLES, Alejandra; ANTUNES-RICARDO, Marilena; GUAJARDO-FLORES, Daniel. Encapsulation of phenolic compounds with liposomal improvement in the cosmetic industry. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 120-125, 2020.

FRANCO, Raquel Alexandra Barreto. **Estudo da Influência de Vários Espessantes em Dispersões Aquosas**. 2014. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica. Universidade Nova de Lisboa. 106 p. 2014.

FREITAS, A. C. C., XIMENES, N. C. A., AGUIAR, J. S., NASCIMENTO, S. C., LINS, T. U. L., MAGALHÃES, L. R., CORREIA, M. T. S. Biological Activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, 2012.

FRESHNEY, R. I. In: Culture of animals Cells: A Manual of Basic Technique. 5. ed. New York: **Wiley-Liss**, 580 p., 2005.

GALDINO, G.; MESQUITA, M. R.; FERRAZ, I. D. K. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 02, p. 747- 749, jul. 2007.

GALVÃO, Marcos Aurélio Moraes. **Estabelecimento de método por UV/Vis para o controle de qualidade dos frutos e das cascas do caule de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz**. 80f. Dissertação de Mestrado em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

GARG, Alka et al. Spreading of semisolid formulations: an update. **Pharmaceutical technology**, v. 26, n. 9, p. 84-105, 2002.

GARROS, I. DE C.; CAMPOS, A. C. L., TÂMBARA, E. M., TENÓRIO, S. B., TORRES, O. J. M., AGULHAM, M. Â. & DE MORAES ARRUDA, E. C. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cir. Bras.**, vol.21, 2006.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N. & SILVA, R. D. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química nova**, p. 136-145, 2007.

GOMES, F. S. L.; CARVALHO, D. V.; LIMA, E. D. R. de P. Tratamento de feridas crônicas com coberturas oclusivas. **Revista Mineira de Enfermagem**, v. 13, n. 1, p. 19-27, 2009.

GONÇALVES, G. M. S.; CAMPOS, PMBG Maia. Shelf life and rheology of emulsions containing vitamin C and its derivatives. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 2, 2009.

GONZALEZ, F. G.; BARROS, S. B. D. M. & BACCHI, E. M. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 78, 2004.

GRISI, C. V. B.; CORDEIRO, A. M. T. de M.; NASCIMENTO, M. K. G. do; FRANCA, S. A. M. da; FREIRE, S. M. M.; ALBUQUERQUE, C. L. C. de; MARQUES, A. da S.; ARAÚJO, G. T. de. Antioxidant potential and stability of the juca (*Libidibia ferrea*) bioadditive. Research, Society and Development, [S. l.], v. 9, n. 7, p. e945975224, 2020. HASENCLEVER, L., PARANHOS, J., COSTA, C. R., CUNHA, G., & VIEIRA, D. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, 22, 2559-2569, 2017.

HASSAN, S. K; EL-SAMMAD, N. M.; MOUSA, A. M.; MOHAMMED, M. H.; FARRAG, ABD.; HASHIM, A. N. E.; WERNER, V.; LINDEQUIST, U.; NAWWAR, M. Hypoglycemic and antioxidant activities of *Caesalpinia ferrea* Martius leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Volume 5, 462-471, 2015.

ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81-96, 2009.

JONES, R. R.; CASTELLETTO, V., CONNON, C. J., & HAMLEY, I. W. The collagen stimulating effect of peptide amphiphile C16-KTTKS on human fibroblasts. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, p. 1063–1069, 2013.

JOZALA, Angela F. et al. *Libidibia ferrea* loaded in bacterial nanocellulose: evaluation of antimicrobial activity and wound care/*Libidibia ferrea* loaded in bacterial nanocellulose: evaluation of antimicrobial activity and wound care. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2, p. 6212-6226, 2020.

KALITA, D.; HOLM, D. G.; LABARBERA, D. V; PETRASH J. M.; JAYANTY S.S. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds. **PloS one**, v. 13, n. 1, 2018.

KIRK, K., HAMELMANN, L., HALAWI, F., TINDANA, P., & GREENBAUM, S. Report of the United Nations Secretary-General's High-Level Panel on Access to Medicines. **Geneva, Switzerland: United Nations Secretary-General**, 2016.

KLEIN, T., LONGHINI, R., BRUSCHI, M. L., & MELLO, J. C. P. D. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2010.

KOBAYASHI, Y.; ALMEIDA, V.; BANDEIRA, T.; ALCÂNTARA, B.; SILVA, A.; BARBOSA, W. L.; SILVA, P.; MONTEIRO, M.; ALMEIDA, M. Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos

Wistar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 34-40, 13 abr. 2015.

KNORST, M. T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides*. Lam. DC. Compositae. (Marcela)**. Porto Alegre. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.

LANG, Gustavo Heinrich et al. Effects of drying temperature and long-term storage conditions on black rice phenolic compounds. **Food chemistry**, v. 287, p. 197-204, 2019.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. 1ª ed. São Carlos: RiMa. 531p. 2004.

LEITE, Beatriz Nori; SILVA, Jhessica Rodrigues; DE SOUZA, Andersy Cordeiro Calado. **DEMAQUILANTE TRIFÁSICO. Revista Pesquisa e Ação**, v. 4, n. 2, 2018.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, p. 563-569, out. 2002.

LIMA, S. M A., ARAÚJO, L. C. C., SITÔNIO, M. M., FREITAS, A. C. C., MOURA, S. L., CORREIA, M. T. S., MALTA, D. J. N. & GONÇALVES-SILVA, T. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 169-175, 2012.

LIMA, T. C., ALVES, J. D. A., de BRITO, M. S., FIGUEIREDO, M., SALLES, H., & ANDRADE, L. D. S. Caracterização de uma amilase de sementes de *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.). In: **Embrapa Caprinos e Ovinos-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 65., 2013, Recife. Ciência para um novo Brasil. Recife: UFPE: SBPC, 2013. 2 p., 2013.

LOCH-NECKEL, Gecioni et al. Obtenção de extratos secos de carotenoides a partir da biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* por secagem em torre de aspersão (spray-drying). **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 23, n. 4, 2018.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 1 ed. Editora Nova Odessa. São Paulo: Instituto Plantarum, 352 p., 1998.

LUNA, M. S. M. et al. Bioprospection of *Libidibia ferrea* var. *ferrea*: Phytochemical properties and antibacterial activity. **South African Journal of Botany**, v. 130, p. 103-108, 2020.

MADALENO, Isabel Maria. Plantas da medicina popular de São Luís, Brasil. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi**. Ciênc. hum., Belém, v. 6, n. 2, p. 273-286, 2011.

MAIA, G.N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. 1ª ed. São Paulo: D & Z Editora., 413 p., 2004.

MARINHO, J.V.F; PEFEIRA, MM; WANDERLEY, A.G.; SOARES, L.A.L.; LIMA, E.S.; SOUZA, T.P. **Technological characteristics of fruits of *Caesalpinia ferrea* Mar. (Leguminosae) as Medicinal Raw Material**. Resumos in: XX SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS, São Paulo, 2008.

MARINHO, Jackeline de Souza. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas contendo alto teor de produto seco por aspersão de frutos de *Libidibia ferrea* Mart.** 106f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, 2016.

MARQUES, L. C.; SOUZA, C. M. Pesquisa e Desenvolvimento de Fitoterápicos: Relatos de Experiência em Indústria Farmacêutica Nacional. **Revista Fitos**, v. 7, n. 1. 2012.

MARTINS, E.; MARTINS, E., CNOSSEN, D. C., SILVA, C. R. J., JUNIOR, J. C., NERO, L. A., PERRONE, I. T., & CARVALHO, A. F. Determination of ideal water activity and powder temperature after spray drying to reduce *Lactococcus lactis* cell viability loss. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 7, p. 6013-6022, 2019.

MARUNO, Monica. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele**. Tese de Doutorado em Medicamentos e Cosméticos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009.

MATOS, Anselmo Junio Pedroso. **Controle de qualidade físico-químico de uma formulação de pomada orabase de *Libidibia ferrea* ex. *Caesalpinia ferrea***. 63 f. Dissertação de Mestrado em Odontologia, Universidade Federal do Amazonas, 2016.

MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFGRS/Ed.UFSC., cap. 24, p.517-543. 2001

MENDONÇA, C. C. et al. Emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%: avaliação da estabilidade acelerada e estudos de liberação in vitro. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 1, 2009.

MISHRA, P., MISHRA, S. AND MAHANTA, C. L. Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. **Food and Bioproducts Processing** 92: 252-258, 2014.

MOLYNEUX, Philip. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. & ARAÚJO, E. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892, 2005.

MORAES, Helen Pimenta de. **Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos de *Byrsonima ssp* E *Alchornea ssp*: estudo comparativo entre as técnicas de diluição em tubos e microplacas**. 79 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2006.

MOREIRA, L.C., DE ÁVILA, R.I., VELOSO, D., et al. In vitro safety and efficacy evaluations of a complex botanical mixture of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae): prospects for developing a new dermocosmetic product. *Toxicol in vitro*. 2017.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; et al. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 135-137, 2002.

NAKAYAMA, Grace R. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **J Immunol Methods**, v. 204, p. 205-208, 1997.

NASCIMENTO, J. É. C., REATGUI, W. D. S., ARAÚJO, L. S. D., RIBEIRO, M. E. D. S., MAIA, D. C. D. S., GIACOMIN, L. L., & BARATTO, L. C. Avaliação do potencial antioxidante e anti-*Helicobacter pylori* *in vitro* de extratos de plantas medicinais utilizadas popularmente na região amazônica. **Revista Fitos**, s.1, v. 11, n. 2, p. 140-152, jan. 2018.

NASCIMENTO, P. L., NASCIMENTO, T. C., GOMES, J. E., SILVA, M. D., SOUZA, S. A., SILVA, T., & MOREIRA, K. A. Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extract of *Libidibia ferrea* pods. **Revista Fitos**, v. 9, n. 3, p. 207-216, dez. 2015.

NASCIMENTO, P. L. A.; NASCIMENTO, T. C. E. S.; GOMES, J. E. G.; SILVA, M. D. S.; SOUZA, S. A.; SILVA, T. M. S.; FALCÃO, R. A.; MOREIRA, K. A. Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extract of *Libidibia ferrea* pods. **Revista Fitos**, v. 9, n. 3, p. 207-216, 2015.

NETTO E. M.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; BALBINO, E. E.; CARVALHO, A. C. B. Comentários sobre o registro de fitoterápicos. **Rev Fitos**, p. 9-17, 2006.

OECD, Guidance document for the conduct of skin absorption studies. **Paris: Organization for economic cooperation and development**, 2004.

OLIVEIRA, Olivia Werner; PETROVICK, Pedro Ros. Secagem por aspensão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista brasileira de farmacognosia**. São Paulo, SP. Vol. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, Ana Claudia Dias; ROPKE, Cristina. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Fitos**, v. 10, n. 2, p. 185-198, dez. 2016.

OLIVEIRA, Renata Nunes et al. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. **Matéria (Rio J.)**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 767-779, 2016.

OLIVEIRA, A. F., BATISTA, J. S., PAIVA, E. S., SILVA, A. E., FARIAS, Y. J. M. D., DAMASCENO, C. A. R., & FREITAS, C. I. A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 302-310, 2010.

OLIVEIRA, Fernando de; SAITO, Maria Lucia. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento da diabetes. **Rev. bras. farmacogn.**, São Paulo, v. 2-3-4, p. 170-196, 1989.

OLIVEIRA, Glauber P; Tatiane P. Souza; Sheila K. Caetano; Kaliny S. Farias; Gisely N. Venancio; Maria F. C. L. Bandeira; Nikeila C. O. Conde. Antimicrobial activity *in vitro* of extracts of the stem bark and fruit of *Libidibia ferrea* against microorganisms of the oral cavity. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol. 8(2): 73-160, 2013.

OLIVEIRA, I. V. P., DA CUNHA DIAS, R. V., CALADO, E., LUCENA, R., COSTA, A. L., & PIMENTEL, M. M. L. Avaliação Cicatricial Macroscópica Da Vagem E Da Casca Do Jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tul. Var. *Ferrea*) Em Lesões Cutâneas Em Asininos (*Equus Asinus*). **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. 2, p. 129-135, 2014.

PAIVA, S.R.; HERINGER, A.P.; FIGUEIREDO, M.R.; KAPLAN, M.A.C. **Taninos condensados de espécies de Plumbaginaceae**. Floresta e Ambiente, v.09, n.01, p. 153-157, dez. 2002.

PAVIA, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. Espectrometria de Massa. **Introdução à Espectroscopia**. 4a ed. São Paulo, 2010.

PACHÚ, C. O. **Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos**. 2007. 102f. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Processos) Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, Campina Grande, 2007.

PAPANAS, N.; MALTEZOS, E. Polyherbal formulation as a therapeutic option to improve wound healing in the diabetic foot. **The Indian Journal of Medical Research**, v.134, n.2, p.146-147, 2011.

PEREIRA, M. DO SOCORRO VIEIRA; ONALDO GUEDES RODRIGUES, FRANCISCO MARLON C. FEIJÓ, ANA CÉLIA R ATHAYDE, EDNALDO QUEIROGA DE LIMA, MARIA RAQUEL QUERINO DE SOUSA. Atividade antimicrobiana de extratos de plantas no Semi-Árido Paraibano. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 2, n. 1, 2010.

PETRY, KATYANNA & ANTÔNIO, WALTER & ROMAN JUNIOR, WALTER. Viabilidade de implantação de fitoterápicos e plantas medicinais no Sistema Único de Saúde (SUS) do município de Três Passos. **Rev. Bras. Farm.** 93. 60-67. 2012.

PRAZERES, Lady DKT et al. Antioxidant and Antiulcerogenic Activity of the Dry Extract of Pods of *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul.(Fabaceae). **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, 2019.

PRIMO, M. S. Efeito do processamento com CO<sub>2</sub> comprimido sobre a atividade enzimática da peroxidase (POD) e da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill). 81 p. Dissertação de mestrado, Universidade Universidade Regional Integrada. 2006.

PRISTA, L. V. N. **Tecnologia farmacêutica**. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. vol. I.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., & RICE-EVANS, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26, 1231–1237, 1999.

RODRIGUES, A. L. S.; DE OLIVEIRA, B. G. R. B.; FUTURO, D. O.; SECOLI, S. R. Efetividade do gel de papaína no tratamento de úlceras venosas: ensaio clínico randomizado. **Rev. Latino-Am. Enfermagem** Forthcoming 2015.

RODRIGUES, I.C.; LIMA, E. S.; SOUZA, T. P. **Standardization of extractive solution of *Caesalpinia ferrea* aiming inhibitory activity of alfa-glucosidase**. In: XXI Simposio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2010, João Pessoa. Anais do XXI Simposio de Plantas Mediciniais do Brasil, v. 1. p. 1-1. 2010.

RUFINO, M. S. M. ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C.G.; PÉEZ-JIMN, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+. EMBRAPA, v.128, 2007.

SADER, HÉLIO S.; DURAZZO, ANAÍ. Terapia antimicrobiana nas infecções do pé diabético. **J. vasc. bras**, v. 2, n. 1, p. 61-66, 2003.

SAMPAIO, F.C.; PEREIRA, M.S.V.; DIAS, C.S.; COSTA, V.C.O.; CONDE, N.C.O.; BUZALAF, M.A.R. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, s.n., p. 289-294, 2009.

SAMPAIO, R. D. C. A., DA COSTA, R. S., DE SOUZA, C. R. F., JÚNIOR, A. P. D., RIBEIRO-COSTA, R. M., DA COSTA, C. E. F., & JÚNIOR, J. O. C. S. Thermal characterization of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. dry extracts obtained by spray dryer. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 3, p. 2469-2475, 2016.

SANTOS & ALMEIDA EDITORA, I. F. B. **Das Plantas Mediciniais à Fitoterapia: uma ciência em expansão**. 214 p. EDITORA IFB, 2016.

SANTOS, F. S.; SANTOS, S. A; CORPES, R. S.; LEÃO, N. V. M. Aspectos do Cultivo *in vitro* de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz (Leguminosae -

Caesalpinioideae) como fonte alternativa para produção de metabólitos secundários. **Revista Espacios**. Vol. 39. Nº 37. 2018.

SANTOS, J.S; VIEIRA, A.B; KAMADA, I. Tratamento de feridas abertas usando Rosa Mosqueta: uma revisão. **Rev. Bras Enferm**, v.62, n.3, p.457-62, 2009.

SCHNEIDER, L. A., KORBER, A., GRABBE, S., & DISSEMOND, J. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? **Archives of dermatological research**, v. 298, n. 9, p. 413-420, 2007.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre, RS: Editora da UFRGS, 2007.

SCHMID-WENDTNER, M.-H.; KORTING, Hans Christian. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin pharmacology and physiology**, v. 19, n. 6, p. 296-302, 2006.

SCRIBAN, E. **Biotecnologia**. Editora Malone: São Paulo. 498p., 1985.

SILVA, L. L., LOPES, P. F., MONTEIRO, M. H. D. A., & MACEDO, H. W. Importância do uso de plantas medicinais nos processos de xerose, fissuras e cicatrização na diabetes mellitus. **Rev. bras. plantas med**, v. 17, n. 4, supl. 1, p. 827-835, 2015.

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Rev. bras. geriatr. gerontol.**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 1102 p. 2007.

SLANC, P.; DOLJAK, B.; KREFT, S.; LUNDER, M.; JANES, D. STRUKELJ, B. Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. **Phytother. Res.**, v.23, 874–877, 2009.

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOARES, Luiz Alberto Lira. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz: a review of the biological activities and phytochemical composition. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 5, p. 140-150, 2015.

SOUZA, M. C. A., FRANCO, R. O. M., DE OLIVEIRA, P. S. C., & DE SOUZA, E. R. P. Úlcera crônica tratada com gel de papaína 10% na Estratégia Saúde da Família: relato de experiência. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, s.1, v. 12, n. 39, p. 1-8, mar. 2017.

SUBRAMANIAN, R., ASMAWI, M. Z., & SADIKUN, A. *In vitro*  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **Acta Biochim Pol**, v. 55, n. 2, p. 391-398, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 820p. 2013

TIWARI, V., ROY, R., TIWARI, M. "Antimicrobial active herbal components against *Acinetobacter baumannii* and other pathogens", *Front. Microbiol.*, Vol. 6, pp. 1-11, junho de 2015.

TOLEDO A.C.O.; HIRATA L.L.; BUFFON M.C.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Rev Lecta**, Bragança Paulista v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

UEDA, H., TACHIBANA, Y., MORIYASU, M., KAWANISHI, K., & ALVES, S. M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 377-381, 2001.

VARELLA, Marcelo Dias. Biodiversidade e instrumentos jurídicos relevantes. **Seqüência: Estudos Jurídicos e Políticos**, v. 18, n. 35, p. 81-96, 1997.

VASCONCELOS, C.F.B.; MARANHÃO, H.M.L.; BATISTA, T.M.; CARNEIRO, E.M.; FERREIRA, F.; COSTA, J.; SOARES, L.A.L.; SÁ, M.D.C.; SOUZA, T.P.; WANDERLEY, A.G. 2011 - 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.

VEHRING, Reinhard; FOSS, Willard R.; LECHUGA-BALLESTEROS, David. Particle formation in spray drying. **Journal of Aerosol Science**, v. 38, n. 7, p. 728-746, 2007.

VIDOVIĆ, Senka S. et al. Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in Satureja montana dry powder extract obtained by spray drying technique. **Powder technology**, v. 258, p. 209-215, 2014.

XU, C.-C., WANG, B., PU, Y.-Q., TAO, J.-S., & ZHANG, T. (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 15(10), 721–731. 2017.

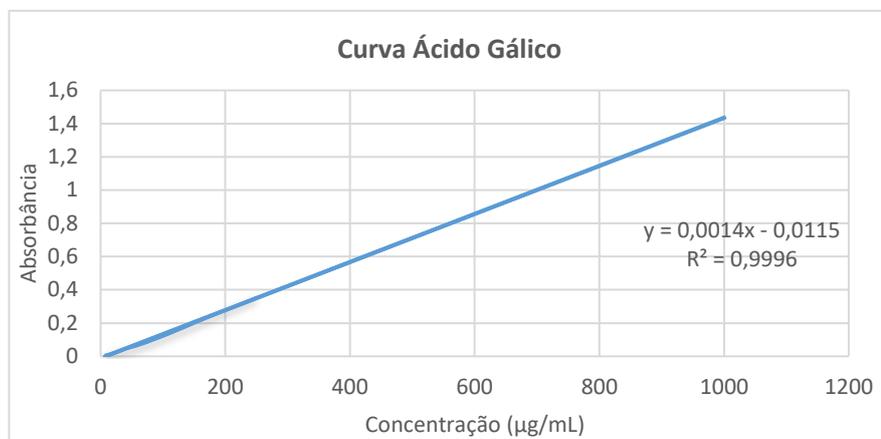
WOLFE, Kelly L. & LIU, Rui Hai. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8896-8907, 2007.

YOU, Qi.; CHEN, F.; WANG, X.; JIANG, Y. & LIN, S. Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. **LWT-Food science and technology**, v. 46, n. 1, p. 164-168, 2012.

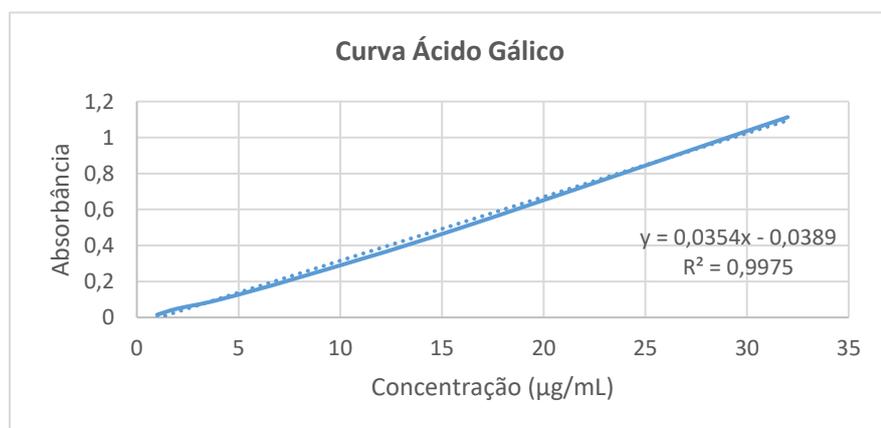
YUNES, Rosendo A.; PEDROSA, Rozangela Curi; CECHINEL FILHO, Valdir. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZORZIN, Fabielle Melissa. **Avaliação da atividade de inibição de alfa-amilase e padronização do extrato aquoso da folha de *Eugenia dysenterica***. 2014. 99 f., il. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2014.

## ANEXO



**Anexo A** – Curva de calibração do padrão de ácido gálico para análise de polifenóis totais.



**Anexo B** – Curva de calibração do ácido gálico obtida pelo método espectrofotométrico a 760 nm.