

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RENÊ OLIVEIRA DO COUTO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO
SECO PADRONIZADO DA *Rosmarinus officinalis* L.
(LAMIACEAE)**

Goiânia

2011

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFRJ), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9.610/96, a documentação conforme permissões individuais analisadas, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

[illegible]

1000

Following the same documentation, the

1000

100

All names mentioned: *Basilides*, *Tertullian*, *Clement*, *Irenaeus*

O Sistema de Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos digitais armazenados no banco de dados de teses e dissertações, antes de sua disponibilização, recebem procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cliques e extração de imagens), permitindo assim (transferência segura) usando o protocolo de Acesso.

Free Download
Download now PDF in English

1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025, 2026, 2027, 2028, 2029, 2030, 2031, 2032, 2033, 2034, 2035, 2036, 2037, 2038, 2039, 2040, 2041, 2042, 2043, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048, 2049, 2050, 2051, 2052, 2053, 2054, 2055, 2056, 2057, 2058, 2059, 2060, 2061, 2062, 2063, 2064, 2065, 2066, 2067, 2068, 2069, 2070, 2071, 2072, 2073, 2074, 2075, 2076, 2077, 2078, 2079, 2080, 2081, 2082, 2083, 2084, 2085, 2086, 2087, 2088, 2089, 2090, 2091, 2092, 2093, 2094, 2095, 2096, 2097, 2098, 2099, 2100, 2101, 2102, 2103, 2104, 2105, 2106, 2107, 2108, 2109, 2110, 2111, 2112, 2113, 2114, 2115, 2116, 2117, 2118, 2119, 2120, 2121, 2122, 2123, 2124, 2125, 2126, 2127, 2128, 2129, 2130, 2131, 2132, 2133, 2134, 2135, 2136, 2137, 2138, 2139, 2140, 2141, 2142, 2143, 2144, 2145, 2146, 2147, 2148, 2149, 2150, 2151, 2152, 2153, 2154, 2155, 2156, 2157, 2158, 2159, 2160, 2161, 2162, 2163, 2164, 2165, 2166, 2167, 2168, 2169, 2170, 2171, 2172, 2173, 2174, 2175, 2176, 2177, 2178, 2179, 2180, 2181, 2182, 2183, 2184, 2185, 2186, 2187, 2188, 2189, 2190, 2191, 2192, 2193, 2194, 2195, 2196, 2197, 2198, 2199, 2200, 2201, 2202, 2203, 2204, 2205, 2206, 2207, 2208, 2209, 2210, 2211, 2212, 2213, 2214, 2215, 2216, 2217, 2218, 2219, 2220, 2221, 2222, 2223, 2224, 2225, 2226, 2227, 2228, 2229, 2230, 2231, 2232, 2233, 2234, 2235, 2236, 2237, 2238, 2239, 2240, 2241, 2242, 2243, 2244, 2245, 2246, 2247, 2248, 2249, 2250, 2251, 2252, 2253, 2254, 2255, 2256, 2257, 2258, 2259, 2260, 2261, 2262, 2263, 2264, 2265, 2266, 2267, 2268, 2269, 2270, 2271, 2272, 2273, 2274, 2275, 2276, 2277, 2278, 2279, 2280, 2281, 2282, 2283, 2284, 2285, 2286, 2287, 2288, 2289, 2290, 2291, 2292, 2293, 2294, 2295, 2296, 2297, 2298, 2299, 2300, 2301, 2302, 2303, 2304, 2305, 2306, 2307, 2308, 2309, 2310, 2311, 2312, 2313, 2314, 2315, 2316, 2317, 2318, 2319, 2320, 2321, 2322, 2323, 2324, 2325, 2326, 2327, 2328, 2329, 2330, 2331, 2332, 2333, 2334, 2335, 2336, 2337, 2338, 2339, 2340, 2341, 2342, 2343, 2344, 2345, 2346, 2347, 2348, 2349, 2350, 2351, 2352, 2353, 2354, 2355, 2356, 2357, 2358, 2359, 2360, 2361, 2362, 2363, 2364, 2365, 2366, 2367, 2368, 2369, 2370, 2371, 2372, 2373, 2374, 2375, 2376, 2377, 2378, 2379, 2380, 2381, 2382, 2383, 2384, 2385, 2386, 2387, 2388, 2389, 2390, 2391, 2392, 2393, 2394, 2395, 2396, 2397, 2398, 2399, 2400, 2401, 2402, 2403, 2404, 2405, 2406, 2407, 2408, 2409, 2410, 2411, 2412, 2413, 2414, 2415, 2416, 2417, 2418, 2419, 2420, 2421, 2422, 2423, 2424, 2425, 2426, 2427, 2428, 2429, 2430, 2431, 2432, 2433, 2434, 2435, 2436, 2437, 2438, 2439, 2440, 2441, 2442, 2443, 2444, 2445, 2446, 2447, 2448, 2449, 2450, 2451, 2452, 2453, 2454, 2455, 2456, 2457, 2458, 2459, 2460, 2461, 2462, 2463, 2464, 2465, 2466, 2467, 2468, 2469, 2470, 2471, 2472, 2473, 2474, 2475, 2476, 2477, 2478, 2479, 2480, 2481, 2482, 2483, 2484, 2485, 2486, 2487, 2488, 2489, 2490, 2491, 2492, 2493, 2494, 2495, 2496, 2497, 2498, 2499, 2500, 2501, 2502, 2503, 2504, 2505, 2506, 2507, 2508, 2509, 2510, 2511, 2512, 2513, 2514, 2515, 2516, 2517, 2518, 2519, 2520, 2521, 2522, 2523, 2524, 2525, 2526, 2527, 2528, 2529, 2530, 2531, 2532, 2533, 2534, 2535, 2536, 2537, 2538, 2539, 2540, 2541, 2542, 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, 2605, 2606, 2607, 2608, 2609, 2610, 2611, 2612, 2613, 2614, 2615, 2616, 2617, 2618, 2619, 2620, 2621, 2622, 2623, 2624, 2625, 2626, 2627, 2628, 2629, 2630, 2631, 2632, 2633, 2634, 2635, 2636, 2637, 2638, 2639, 2640, 2641, 2642, 2643, 2644, 2645, 2646, 2647, 2648, 2649, 2650, 2651, 2652, 2653, 2654, 2655, 2656, 2657, 2658, 2659, 2660, 2661, 2662, 2663, 2664, 2665, 2666, 2667, 2668, 2669, 2670, 2671, 2672, 2673, 2674, 2675, 2676, 2677, 2678, 2679, 26

² Das caso de emergência, nos pedidos de matrícula por um ano ou a partir de data de início, é reservado às seguintes pessoas: beneficiários de uma situação de carência. Toda renovação e matriculacão deverá ser acompanhada de documentação.

RENÊ OLIVEIRA DO COUTO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO
SECO PADRONIZADO DA *Rosmarinus officinalis* L.
(LAMIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal de Goiás, como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e
Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. José Realino de Paula

Co-Orientador: Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição

Goiânia

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)

GPT/BC/UFG

Couto, Renê Oliveira do.

C871o Obtenção e caracterização do extrato seco padronizado da *Rosmarinus officinalis* L. (LAMIACEAE) [manuscrito] / Renê Oliveira do Couto. - 2011.

128 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. José Realino de Paula; Co-orientador: Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2011.

Bibliografia.

1. Ácido rosmarínico 2. Atividade antioxidante 3. Fitoterápicos 4. *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim) 5. Spray drying 6. Tecnologia de pós I. Título.

CDU: 615:633.812

Folha de Aprovação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 24 de fevereiro de 2011, pelo mestrando Raul Oliveira de Costa.

Banca Examinadora


Prof. Dr. José Realino de Paula (FF/LFG)
Presidente


Prof. Dr. Ricardo Neves Martins (FF/LFG)


Prof. Dr. Geraldo da Fritas (USP)

Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditam na fitoterapia e vêem a ciência e a educação não apenas como mecanismo de desenvolvimento intelectual, mas também como ferramenta na formação humana.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida e por ter criado, com tanta perfeição, a natureza que hoje nos serve como base para pesquisa;

Aos meus pais, irmãos e à pessoa amada pelo carinho, paciência, apoio, incentivo e confiança em meu potencial

A todos os outros familiares e amigos que, direta e indiretamente, participaram dessa jornada como colaboradores e encorajadores.

Aos orientadores Prof. Dr. José Realino de Paula e Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição pelos ensinamentos e pela confiança, amizade, disponibilidade, atenção e paciência.

A todos os colegas e professores dos Programas de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e Ciências Biológicas, inestimáveis companheiros de pesquisa e aprendizado.

A todos os colegas, professores e servidores do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais pela amizade, atenção, carinho e troca de experiências.

Aos membros da Banca Examinadora por terem aceitado esse convite e por todo o ensinamento e amizade.

À direção e coordenação da Faculdade de Farmácia da UFG, bem como a todos os professores, servidores técnico-administrativos e prestadores de serviço.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (UFG) pelo apoio técnico.

Ao Laboratório de Biofarmácia & Farmacocinética – FF/UFG pelo apoio técnico.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pela realização das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro fundamental na concretização deste trabalho.

“Acreditar em algo e não vivê-lo é desonesto”

Mahatma Gandhi

RESUMO

A obtenção de extratos secos padronizados da *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), por meio da técnica de *spray drying*, foi precedida de duas etapas, iniciando-se pela obtenção e caracterização do material de partida (pó das folhas da planta) e a partir desse, obtendo-se o extrato hidroalcoólico pelo método de percolação usando como solvente etanol a 80% (v/v). Os experimentos de secagem foram conduzidos seguindo um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken (3^3) a fim de se obter produtos secos com propriedades otimizadas. Nesse sentido, foram investigadas as influências de alguns parâmetros envolvidos no processo, *e. g.* fluxo de alimentação de extrato, temperatura de entrada do ar de secagem e vazão do ar de aspersão nas propriedades dos extratos secos obtidos. Tanto o material de partida quanto os produtos obtidos através dele, foram caracterizados por vários ensaios físico-químicos e físicos. Ainda, foi avaliado o potencial antioxidante *in vitro* do extrato hidroalcoólico e dos extratos secos por meio de um método colorimétrico empregando o radical livre DPPH[•]. O ácido rosmarínico, componente majoritário e um dos principais responsáveis pelas atividades farmacológicas da espécie, foi selecionado como marcador químico e, em todas as etapas do processo, foi quantificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector de arranjo de fotodiodos (DAD). Para tanto um método analítico foi validado seguindo os parâmetros e critérios de aceitação propostos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o qual provou ser de fácil execução, rápido, seletivo, linear, sensível, preciso, exato e robusto. Na caracterização da droga vegetal, foram verificados teores de voláteis, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, polifenóis totais, taninos totais, flavonóides totais e ácido rosmarínico de $9,1 \pm 0,23$, $7,32 \pm 0,045$, $0,378 \pm 0,016$, $3,81 \pm 0,043$, $0,49 \pm 0,01$, $1,73 \pm 0,07$ e $1,05 \pm 0,03\%$ (m/m), respectivamente, além de índice de intumescência de $2,33 \pm 0,11$ e tamanho médio de partículas de $437,94 \pm 7,00 \mu\text{m}$. O extrato hidroalcoólico apresentou densidade de $0,964 \pm 0,002 \text{ g/mL}$, resíduo seco de $9,66 \pm 0,07\%$, pH $5,106 \pm 0,005$, teor alcoólico de $38,2 \pm 0,53\%$ e viscosidade de $5,2 \pm 0,09 \text{ mPas}$. Ainda, foi obtida uma concentração inibitória (CE_{50}) de $17,29 \mu\text{g/mL}$ nos ensaios de atividade antioxidante e os teores de polifenóis totais, taninos totais, flavonóides totais e ácido rosmarínico foram de $30,19 \pm 0,24$, $9,13 \pm 0,01$, $8,78 \pm 0,1$ e $10,68 \pm 0,43\%$ (m/m), respectivamente. Os rendimentos de secagem variaram de 17,1 a 74,96%, sendo que em todos os produtos secos, foram observados teores de voláteis e atividade de água abaixo de 5% (m/m) e 0,5, respectivamente. Apesar dos produtos secos terem perdido parte de seus compostos polifenólicos, eles ainda apresentaram CE_{50} variando de 17,58 a 24,83 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, a maioria dos extratos secos apresentou propriedades de fluxo e compressibilidade inadequadas para fins farmacêuticos. As fotomicrografias obtidas para esses produtos mostraram partículas de tamanho variável e formato esférico. Análises de Variância (ANOVAs) demonstraram que ambos os fatores estudados e algumas de suas interações afetaram significativamente a maioria das respostas investigadas, sendo que a melhor condição a ser empregada na obtenção de extratos secos padronizados com indícios de estabilidade, assim como propriedades físico-químicas e funcionais adequadas é aquela realizada com alto fluxo de extrato de alimentação, temperatura do ar de admissão intermediária e baixa vazão do ar de aspersão. Assim, a técnica de *spray drying* pode ser uma alternativa atrativa e promissora para a obtenção de produtos fitofarmacêuticos intermediários da *R. officinalis*.

Palavras-chave: ácido rosmarínico, atividade antioxidante, fitoterápicos, *Rosmarinus officinalis* L., *spray drying*, tecnologia de pós.

ABSTRACT

In this work, standardized spray-dried extracts of *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), were obtained. The work started with the obtainment and characterization of the *R. officinalis* dried and powder leaves. A hydroalcoholic extract was obtained by percolation using as solvent ethanol at 80 % (v/v). The drying experiments followed a Box-Behnken (3^3) factorial design in order to obtain dry powders with optimized properties. In this way, the influence of several in-process parameters *e. g.* extract feed rate, drying air inlet temperature and spray nozzle airflow rate, on the dried extracts properties were investigated. The herbal raw material as well as both hydroalcoholic and dried extracts were analyzed by several physic-chemical and physical techniques. Additionally, the *in vitro* antioxidant activity from both hydroalcoholic and dried extracts were assessed by DPPH[•] free radical scavenging test. Rosmarinic acid, the major component on the specie and one of the main compounds responsible for these pharmacological activities, was used as chemical marker in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled to photodiode array detection (PDA) quantification assays in all steps of this work. The analytical method was validated following Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA – Brazilian National Health Surveillance Agency) guidelines. This method proved to be simple, rapid, selective, linear, sensible, precise, accurate and robust. On the herbal raw material characterization, it was observed a swelling index of 2.33 ± 0.11 , a mean powder size of $437.94 \pm 7.00 \mu\text{m}$, as well as moisture, total ashes, acid insoluble ashes, total polyphenols, total tannins, total flavonoids and rosmarinic contents of 9.1 ± 0.23 , 7.32 ± 0.045 , 0.378 ± 0.016 , 3.81 ± 0.043 , 0.49 ± 0.01 , 1.73 ± 0.07 and $1.05 \pm 0.03\%$ (w/w), respectively. The concentrated hydroalcoholic extract presented density of $0.964 \pm 0.002 \text{ g/mL}$, solids content of $9.66 \pm 0.07\%$, pH 5.106 ± 0.005 , alcoholic content of $38.2 \pm 0.53\%$ and a viscosity of $5.2 \pm 0.09 \text{ mPas}$. The levels of total polyphenols, total tannins, total flavonoids and rosmarinic contents were of 30.19 ± 0.24 , 9.13 ± 0.01 , 8.78 ± 0.1 and $10.68 \pm 0.43\%$ (w/w), respectively. Also, in the antioxidant assessment, the extract presented an inhibitory concentration (IC_{50}) of $17.29 \mu\text{g/mL}$. Results showed drying yields ranging from 17.1 to 74.96%. Also, all dried products showed moisture contents and water activities below 5% (w/w) and 0.5, respectively. Although dry products having lost some of their polyphenols they still presented antioxidant activities (IC_{50}) ranging from 17.58 to $24.83 \mu\text{g/mL}$. However, most recovered products presented inadequate flowability and compressibility. In general, the particles showed spherical shape and various sizes. Analysis of variance (ANOVAs) proved that the factors studied and some of their interactions significantly affected most of the investigated responses. Moreover, the best condition for obtaining dry extracts of rosemary with stability evidence as well as adequate physico-chemical and functional properties is the one performed with a high extract feed rate, an intermediate drying air inlet temperature and a low spray nozzle air flow rate. Accordingly, spray drying technique may be an attractive and promising alternative to develop intermediate phytopharmaceutical products of rosemary.

Keywords: antioxidant activity, phytopharmaceuticals, powder technology, rosmarinic acid, *Rosmarinus officinalis* L., spray drying.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.: ASPECTOS BOTÂNICOS, FITOQUÍMICOS E PROPRIEDADES MEDICINAIS	19
2.2	A TÉCNICA DE <i>SPRAY DRYING</i> COMO FERRAMENTA NA OBTENÇÃO DE PRODUTOS FITOFARMACÊUTICOS INTERMEDIÁRIOS	22
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL.....	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	REAGENTES, SOLVENTES E OUTROS MATERIAIS.....	30
4.2	EQUIPAMENTOS	31
4.3	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL DA <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	32
4.3.1	Coleta e processamento	32
4.3.2	Determinação do teor de voláteis (V_T)	32
4.3.3	Determinação do teor de cinzas totais (C_T)	32
4.3.4	Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido (C_I)	33
4.3.5	Determinação do índice de intumescência (II).....	33
4.3.6	Determinação da distribuição granulométrica	33

4.3.7	Determinação dos teores de polifenóis e taninos totais	34
4.3.7.1	Extração de polifenóis e taninos totais	34
4.3.7.2	Quantificação dos polifenóis totais	34
4.3.7.2.1	<i>Preparo da curva padrão de ácido tânico</i>	<i>34</i>
4.3.7.2.2	<i>Teor de polifenóis totais (P_T)</i>	<i>35</i>
4.3.7.3	Quantificação dos taninos totais	35
4.3.7.3.1	<i>Preparo da curva padrão de ácido tânico</i>	<i>35</i>
4.3.7.3.2	<i>Teor de taninos totais (T_T).....</i>	<i>35</i>
4.3.8	Determinação dos teores de flavonóides totais	36
4.3.8.1	Extração de flavonóides totais.....	36
4.3.8.2	Quantificação dos flavonóides totais.....	36
4.3.8.2.1	<i>Preparo da curva padrão de rutina.....</i>	<i>36</i>
4.3.8.2.2	<i>Teor de flavonóides totais (F_T).....</i>	<i>37</i>
4.3.9	Determinação do teor de ácido rosmarínico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	37
4.3.9.1	Avaliação dos parâmetros de <i>System Suitability</i>	38
4.3.9.2	Validação do método	38
4.3.9.2.1	<i>Seletividade.....</i>	<i>38</i>
4.3.9.2.2	<i>Linearidade e Intervalo</i>	<i>38</i>
4.3.9.2.3	<i>Limite de Detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....</i>	<i>38</i>
4.3.9.2.4	<i>Precisão</i>	<i>39</i>
4.3.9.2.4.a	<i>Repetibilidade.....</i>	<i>39</i>

4.3.9.2.4.b	Precisão intermediária	40
4.3.9.2.5	Exatidão	40
4.3.9.2.6	Robustez	40
4.4	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	41
4.4.1	Determinação do resíduo seco (C_S)	41
4.4.2	Determinação do teor alcoólico	41
4.4.3	Determinação do pH	41
4.4.4	Determinação da densidade	42
4.4.5	Determinação da viscosidade	42
3.4.6	Determinação dos teores de polifenóis e taninos totais	42
4.4.6.1	Quantificação dos polifenóis totais	42
4.4.6.2	Quantificação dos taninos totais	42
4.4.7	Determinação dos teores de flavonóides totais	42
3.4.8	Determinação do teor de ácido rosmarínico por CLAE	43
4.4.8.1	Co-validação do método	43
4.4.8.1.1	<i>Seletividade</i>	43
4.4.8.1.2	<i>Linearidade e Intervalo</i>	43
4.4.8.2	Quantificação do ácido rosmarínico	44
4.4.9	Avaliação da atividade antioxidante (AAO)	44
4.5	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DA <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	45

4.5.1	<i>Design experimental</i>	45
4.5.2	<i>Caracterizações dos produtos obtidos</i>	47
4.5.2.1	Determinação do rendimento de secagem (R_p)	47
4.5.2.2	Determinação do teor de voláteis (V_T)	47
4.5.2.3	Determinação da atividade de água (A_{ATV})	47
4.5.2.4	Determinação das densidades aparente e compactada	48
4.5.2.4.1	<i>Determinação da densidade aparente (ρ_a)</i>	48
4.5.2.4.2	<i>Determinação da densidade compactada (ρ_c)</i>	48
4.5.2.5	Determinação do Fator de Hausner e Índice de Carr	48
4.5.2.6	Determinação da distribuição granulométrica	49
4.5.2.7	Determinação da morfologia das partículas	48
4.5.2.8	Determinação do ângulo de repouso (θ)	49
4.5.2.9	Determinação dos teores de polifenóis e taninos totais	49
4.5.2.9.1	<i>Quantificação dos polifenóis totais</i>	50
4.5.2.9.2	<i>Quantificação dos taninos totais</i>	50
4.5.2.10	Determinação dos teores de flavonóides totais	50
4.5.2.11	Determinação do teor de ácido rosmarínico por CLAE	51
4.5.2.11.1	<i>Co-validação do método</i>	51
4.5.2.11.1.a	<i>Seletividade</i>	51
4.5.2.11.1.b	<i>Linearidade e Intervalo</i>	51
4.5.2.11.2	<i>Quantificação do ácido rosmarínico</i>	51
4.5.2.12	Avaliação da atividade antioxidante	51

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	ARTIGO 1	53
5.2	ARTIGO 2	74
6	CONCLUSÕES GERAIS	112
	REFERÊNCIAS	114

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos derivados de plantas medicinais no tratamento de diversas doenças é uma prática milenar em diversas culturas e nações em todo o mundo, exercendo assim um papel primordial na atenção primária a saúde da população tanto de países em desenvolvimento quanto de países desenvolvidos (AKERELE, 1993; CALIXTO, 2000). De fato, as plantas medicinais tem sido uma promissora fonte de agentes terapêuticos. A terapêutica moderna, atualmente constituída por um grande número de medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria atingido o grau de desenvolvimento atual sem o auxílio dos produtos de origem natural, em especial os provenientes das plantas superiores (SIANI, 2003).

No período de 1983 a 1994, cerca de 40% dos novos fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration* - EUA) foram derivados dos produtos naturais, análogos semi-sintéticos de produtos naturais ou compostos sintéticos baseados em grupos farmacofóricos de produtos naturais e, aproximadamente 70% das novas entidades químicas divulgadas entre 1981 a 2006 foram resultados de estudos com os produtos naturais. Ainda, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que quase 75% da população mundial possuam experiência com o uso de plantas medicinais (LIU; WANG, 2008). Entretanto, poucas plantas (menos de 10%) têm estudos científicos para validação de sua qualidade, segurança e eficácia (CALIXTO, 2005).

Ao longo das últimas décadas, as plantas medicinais passaram a ser vistas não apenas como recursos terapêuticos, mas também como fontes de recursos econômicos (GUERRA; NODARI, 2005). Outrossim, a produção industrial de fitoterápicos vem crescendo consideravelmente e, em função das tendências mundiais da comercialização desse tipo de produtos, esta área vem atraindo a atenção da comunidade científica e, principalmente, das indústrias farmacêuticas de todo o mundo, incluindo as brasileiras (CALIXTO, 2005).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. Esse tipo de produto é caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Assim sendo, os fitoterápicos, assim como todos os medicamentos, devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população (BRASIL, 2010).

Neste contexto, uma das principais limitações relacionadas à produção de fitoterápicos é a inerente complexidade química, influenciada pelas condições de cultivo, época de coleta, métodos de extração, secagem e condições de armazenamento (CASTRO et. al., 2004). Considerando-se esse fator, a utilização de marcadores químicos no controle de qualidade e padronização de fitoterápicos tornou-se um requisito fundamental nos protocolos da OMS, da ANVISA e de outros órgãos responsáveis pela regulamentação da produção de medicamentos (CHAVES, 2005). Por definição, marcador químico é uma substância ou grupo de substâncias químicas que esteja presente em maior quantidade em uma espécie vegetal, de preferência responsável ou uma das responsáveis pela atividade farmacológica da planta, estável e passível de ser analisada por metodologias analíticas *e.g.* cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG) ou espectrofotometria (BRASIL, 2010).

Desta forma, paralelamente às etapas de processamento tecnológico, *e. g.*, cominuição, extração, secagem, pré-formulação etc, a realização de um rigoroso controle de qualidade em todas as fases de desenvolvimento é um requisito fundamental para a obtenção de produto fitoterápicos padronizados, seguros, eficazes e com alto valor agregado (CALIXTO, 2000; SONAGLIO et al., 2005). Os rigorosos requisitos inerentes ao desenvolvimento de medicamentos, tais como precisão de dosagem, biodisponibilidade e estabilidades química e física fazem o desenvolvimento do binômio farmacêutico formulação/processo uma tarefa complexa (LEUENBERGER; LANZ, 2005). Uma ferramenta que tem sido aplicada com sucesso no desenvolvimento de produtos fitoterápicos com características ótimas de segurança e *performance* é o emprego de produtos intermediários padronizados (CALIXTO, 2000; SONAGLIO et al., 2005).

São exemplos de medicamentos fitoterápicos provenientes de extratos padronizados encontrados no mercado brasileiro: *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aquifoliaceae) (erva-mate, padronizado em metilxantinas), *Paullinia cupana* Kunth (Sapindaceae) (guaraná, padronizado em metilxantinas), *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) (mamacadela, padronizado em psoraleno e bergapteno), *Cordia verbanacea* DC. (Boraginaceae) (erva-baleeira, padronizado em α -humuleno), *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae) (chá verde, padronizado em metilxantinas), *Panax ginseng* C.A. Mey. (Araliaceae) (ginseng, padronizado em ginsenosídeos), *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) (guaco, padronizado em cumarina), *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) (hipérico, padronizado em hipericina), *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae) (soja, padronizado em isoflavonas), *Passiflora incarnata* L. (Passifloraceae) (maracujá, padronizado em vitexina), *Valeriana officinalis* L.

(Caprifoliaceae) (valeriana, padronizado em alcalóides), *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. (Celastraceae) (espinheira santa, padronizada em taninos); *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) (alcachofra, padronizada em cinarina); *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) (boldo, padronizado em boldina); *Rhamnus purshiana* DC. (Rhamnaceae) (cáscara sagrada, padronizada em cascarosídeo “A”); *Equisetum arvense* L. (Equisetaceae) (cavalinha, padronizada em quercetina), entre outros (BARATA, 2005; CARVALHO et al., 2008).

De modo geral, a padronização e validação de processos que garantam a obtenção de insumos e produtos fitofarmacêuticos intermediários ou acabado com constância de qualidade requer a avaliação de diversos parâmetros químicos, físicos e físico-químicos, *e. g.*, teor de marcadores químicos, umidade residual, propriedades organolépticas, carga microbiana, distribuição granulométrica, morfologia de partículas, características farmacotécnicas etc, tornando-se assim um desafio constante (CALIXTO, 2000; SONAGLIO et al., 2005).

Face ao exposto, a realização de trabalhos científicos visando o desenvolvimento de insumos fitoterápicos padronizados obtidos a partir de espécies vegetais com valor medicinal conhecido pela população e validado cientificamente e que, além disso, apresentem viabilidade agrônômica é amplamente justificada, tornando-se ainda uma alternativa promissora para o desenvolvimento sustentável da indústria fitofarmacêutica nacional.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Rosmarinus officinalis* L.: ASPECTOS BOTÂNICOS, FITOQUÍMICOS E PROPRIEDADES MEDICINAIS

A família Lamiaceae compreende 236 gêneros e aproximadamente 7200 espécies distribuídas em todo o mundo e concentrando-se nas regiões do Mediterrâneo e Oriente Próximo (BECKETT, 1988). Destaca-se nesta família a espécie *Rosmarinus officinalis* L., oriunda da região mediterrânea da Europa e cultivada em quase todos os países de clima temperado, de Portugal à Austrália (LORENZI; MATOS, 2002),

Conhecida popularmente como alecrim, alecrim-de-jardim, alecrim-rosmarinho, alecrim-comum, alecrim-de-casa, alecrim-de-cheiro, alecrim-de-horta, erva-coada, erva-da-graça, flor-de-olimpio, rosa-marinha, rosmarinho ou rosmarino, seu nome em latim, “*Rosmarinus*”, significa “o orvalho que vem do mar”, em alusão ao aroma abundante das praias do mediterrâneo onde o alecrim crescia e se desenvolvia espontaneamente, enquanto o termo “*officinalis*” refere-se à designação de que era uma planta conhecida sobre o ponto de vista médico-herborista, sendo amplamente utilizada na culinária, medicina, beleza e magia (MATOS, 2002).

Trata-se de um subarbusto, densamente ramoso e foliado, cujo caule geralmente mede de 1 a 2 m de altura apresentando secção transversal obtuso tetragonal e ramos geralmente opostos e pubescentes. Suas folhas são sésseis, lineares, inteiras, coriáceas e persistentes, possuindo disposição oposta e margens fortemente revolutas, de cor verde e pontuado rugosas na epiderme adaxial, enquanto na epiderme abaxial são branca tomentosas com nervura mediana bastante proeminente, podendo medir de 2 a 3,5 cm de comprimento por 2 a 4 mm de largura. As flores, pouco numerosas e curtamente pediceladas, apresentam-se reunidas em pequenos racimos axilares onde o cálice, de colorações que variam de verde á púrpura, é tomentoso-pubescente e a corola é bilabiada e de coloração azulada, sobre a qual se inserem dois estames providos de uma única teca fértil e a outra transformada em alavanca. O gineceu possui ovário súpero bicarpelar e falsamente tetraocular por invaginação dos carpelos, enquanto o estilete é inserido ginobasicamente e o ovário se assenta sobre um disco glandular, unilateralmente expandido e saliente. Por fim, o fruto é seco e separa-se caracteristicamente em quatro frutículos ou nóculas (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998).

Sob o ponto de vista microscópico, a epiderme adaxial apresenta pêlos tectores unicelulares e cônicos e é formada de células de contorno retangular, alongadas no sentido tangencial. Essas células quando vistas de face apresentam contorno poligonal e paredes espaçadas. Por outro lado, a epiderme abaxial quando vista de face, apresenta células de contorno sinuoso, estômatos do tipo diacítico, pêlos tectores ramificados pluricelulares e

pêlos glandulares característicos de espécies da família, providos de quatro a oito células formando a glândula. Tanto a epiderme adaxial quanto a abaxial apresentam pêlos glandulares capitados suportados por pedicelo bicelular. Abaixo da epiderme adaxial existe hipoderme formada de várias camadas de células poligonais grandes, bastante visíveis na região do feixe vascular. O mesófilo é heterogêneo e assimétrico formado de uma ou duas camadas de células paliçadas e de poucas camadas de células, formando o parênquima lacunoso. O feixe vascular é do tipo colateral e envolvido por parênquima fundamental. O caule em secção transversal apresenta estrutura eustélica (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998).

Verifica-se na literatura científica que vários estudos fitoquímicos foram realizados com *R. officinalis*, os quais resultaram na identificação de várias classes de metabólitos secundários e isolamento de alguns de seus representantes (COLLIN; CHARLES, 1987; BISSET, 1994; TISSERAND; BALACS, 1995; USDA, 2003):

- Flavonóides: cirsimarina, diosmetina, diosmina, genkwanina e derivados, luteolina e derivados, hispidulina, nepetina, nepitrina, hesperidina, homoplantigenina, fegopolina e apigenina.
- Ácidos Orgânicos/Fenilpropanóides: Ácido caféico, ácido clorogênico, ácido labiático, ácido neoclorogênico e ácido rosmarínico
- Óleos essenciais (1–2,5%): Os componentes podem variar de acordo com o quimiótipo, sendo compostos principalmente por hidrocarbonetos monoterpênicos, incluindo α - e β -pinenos (15-25%), esqualeno, gamma-terpineno, canfeno e limoneno, juntos a 1,8-cineol (20-50%), borneol, timol, cânfora (10–25%), metil-eugenol, linalol, verbinol, terpineol, 3-octaneno, β -cariofileno, p-cimeno, mirceno, trans-anetol, carvacrol acetato de bornila e acetato de isobornila.
- Terpenóides: carnosol, ácido carnosólico, rosmaridifenol, rosmariquinonas A e B, rosmadial, isorosmanol, rosmanol (diterpenos); beta-sitosterol, ácidos oleanólico e ursólico e seus 3-acetil ésteres (triterpenos).

Aliados às suas conhecidas aplicações culinárias, em especial como aromatizantes em alimentos, várias propriedades medicinais também são associadas à espécie, da qual são utilizadas as folhas e sumidades floridas que apresentam atividades carminativa, espasmolítica, sedativa, diurética e antimicrobiana. Topicamente, são relatadas propriedades rubefaciente, analgésica e antiparasitária (BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA, 1990). Tradicionalmente é indicada em casos de dismenorréia, desordens respiratórias, cólicas renais, calvície, flatulência dispepsia, dores-de-cabeça, e topicamente para mialgia e neuralgia ciática e intercostal (KARIM; QURAAN, 1986; BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA, 1990;

OLUWATUYI; KAATZ; GIBBONS, 2004). Segundo Blumenthal et al. (1998), o uso interno contra queixas de dispepsia e o uso externo na terapia suporte de problemas circulatórios e reumatismo, foi aprovado pela Comissão E da Farmacopéia Alemã.

Além disso, resultados de estudos pré-clínicos recentes confirmam sua atividade anti-inflamatória (ALTINIER et al., 2007; TAKAKI et al., 2008; BENINCÁ et al., 2011), analgésica (GONZÁLEZ-TRUJANO et al., 2007), antimicrobiana (ANGIONI et al., 2004; SHAN et al., 2005; BOZIN et al., 2007; TSAI; TSAI; HO, 2007; YESIL-CELIK TAS et al., 2007a; SILVA et al., 2008), antidiabética (BAKIREL et al., 2008), antioxidante (WOJDYŁO; OSZMIAN'SKI; CZEMERYS, 2007; YESIL-CELIK TAS et al., 2007b; ERKAN; AYRANCI; AYRANCI, 2008; MARIUTTI et al., 2008; WANG et al., 2008), antitumoral (CHEUNG; TAI, 2007; BAI et al., 2010), citoprotetora (YOO et al., 2008; PARK et al., 2010) e hepatoprotetora (AMIN; HAMZA, 2005; GUTIÉRREZ et al., 2009). Tantos atributos justificam o desenvolvimento de uma gama de produtos variando de conservantes na indústria alimentícia (GEORGANTELIS et al., 2007; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2009; ROMANO et al., 2009, HAMRE, KOLÅS; SANDNES, 2010), fitocosméticos (LEE et al., 2011), nutracêuticos (NIETO et al., 2010) até fitoterápicos (IBARRA et al., 2010).

Em sua maioria, as propriedades medicinais da *R. officinalis* vem sendo atribuídas ao seu elevado teor de compostos polifenólicos, especialmente aqueles derivados do ácido caféico, principalmente o ácido rosmarínico (Fig. 1), o qual é um dos componentes majoritários da planta e tem sido considerado um marcador químico da espécie (TSAI; TSAI; HO, 2007; YESIL-CELIK TAS et al., 2007b; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2009; ROMANO et al., 2009; IBARRA et al., 2010). Ademais, o ácido rosmarínico possui baixa toxicidade ($DL_{50} = 561 \text{ mg/kg IV}$) e é rapidamente eliminado pela circulação ($t_{1/2} = 9$ minutos) (PARNHAM; KESSELRING, 1985). Desse modo, a luz dos complexos requisitos proposto pela legislação vigente para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, a determinação deste importante metabólito secundário é primordial para a padronização de produtos fitoterápicos derivados da *R. officinalis*.

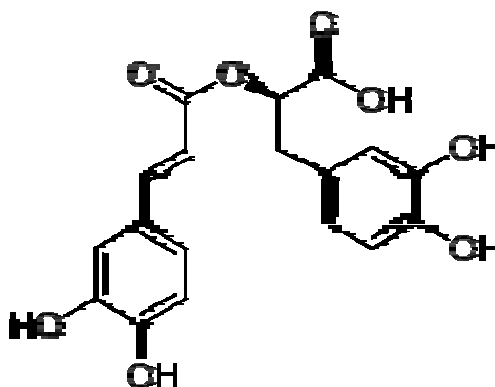


Figura 1 – Estrutura química do ácido rosmarínico

Não existem relatos documentados de interações medicamentosas. Entretanto, o fato de que preparações contendo extratos de *R. officinalis* possam interagir com outros medicamentos administrados concomitantemente, particularmente aqueles com propriedades similares ou antagônicas, devem ser considerados (TISSERAND; BALACS, 1995).

2.2 A TÉCNICA DE *SPRAY DRYING* COMO FERRAMENTA NA OBTENÇÃO DE PRODUTOS FITOFARMACÊUTICOS INTERMEDIÁRIOS

A transformação de uma matéria-prima vegetal em um produto mais adequado para uso industrial e posterior aplicação terapêutica configura-se como uma tarefa complexa, exigindo o uso de tecnologias de processo específicas e padronizadas, dentre elas, a secagem de extratos vegetais (COUTO et al., 2010). Para cada uma das etapas do processo tecnológico, a seleção de uma operação específica é determinada pelas características físicas e físico-químicas do produto a ser obtido, pela natureza da matéria-prima a ser transformada e pelo volume de produção exigido (SONAGLIO et al., 2005).

Do ponto de vista tecnológico, extratos secos apresentam várias vantagens em relação às formas fluidas, *e. g.*, maior estabilidade e facilidades de padronização, transporte e acondicionamento (OLIVEIRA; BOTT; SOUZA, 2006). Ademais, a preparação desse tipo de produto intermediário é muito importante no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas (LEUENBERGER; LANZ, 2005), como comprimidos e cápsulas, as quais representam cerca de 80% dos medicamentos comercializados em todo o mundo (MUZZIO; SHINBOT; GLASSER, 2002). No Brasil encontram-se registrados 512 medicamentos fitoterápicos, dos quais mais de 70% apresentam-se como formas farmacêuticas sólidas (CARVALHO et al., 2008).

Várias técnicas vêm sendo aplicadas na produção de extratos secos, incluindo liofilização (HAWLADER; PERERA; TIAN, 2006; RATTI et al., 2007; BORGOGNONI; POLAKIEWIC; PITOMBO, 2008), leite de jorro (RUNHA et al., 2001; CORDEIRO; OLIVEIRA, 2005; SOUZA; OLIVEIRA, 2005; MARRETO; FREIRE; FREITAS, 2006; OLIVEIRA; BOTT; SOUZA, 2006; SOUZA, 2008; SOUZA et al., 2008), leite fluidizado (PAGLIARUSSI; BASTOS; FREITAS, 2006; MURTHY; JOSHI, 2007; BURANDE et al., 2008; BUCHAILLOT; CAFFIN; BHANDARI, 2009) e *spray drying* (VASCONCELOS et al., 2005; MARQUELE et al., 2006; VAIDYA; BHOSALE; SINGHAL, 2006; SILVA JÚNIOR et al., 2006; SOUZA et al., 2007; GEORGETTI et al., 2008; HUYNH et al., 2008; RODRÍGUEZ CHANFRAU et al., 2008; CHAVES; DA COSTA; FREITAS, 2009; COUTO et al., 2010; ARAÚJO; TEIXEIRA; FREITAS, 2010; TEIXEIRA; TEIXEIRA; FREITAS, 2010; ZHANG et al., 2010), também conhecida como secagem por aspersão ou nebulização.

De acordo com a literatura, a técnica de *spray drying* é provavelmente a mais utilizada nas indústrias fitofarmacêuticas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Outrossim, esta vem sendo amplamente aplicada na indústria farmacêutica para a obtenção de flavorizantes e fragrâncias, microcápsulas, nanopartículas, lipossomas, produtos alimentícios, emulsões secas, produtos efervescentes, partículas injetáveis e formulações para inalação nasal ou administração pulmonar (WENDEL, 1987; LIST; SCHMIDT, 1989; FILKOVÁ; MUJUNDAR, 1995).

A técnica de *spray drying* consiste na transformação de um material fluído (solução, dispersão ou emulsão) em partículas secas através da atomização do fluido em um meio de secagem com temperatura elevada, sendo assim, um processo contínuo de uma única etapa envolvendo secagem. O fluido a ser secado é aspergido em forma de gotículas muito pequenas em uma corrente de ar quente, ocorrendo assim, um aumento considerável da superfície de contato do material com o ar quente. As características do produto seco dependem das propriedades físico-químicas do fluído, do *design* do equipamento e das condições operacionais, podendo se apresentar sob a forma de grânulos, aglomerados ou pó (MASTERS, 1985; WENDEL; CELIK, 1987; LIST; SCHMIDT, 1989; BROADHEAD; ROUAN; RHODES, 1992; FILKOVÁ; MUJUNDAR, 1995; SHARAPIN et al., 2000).

O equipamento utilizado nesse processo consiste basicamente em um sistema de alimentação, composto por um recipiente onde a amostra geralmente permanece sob ligeira agitação (para garantir a homogeneidade do produto final) e uma bomba (que leva o material a ser seco até o bico atomizador); um sistema atomizador, classificados de acordo com os tipos de bico atomizador (que podem ser: rotatório, de pressão e pneumático, também

conhecido como *two-fluid*); uma câmara de secagem, onde o ar quente e o material a ser seco entram em contato (esse sistema pode operar em fluxo co-corrente ou contracorrente); um ciclone, onde ocorre a separação do sistema de ar do produto seco e um sistema frasco coletor de amostra seca (BROADHEAD et al., 1992). Dessa forma, a técnica de *spray drying* consiste basicamente em quatro etapas (MASTERS, 1985): 1) atomização do produto a ser secado (alimentação do aparelho); 2) contato com o ar quente (mistura e fluxo); 3) secagem do spray formado (evaporação da umidade e voláteis); 4) separação do produto seco do ar quente.

O grande interesse pelo emprego da técnica de *spray drying* na indústria farmacêutica deve-se, em grande parte, às várias vantagens apresentadas por esta técnica, *e. g.*, flexibilidade operacional, facilidade de otimização do processo, aplicação tanto para produtos termoestáveis quanto termosensíveis, grande volume de produção, assim como custo acessível (MASTERS, 1985; WENDEL; CELIK, 1987; LIST; SCHMIDT, 1989; BROADHEAD; ROUAN; RHODES, 1992; FILKOVÁ; MUJUNDAR, 1995; SHARAPIN et al., 2000).

No decorrer dos últimos anos, o desenvolvimento e a avaliação da qualidade e *performance* de produtos fitofarmacêuticos intermediários obtidos empregando a técnica de *spray drying* vem sendo o alvo de vários estudos. Senna et al. (1997) obtiveram e caracterizaram extratos secos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae). Paula e Petrovick (1997) avaliaram o efeito da incorporação dos extratos secos de *A. satureioides* em base dermatológica de monoestearato de glicerila sobre as características físico-químicas, biodisponibilidade e estabilidade preliminar das pomadas resultantes. De Souza et al. (2000) investigaram a influência dos adjuvantes de secagem Aerosil® 200 e Gelita-Sol-P nas propriedades farmacotécnicas de extratos secos de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* O. Deg. (Passifloraceae). Heberlé, Wehrmann e Petrovic (2000) obtiveram e caracterizaram o extrato seco de *Cecropia glaziovii* Sneth. (Cecropiaceae).

Zetola et al. (2002), avaliaram os efeitos sedativo e anticonvulsivante da fração não volátil do extrato líquido e seco de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson (Verbenaceae). Bruschi et al. (2003) se dedicaram a preparação e caracterização de micropartículas de própolis revestidas com gelatina e manitol. Valdaga, Battestin e Finzer (2003) obtiveram e caracterizaram extratos secos de *I. paraguariensis*, avaliando a influência da goma arábica nas características dos produtos. Paradkar et al. (2004) obtiveram e caracterizaram dispersões sólidas com diferentes razões de curcumina-PVP. Andrade e Flores (2004) avaliaram os efeitos de alguns parâmetros de secagem (vazão do extrato de alimentação, temperatura de entrada do ar de secagem e pressão do bico atomizador) em várias características de extratos de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae). Vasconcelos et al.

(2005) avaliaram a influência da temperatura de entrada e a concentração de Aerosil® 200 nas características de extratos secos da *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae). Souza, Spaniol e Petrovick (2005) investigaram a viabilidade do revestimento de comprimidos contendo alto teor de extrato seco de *Phyllanthus niruri* L. (Phyllanthaceae) visando proteção frente a variações atmosféricas. Soares et al. (2005) avaliaram a influência de parâmetros de granulação por via seca nas propriedades de grânulos e comprimidos contendo extrato seco de *M. ilicifolia*.

Marquele et al. (2006) e Souza et al. (2007) investigaram a influência das condições de secagem nas propriedades químicas (polifenóis e flavonóides) e biológicas (atividade antioxidante) de extratos de própolis. Daiuto e Cereda (2006) investigaram a influência da granulometria de grânulos de amido sobre a densidade aparente de extratos secos de *P. boldus*. Silva Júnior et al. (2006) obtiveram e caracterizaram o extrato seco de *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae). Hernández et al. (2006) estudaram a influência da concentração dos adjuvantes de maltodextrina e amido na secagem de extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). De Souza, Lionzo e Petrovick (2006) avaliaram a redução da contaminação microbiana de extratos obtidos apartir de decoctos das partes aéreas de *P. niruri*.

De Souza et al. (2006) avaliaram o comportamento de compressão bem como a influência de excipientes nas propriedades de comprimidos contendo um elevado teor de extrato seco de *P. niruri*. Oliveira, Bott e Souza (2006) obtiveram e caracterizam extratos secos de *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae), *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae) e *M. ilicifolia* comparando as técnicas de *spray drying* e leito de jorro. Souza e Oliveira (2006) investigaram o efeito do processo de secagem por *spray drying* do extrato de *B. forficata* no comportamento do sistema e nas propriedades dos produtos secos. Ramos (2006) desenvolveu e caracterizou quanto a estabilidade e atividade anti-inflamatória microcápsulas contendo a fração volátil da oleoresina da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Fabaceae).

De Souza, Bassani e Schapoval (2007) avaliaram a influência de adjuvantes de secagem e método de obtenção (liofilização e *spray drying*) no efeito antiinflamatório de extratos secos de *A. satureioides*. Vargas et al. (2007) investigaram a atividade anti-inflamatória de extratos secos de *P. alata* e *P. edulis*. Souza, Schiavetto e Oliveira (2008) compararam o potencial das técnicas de *spray drying* e leito de jorra para a produção de extratos secos de *R. officinalis*. Oliveira (2008) investigou a influências de parâmetros tecnológicos de produção sobre as características de produtos secos de *M. ilicifolia*. Georgetti et al. (2008) investigaram os efeitos do processo de secagem por *spray drying* nas propriedades físico-químicas e antioxidantes (*in vitro*) de extratos de *G. max*. Silva Júnior e

Pereira (2009) avaliaram a permeação *in vitro* de um gel fitoterápico contendo extrato seco de *S. officinale*.

Da Costa et al. (2009) realizaram a caracterização física, química e físico-química do extrato seco de *C. scolymus*. Chaves, Da Costa e Freitas (2009) desenvolveram e caracterizaram comprimidos revestidos contendo extrato seco padronizado de *Tanacetum parthenium* (Willd.) Sch. Bip. (Asteraceae). Acosta-Esquivarosa et al. (2009) investigaram a possibilidade de aumento de escala da produção de extratos secos otimizados de *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). Araújo, Teixeira e Freitas (2010), com o objetivo de aumentar a solubilidade da curcumina, obtiveram e caracterizaram dispersões sólidas ternárias contendo como excipientes de secagem Aerosil® 200 e Gelucire 44/14. Osório et al. (2010) isolaram e microencapsularam antocianinas dos frutos da *Bactris guineensis* (L.) H.E. Moore (Arecaceae) usando maltodextrina como adjuvante tecnológico. Couto et al. (2010) investigaram o efeito de vários excipientes de secagem (Manitol, Maltodextrina 19-20 e Aerosil® 200), em diferentes concentrações e com diferentes tempos de incorporação nas propriedades tecnológicas de extratos secos de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae).

Considerando-se a importância medicinal e comercial da *R. officinalis*, bem como a insuficiência de dados na literatura sobre seu comportamento durante processos e padronização é que se procurou investigar o efeito de parâmetros de processo nas propriedades físicas, físico-químicas e biológicas (*in vitro*) de extratos secos via *spray drying*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a obtenção do extrato seco padronizado da *Rosmarinus officinalis* L. (LAMIACEAE).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção e caracterização física e físico-química da droga vegetal das folhas da *Rosmarinus officinalis* L.;
- Obtenção e caracterização física e físico-química do extrato hidroalcoólico da *Rosmarinus officinalis* L.;
- Desenvolvimento e validação de método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado a detector de arranjo de fotodiodos (DAD) para a determinação dos teores de ácido rosmarínico na droga vegetal da *Rosmarinus officinalis* L. e nos produtos obtidos a partir desta;
- Investigação do potencial da técnica de *spray drying* para a produção de extratos secos da *Rosmarinus officinalis* L. padronizados em ácido rosmarínico.
- Verificar o perfil de degradação dos marcadores químicos durante o processo de secagem por *spray drying* do extrato hidroalcoólico da *Rosmarinus officinalis* L.;
- Investigação da influência de fatores de processo nas propriedades físicas e físico-químicas dos produtos secos obtidos por *spray drying*;
- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos hidroalcoólico e secos por *spray drying* da *Rosmarinus officinalis* L.;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES, SOLVENTES E OUTROS MATERIAIS

- ✓ acetato de sódio (Synth[®], São Paulo, Brasil)
- ✓ acetonitrila grau HPLC (Tedia Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- ✓ ácido acético glacial P.A (Impex[®], São Paulo, Brasil)
- ✓ ácido clorídrico P.A (Impex[®], São Paulo, Brasil)
- ✓ albumina bovina sérica (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Alemanha)
- ✓ ácido fórmico P.A (Impex[®], São Paulo, Brasil)
- ✓ ácido rosmarínico 98% (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Alemanha)
- ✓ ácido tânico 98% (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Alemanha)
- ✓ álcool etílico 95% P.A (Chemis[®], São Paulo, Brasil)
- ✓ álcool metílico grau HPLC (Tedia Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- ✓ álcool metílico P.A (Chemis[®], São Paulo, Brasil)
- ✓ algodão hidrófilo (Topz[®], Jaguariúna, SP, Brasil)
- ✓ cloreto de sódio P.A (Synth[®], São Paulo, Brasil)
- ✓ cloreto férrico (Acros Organics Co., NJ, EUA)
- ✓ 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]) (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Germany)
- ✓ fita indicadora de pH (Eintauche – Feucht Ablesen, Alemanha)
- ✓ lauril sulfato de sódio P.A (CAQ – Casa da Química Ind. E Com. Ltda, Diadema, SP, Brasil)
- ✓ membrana filtrante de 0,45µm Millex[®] (Millipore, São Paulo, Brasil)
- ✓ membrana filtrante para fase móvel 0,45µm Millex[®] (Millipore, São Paulo, Brasil)
- ✓ papel de filtro de 14µm QUALY (J. Prolab, Paraná, Brasil)
- ✓ pó das folhas da *R. officinalis*
- ✓ rutina 98% (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Alemanha)
- ✓ solução tampão pH 4,0 (Labmeter Ltda, São Paulo, SP, Brasil)
- ✓ solução tampão pH 7,0 (Labmeter Ltda, São Paulo, SP, Brasil)
- ✓ trietanolamina P.A (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil)

4.2 EQUIPAMENTOS

- ✓ Agitador mecânico de tubos AP - 56 (Tecnal Ltda, Piracicaba, SP, Brazil)
- ✓ Agitador eletromagnético 78 HW-1 (Biomixer, São Paulo, SP, Brasil)
- ✓ Alcoômetro (Incoterm Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil)
- ✓ Analisador de umidade MB35 (Ohaus Co., Pine Brook, NJ, EUA)
- ✓ Balança analítica SHIMADZU AUW220D (Shimadzu do Brasil, São Paulo, SP, Brasil)
- ✓ Banho de refrigeração com circulação Te - 184 (Tecnal Ltda, Piracicaba, SP, Brazil)
- ✓ Banho-maria CT-248 (Cientec Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil)
- ✓ Bomba de vácuo Te-152 (Tecnal Ltda, Piracicaba, SP, Brasil)
- ✓ Chapa aquecedora Q321A26 (QUIMIS[®], Diadema, SP, Brasil)
- ✓ Coluna cromatográfica Gemini RP-C18 (Phenomenex, Inc., Torrance, CA, EUA)
- ✓ Cromatógrafo Líquido LC – 20AT Prominence (Shimadzu[®], Kyoto, Japão)
- ✓ Determinador de atividade de água Testo[®] 650 (Testo AG, Alemanha)
- ✓ Espectrofotômetro SP220 UV/VIS (Biospectro[®], Curitiba, PR, Brasil)
- ✓ Lavadora ultra-sônica USC 4800 (Unique Group, Indaiatuba, SP, Brazil)
- ✓ Mufla EDG 3000 (EDG Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil)
- ✓ Micropipeta (DIGIPET[®], Diadema, SP, Brasil)
- ✓ Microscópio Eletrônico de Varredura PhenomTM (FEI Company, Hillsboro, Oregon, EUA)
- ✓ Moinho de facas TE-625 (Tecnal Ltda, Piracicaba, SP, Brasil)
- ✓ Percoladores de aço inoxidável (Revitec Ltda, São Paulo, SP, Brasil)
- ✓ Potenciômetro digital PHS 3B (Labmeter Ltda, São Paulo, SP, Brasil)
- ✓ Rotaevaporador MA 120 (Marconi Ltda, Piracicaba, SP, Brasil)
- ✓ *Spray dryer* MSD 1.0 (Labmaq do Brasil Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil)
- ✓ Tamisador vibratório eletromagnético (Bertel Ltda, Caieiras, SP, Brasil)
- ✓ Tamises de aço inoxidável (Bertel Ltda, Caieiras, SP, Brasil)
- ✓ Termômetro (Incoterm Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil)
- ✓ Ultra-purificador de água Milli-Q (Millipore[®], Bedford, MA, EUA)
- ✓ Ultraturrax TE-102 (Tecnal Ltda, Piracicaba, SP, Brasil)
- ✓ Viscosímetro DV-III+ (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Massachusetts, EUA)

4.3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL DA *Rosmarinus officinalis* L.

4.3.1 Coleta e processamento

Amostras de folhas foram coletadas de espécimes localizados no horto de plantas medicinais do Hospital de Medicina Alternativa (HMA) de Secretaria Estadual da Saúde – Goiânia - GO. Após identificação pelo prof. Dr. José Realino de Paula, uma exsicata foi preparada e depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás (UFG) sob registro UFG – 43206. No Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (P, D & I) de Produtos Fitoterápicos da Faculdade de Farmácia/UFG, esta matéria-prima vegetal foi dessecada à temperatura ambiente, triturada em moinho de facas e acondicionada em recipiente fechado sob refrigeração (-2 a +8 °C) para caracterização e posterior uso nos estudos de validação e na obtenção do extrato hidroalcoólico.

4.3.2 Determinação do teor de voláteis (V_T)

Foi utilizada uma balança para análise de umidade com lâmpada de halogênio, sendo os ensaios realizados em triplicata com amostras de 0,5 g.

4.3.3 Determinação do teor de cinzas totais (C_T)

Amostras de 3 g da droga vegetal foram pesadas em balança analítica e transferidas para cadinhos de porcelana, previamente calcinados em mufla a 450°C, sendo depois resfriados e pesados. As amostras foram uniformemente distribuídas nos cadinhos e incineradas em mufla, aumentando-se gradativamente a temperatura até 450°C e esta mantida durante 4 h, resfriadas em dessecador e novamente pesadas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2000). O teor de cinzas totais (C_T) foi calculado como percentual pela média de três determinações segundo a **equação 1**:

$$C_T (\% m/m) = \frac{mra_2}{mra_1} \times 100 \quad (1)$$

onde: mra_2 = massa do recipiente mais amostra pós aquecimento; mra_1 = massa do recipiente mais amostra antes do aquecimento.

4.3.4 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido (C_I)

Os resíduos obtidos no ensaio anterior foram fervidos durante 5 minutos com 25 mL de ácido clorídrico 7% (m/v), em cadinhos cobertos com vidro de relógio. Os vidros de relógio foram lavados com 5 mL de água quente, as amostras (resíduos + lavagens dos vidros de relógio) foram reunidas e filtradas em papéis de filtro isentos de cinza. Em seguida, os papéis de filtro foram lavados com água quente até pH neutro e transferidos para os cadinhos originais, cujos conteúdos foram secos sob chapa quente e incinerados em mufla a 500°C, durante 4h (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2000). O teor de cinzas insolúveis em ácido foi calculado como percentual segundo a **equação 2**.

$$C_I (\% m / m) = \frac{mra_2}{mra_1} \times 100 \quad (2)$$

4.3.5 Determinação do índice de intumescência (II)

Amostras de 1 g da droga vegetal foram colocadas em provetas de 25 mL com escala de 0,2 mL e tampa esmerilhada. Em seguida, foram adicionados 25 mL de água destilada e as provetas foram agitadas a cada 10 min., durante 1 h. Após repouso de três horas à temperatura ambiente, foram verificados os volumes finais ocupado pelas amostras (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2000). O II foi calculado, em mililitros, pela média de três determinações segundo a **equação 3**:

$$II = V_f - V_i \quad (3)$$

onde: V_f = volume final ocupado pela amostra (mL); V_i = volume inicial ocupado pela amostra (mL).

4.3.6 Determinação da distribuição granulométrica

Amostras de 20 g da droga vegetal foram pesadas em balança analítica e colocadas sobre um jogo de tamises previamente pesados, de malhas 710, 355, 300, 250, 180, 150, 106 e 53 μ m, provido de tampa e recipiente para coleta de pó. Os tamises foram agitados em um agitador mecânico, através de movimentos horizontais rotativos e verticais, sob nível de vibrações 5, durante vinte minutos e cuidadosamente pesados para verificar a quantidade de pó remanescente em cada um (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988). Assim, o diâmetro

médio das partículas (D_{50}) foi determinado pela técnica da distribuição cumulativa de frequência das massas retidas em cada tamis.

4.3.7 Determinação dos teores de polifenóis e taninos totais

As determinações dos teores de polifenóis (P_T) e taninos totais (T_T) seguiram a metodologia proposta por Hagerman e Butler (MOLE; WATERMAN, 1987a e b), com adaptações.

4.3.7.1 Extração de polifenóis e taninos totais

Para extração dos compostos polifenólicos e taninos pesou-se amostras de aproximadamente 750 mg (base seca) da droga vegetal e transferiu-se para frascos Erlenmeyer de 250 mL. Adicionou-se 150 mL de água destilada, aqueceu-se em chapa quente até ebulição e manteve-se em banho-maria sob refluxo à temperatura entre $85 \pm 5^\circ\text{C}$ por 30 min. Resfriou-se em água corrente e transferiu-se para balões volumétricos de 250 mL, completando-se os volumes com água destilada. Deixou-se decantar os sedimentos e filtrou-se através de papel de filtro, sendo desprezados os primeiros 50 mL dos filtrados.

4.3.7.2 Quantificação dos polifenóis totais

4.3.7.2.1 Preparo da curva padrão de ácido tânico

Pesou-se 10 mg de um padrão de ácido tânico e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com metanol 20% (v/v). Retiraram-se alíquotas de 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800 μL desta solução, as quais foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2 mL de solução aquosa de lauril sulfato de sódio (LSS, 1% m/v) / trietanolamina (TRI, 5% v/v) / isopropanol (ISOP, 20% v/v) e 1 mL de solução de cloreto férrico (FeCl_3) e completou-se o volume para 4 mL com água destilada. Homogeneizou-se, deixou-se em repouso por 15 min., homogeneizou-se novamente em agitador mecânico e fez-se a leitura da absorbância a 510 nm utilizando um espectrofotômetro. Desta forma, foi plotada uma curva da absorbância (u.a.) em função da concentração de ácido tânico ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). Para avaliação dos resultados obtidos para a curva padrão, foi realizada análise de regressão linear, calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação linear da reta (r) utilizando-se o *software* Origin 8.0 (OriginLab Co., MA, EUA).

4.3.7.2.2 Teor de polifenóis totais (P_T)

Adicionou-se a tubos de ensaio 2 mL de solução aquosa de LSS / TRI / ISOP, 1 mL de solução de FeCl_3 e alíquotas de 1 mL das soluções extrativas obtidas. Deixou-se em repouso por 15 min. e fez-se a leitura das absorbâncias em 510 nm. Utilizou-se como branco uma solução contendo 2 mL de solução aquosa de LSS / TRI / ISOP, 1 mL de solução de FeCl_3 e 1 mL de água destilada. Através da curva padrão de ácido tânico e das diluições das amostras a porcentagem de polifenóis totais foi calculada, como média de três replicatas, segundo a **equação 4**:

$$P_T (\% m/m) = C_A \times FD_A \times 100 \quad (4)$$

em que: C_A = valor correspondente à concentração da amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de acordo com a curva padrão de ácido tânico; FD_A = fator de diluição da amostra.

4.3.7.3 Quantificação dos taninos totais

4.3.7.3.1 Preparo da curva padrão de ácido tânico

Pesou-se 10 mg de um padrão de ácido tânico e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com metanol 20% (v/v). Retiraram-se alíquotas de 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800 μL desta solução, as quais foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2 mL de solução de albumina bovina sérica (ABS, 1mg.mL^{-1}) em solução tampão Acetato 0,2M (pH 4,9) e completou-se os volumes para 3mL com água destilada. Após homogeneização, as soluções foram deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos e então centrifugada por 15 min. a 3000 r.p.m. Após desprezar os sobrenadantes, os precipitados foram dissolvidos em 4 mL de solução de LSS / TRI / ISOP, adicionou-se 1 mL de solução cromogênica de FeCl_3 e homogeneizou-se em agitador mecânico. Após 30 min. mediram-se as absorbâncias a 510 nm. Desta forma, foi plotada uma curva da absorbância (u.a.) em função da concentração de ácido tânico ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). Para avaliação dos resultados obtidos para a curva padrão, foi realizada análise de regressão linear, calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação linear da reta (r) utilizando-se o *software* Origin 8.0 (OriginLab Co., MA, EUA).

4.3.7.3.2 Teor de taninos totais (T_T)

Adicionou-se a tubos de ensaio 2 mL da solução de ABS e 1 mL das soluções extrativas obtidas. Após homogeneização, as soluções foram deixadas à temperatura ambiente

por 15 min. e então centrifugadas por 15 min. a 3000 r.p.m. Após desprezar os sobrenadantes, os precipitados foram dissolvidos em 4 mL de solução de LSS / TRI / ISOP, adicionou-se 1 mL de solução cromogênica de FeCl_3 e homogeneizou-se em agitador mecânico. Após 30 min. mediram-se as absorbâncias a 510 nm. Utilizou-se como branco, uma solução contendo 4 mL de LSS / TRI / ISOP e 1 mL da solução cromogênica de FeCl_3 . Através da curva padrão de ácido tânico e das diluições das amostras a porcentagem de taninos totais foi calculada, como média de três replicatas, segundo a **equação 5**:

$$T_T (\% m/m) = C_{A'} \times FD_A \times 100 \quad (5)$$

em que: $C_{A'}$ = valor correspondente à concentração da amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de acordo com a curva padrão de ácido tânico; FD_A = fator de diluição da amostra.

4.3.8 Determinação dos teores de flavonóides totais

Os teores de flavonóides totais (F_T) foram determinados, como equivalentes de rutina, usando o método proposto por Rolim et al. (2005), modificado.

4.3.8.1 Extração dos flavonóides totais

Para extração dos flavonóides pesou-se amostras de aproximadamente 250 mg da droga vegetal e transferiu-se para balões de fundo redondo de 125 mL. Adicionou-se 50 mL de solução de metanol : ácido acético 0,02M (99 : 1) e aqueceu-se em banho-maria sob refluxo a $95 \pm 5^\circ\text{C}$ por 40 min. Resfriou-se em água corrente e filtrou-se através de papel de filtro de 14 μm Qualy (J. Prolab, Paraná, Brasil).

4.3.8.2 Quantificação dos flavonóides totais

4.3.8.2.1 Preparo da curva padrão de rutina

Pesou-se 10 mg de um padrão de rutina e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com a solução de metanol:ácido acético 0,02M (99:1). Retiraram-se alíquotas de 100, 200, 300, 400 e 500 μL desta solução, as quais foram transferidas para tubos de ensaio e completou-se o volume para 2 mL com a solução de metanol : ácido acético 0,02M (99 : 1). Homogeneizou-se em agitador mecânico e fez-se a leitura da absorbância a 361 nm. Desta forma, foi plotada uma curva da absorbância (u.a.) em função da concentração de rutina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). Para avaliação dos resultados obtidos para a curva padrão, foi realizada análise de regressão linear, calculada a equação da reta e o

coeficiente de correlação linear da reta (r) utilizando-se o *software* Origin 8.0 (OriginLab Co., MA, EUA).

4.3.8.2.2 Teor de flavonóides totais (F_T)

Adicionou-se a tubos de ensaio 2 mL das soluções extrativas obtidas e fez-se a leitura das absorbâncias em 361 nm. Utilizou-se como branco uma alíquota de 2 mL da solução de metanol : ácido acético 0,02M (99 : 1). Através da curva padrão de rutina e das diluições das amostras a porcentagem de flavonóides totais foi calculada, como média de três replicatas, segundo a **equação 6**:

$$F_T (\% m/m) = C_{A''} \times FD_A \times 100 \quad (6)$$

em que: $C_{A''}$ = valor correspondente à concentração da amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de acordo com a curva padrão de rutina; FD_A = fator de diluição da amostra.

4.3.9 Determinação do teor de ácido rosmarínico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A determinação do teor de ácido rosmarínico (AR_T) foi baseada na metodologia analítica proposta por Canelas e Costa (2007), modificada. As análises foram realizadas no Laboratório de Biofarmácia & Farmacocinética – FF/UFG, sob a supervisão da Prof^a. Dra. Kênnia Rocha Rezende, usando um Cromatógrafo Líquido modelo LC – 20AT Prominience (Shimadzu[®], Kyoto, Japão) equipado de uma bomba quartenária (LC – 20AT), degaseificador (DGU – 20A5 Prominience), injetor automático (SIL – 20A Prominience) e detector PDA (SPD – M20A Prominience).

As separações cromatográficas foram conduzidas em coluna de fase reversa Gemini RP-C18 (250 mm x 4.6 mm, 3 μm , 110Å) inserida em um compartimento com temperatura regulada por termostato (CTO – 20A Prominience). Empregou-se como fase móvel uma mistura de acetonitrila a 30% (v/v) e 70% (v/v) de uma solução de acetonitrila : ácido fórmico : água milli-Q (2,5 : 0,5 : 97% v/v) sob fluxo isocrático de 0,5 mL.min.⁻¹. O comprimento de onda de detecção foi de 254 nm, o volume de injeção foi de 20 μL e o tempo total de corrida foi fixado em 15 min. A aquisição e análise dos dados foram feitas empregando um Módulo Controlador (CBM – 20A Prominience) acoplado a um computador com *software* Shimadzu[®] LC Solution.

4.3.9.1 Avaliação dos parâmetros de *System Suitability*

Com intuito de assegurar o desempenho do sistema antes e durante as análises e definir as melhores condições cromatográficas, foram avaliados, conforme especificações do FDA (1994), os seguintes parâmetros de *System Suitability*: fator de cauda (T), resolução (Rs), número de pratos teóricos (N) e repetibilidade do padrão (CV).

4.3.9.2 Validação do método

A fim de se verificar a confiabilidade do método analítico, estudos de validação foram realizados seguindo as diretrizes propostas na Resolução - RE nº 899/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003). O método foi validado quanto aos parâmetros analíticos de seletividade, linearidade e intervalo, limites de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez.

4.3.9.2.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por meio da identificação do ácido rosmarínico na amostra por comparação entre os tempos de retenção e pureza dos picos das amostras e do padrão de referência.

4.3.9.2.2 Linearidade e Intervalo

Para a construção das curvas padrão foram preparadas três soluções-mãe, em três dias consecutivos, na concentração de 1 mg.mL^{-1} da substância química de referência correspondente ao ácido rosmarínico em metanol grau cromatográfico. A partir de cada solução-mãe foram realizadas diluições sucessivas em metanol, obtendo-se as seguintes concentrações: 2,5, 5, 10, 20, e 50 µg.mL^{-1} . As amostras foram filtradas em membrana de $0,45 \text{ µm}$ e injetadas em triplicata no cromatógrafo. As médias das áreas dos picos de cada concentração de ácido rosmarínico foram plotadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações nas abscissas. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e expressa por $y = ax + b$, onde o coeficiente angular (a) é a inclinação da reta em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) é a interseção da reta com o eixo y. Já a faixa linear de trabalho foi determinada por intermédio do coeficiente de correlação de Pearson (r).

4.3.9.2.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Para determinação do LD e LQ utilizou-se o método do desvio padrão. Preparou-se três soluções-mãe na concentração de 1 mg.mL^{-1} do padrão de ácido rosmarínico em metanol

grau cromatográfico. A partir de cada solução-mãe foram realizadas diluições sucessivas em metanol, obtendo-se as concentrações de 2,5, 5, 10, 20, e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 μm e injetadas em triplicata no cromatógrafo. Determinou-se a média das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas e os respectivos desvios padrões. Construiu-se duas curvas, uma plotando as concentrações no eixo das abscissas e no eixo das ordenadas as áreas dos picos obtidos e outra plotando as concentrações no eixo das abscissas e no eixo das ordenadas os desvios padrões obtidos. As equações 7 e 8, respectivamente, foram utilizadas para determinação dos *LD* e *LQ*:

$$LD = \frac{b + 3(b_{dp})}{a} \quad (7)$$

$$LQ = \frac{b + 10(b_{dp})}{a} \quad (8)$$

onde, *b* é o intercepto *y* obtido da equação da reta das médias das áreas dos picos, *a* é a inclinação obtida da equação da reta das médias das áreas dos picos e *b_{dp}* é o intercepto *y* obtido da equação da reta dos desvios padrões.

4.3.9.2.4 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-corrida), precisão intermediária (precisão inter-corridas). A repetibilidade e a precisão intermediária foram expressas através do coeficiente de variação entre as amostras (*CV*), calculado segundo a equação 9:

$$CV(\%) = \frac{DP}{\bar{X}} \times 100 \quad (9)$$

em que: *DP* = desvio padrão; $\bar{X}$ = média das áreas dos picos.

4.3.9.2.4.a Repetibilidade

Foram preparadas seis soluções, pesando-se aproximadamente 0,4 g (base seca) da droga vegetal e transferindo-se para balões volumétricos de 10 mL, os quais foram completados com metanol e levados a extração em banho de ultrassom por 30 min. Alíquotas

de 1 mL dos extratos obtidos foram novamente diluídas em balões volumétricos de 10 mL usando o mesmo solvente. As amostras eram filtradas em membrana de 0,45 µm e injetadas em triplicata no cromatógrafo. Através da construção de uma curva padrão de ácido rosmarínico e das diluições das amostras o teor percentual de ácido rosmarínico foi calculado segundo a **equação 10**:

$$AR_T(\% m/m) = C_{A''} \times FD_A \times 100 \quad (10)$$

em que: $C_{A''}$ = valor correspondente à concentração da amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de acordo com a curva padrão de ácido rosmarínico; FD_A = fator de diluição da amostra.

4.3.9.2.4.b Precisão intermediária

A precisão intermediária foi realizada por analista diferente e em dias diferentes, sendo a preparação das amostras e as análises realizadas como descrito no item anterior.

4.3.9.2.5 Exatidão

Para a avaliação da exatidão, pesou-se aproximadamente 0,32, 0,4 e 0,48 g da droga vegetal, correspondendo a 80, 100 e 120% da concentração testada. Este material foi transferido para balões volumétricos de 10 mL, sendo os volumes completados com metanol e levados a extração em banho de ultrassom por 30 min. Alíquotas de 1 mL dos extratos obtidos foram novamente diluídas em balões volumétricos de 10 mL usando o mesmo solvente. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm e injetadas em triplicata no cromatógrafo. O cálculo da exatidão é expresso em função da percentagem do erro relativo, através da **equação 11**:

$$Exatidão(\%) = \frac{\text{Concentração média obtida}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (11)$$

4.3.9.2.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada variando-se a composição (29 e 31% de acetonitrila) e o fluxo da fase móvel (0,48 e 0,52 mL.min⁻¹). Os resultados foram comparados com aqueles obtidos sob as condições iniciais de análise. Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, usando o

software GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software Inc., CA, EUA). Foram considerados significativos valores de p menores ou iguais a 5% ($p \leq 0.05$).

4.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Rosmarinus officinalis* L.

O extrato hidroalcoólico foi obtido por percolação usando como solvente etanol a 80% (v/v) e identificação do ácido rosmarínico por CCD para a monitoração do esgotamento da droga vegetal. Este processo foi realizado em três etapas (LIST; SCHMIDT, 1989): 1) pré-intumescimento por 2 h com uma proporção droga : solvente de 3 : 1; 2) maceração intermediária (24 h); 3) percolação ($0,2 \pm 0,05 \text{ mL.min}^{-1}$) por 3000 g de pó. Três partes de extrato foram obtidas a partir de uma parte de droga vegetal. Este material foi acondicionado em frascos âmbar fechados sob refrigeração (-2 a $+8$ °C) para caracterização e posterior uso nos experimentos de secagem.

4.4.1 Determinação do resíduo seco (C_s)

O resíduo seco foi determinado utilizando uma balança para análise de umidade com lâmpada de halogênio, sendo os ensaios realizados em triplicata com amostras de 0,5 g.

4.4.2 Determinação do teor alcoólico

Os ensaios foram realizados, em triplicata, conforme proposto pela Farmacopéia Brasileira (1988). Transferiu-se para aparato destilador 25 mL do extrato hidroalcoólico e igual quantidade de água destilada, iniciando-se o processo de destilação. O destilado foi coletado em um balão volumétrico de 25 mL. Determinou-se então, a densidade relativa do líquido à 25°C através de picnometria, e o resultado obtido foi avaliado em porcentagem em volume de etanol contido no extrato, conforme tabela alcoométrica proposta na Farmacopéia Brasileira (1988).

4.4.3 Determinação do pH

O pH foi determinado por método potenciométrico, utilizando-se um pHmetro previamente calibrado com soluções tampão 7,0 e 4,0 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000).

4.4.4 Determinação da densidade

A densidade foi determinada por picnometria, sendo que para tanto, foram determinadas as massas de um picnômetro vazio, com água destilada a 20°C com amostra a 20 °C (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000). A densidade foi calculada seguindo a equação 12.

$$Densidade \left(g / cm^3 \right) = \frac{(ma_2 - mv)}{(ma_1 - mv)} \quad (12)$$

onde: ma_1 = massa do picnômetro + água; ma_2 = massa do picnômetro + amostra; mv = massa do picnômetro vazio.

4.4.5 Determinação da viscosidade

A viscosidade foi determinada, em triplicata, usando um viscosímetro DV-III+ (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Massachusetts, USA).

4.4.6 Determinação dos teores de polifenóis e taninos totais

As determinações dos teores de polifenóis e taninos totais seguiram a metodologia proposta por Hagerman & Butler (MOLE; WATERMAN, 1987a e b), com adaptações.

4.4.6.1 Quantificação dos polifenóis totais

Alíquotas de 100 µL do extrato hidroalcoólico foram diluídas em balões volumétricos de 10 mL com metanol 20% (v/v). Adicionou-se a tubos de ensaio 2 mL de solução aquosa de LSS / TRI / ISOP, 1 mL de solução de FeCl₃ e alíquotas de 1 mL das soluções obtidas. Deixou-se em repouso por 15 minutos e fez-se a leitura das absorbâncias em 510 nm. Através da construção de uma curva padrão de ácido tânico (ver item 4.3.7.2.1) e considerando-se não apenas as diluições da amostra, mas também a densidade e o resíduo seco do extrato hidroalcoólico a porcentagem de polifenóis totais foi calculada, como média de três replicatas, segundo a equação 4.

4.4.6.2 Quantificação dos taninos totais

Alíquotas de 100 µL do extrato hidroalcoólico foram diluídas em balões volumétricos de 10 mL com metanol 50% (v/v). Adicionou-se a tubos de ensaio 2 mL da solução de ABS e 1 mL das soluções obtidas. Após homogeneização, as soluções foram deixadas à temperatura

ambiente por 15 min. e então centrifugadas por 15 min. a 3000 r.p.m. Após desprezar os sobrenadantes, os precipitados foram dissolvidos em 4 mL de solução de LSS / TRI / ISOP, adicionou-se 1 mL de solução cromogênica de FeCl_3 e homogeneizou-se em agitador mecânico. Após 30 min. mediram-se as absorbâncias a 510 nm. Através da construção de uma curva padrão de ácido tânico (ver item 4.3.7.3.1) e considerando-se não apenas as diluições da amostra, mas também a densidade e o resíduo seco do extrato hidroalcoólico a porcentagem de taninos totais foi calculada, como média de três replicatas, segundo a **equação 5**.

4.4.7 Determinação dos teores de flavonóides totais

Os teores de flavonóides totais (F_T) foram determinados, como equivalentes de rutina, usando o método proposto por Rolim et al. (2005), modificado. Alíquotas de 50 μL do extrato hidroalcoólico foram diluídas em balões volumétricos de 10 mL com solução de metanol:ácido acético 0,02M (99:1). Adicionou-se a tubos de ensaio 2 mL das soluções obtidas e fez-se a leitura das absorbâncias em 361 nm. Através da construção de uma curva padrão de rutina (ver item 3.3.8.2.1) e considerando-se não apenas as diluições da amostra, mas também a densidade e o resíduo seco do extrato hidroalcoólico a porcentagem de flavonóides totais foi calculada, como média de três replicatas, segundo a **equação 6**.

4.4.8 Determinação do teor de ácido rosmarínico por CLAE

Os ensaios foram realizados nas mesmas condições analíticas descritas no item 4.3.9. A metodologia foi co-validada quanto aos parâmetros analíticos de seletividade, linearidade e intervalo, seguindo os parâmetros e critérios de aceitação baseados na Resolução - RE nº 899/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

4.4.8.1 Co-validação do método

4.4.8.1.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por meio da identificação do ácido rosmarínico na amostra por comparação entre os tempos de retenção e pureza dos picos das amostras e do padrão de referência.

4.4.8.1.2 Linearidade e Intervalo

Procedeu-se conforme proposto no item 4.3.9.1.2.

4.4.8.2 Quantificação do ácido rosmarínico

Alíquotas de 20 µL do extrato hidroalcoólico, previamente filtrado em papel de filtro de 14µm, foram diluídas com metanol grau cromatográfico em balões volumétricos de 10 mL. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm e injetadas em triplicata no cromatógrafo. Através da curva padrão de ácido rosmarínico e considerando-se não apenas as diluições da amostra, mas também a densidade e o resíduo seco do extrato hidroalcoólico, o teor percentual de ácido rosmarínico foi calculado segundo a **equação 10**.

4.4.9 Avaliação da atividade antioxidante (AAO)

A atividade sequestradora do radical livre DPPH[•] foi avaliada conforme descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com mínimas modificações. Amostras do extrato hidroalcoólico foram primeiramente solubilizadas em álcool etílico a 95% e sucessivamente diluída usando o meio de reação para intervalos de concentração final variando de 0,5 - 500 µg.mL⁻¹ (base seca) em média. 2,5 mL das várias diluições do material de ensaio foram misturados com 1,0 mL de uma solução etanólica de DPPH[•] a 0,3 mM. Após um período de incubação de 30 min a 25°C, as absorbâncias foram registradas a 517 nm como $A_{amostra}$. Um ensaio em branco também foi realizado aplicando o mesmo procedimento para uma solução sem o DPPH[•] e absorbância foi registrada como A_{branco} . Paralelamente, um experimento controle (ausente de antioxidante) foi realizado utilizando uma solução sem o material de ensaio e a absorbância foi registrada como $A_{controle}$. A atividade sequestradora de radical livre de cada solução foi então calculada como porcentagem de inibição de acordo com a **equação 13**:

$$AAO (\% \text{ inibição}) = 100 - \frac{(A_{amostra} - A_{branco}) \times 100}{A_{controle}} \quad (13)$$

Assim, a AAO foi expressa como CE₅₀, definido como a concentração (µg.mL⁻¹) da amostra necessária para causar uma redução de 50% na concentração inicial de DPPH[•]. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DA *Rosmarinus officinalis* L.

Os experimentos de secagem foram realizados em um *spray dryer* com regime de fluxo co-corrente. Sua capacidade evaporatória máxima é de 1.0 L.h⁻¹ a uma temperatura de entrada do ar de secagem de 200°C. Os principais componentes deste sistema são: sistema de alimentação de extrato, composto por uma bomba peristáltica e um atomizador pneumático (duplo-fluido) com orifício de 1,2 mm de diâmetro interno; ar de secagem fornecido por um soprador circular, aquecido eletricamente e com temperatura regulada por um termostato digital do tipo PID; câmara de secagem, de formato cilíndrico (160 mm de diâmetro e 645 mm de comprimento), feita de vidro borossilicato; sistema de separação do produto seco do ar (ciclone), feito de aço inoxidável; recipiente de coleta do produto seco.

4.5.1 Design experimental

A fim de se obter produtos secos com propriedades otimizadas, os efeitos de alguns parâmetros envolvidos no processo, *e.g.* fluxo de alimentação de extrato (F_E), temperatura de entrada do ar de secagem (E_T) e vazão do ar de aspersão (V_A), foram determinados seguindo um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken com 3 fatores (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978). Os níveis dos fatores estudados são apresentados na Tabela 1, que mostra os valores codificados e não-codificados de cada fator. As matrizes do planejamento fatorial com os fatores e níveis estudados são apresentadas na Tabela 2.

Nas Tabelas 1 e 2, os fatores foram codificados para permitir a análise de variância (ANOVA) seguindo a regra de codificação dada pela **equação 14**:

$$Valor\ codificado = \frac{(valor\ não\ codificado - 0.5 \times (nível\ alto + nível\ baixo))}{0.5 \times (nível\ alto - nível\ baixo)} \quad (14)$$

Tabela 1: Fatores codificados e seus níveis no planejamento fatorial Box-Behnken (3³)

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
$X_1 \cdot F_E$ (mL.min. ⁻¹)	2	4	6
$X_2 \cdot E_T$ (°C)	80	110	140
$X_3 \cdot V_A$ (L.min. ⁻¹)	30	40	50

Tabela 2: Planejamento fatorial Box-Behnken (3^3)

Exp.	X ₁	X ₂	X ₃
1	2	80	40
2	6	80	40
3	2	140	40
4	6	140	40
5	2	110	30
6	6	110	30
7	2	110	50
8	6	110	50
9	4	80	30
10	4	140	30
11	4	80	50
12	4	140	50
13	4	110	40
14	4	110	40
15	4	110	40

As análises estatísticas dos dados experimentais foram realizada por ANOVA e regressão linear usando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), empregando o módulo *Visual General Linear Model (VGLM)* do *software* Statistica 7 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA). A função de resposta aplicada foi uma equação polinomial quadrática, dada pela **equação 15**:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \quad (15)$$

onde, Y é a resposta predita (variável dependente); β_0 é a constante do modelo; x_1 , x_2 e x_3 são as variáveis independentes; β_1 , β_2 e β_3 são os coeficientes lineares; β_{12} , β_{13} e β_{23} são os coeficientes de interação; β_{11} , β_{22} e β_{33} são coeficientes quadráticos.

Paralelamente, o seguinte conjunto de condições foi fixado para todos os experimentos: pressão do ar de aspersão, 4 bar; fluxo do ar de secagem, 1.0 m³/min.; massa do extrato de alimentação (Q_E), 300 g. Os extratos secos foram coletados, pesados e acondicionados em frascos fechados, protegidos da luz e umidade em dessecadores sob temperatura e umidade relativa ambiente antes e durante suas caracterizações.

4.5.2 Caracterizações dos produtos obtidos

4.5.2.1 Determinação do rendimento de secagem (R_P)

Os rendimentos de secagem (R_P), ou percentual de recuperação dos produtos secos, foram calculado, pela diferença de massa do frasco de coleta antes e depois de usado para a coleta do material seco (W). Para tanto, foram feitas considerações relacionadas à massa do extrato de alimentação (Q_E) e ao resíduo seco (C_S) do extrato de alimentação. A **equação 16** demonstra essa relação:

$$R_P (\% m/m) = \frac{W}{Q_E \times \left(\frac{C_S}{100} \right)} \times 100 \quad (16)$$

4.5.2.2 Determinação do teor de voláteis (V_T)

Foi utilizada uma balança para análise de umidade com lâmpada de halogênio, sendo os ensaios realizados em triplicata com amostras de 0,5 g.

4.5.2.3 Determinação da atividade de água (A_{ATV})

Para a análise da A_{ATV} nos extratos secos, em triplicata, foi utilizado um aparelho de determinação de atividade de água composto por um termohigrômetro e uma câmara hermética.

4.5.2.4 Determinação das densidades aparente e compactada

4.5.2.4.1 Determinação da densidade aparente (ρ_a)

Foram adicionadas amostras de 1,5 g dos pós a provetas de 10 mL previamente pesadas. As densidades aparentes constituíram-se pela relação entre os volumes e as massas de pó adicionadas às provetas (WANCZINSKI et al., 2002), como mostra a **equação 17**:

$$\rho_a \text{ (g / cm}^3\text{)} = m / v_a \quad (17)$$

onde: m é a massa da amostra e v_a corresponde ao volume aparente.

4.5.2.4.2 Determinação da densidade compactada (ρ_c)

As mesmas provetas acima citadas foram acoplada a um tamizador vibratório e em seguida submetidas à vibração de nível 4 por 1 min. e a vibração máxima por 1 min. A relação entre os volumes ocupados pelos pós após a compactação e as massas dos mesmos adicionados às provetas constituíram as densidades de compactação, como sugere a **equação 18**:

$$\rho_c \text{ (g / cm}^3\text{)} = m / v_c \quad (18)$$

onde: v_c corresponde ao volume obtido na compactação.

4.5.2.5 Determinação do Fator de Hausner e Índice de Carr

O Fator de Hausner (F_H) e o Índice de Carr (I_C) foram calculados, em triplicata, conforme metodologia referendada na USP XXX (2007), sendo o Fator de Hausner o quociente da razão entre a densidade compactada e a densidade aparente; como mostra a **equação 19**:

$$F_H = \rho_c / \rho_a \quad (19)$$

O Índice de Carr foi determinado segundo a **equação 20**:

$$I_C (\%) = (\rho_c - \rho_a) / \rho_c \times 100 \quad (20)$$

4.5.2.6 Determinação da distribuição granulométrica

Amostras de 5 g dos extratos secos foram pesadas em balança analítica e colocadas sobre um jogo de tamises previamente pesados, de malhas 710, 355, 300, 250, 180, 150, 106 e 53 μm , provido de tampa e recipiente para coleta de pó. Os tamises foram agitados em um agitador mecânico, através de movimentos horizontais rotativos e verticais, sob nível de vibrações 5, durante vinte min. e cuidadosamente pesados para verificar a quantidade de pó remanescente em cada um (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988). Assim, D_{50} foi determinado pela técnica da distribuição cumulativa de frequência das massas retidas em cada tamis.

4.5.2.7 Determinação da morfologia das partículas

Os extratos secos obtidos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (M.E.V) em baixo vácuo no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (FARMATEC), da Faculdade de Farmácia / UFG. Os pós foram previamente recobertos com uma fina camada de ouro em *sputter coater* SCD modelo 50 e depois, analisados no microscópio variando-se as condições até se obter as melhores micrografias. Os tamanhos de algumas partículas foram medidos para efeito de comparação entre os pós obtidos.

4.5.2.8 Determinação do ângulo de repouso (θ)

Os ângulos de repouso (θ) foram determinados, em triplicata, pelo método do funil (BROWN; RICHARDS, 1970). Amostras de 5 g dos pós foram escoadas através de um funil de vidro para uma base de superfície circular plana com diâmetro conhecido. As alturas dos cones formados foram medidas com um paquímetro e os ângulos de repouso foram calculados, sendo correspondes à tangente inversa (tg^{-1}) do ângulo formado pelo cateto correspondente ao raio da base (R) e a altura do cone (H), como mostrado na **equação 21**:

$$\text{tg}^{-1} \theta = H/R \quad (21)$$

4.5.2.9 Determinação dos teores de polifenóis e taninos totais

As determinações dos teores de polifenóis e taninos totais seguiram a metodologia proposta por Hagerman e Butler (MOLE; WATERMAN, 1987a e b), com adaptações.

4.5.2.9.1 *Quantificação dos polifenóis totais*

Amostras de aproximadamente 10 mg (base seca) dos extratos secos foram solubilizadas em balões volumétricos de 10 mL com metanol 20% (v/v). Adicionou-se a tubos de ensaio 2 mL de solução aquosa de LSS / TRI / ISOP, 1 mL de solução de FeCl_3 e alíquotas de 1 mL das soluções obtidas. Deixou-se em repouso por 15 minutos e fez-se a leitura das absorbâncias em 510 nm. Através da construção de uma curva padrão de ácido tânico (ver item 4.3.7.2.1) e considerando-se as diluições das amostras, a porcentagem de polifenóis totais foi calculada, como média de três replicatas, segundo a **equação 4**.

4.5.2.9.2 *Quantificação dos taninos totais*

Amostras de aproximadamente 20 mg (base seca) dos extratos secos foram solubilizadas em balões volumétricos de 10 mL com metanol 20% (v/v). Adicionou-se a tubos de ensaio 2 mL da solução de ABS e 1 mL das soluções obtidas. Após homogeneização, as soluções foram deixadas à temperatura ambiente por 15 min. e então centrifugadas por 15 min. a 3000 r.p.m. Após desprezar os sobrenadantes, os precipitados foram dissolvidos em 4 mL de solução de LSS / TRI / ISOP, adicionou-se 1 mL de solução cromogênica de FeCl_3 e homogeneizou-se em agitador mecânico. Após 30 min. mediram-se as absorbâncias a 510 nm. Através da construção de uma curva padrão de ácido tânico (ver item 4.3.7.3.1) e considerando-se as diluições das amostras, a porcentagem de taninos totais foi calculada, como média de três replicatas, segundo a **equação 5**.

4.5.2.10 Determinação dos teores de flavonóides totais

Os teores de flavonóides totais foram determinados, como equivalentes de rutina, usando o método proposto por Rolim et al. (2005), modificado. Amostras de aproximadamente 10 mg (base seca) dos extratos secos foram solubilizadas em balões volumétricos de 10 mL com solução de metanol:ácido acético 0,02M (99:1). Adicionou-se a tubos de ensaio 2 mL das soluções obtidas e fez-se a leitura das absorbâncias em 361 nm. Através da construção de uma curva padrão de rutina (ver item 4.3.8.2.1 e considerando-se as diluições das amostras, a porcentagem de flavonóides totais foi calculada, como média de três replicatas, segundo a **equação 6**.

4.5.2.11 Determinação do teor de ácido rosmarínico por CLAE

Os ensaios foram realizados nas mesmas condições analíticas descritas no item **4.3.9**. A metodologia foi co-validada quanto aos parâmetros analíticos de seletividade, linearidade e intervalo, seguindo os parâmetros e critérios de aceitação baseados na Resolução - RE nº 899/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

4.5.2.11.1 Co-validação do método

4.5.2.11.1.a Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por meio da identificação do ácido rosmarínico na amostra por comparação entre os tempos de retenção e pureza dos picos das amostras e do padrão de referência.

4.5.2.11.1.b Linearidade e Intervalo

Procedeu-se conforme proposto no item 4.3.9.1.2.

4.5.2.11.2 Quantificação do ácido rosmarínico

Amostras de aproximadamente 10 mg (base seca) dos extratos secos foram solubilizadas em balões volumétricos de 10 mL com metanol grau cromatográfico. Alíquotas de 1 mL das soluções obtidas foram novamente diluídas em balões volumétricos de 10 mL usando o mesmo solvente. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45µm e injetadas em triplicata no cromatógrafo. Através da curva padrão de ácido rosmarínico e considerando-se as diluições das amostras, o teor percentual de ácido rosmarínico foi calculado segundo a **equação 10**.

4.5.2.12 Avaliação da atividade antioxidante

Procedeu-se conforme proposto no item **4.4.9**.

5 CONCLUSÕES GERAIS

- O presente estudo possibilitou o controle de qualidade da droga vegetal da *R. officinalis* a partir da determinação dos seus teores de voláteis, cinzas totais e insolúveis em ácido, índice de intumescência e distribuição granulométrica, bem como a investigação dos teores de seus principais grupos de metabólitos secundários, *i.e.* polifenóis, taninos e flavonóides totais. Os resultados forneceram informações importantes acerca da eficiência na obtenção, processo e acondicionamento da matéria-prima da *R. officinalis*.
- O método analítico validado para o doseamento de ácido rosmarínico provou ser de fácil execução, rápido, seletivo, linear, sensível, preciso, exato e robusto, o que nos permite concluir que este pode ser empregado com sucesso na rotina do controle de qualidade e padronização de insumos e produtos fitofarmacêuticos intermediários da *R. officinalis*. Seria útil estender a validade desses resultados a partir da realização de novos estudos de validação envolvendo diferentes laboratórios no sentido de torná-lo um método farmacopéico.
- O extrato hidroalcoólico obtido por percolação e concentrado na proporção de 1:3 (droga vegetal:extrato hidroalcoólico) apresentou características favoráveis a obtenção de extratos secos sob condições ótimas de segurança e *performance*.
- Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o impacto significativo das condições de processo (temperatura de entrada do ar de secagem, fluxo de alimentação do extrato e vazão do ar de aspersão) na eficiência da secagem e nas propriedades químicas, físicas, físico-químicas e funcionais dos extratos secos da *R. officinalis* obtidos por *spray drying*.
- O melhor conjunto de condições a ser empregado na obtenção de extratos secos da *R. officinalis* com indícios de estabilidade química e microbiológica (baixa umidade residual e atividade de água), assim como propriedades físico-químicas e funcionais adequadas (altos níveis de marcadores químicos e atividade antioxidante) é aquele executado com um alto fluxo de extrato de alimentação (6 mL.min^{-1}), temperatura do ar de admissão intermediária (110°C) e baixa vazão do ar de aspersão (30 L.min^{-1}).
- Faz-se necessária a futura investigação de outros parâmetros de processo (tipo, proporção e tempo de incorporação de adjuvantes de secagem; tipo, pressão e diâmetro interno do bico atomizador; regime de fluxo e vazão do ar de secagem, etc) e suas interações com as características dos produtos secos.
- As propriedades antioxidantes do extrato seco obtido sob condições otimizadas (fluxo de extrato de alimentação de 6 mL.min^{-1} ; temperatura do ar de admissão de 110°C e vazão do ar de aspersão de 30 L.min^{-1}) podem justificar seu emprego na indústria farmacêutica no

desenvolvimento de fitoterápicos e nutracêuticos e na indústria alimentícia como conservante de alimentos.

- Os resultados como um todo demonstram que o processo de secagem pela técnica de *spray drying* pode ser uma alternativa atrativa e promissora para o desenvolvimento de produtos intermediários padronizados da *R. officinalis*.

REFERÊNCIAS

ACOSTA-ESQUIJAROSA, J.; JÁUREGUI-HAZA, U.; AMARO-GONZÁLEZ, D.; SORDO-MARTÍNEZ, L. Spray Drying of Aqueous Extract of *Mangifera indica* L. (Vimang): Scale up for the Process. **World Applied Sciences Journal**, v. 6, n. 3, p. 408–412, 2009.

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *HerbalGram*, 28, 13–19, 1993.

ALTINIER, G.; SOSA, S.; AQUINO, R. P.; MENCHERINI, T.; LOGGIA, R. D.; TUBARO, A. Characterization of Topical Antiinflammatory Compounds in *Rosmarinus officinalis* L., **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 1718–1723, 2007.

AMIN, A.; HAMZA, A. A., Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, *Rosmarinus* and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats. **Life Science**. v. 77, p. 266–278, 2005.

ANDRADE, I.; FLORES, H. Optimization of spray drying of Roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Drying 2004 - Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004)**. São Paulo, Brazil, 22-25 August 2004, vol. A, pp. 597–604, 2004.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COÏSSON, J. D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P., Chemical Composition, Plant Genetic Differences, Antimicrobial and Antifungal Activity Investigation of the Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 530–535, 2004.

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

BAI, N.; HE, K.; ROLLER, M.; LAI, C. S.; SHAO, X.; PAN, M. H.; HO, C. T., Flavonoids and Phenolic Compounds from *Rosmarinus officinalis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p. 5363–5367, 2010.

BAKIREL, T.; BAKIRE, U.; KELES, O. Ü.; ÜLGEN, S. G.; YARDIBI, H. *In vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 116, p. 64–73, 2008.

BARATA, L. E. S. Empirismo e ciência: fonte de novos fitomedicamentos. **Ciência e Cultura**. v. 57, n. 4, p. 4–5. 2005.

BECKETT, K. A. *Hierbas Aromaticas*. Barcelona, Ediciones Folio, 1988, 76 p.

BENINCÁ, J. P., DALMARCO, J. B., PIZZOLATTI, M. G., FRÖDE, T. S. Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. **Food Chemistry**. v. 124, p. 468–475, 2011.

BISSET, N.G., ed. **Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals** (WICHTL M., ed., German edition). Stuttgart: Medpharm, 1994.

BLUMENTHAL, M.; BUSS, W.R.; GOLDEBERG, A.; GRUENWALD, J.; HAL, T.; RIGGINS, C.W., eds. **The Complete German Commission E Monographs**. Austin, Texas: American Botanical Council, 1998.

BORGOGNONI, C. F.; POLAKIEWIC, B.; PITOMBO, R. N. M. Moisture Sorption Isotherm Characteristics of Freeze-Dried D-Limonene Emulsions in Modified Chitosan and Maltodextrin. **Drying Technology**. v. 26, n. 7, p. 956–962, 2008.

BOX, M.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters**. John Wiley & Sons, New York, 1978.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; JOVIN, E., Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 7879–7885, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**. v. 28, p. 25–30, 1995.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. DOU 02/07/2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº14, de 31 de março de 2010 - **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. Brasília, 2010.

BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA. vol. 2. Bournemouth, Dorset: British Herbal Medicine Association, 1990.

BROADHEAD, J.; ROUAN, S. K. E.; RHODES, C. T. The spray drying of pharmaceuticals. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 18, 1169–1206, 1992.

BROWN, R. L.; RICHARDS, J. C. **Principles of Powder Mechanics**. Pergamon Press, 1st ed., January 1, 1970, 221 p.

BRUSCHI, M. L.; CARDOSO, C.; LUCCHESI, M. B.; GREMIÃO, M. P. D. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 264, n. 1-2, p. 45–55, 2003.

BUCHAILLOT, A.; CAFFIN, N.; BHANDARI, B. Drying of Lemon Myrtle (*Backhousia citriodora*) Leaves: Retention of Volatiles and Color. **Drying Technology**. v. 27, n. 3, p. 445–450, 2009.

BURANDE, R. R.; KUMBHAR, B. K.; GHOSH, P. K.; JAYAS, D. S. Optimization of Fluidized Bed Drying Process of Green Peas Using Response Surface Methodology. **Drying Technology**. v. 26, n. 7, p. 920–930, 2008.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, n. 2, p. 179–189, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, n. 1-2, p. 131–134, 2005.

CANELAS, V.; COSTA, C. T. Quantitative HPLC Analysis of Rosmarinic Acid in Extracts of *Melissa officinalis* and Spectrophotometric Measurement of Their Antioxidant Activities. **Journal of Chemical Education**. v. 84, n. 9, 2007.

CARVALHO A. C. B.; BALBINO E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 314–319, 2008.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D.J. H.; MOSQUIM, P. R. *Contribuição ao estudo de plantas medicinais: metabólitos secundários*, 2 ed., 2004, 113 p.

CHAVES, J. S. “Obtenção e caracterização de um fitoterápico a partir de *Tanacetum parthenium* Shultz-Bip (Asteraceae): caracterização química e física do pó das partes aéreas de *T. parthenium* e obtenção e caracterização química, física e físico-química dos extratos hidroalcoólico e seco e de comprimidos de dissolução entérica.” 2005. 95f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

CHAVES, J. S.; DA COSTA, F. B.; FREITAS, L. A. P. Development of Enteric Coated Tablets from Spray Dried Extract of Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**. v. 45, n. 2, p. 1–12, 2009.

CHEUNG, S.; TAI, J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. **Oncology Reports**. v. 17, p. 1525–1531, 2007.

COLLIN, M.A.; CHARLES, H.P. Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. **Food Microbiology**, v. 4, p. 311–315, 1987.

CORDEIRO, D. S.; OLIVEIRA, W. P. Technical aspects of the production of dried extract of *Maytenus ilicifolia* leaves by jet spouted bed drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 299, p. 115–126, 2005.

COUTO, R. O.; ARAÚJO, R. R.; TACON, L. A.; CONCEIÇÃO, E. C.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R.; FREITAS, L. A. P. Development of a Phytopharmaceutical Intermediate Product Via Spray Drying. **Drying Technology**. aceito para publicação, 2010.

DA COSTA, R. S.; OZELA, E. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L.; SILVA JÚNIOR, J. O. C. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 90, n. 3, p. 169–174, 2009.

DAIUTO, E. R.; CEREDA, M. P. Influência da granulometria de grânulos de amido sobre a densidade aparente de extratos atomizados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 27, n. 1, p. 51–56, 2006.

DE SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. **Phytomedicine**. v. 14, p. 102–108, 2007.

DE SOUZA K. C.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L.; ORTEGA, G. G. The adjuvants aerosil 200 and Gelita-Sol-P influence on the technological characteristics of spray-dried powders from *Passiflora edulis* var. flavicarpa. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 26, n. 3, p. 331–336, 2000.

DE SOUZA, T. P.; LIONZO, M. I. Z.; PETROVICK, P. R. Avaliação da redução da carga microbiana de droga vegetal através do processamento tecnológico: decocção e secagem por aspersão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 1, 94–98, 2006.

DE SOUZA, T. P.; GÓMEZ-AMOZA, J. L.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; PETROVICK, P. R. Compression behavior of formulations from *Phyllanthus niruri* spray dried extract. **Pharmazie**. v. 61, p. 213–217, 2006.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**. v. 110, p. 76–82, 2008.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. - São Paulo; Atheneu Editora LTDA, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed., Fascículo II - São Paulo; Atheneu Editora LTDA, 2000.

FILKOVÁ, I; MUJUNDAR, A. S. Industrial Spray Drying Systems. In: MUJUNDAR, A. S. **Handbook of industrial drying**. 2 ed. CRC/Taylor & Francis, 1995. cap.9, p. 263–307.

GEORGANTELIS, D.; AMBROSIADIS, I.; KATIKOU, P.; BLEKAS, G.; GEORGAKIS, S. A. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. **Meat Science**. v. 76, p. 172–181, 2007.

GEORGETTI, S. R., CASAGRANDE, R., SOUZA, C. R. F., OLIVEIRA, W. P., FONSECA, M. J. V. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**. v. 41, p. 1521–1527, 2008.

GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E.; PEÑA, E. I.; MARTÍNEZ, A. L.; MORENO, J.; GUEVARA-FEFER, P.; DÉCIGA-CAMPOS, M.; LÓPEZ-MUÑOZ, F. J. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, p. 476–482, 2007.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Legais e Éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, 5 ed. Florianópolis, Porto Alegre. Editora da UFSC e da UFRS, 2005. cap.1, p. 13–28.

GUTIÉRREZ, R., ALVARADO, J. L., PRESNO, M., PÉREZ-VEYNA, O., SERRANO, C. J., YAHUACA, P. Oxidative Stress Modulation by *Rosmarinus officinalis* in CCl₄-induced Liver Cirrhosis. **Phytotherapy Research**. v. 24, n. 4, p. 595–601, 2009.

HAMRE, K., KOLÅS, K., SANDNES, K. Protection of fish feed, made directly from marine raw materials, with natural antioxidants. **Food Chemistry**. v. 119, p. 270–278, 2010.

HAWLADER, M. N. A.; PERERA, C. O.; TIAN, M. Comparison of the Retention of 6-Gingerol in Drying of Ginger Under Modified Atmosphere Heat Pump Drying and other Drying Methods. **Drying Technology**. v. 24, n. 1, p. 51–56, 2006.

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

HERNÁNDEZ, O. D. L.; CERNADA, A. M.; FERNÁNDEZ, R. C.; AMARO, L. T.; Sanabria, M. L. G. Influencia del uso de aditivos sobre el rendimiento Del proceso de secado por aspersión de extracto acuoso de *Calendula officinalis* L. **Revista Cubana de Plantas Medicinails**. v. 11, n. 1, p. 1–8. 2006.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E.; PONCE-ALQUICIRA, E.; JARAMILLO-FLORES, M. E.; LEGARRETA, I. G. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. **Meat Science**. v. 81, p. 410–417, 2009.

HUYNH, T. V.; CAFFIN, N.; DYKES, G. A.; BHANDARI, B. Optimization of the Microencapsulation of Lemon Myrtle Oil using Response Surface Methodology. **Drying Technology**. v. 26, n. 3, p. 357–368, 2008.

IBARRA, A., CASES, J., BILY, A., HE, K., BAI, N., ROLLER, M., COUSSAERT, A., RIPOLL, C. Importance of Extract Standardization and *In Vitro/Ex Vivo* Assay Selection for the Evaluation of Antioxidant Activity of Botanicals: A Case Study on Three *Rosmarinus officinalis* L. Extracts. **Journal of Medicinal Food**. v. 13, n. 5, p. 1–9, 2010.

KARIM, F.M.; QURAAN, S. A. Herbal uses. In: **Medicinal Plants of Jordan**. Irbid, Jordan: Center for Jordanian Studies, Yarmouk University, p. 43–67, 1986.

LEE, C. J., CHEN, L. G., CHANG, T. L., KE, W. M., LO, Y. F., WANG, C. C. The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. **Food Chemistry**. v. 124, p. 833–841, 2011.

LEUENBERGER, H.; LANZ, M. Pharmaceutical Powder technology – from Art to Science: The Challenge of the FDA's Process Analytical Technology Initiative. **Advanced Powder Technology**. v. 16, n. 1, p. 3–25, 2005.

LIST, P. H.; SCHMIDT, T. **Phytopharmaceutical Technology**. CRC Press, Boca Raton, USA, 1989.

LIU, Y.; WANG M, W. Botanical drugs: Challenges and opportunities Contribution to Linnaeus Memorial Symposium 2007. **Life Sciences**. v. 82, p. 445–449, 2008.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. Nova Odessa-SP: Plantarum, 2002.

MARIUTTI, L. R. B.; BARRETO, G. P. M.; BRAGAGNOLO, N.; MERCADANTE, A. Z., Free Radical Scavenging Activity of Ethanolic Extracts from Herbs and Spices Commercialized in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 51, n. 6, p. 1225–1232, 2008.

MARQUELE, F. D.; STRACIERI, K. M.; FONSECA, M. J. V; FREITAS, L. A. P. Spray-dried Propolis Extract. I: Physico-chemical and Antioxidant Properties. **Die Pharmazie**. v. 61, n. 4, p. 325–330, 2006.

MARRETO, R. N.; FREIRE, J. T.; FREITAS, L. A. P. Drying of Pharmaceuticals: The Applicability of Spouted Beds. **Drying Technology**. v. 24, n. 3, p. 327–338, 2006.

MASTERS, K. **Spray drying handbook**. London, Godwin, 1985. 696 p.

MATOS, J.F.A. **Plantas Medicinais**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2002.

MOLE, S. & WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I. Techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**. v.72, p.137–147, 1987a.

MOLE, S. & WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II. Techniques for biochemically defining tannins. **Oecologia**. v.72, p.148–156, 1987b.

MURTHY, Z. V. P.; JOSHI, D. Fluidized Bed Drying of Aonla (*Emblica officinalis*). **Drying Technology**. v. 25, n. 5, p. 883–889, 2007.

MUZZIO, F.J.; SHINBOT, T.; GLASSER, B.J. Powder Technology in the Pharmaceutical Industry: The Need to Catch Up Fast. **Powder Technology**. v. 124, n. 1, p. 1–7, 2002.

NIETO, G.; ESTRADA, M.; JORDÁN, M. J.; GARRIDO, M. D.; BAÑÓN, S. Effects in ewe diet of rosemary by-product on lipid oxidation and the eating quality of cooked lamb under retail display conditions. **Food Chemistry**. doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.102, 2010.

OLIVEIRA, O. W. “Parâmetros de produção e caracterização de produto seco de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek – celastraceae – em torre de secagem por aspersão.” 2008. 94f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo; Editora Livraria Atheneu, 1998.

OLIVEIRA, W. P., BOTT, R. B., SOUZA, C. R. F. Manufacture of standardized dried extracts from medicinal brazilian plants. **Drying Technology**. v. 24, n. 4, p. 523–533, 2006.

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

OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**. v. 65, p. 3249–3254, 2004.

OSORIO, C.; ACEVEDO, B.; HILLEBRAND, S.; CARRIAZO, J.; WINTERHALTER, P.; MORALES, A. L. Microencapsulation by Spray-Drying of Anthocyanin Pigments from Corozo (*Bactris guineensis*) Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, n. 11, p. 6977–6985, 2010.

PAGLIARUSSI, R. S.; BASTOS, J. K.; FREITAS, L. A. P. Fluid Bed Drying of Guarana (*Paullinia cupana* HBK) Extract: Effect of Process Factors on Caffeine Content. **AAPS PharmSciTech**. v. 7, n. 2, Article 54, 2006.

PARADKAR, A.; AMBIKE, A. A.; JADHAV, B. K.; MAHADIK, K. R. Characterization of curcumin–PVP solid dispersion obtained by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 271, p. 281–286, 2004.

PARK, S. E.; KIM, S.; SAPKOTA, K.; KIM, S. J. Neuroprotective Effect of *Rosmarinus officinalis* Extract on Human Dopaminergic Cell line, SH-SY5Y. **Cellular and Molecular Neurobiology**. DOI 10.1007/s10571-010-9502-3, 2010.

PARNHAM, M. J.; KESSELRING, K. Rosmarinic acid. **Drugs Future**. v. 10, p. 756–757, 1985.

PAULA, I. C.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. compositae (marcela). **Caderno de Farmácia**. v. 13, n. 2, p. 143–145, 1997.

RAMOS, M. F. S. “Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray drying: estudo da estabilidade e avaliação farmacológica.” 2006. 132f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

RATTI, C.; ARAYA-FARIAS, M.; MENDEZ-LAGUNAS, L.; MAKHLOUF, J. Drying of Garlic (*Allium sativum*) and Its Effect on Allicin Retention. **Drying Technology**. v. 25, n. 2, p. 349–356, 2007.

Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, 1994.

RODRÍGUEZ CHANFRAU, J. E.; LÓPEZ, O. D.; NÚÑEZ, Y.; RODRÍGUEZ, C.; CARRILLO, C.; GIL APAN, J. M.; ECHEVARRIA, I. Obtención de una Materia Prima de Calidad Farmacêutica a partir de Extractos de *Justicia pectoralis* Jacq., mediante Secado por Aspersión. Desarrollo Tecnológico a partir de Extracto Hidroalcoholico at 30%. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 27, n. 3, p. 333–338, 2008.

ROLIM, A.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; VELASCO, M.V.R. Validation Assay for Total Flavonoids, as Rutin Equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olachoides* Benthham (Olacaceae) commercial extracts. **Journal of AOC International**. v. 88, n. 4, p. 1015–1019, 2005.

ROMANO, C. S., ABADI, K.; REPETTO, V.; VOJNOV, A. A.; MORENO, S. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. **Food Chemistry**. v. 115, p. 456–461, 2009.

RUNHA, F. P.; CORDEIRO, D.S.; PEREIRA, C. A. M., VILEGAS, J.; OLIVEIRA, W. P. Production of dry extracts of medicinal Brazilian plants by spouted bed process: development of the process and evaluation of thermal degradation during the drying operation. **Trans Journal of Chemical Engineer**. v. 79, p. 1–9, 2001.

SENNA, E. L.; PETROVICK, P. R.; ORTEGA, G. G.; BASSANI, V. L. Preparation and Characterization of Spray-dried Powders from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC Extracts. **Phytotherapy Research**. v. 11, p. 123–127, 1997.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H., Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 7749–7759, 2005.

SHARAPIN, N.; ROCHA, L. M.; CARVALHO, E. S.; LÚCIO, E. M. R. A.; SANTOS, E. V. M.; ALMEIDA, J. M. L. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**, 1 ed., Santa Fé de Bogotá, D.C., Convenio Andrés Bello (CAB) y Programa Iberoamericano de Ciência y Tecnologia para el Desarrollo, 2000, Extracción de materias primas vegetales, 247p.

SIANI, A. C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica**. 1 ed. Rio de Janeiro: Scriptorio, 2003. 97p.

SILVA, M. S. A.; SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; CARVALHO, A. A. T. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 2, p. 236–240, 2008.

SILVA JÚNIOR., J. O. C.; VIEIRA, J. L. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L. Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nedulização de *Symphyton officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16 (Supl.), p. 671–677, 2006.

SILVA JÚNIOR, J. O. C.; PEREIRA, N. L. Avaliação da permeação *in vitro* de gel fitoterápico contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytum officinale* L. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 90, n. 1, p. 3–9, 2009.

SOARES, L. A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; SCHMIDT, P. C. Dry Granulation and Compression of Spray-Dried Plant Extracts. **AAPS PharmSciTech**. v. 6, n. 3, Article 45, 2005.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L., Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, 5 ed., Florianópolis, Porto Alegre. Editora da UFSC e da UFRS, 2005. cap. 13, p. 289–326.

SOUZA, C. R. F. Thesis Summary: Standardized Dried Extracts of Brazilian Medicinal Plants: Assessment of Technical and Economic Feasibility of Spouted Bed Drying. **Drying Technology**. v. 26, n. 3, p. 386–387, 2008.

SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Spouted Bed Drying of *Bauhinia forficata* LINK Extract: The Effects of Feed Atomizer Position and Operating Conditions on Equipment

Performance and Product Properties. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 22, n. 2, p. 239–247, 2005.

SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Powder Properties and System Behavior during Spray Drying of *Bauhinia forficata* Link Extract. **Drying Technology**. v. 24, p. 735–749, 2006.

SOUZA, J. P. B.; TACON, L. A.; CORREIA, C. C.; BASTOS, J. K.; FREITAS, L. A. P. Spray-dried Propolis Extract. II: Prenylated Components of Green Propolis. **Die Pharmazie**. v. 62, n. 7, p. 488–492, 2007.

SOUZA, C. R. F.; SCHIAVETTO, I. A.; THOMAZINI, F. C. F.; OLIVEIRA, W. P. Processing of *Rosmarinus officinalis* LINNE extract on spray and spouted bed dryers. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 25, n. 1, p. 59–69, 2008.

SOUZA, T. P.; SPANIOL, B.; PETROVICK, P. R. Avaliação de Comprimidos Revestidos por Película contendo Alta Concentração de Produto Seco por Aspersão de *Phyllanthus niruri*. **Acta Farmacêutica Bonaerense**. v. 24, n. 1, p. 61–67, 2005.

TAKAKI, I.; BERSANI-AMADO, L. E.; VENDRUSCOLO, A.; SARTORETTO, S. M.; DINIZ, S. P.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R. K. N. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil in Experimental Animal Models. **Journal of Medicinal Food**. v. 11, n. 4, p. 741–746, 2008.

TEIXEIRA, C. C. C.; TEIXEIRA, G. A.; FREITAS, L. A. P. Spray Drying of Extracts from Red Yeast Fermentation Broth. **Drying Technology**. aceito para publicação, 2010.

TISSERAND, R.; BALACS, T. **Essential Oil Safety**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.

TSAI, P.J.; TSAI, T. H.; HO, S. C. *In vitro* inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. **Food Chemistry**. v. 105, p. 311–316, 2007.

USDA, ARS, **National Genetic Resources Program. Phytochemical and Ethnobotanical Databases**. [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, 25 June 2003. Available from (<http://www.ars-grin.gov/duke/>)

USP XXX. **United States Pharmacopeia**, 30 ed., United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, 2007.

VAIDYA, S.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. S. Microencapsulation of Cinnamon Oleoresin by Spray Drying using Different Wall Materials. **Drying Technology**. v. 24, n. 8, p. 983–992, 2006.

VALDAGA, A. T.; BATTESTIN, V.; FINZER, J. R. D. Secagem de extratos de Erva-mate em secador por atomização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, n. 2, p. 184–189, 2003.

VARGAS, A. J.; GEREMIAS, D. S.; PROVENSI, G.; FORNARI, P. E.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**. v. 78, p. 112–119, 2007.

VASCONCELOS, E. A. F.; MEDEIROS M. G. F.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil® 200 nas características dos extratos secos por aspersão de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15 (Supl.), p. 243–249, 2005.

YESIL-CELIK, O., HAMES KOCABAS, E. E., BEDIR, E., VARDAR SUKAN, F., OZEK, T., BASER, K. H. C.. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**. v. 100, p. 553–559, 2007a.

YESIL-CELIK, O., GIRGIN, G., ORHAN, H., WICHES, H. J., BEDIR, E., VARDAR-SUKAN, F. Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times. **European Food Research and Technology**. v. 224, p. 443–451, 2007b.

YOO, K. M.; LEE, C. H.; LEE, H.; MOON, B.; LEE, C. Y. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. **Food Chemistry**. v. 106, p. 929–936, 2008.

WANG, W.; WU, N.; ZU, Y. G.; FU, Y. J. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**. v. 108, p. 1019–1022, 2008.

WANCZINSKI, B. J.; FELIPE, D. F.; CARDOSO, M. L. C.; CAVALCANTI, O. A. Desenvolvimento de comprimidos de AAS® 500 mg: influência do Amido 1500® na compressão direta. **Acta Scientiarum**. v. 24, n. 3, p. 649–655, 2002.

WENDEL, S.; CELIK, M. An overview of spray-drying applications. **Pharmaceutical Technology**. v. 21, p. 125–156, 1987.

WOJDYŁO, A., OSZMIAN'SKI, J., CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**. v. 105, p. 940–949, 2007.

ZETOLA, M.; DE LIMA, T. C. M.; SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; LIMBERGER, R. P.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* Verbenaceae (Brazilian false melissa). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 82, n. 2-3, p. 207–215, 2002.

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