

Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

SUZANA FERREIRA ALVES

**Estudo da composição química, de atividades
biológicas e microencapsulação do óleo essencial dos
frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel – Fabaceae
("sucupira")**

Goiânia

2012

SUZANA FERREIRA ALVES

Estudo da composição química, de atividades biológicas e
microencapsulação do óleo essencial dos frutos de *Pterodon*
emarginatus Vogel – Fabaceae (“sucupira”)

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
da Faculdade de Farmácia da Universidade
Federal de Goiás, como requisito necessário
à obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador (a): Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara

Co – orientador: Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição

Goiânia

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

Alves, Suzana Ferreira.
A474e Estudo da composição química, de atividades biológicas e microencapsulação do óleo essencial dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel – Fabaceae (“sucupira”) [manuscrito] / Suzana Ferreira Alves. - 2012.
196 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Teresa Freitas Bara; Co-orientador: Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2012.

Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.
Apêndices.

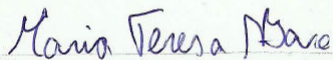
1. Óleos essenciais. 2. Sucupira. 3. Plantas medicinais.

CDU: 615.89

Folha de Aprovação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 28 de fevereiro de 2012, pela mestranda Suzana Ferreira Alves.

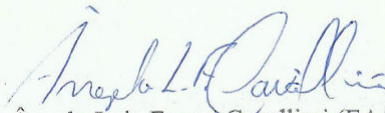
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara (FF/UFG)
Presidente



Dr. Roberto Fontes Vieira (EMBRAPA)



Prof. Dr. Ângelo Luiz Fazani Cavallieri (EA/UFG)

Dedico este trabalho, a minha mãe Marilene F. dos Santos e ao meu marido Welber Fabiano Batista, pelo apoio e compreensão e por permanecerem ao meu lado durante toda caminhada me preenchendo com muito carinho e atenção.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido saúde e discernimento me mostrando com clareza o caminho que ele me permitiu trilhar.

À Professora Dra. Maria Teresa Freitas Bara, pela orientação, paciência, inigualável amizade e pela confiança em mim depositada para realização deste trabalho.

Aos Professores Dr. Edemilson Cardoso da Conceição e Dr. José Realino de Paula, pela amizade e contribuições imprescindíveis em todo desenvolvimento do estudo aqui apresentado.

À Professora Dra. Joelma Abadia Marciano de Paula, pela paciência, amizade, dedicação e ética em todas as parcerias realizadas durante as análises.

Ao Professor Dr. Pedro Henrique Ferri, do Instituto de Química – UFG, pela realização das análises espectrométricas e pela enorme contribuição na análise estatística da variabilidade química dos óleos essenciais de *Pterodon emarginatus* Vogel.

Ao Professor Dr. Élon Alves Costa e aos seus orientandos em especial à Iziara Ferreira Florentino, do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Universidade Federal de Goiás (UFG), pela parceria, acolhimento e contribuição aos ensaios de atividade farmacológica.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) do Instituto de Física da UFG, representado pela Dra. Tatiane Oliveira dos Santos e pelo Prof. Dr. Jesiel Freitas Carvalho, que tornou possível a visualização das microcápsulas da fração volátil.

Ao Dr. Roberto Vieira Fontes, pela disponibilidade e atenção, permitindo – nos utilizar o equipamento de arraste a vapor da EMBRAPA – *Recursos Genéticos e Biotecnologia* – Brasília (DF).

Ao Prof. Dr. Osvaldo de Freitas pelas imprescindíveis contribuições, por toda atenção e esmero.

Ao Prof. Dr. Ângelo Luiz Fazani Cavallieri, pela contribuição estatística na análise de dados das microcápsulas.

Aos estagiários, alunos de iniciação científica, mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da UFG, em especial à Beatriz Abdallah Chaibub, ao Leonardo Luiz Borges e à Fernanda Pimenta pela agradável presença, companheirismo, respeito e ética.

À D. Clélia Fróes Camarano, por todo carinho a mim oferecido, durante todos os anos de nossa convivência.

Ao meu amado esposo, Welber Fabiano Batista, pelo apoio, compreensão nos momentos difíceis e por seu amor.

À todos, “Muitíssimo Obrigada!”.

*“Porque eu sou do tamanho daquilo que eu sinto,
que vejo e que faço, não do tamanho
que as pessoas me enxergam.”*

Carlos Drummond de Andrade.

*“Comece devagar, porque a direção
é mais importante que a velocidade”*

Clarice Lispector.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos realizar o estudo da variabilidade química, avaliar atividades biológicas e microencapsular o óleo essencial dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae). O capítulo 1 traz o estudo da variabilidade química do óleo essencial dos frutos de sucupira extraído de 11 indivíduos do cerrado brasileiro, coletados de 5 diferentes localidades, e que foram identificados quanto sua composição química através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), para análise dos dados empregou-se a ferramenta estatística multivariada que indicou os compostos β -cariofileno e α -copaeno como os principais discriminantes das localidades estudadas, sendo ambos de maior significância. O capítulo 2 descreve a atividade antimicrobiana e a composição química do óleo total dos frutos de sucupira, sendo quatro amostras analisadas, três da cidade de Jussara-GO e uma da região de Jaciara-MT, os óleos testados apresentaram boa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (Gram (+)) e moderada atividade contra *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. O capítulo 3 descreve o processo de obtenção de microcápsulas contendo o óleo essencial (OE) de sucupira empregando a técnica de *spray drying* e o desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação do composto β – cariofileno. Foram utilizados goma arábica e maltodextrina como material de parede e preparadas 5 diferentes dispersões (Emulsão 1-E1, Emulsão 2-E2, Emulsão 3-E3, Emulsão 4-E4 e Emulsão 5-E5), que em seguida foram atomizadas em *spray dryer*. Os resultados mostram que a condição de secagem mais adequada foi bico aspersor de 1,2 mm de diâmetro, fluxo de alimentação da emulsão no sistema de 4 mL/min, temperatura de entrada de 160°C, fluxo de ar de 40 L/min e pressão de 60 psi. Dentre as emulsões, E2 foi padronizada com a proporção adequada de óleo essencial e dos materiais de parede, por apresentar microcápsulas (MOE) de parede espessa, com pronunciada retenção do óleo essencial, morfologia esférica e baixa higroscopicidade. O método desenvolvido e validado mostrou ser linear, preciso, exato e robusto. O capítulo 4 traz a avaliação de atividades biológicas antimicrobiana do óleo essencial de PES-01 pela técnica de microdiluição em caldo e atividades antinociceptiva e anti-inflamatória realizadas para as microcápsulas contendo o óleo essencial. Os modelos de dor induzida por formalina e placa quente foram empregados para avaliar a atividade antinociceptiva e o modelo de pleurisia induzida por carragenina e azul de Evans para avaliação da atividade anti-inflamatória. O OE apresentou fraca atividade antimicrobiana (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para bactérias Gram (+) e fungos do gênero *Cryptococcus*, foi inativo para *S. aureus* ATCC 25923, contra bactérias Gram (-) e contra fungos do gênero *Candida*. OE reduziu em 61,54% (300 mg kg^{-1}) a reatividade à dor. As MOE reduziram 40,87% (1,0 g kg^{-1}) e 41,57% (2,0 g kg^{-1}) na 1ª fase do teste de dor induzida por formalina, sugerindo atividade antinociceptiva, na 2ª fase do teste, o óleo essencial inibiu 52,35% da dor relacionada aos mediadores da inflamação e as microcápsulas reduziram de 25,86% a 55,60% da dor. MOE na dose de 1,0 g kg^{-1} demonstraram atividade antinociceptiva no modelo de placa quente, sugerindo atividade analgésica central. Na pleurisia induzida por carragenina as MOE reduziram 25,44% da migração total de leucócitos e diminuíram significativamente a concentração de azul Evans em 24,18%, o que demonstra importante atividade anti-inflamatória.

Palavras – chave: *Pterodon emarginatus*. Variabilidade química. Microencapsulação. *Spray drying*. Validação analítica. β – cariofileno.

ABSTRACT

The present work aimed to do the study of chemical variability, evaluating biological activities and microencapsulate the essential oil of the fruits of *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae). Chapter 1 presents the study of the chemical variability of essential oil from fruits of sucupira of 11 individual of the Brazilian savanna, collected from five different populations, and were identified as its chemical composition by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), used for data analysis to multivariate statistical tool that indicated compounds β -caryophyllene and α -copaene as the main discriminant of the samples studied, both of which are of greater significance. Chapter 2 describes the antimicrobial activity and chemical composition of total oil of the fruits of sucupira, four samples being analyzed, three of the city of Jussara – GO and one of region of Jaciara – MT. The oils tested showed good antimicrobial activity against bacteria Gram – positive (Gram (+)) and moderate activity against *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Chapter 3 describes the process of obtaining microcapsules containing essential oil (OE) of sucupira employing the technique of spray drying and the development and validation methodology for quantification of the compound β -caryophyllene. Were used gum Arabic and maltodextrin as wall material and prepared five different dispersions (Emulsion 1-E1, Emulsion 2-E2, Emulsion 3-E3, Emulsion 4-E4 and Emulsion 5-E5) which then were atomized in spray dryer. The results show that the drying condition most appropriate was sprinkler beak of 1,2 mm of diameter, power flow the emulsion in system of 4 mL/min, inlet temperature of 160°C, air flow of 40 L/min e and pressure of 60 psi. Among the emulsions, E2 was standardized with adequate proportion of essential oil and wall materials, by presenting microcapsules (MOE) for having thick-walled, with a pronounced retention of essential oil, spherical morphology and low hygroscopicity. The method developed and validated proved to be linear, precise, accurate and robust. Chapter 4 presents the evaluation of biological activities of antimicrobial essential oil of PES-01 employing the technique of broth microdilution and anti-nociceptive and anti-inflammatory activities performed to the microcapsules with the essential oil. The models of pain induced by formalin and hot plate were used to assess the antinociceptive activity and the model of carrageenan-induced pleurisy and Evans blue for evaluation of anti-inflammatory activity. The OE has weak antimicrobial activity (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) against bacteria Gram (+) and against the fungi of the genus *Cryptococcus* was inactive against *S. aureus* ATCC 25923, against bacteria Gram (-) and against the fungi of the genus *Candida*. OE reduced by 61,54% (300 mg kg^{-1}) of the reactivity to pain. The MOE reduced 40,87% (1,0 g kg^{-1}) and 41,57% (2,0 g kg^{-1}) in first phase of the test formalin-induced pain, suggesting, anti-nociceptive activity. The 2nd phase of the test, the essential oil inhibited 52,35% of the pain related to inflammatory mediators and the microcapsules decreased from 25,86% - 55,60% of the pain. MOE at a dose of 1,0 g kg^{-1} showed anti-nociceptive activity in hot plate model, suggestion central analgesic activity. In the carrageenan-induced pleurisy the MOE reduced 25,44% of the complete migration of leukocytes and significantly decreased the concentration of Evans blue in 24,18%, which demonstrates important anti-inflammatory activity.

Key words: *Pterodon emarginatus*. Chemical variability. Microencapsulation. Spray drying. Analytical validation. β – caryophyllene.

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

- Figura 1** *Pterodon emarginatus* Vogel: A, aspecto geral da planta, na época de floração. B, detalhe das sementes, após queda espontânea..... 23

Capítulo 1

- Figura 1** Aparato tipo Clevenger empregado na extração de óleos essenciais. A, processo de extração (hidrodestilação). B, tubo graduado do aparato com o volume de óleo extraído..... 34
- Figura 2** Rendimento percentual do óleo essencial extraído e do volume de óleo obtido em relação à massa de amostra..... 39
- Figura 3** Primeiro plano fatorial da PCA apresentando os dois agrupamentos obtidos pela HCA sequencial a partir dos escores da PCA dos constituintes do óleo essencial dos frutos de sucupira..... 43
- Figura 4** Dendrograma de Similaridade com base na distância Euclidiana a partir dos escores da PCA com os dois agrupamentos dos constituintes do óleo essencial dos frutos de sucupira..... 44

Capítulo 3

- Figura 1** Duas formas principais de encapsulamento: cápsula mononuclear (A) e núcleos dispersos na matriz polimérica (B). 92
- Figura 2** Equipamento de arraste a vapor (Linax) – EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília - abril/2011)..... 99
- Figura 3** Constituintes majoritários do óleo essencial dos frutos de *P. emarginatus* Vogel..... 112
- Figura 4** A) perfil cromatográfico do óleo essencial; B) perfil comparativo da banda indicativa de β – cariofileno com o padrão sigma de β – cariofileno $R_F = 0,87$, sob as mesmas condições..... 114
- Figura 5** Perfil cromatográfico do óleo essencial dos de 10 exemplares de *P. emarginatus*; presença do marcador β – cariofileno em todas as amostras $R_F = 0,87$ 114
- Figura 6** Espectro de absorção máxima do composto β – cariofileno..... 116
- Figura 7** Perfil cromatográfico 2D a 210 nm do padrão e da amostra..... 117
- Figura 8** Perfil cromatográfico 3D gerado pelo *software Empower 2.0*.... 118
- Figura 9** Curva de calibração do padrão sigma de β – cariofileno em $\mu\text{g/mL}$ 120

Figura 10	Curva analítica do composto β – cariofileno no óleo essencial de sucupira em $\mu\text{g/mL}$	124
Figura 11	Perfil cromatográfico 3D gerado pelo <i>software Empower 2.0</i>	125
Figura 12	(A e B) Fotomicrografias obtidas por MEV das microcápsulas do óleo essencial de sucupira obtidas pelo processo de secagem 1.....	127
Figura 13	Histograma das distribuições de frequências relativas obtidas a partir de 595 partículas observadas no conjunto de imagens composto pelas microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira do processo de secagem 1.....	128
Figura 14	(A e B) Fotomicrografias obtidas por MEV das microcápsulas do óleo essencial de sucupira obtidas pelo processo de secagem 2.....	129
Figura 15	Histograma das distribuições de frequências relativas obtidas a partir de 494 partículas observadas no conjunto de imagens composto pelas microcápsulas do óleo essencial de sucupira do processo de secagem 2.....	130
Figura 16	(A e B) Fotomicrografias obtidas por MEV das microcápsulas do óleo essencial de sucupira obtidas pelo processo de secagem 3.....	131
Figura 17	Histograma das distribuições de frequências relativas obtidas a partir de 406 partículas observadas no conjunto de imagens composto pelas microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira do processo de secagem 3.....	132
Figura 18	(A e B) Fotomicrografias obtidas por MEV das microcápsulas do óleo essencial de sucupira obtidas pelo processo de secagem 4.....	133
Figura 19	Histograma das distribuições de frequências relativas obtidas a partir de 418 partículas observadas no conjunto de imagens composto pelas microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira do processo de secagem 4.....	134
Figura 20	(A e B) Fotomicrografias obtidas por MEV das microcápsulas do óleo essencial de sucupira obtidas pelo processo de secagem 5.....	135
Figura 21	Histograma das distribuições de frequências relativas obtidas a partir de 1057 partículas observadas no conjunto de imagens composto pelas microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira do processo de secagem 5.....	136
Figura 22	(A e B) Fotomicrografias obtidas por MEV das microcápsulas do óleo essencial de sucupira obtidas pelo processo de secagem 6.....	137

Figura 23	Histograma das distribuições de frequências relativas obtidas a partir de 661 partículas observadas no conjunto de imagens composto pelas microcápsulas do óleo essencial de sucupira do processo de secagem 6.....	138
Figura 24	Fotomicrografia obtida por MEV das microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira de E1 (1OE : 2G : 3,6M) de superfície irregular.....	140
Figura 25	Fotomicrografia obtida por MEV das microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira de E2 (1OE : 3G : 3,6M) de superfície lisa, vítrea e homogênea.....	141
Figura 26	(A, B e C) Fotomicrografias obtidas por MEV das microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira de E3 (1OE : 2G).....	142
Figura 27	Fotomicrografia obtida por MEV das microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira de E5 (1OE : 3,6M).....	143
Figura 28	Teor de óleo essencial total recuperado a partir dos diferentes lotes de microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira.	147
Figura 29	Fotomicrografia das microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira de E2 evidenciando a morfologia esférica, a superfície lisa e o núcleo contendo microcápsulas menores.....	152
Figura 30	Análise de difração de raios - X das microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira de E2 (1OE : 3G : 3,6M).....	153
Figura 31	Decréscimo do teor de β – cariofileno nas microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira de E2 no período de 45 dias.....	154
Capítulo 4		
Figura 1	Esquema aplicativo da técnica de microdiluição em caldo para teste de atividade antimicrobiana do óleo essencial contra bactérias. As cores diferentes nas duplas de linhas de A a F indicam inóculos diferentes.....	173
Figura 2	Esquema aplicativo da técnica de microdiluição em caldo para teste de atividade antimicrobiana do óleo essencial de sucupira contra fungos. As cores diferentes nas duplas de linhas de A a F indicam inóculos diferentes.....	175
Figura 3	Efeito do óleo essencial (300 mg Kg^{-1}) e das microcápsulas da óleo essencial de sucupira ($0,5$; $1,0$ e $2,0 \text{ g kg}^{-1}$) no modelo de dor induzida por formalina, primeira fase ($0 - 5 \text{ min}$) e segunda fase ($15 - 30 \text{ min}$). As barras verticais representam as médias $\pm$ erro padrão das médias, do tempo de reatividade dos animais expresso em segundos. ** $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ indicam o nível de significância das diferenças entre os grupos tratados e o controle, segundo análise de variância seguido do pós teste Tukey. A Indometacina e morfina foram utilizadas como controles positivos.....	182

- Figura 4** Latência ao estímulo térmico nociceptivo medido no teste da placa quente em camundongos antes e após os tratamentos com: veículo, morfina ou microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira. Nas ordenadas estão representados os tempos de latência ao estímulo térmico expressos em segundos. Os símbolos indicam as médias $\pm$ erro padrão das médias dos tempos para reação. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, indicam o nível de significância das diferenças entre os grupos tratados e o controle. Segundo ANOVA seguida do teste de Student-Newmankeuls..... 184
- Figura 5** Efeito anti - inflamatório das MOE (1,0 g/kg) avaliado pelo modelo da pleurisia. As barras verticais representam as médias $\pm$ erro padrão das médias, do número de leucócitos totais migrados/mL. ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$ indicam o nível de significância das diferenças entre os grupos tratados e o controle, segundo análise de variância seguido do pós teste Tukey..... 186
- Figura 6** Efeito anti - inflamatório das MOE (1,0 g/kg) avaliadas pelo modelo da pleurisia. As barras verticais representam as médias $\pm$ erro padrão das médias, do extravasamento plasmático de azul de Evans para a cavidade pleural. ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$ indicam o nível de significância das diferenças entre os grupos tratados e o controle, segundo análise de variância seguido do pós teste Tukey..... 187

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1	Localização geográfica dos exemplares de <i>P. emarginatus</i> Vogel estudados neste trabalho.....	33
Tabela 2	Influência do tempo de extração na composição química do óleo essencial de <i>P. emarginatus</i> Vogel (PES-01) obtida por CG/EM.....	38
Tabela 3	Composição química e rendimento percentual dos óleos essenciais de onze exemplares de <i>P. emarginatus</i> Vogel do Cerrado Brasileiro.....	41
Tabela 4	Análise entre as Classes I e II, indicando as variáveis de maior poder discriminatório interclasses.....	44
Tabela 5	Sumário da análise de discriminante canônico.....	45

Capítulo 2

Tabela 1	Resultado da Concentração Inibitória Mínima do óleo total testado (frações fixa e voláteis juntas).....	59
Tabela 2	Composição química de metil ésteres da fração fixa das sementes de <i>P. emarginatus</i> Vogel.....	61
Tabela 3	Composição química da fração volátil (óleo essencial) obtida das sementes de <i>P. emarginatus</i> Vogel por localidade.....	62
Tabela 4	Resultados da análise centesimal das sementes de <i>P. emarginatus</i> Vogel.....	63

Capítulo 3

Tabela 1	Etapas de desenvolvimento da metodologia analítica CLAE para quantificação do marcador β – cariofileno.....	102
Tabela 2	Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações.....	103
Tabela 3	Avaliação dos parâmetros de secagem em <i>spray dryer</i> para obtenção de microcápsulas do óleo essencial de sucupira.....	107
Tabela 4	Composição química do óleo essencial dos frutos de <i>P. emarginatus</i> obtida por CG/EM.....	111
Tabela 5	Condições de separação para o parâmetro de conformidade do sistema.....	116

Tabela 6	Valores equivalentes ao parâmetro de precisão ao nível de repetibilidade.....	121
Tabela 7	Valores equivalentes ao parâmetro de precisão ao nível de precisão intermediária.....	121
Tabela 8	Valores referentes ao parâmetro de exatidão pelo método de recuperação do padrão de β – cariofileno.....	122
Tabela 9	Avaliação do parâmetro robustez considerando variação de fluxo da fase móvel, comprimento de onda do método e composição da fase móvel em relação ao método original desenvolvido.....	123
Tabela 10	Precisão ao nível de repetibilidade para as microcápsulas do óleo essencial de sucupira.....	126
Tabela 11	Viscosidade e tamanho das microcápsulas obtidas por cada emulsão contendo a óleo essencial dos frutos de sucupira.....	139
Tabela 12	Atividade de água (aw) das microcápsulas do óleo essencial de sucupira produzidas pela secagem por atomização.....	145
Tabela 13	Doseamento do marcador β – cariofileno no óleo essencial extraído das microcápsulas, empregando a metodologia desenvolvida por CLAE.....	149
Tabela 14	Composição química do óleo essencial de sucupira extraído das microcápsulas dos cinco lotes e identificadas por CG/EM..	150

Capítulo 4

Tabela 1	Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>P. emarginatus</i> Vogel, determinação da CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$).....	179
Tabela 2	Atividade antinociceptiva do óleo essencial (OE) e das microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira no teste de dor induzida por formalina durante a 1ª Fase.....	182
Tabela 3	Atividade antinociceptiva do óleo essencial de sucupira e das microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira no modelo de dor induzida por formalina na 2ª Fase.....	183
Tabela 4	Atividade anti – inflamatória das microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira pelo teste de pleurisia induzida por carragenina.....	186
Tabela 5	Atividade anti – inflamatória das microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira pelo teste de pleurisia induzido pelo azul de Evans.....	187

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
aw	Atividade de água
ACN	Acetonitrila
°C	Graus Celsius
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDA	Discriminante Canônico
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DE	Dextrose equivalente
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de raios – X
EPM	Erro Padrão da Média
E1	Emulsão 1/ Microcápsulas 1
E2	Emulsão 2/ Microcápsulas 2
E3	Emulsão 3/ Microcápsulas 3
E4	Emulsão 4/ Microcápsulas 4
E5	Emulsão 5/ Microcápsulas 5
F	Fator de Fisher
FV	Fração volátil
G	Goma arábica
g	Gramas
GL	Graus de Liberdade
h	Horas

HCA	Agrupamento Hierárquico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
H ₂ O	Água
IK	Índice de Kovats
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
IR	Índice de Retenção
JUS	Jussara
λ	<i>Lambda</i> – comprimento de onda
m	Massa
m	Metros
M	Maltodextrina
MH	Müller Hinton
MetOH	Metanol
MEV	Microscopia Eletrônica por Varredura
mL	Mililitros
min	Minutos
mm	Milímetros
μm	Micrômetros
μg	Micrograma
μL	Microlitro
MOE	Microcápsulas contendo óleo essencial
MTOE	Óleo essencial de Mato Grosso
NA	Nova América
nm	Nanômetro
OE	Óleo Essencial
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCA	Análise por Componentes Principais
p/p	Peso por peso
PVC	Policloreto de Polivinila

QM	Quimiótipo
RF	Fator de Retenção
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
TTC	Cloreto de Trifenil Tetrazolium
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFG	Universidade Federal de Goiás
UV	Ultravioleta
v.o.	Via oral
v/p	Volume por peso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	21
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
Capítulo 1	Variabilidade química do óleo essencial de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (Fabaceae) do Cerrado brasileiro	29
1	INTRODUÇÃO.....	30
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1	MATERIAL VEGETAL.....	33
2.2	INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO E OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	34
2.3	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	34
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1	INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO.....	37
3.2	VARIABILIDADE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	40
4	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
Capítulo 2	Atividade antimicrobiana e composição química do óleo extraído dos frutos de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (Fabaceae).....	51
	INTRODUÇÃO.....	54
	EXPERIMENTAL.....	55
	Material Vegetal.....	55
	Reagentes e Produtos Químicos.....	55
	Extração e Análise Química da Fração volátil.....	55
	Extração e Análise Química da Fração fixa.....	56
	Análise centesimal das sementes.....	56
	Microrganismos utilizados e as condições de crescimento.....	57
	Atividade antimicrobiana em ensaio in vitro.....	57

	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	Apêndice.....	68
Capítulo 3	Obtenção de microcápsulas do óleo essencial dos frutos de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (Fabaceae)	86
1	INTRODUÇÃO.....	87
1.1	ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel.....	89
1.2	MICROENCAPSULAÇÃO.....	91
1.2.1	MATERIAIS DE PAREDE: GOMA ARÁBICA E MALTODEXTRINA.....	94
1.3	METODOLOGIA ANALÍTICA E VALIDAÇÃO.....	96
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	98
2.1	MATERIAL VEGETAL.....	98
2.1.1	MATERIAL ENCAPSULANTE.....	98
2.2	OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	98
2.2.1	Hidrodestilação em aparato de Clevenger.....	99
2.2.2	Arraste a vapor.....	99
2.3	ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE.....	99
2.3.1	Determinação da densidade do óleo essencial de sucupira..	99
2.3.2	Determinação do índice de refração do óleo essencial de sucupira.....	100
2.3.3	Determinação do pH do óleo essencial de sucupira.....	100
2.3.4	Verificação do perfil cromatográfico por CCD.....	100
2.4	IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL POR CG/EM.....	100
2.5	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE QUANTIFICAÇÃO DO MARCADOR β - CARIOFILENO POR CLAE.....	101
2.5.1	Conformidade do sistema (“system suitability”).....	102
2.5.2	Validação de metodologia analítica.....	103
2.5.3	Co - validação da metodologia analítica para as microcápsulas.....	105
2.5.4	Curva de calibração com o óleo essencial de <i>P. emarginatus</i>.....	106
2.6	OBTENÇÃO DAS MICROCÁPSULAS.....	106

2.6.1	Determinação da viscosidade das emulsões.....	108
2.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA NAS MICROCÁPSULAS.....	108
2.8	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	108
2.9	DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA.....	109
2.10	MORFOLOGIA DAS MICROCÁPSULAS.....	109
2.10.1	Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV).....	109
2.10.2	Difração de raios – X.....	110
2.11	ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	110
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	111
3.1	RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	111
3.2	IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL POR CG/EM.....	111
3.3	ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL.....	113
3.3.1	Verificação do perfil cromatográfico por CCD.....	113
3.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO MARCADOR β - CARIOFILENO.....	115
3.4.1	Conformidade do sistema.....	116
3.4.2	Seletividade.....	118
3.4.3	Linearidade e Intervalo.....	119
3.4.4	Precisão.....	120
3.4.5	Exatidão.....	121
3.4.6	Robustez.....	122
3.4.7	Limites de detecção e quantificação.....	123
3.4.8	Curva de calibração com óleo essencial de <i>P. emarginatus</i> . ..	124
3.4.9	Co – validação de metodologia analítica para as microcápsulas.....	124
3.5	OBTENÇÃO DAS MICROCÁPSULAS.....	126
3.5.1	Avaliação dos parâmetros de secagem em <i>spray dryer</i> por meio da Microscopia Eletrônica por varredura (MEV).....	126
3.5.2	Avaliação das proporções dos materiais de parede.....	138
3.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA NAS MICROCÁPSULAS.....	145
3.7	RENDIMENTO DE PROCESSO.....	146
3.8	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	146
3.8.1	Determinação do óleo total das microcápsulas.....	146

3.9	ANÁLISE QUANTITATIVA E PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS MICROCÁPSULAS.....	148
3.10	MORFOLOGIA DAS MICROCÁPSULAS.....	151
3.10.1	Difração de raios – X.....	152
3.11	ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	154
4	CONCLUSÕES.....	156
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	158
Capítulo 4	Atividades biológicas, antimicrobiana, antinociceptiva e anti – inflamatória do óleo essencial e das microcápsulas contendo o óleo essencial dos frutos de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	169
1	INTRODUÇÃO.....	170
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	171
2.1	MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.	171
2.2	MICROCÁPSULAS.....	171
2.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	171
2.3.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	171
2.3.2	Microrganismos e Reativação das culturas.....	171
2.3.3	Determinação da CIM para bactérias.....	172
2.3.4	Determinação da CIM para fungos.....	174
2.4	ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA.....	175
2.4.1	Atividade Antinociceptiva.....	175
2.4.2	Atividade Anti – inflamatória.....	177
2.4.3	Análise Estatística.....	177
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	178
3.1	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	178
3.2	ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	181
3.3	ATIVIDADE ANTI – INFLAMATÓRIA.....	185
3.3.1	Pleurisia induzida por carragenina.....	185
4	CONCLUSÕES.....	189
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	190
	CONCLUSÃO GERAL.....	194
	Conclusão Geral.....	195

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

O mercado farmacêutico mundial de fitoterápicos movimenta hoje cerca de 50 bilhões de dólares. Contudo, no Brasil esse mercado começou a se expandir recentemente e movimenta em torno de 500 milhões de dólares por ano. Apesar destas cifras, e considerando que somos detentores de uma das maiores biodiversidades do planeta, pouco ainda é realmente desenvolvido no país nesta área (MARQUES, 2010).

A produção de medicamentos fitoterápicos passa por várias limitações relacionadas a fatores como época de coleta, condições de cultivo, metodologias de extração, secagem, armazenamento, complexidade química e desenvolvimento de formas farmacêuticas adequadas. Esses fatores dificultam a produção de fitoterápicos com a aplicação e desenvolvimento de novas tecnologias. Além disso, há ainda insuficiência de dados na literatura sobre formas farmacêuticas e formulações adequadas de muitas plantas medicinais e produtos fitoterápicos extensamente comercializados (CALIXTO, 2000).

É fato que, para o desenvolvimento de um produto farmacêutico fitoterápico, muitas são as etapas a serem realizadas, e o Brasil vem no decorrer dos anos buscando seu domínio e aprofundamento no desenvolvimento tecnológico nesta área, contudo ainda há um longo caminho a ser percorrido para atingirmos tal objetivo (RAMOS, 2006).

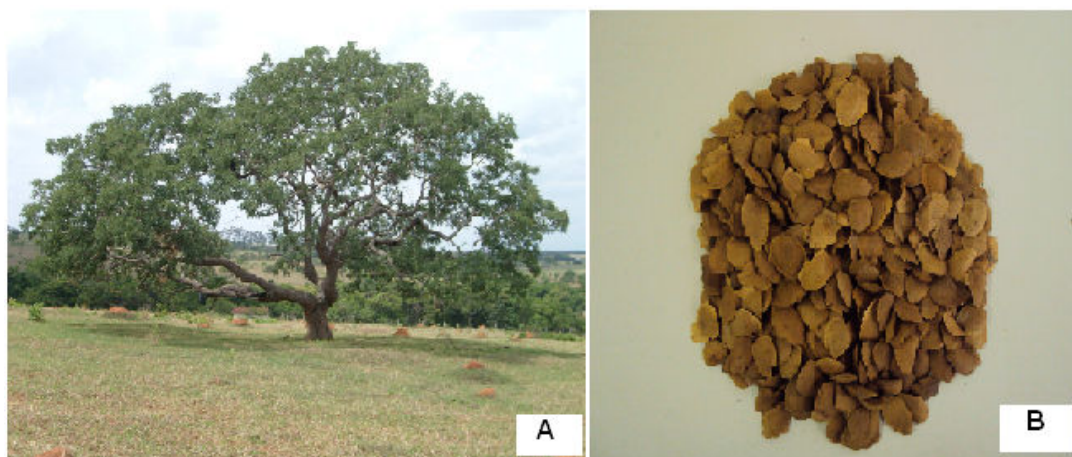
Considerando que o Brasil possui a flora mais rica do mundo em matéria-prima para a produção de fitofármacos (cerca de 1/3 do total) e que apenas cerca de 8% foram estudadas, é de suma importância que se busque nestas plantas uma fonte alternativa de fármacos, visando no futuro à obtenção de novos fármacos mais eficazes e específicos (BRAZ-FILHO, 1994; SIMÕES; MENTZ; BORDIGNOM, 2004).

No contexto da flora brasileira, *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae), conhecida popularmente como “sucupira-branca” ou “faveiro” é uma árvore nativa que mede de 5-10 metros de altura (Figura 1A) (LORENZI e MATOS, 2002), facilmente encontrada na região do Cerrado brasileiro, floresce entre abril e maio, frutifica entre maio e junho e libera seus frutos entre junho e agosto (MASCARO; TEIXEIRA; GILBERT, 2004). É utilizada na medicina popular para o tratamento de reumatismo, dores de garganta, disfunções respiratórias (bronquites e amidalites), além das suas atividades anti-inflamatória e analgésica, principalmente observadas

nos frutos. Levantamentos etnofarmacológicos demonstram que as sementes são comercializadas em mercados populares por suas propriedades terapêuticas (AGRA et al., 2008; ARRIAGA et al., 2000; DUTRA et al., 2009; LEITE DE ALMEIDA e GOTTLIEB, 1975).

O nome grego-latino *P. emarginatus* significa frutos com asas que circulam sua periferia; a taxonomia é adequada, pois de todos os frutos alados, comuns em outras leguminosas, somente a sucupira branca possui esta morfologia quase perfeitamente circular (Figura 1B). Tal formato permite uma propagação estável e capaz de cobrir grandes distâncias em condições de ventos unidirecionais (MASCARO; TEIXEIRA; GILBERT, 2004).

Figura 1 – *Pterodon emarginatus* Vogel: **A**, aspecto geral da planta, arbórea. **B**, frutos após queda espontânea.



Fonte: A) Santos, A.P.; B) Próprio autor.

Estudos têm demonstrado atividades cercaricida, antimicrobiana e anti-inflamatória (MORAES et al., 2009; MORAES et al., 2011), analgésica (SILVA et al., 2004), antinociceptiva (MORAES et al., 2009; SPINDOLA et al., 2010; OLIVEIRA, 2010) e antitumoral (EUZÉBIO et al., 2009; SPINDOLA et al., 2009) do óleo da sucupira e extratos dos seus frutos. Além disso, constatou-se atividade biológica sobre larvas de estágio 3 de *Aedes aegypti* - extrato hexânico de *Pterodon polygalaeflorus* Benth. (PIMENTA et al., 2006) e atividade quimiprolática na esquistossomose a partir de formulação de sabonete contendo óleo essencial de frutos de *Pterodon pubescens* Benth (KATZ et al., 1993).

Estudos fitoquímicos do gênero *Pterodon* têm demonstrado a presença de alcalóides nas cascas das árvores, isoflavonas e alguns triterpenos (MARQUES et al., 1998) na casca, e diterpenos (FASCIO et al., 1976; ARRIAGA et al., 2000;

SPINDOLA et al., 2010) e isoflavonas no óleo das sementes (BRAZ-FILHO e GOTTLIEB, 1971).

Aliado a essa diversidade de compostos bioativos encontrados no gênero *Pterodon*, que têm atraído a atenção da comunidade científica e das indústrias farmacêuticas é possível apostar na produção de fitoterápicos, pois segundo Calixto (2005) a produção de fitoterápicos tornou-se um negócio lucrativo, uma vez que a utilização de plantas medicinais atinge um público cada vez maior.

Baseado no exposto, esse trabalho teve por intuito agregar valor ao óleo essencial (fração volátil) extraído dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel, com a produção de microcápsulas a partir dessa matéria-prima, demonstrando também sua variabilidade química, caracterização microscópica das microcápsulas e seu potencial biológico (atividade antimicrobiana e atividades antinociceptiva e anti-inflamatória).

No capítulo 1 do presente estudo foi abordada a variabilidade química do óleo essencial de sucupira de 11 indivíduos do Cerrado brasileiro através de análise multivariada da composição química desse óleo. O capítulo 2 traz os dados referentes ao artigo de avaliação da composição química e atividade antimicrobiana do óleo total dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel. O capítulo 3 descreve a obtenção de microcápsulas contendo óleo essencial de sucupira por nebulização, o desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação do marcador β – cariofileno por CLAE e a caracterização morfológica das microcápsulas. O capítulo 4 aborda as atividades biológicas do óleo essencial dos frutos de sucupira e das microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira, antimicrobiana, antinociceptiva e anti-inflamatória.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudo da composição química, de atividades biológicas e aplicação de tecnologia fitofarmacêutica a partir do óleo essencial dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ocorrência de variabilidade química no óleo essencial dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel coletados no Cerrado brasileiro.
- Investigar o processo extrativo do óleo essencial dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel em aparato tipo Clevenger.
- Avaliar a atividade antimicrobiana e a composição química do óleo total extraído dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel de diferentes localidades.
- Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação do marcador (E)-cariofileno (β -cariofileno) no óleo essencial e nas microcápsulas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Obter microcápsulas por *spray drying* utilizando polímeros encapsulantes.
- Avaliar eficiência de encapsulação por análise química quantitativa do óleo essencial.
- Avaliar a morfologia das microcápsulas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios-X (DRX).
- Avaliar as atividades biológicas antimicrobiana, antinociceptiva e anti-inflamatória do óleo essencial e das microcápsulas do óleo essencial de sucupira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal Pharmacognosy**, v. 18, p. 472-508, 2008.
- ARRIAGA, A.M.C.; CASTRO, M.A.B.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R. Further diterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 1, p. 187-190, 2000.
- BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O.R. The isoflavones of *Pterodon pubescens*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 2835-2836, 1971.
- BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um Pacatubano. **Química Nova**, v. 17, p. 405-445, 1994.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agent). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-89, 2000.
- CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.
- DUTRA, R.C.; BRAGA, F.G.; COIMBRA, E.S.; SILVA, A.D.; BARBOSA, N.R. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 429-435, 2009.
- EUZÉBIO, F.P.G.; SANTOS, F.J.L.; PILÓ-VELOSO, D.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; FERREIRA-ALVES, D.L.; FATIMA, A. Effect of 6a,7b-dihydroxyvouacapan-17b-oic acid and its lactone derivatives on the growth of human cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 37, p. 96-100, 2009.
- FASCIO, M.; MORS, W.B.; GILBERT, B.; MAHJAN, J.R.; MONTEIRO, M.B.; DOS SANTOS FILHO, D.; VICHNEWSKI, W. Diterpenoids furans from *Pterodon* species. **Phytochemistry**, v. 15, p. 201-203, 1976.
- KATZ, N.; FILHO, D. S.; SARTI, S. J.; MENDES, N. M.; FILHO, P. A. R.; ARAÚJO, N. Atividade quimioprolifática na esquistossomose mansoni de sabonetes contendo óleo essencial de frutos de *Pterodon pubescens*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, p. 183-191, 1993.
- LEITE DE ALMEIDA, M.E.; GOTTLIEB, O.R. The chemistry of Brazilian Leguminosae, further isoflavones from *Pterodon apparicia*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 2716-2720, 1975.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- MARQUES, D.D.; MACHADO, M.I.L.; CARVALHO, M.G.; MELEIRA, L.A.C.; BRAZ-FILHO, R.; AUGHLIN, J.L. Isoflavonoidas and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 295-301, 1998.

MARQUES, L.C. www.comciencia.br/reportagens/fito/fito8.htm, acessado em março de 2010.

MASCARO, U.C.P.; TEIXEIRA, D.F.; GILBERT, B. Avaliação da sustentabilidade da coleta de frutos de sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vog.) após queda espontânea. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 7, p. 131-138, 2004.

MORAES, W.F.; MATOS, L.G.; NASCIMENTO, M.V.M.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F.; CUNHA, L.C.; VALADARES, M.C.; COSTA, E.A. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of *Pterodon emarginatus* stem bark alcohol extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 146-150, 2009.

MORAES, W.F.; GALDINO, P.M.; NASCIMENTO, M.V.M.; VANDERLINDE, F.A.; BARA, M.T.F.; COSTA, E.A.; PAULA, J.R. Triterpenoids involved in the anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. **Journal of Natural Medicines**, 2011. (ARTICLE IN PRESS)

OLIVEIRA, P.C. **Obtenção e caracterização do extrato seco padronizado dos frutos da sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

PIMENTA, A.T.A.; SANTIAGO, G.M.P.; ARRIAGA, A.M.C.; MENEZES, G.H.A.; BEZERRA, S.B. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvídica de *Pterodon polygalaeiflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 501-505, 2006.

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

SANTOS, A.P. **Estudo farmacognóstico, avaliação da atividade antioxidante e da toxicidade aguda dos extratos etanólicos brutos das cascas do caule e folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae)**. 2008. 146f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

SILVA, M.C.C.; GAYER, C.R.M.; LOPES, C.S.; CALIXTO, N.O.; REIS, P.A.; PASSAES, C.P.B.; PAES, M.C.; DALMAU, S.R.; SABINO, K.C.C.; TEDESCHINI, A.R.; COELHO, M.G.P. Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, p. 135-141, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; BORDIGNOM, S.A.L. Nomenclatura botânica, classificação e identificação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O. (Org.). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 5ª ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. p. 211-227.

SPINDOLA, H.M.; CARVALHO, J.E.; RUIZ, A.L.T.G.; RODRIGUES, R.A.F.; DENNY, C.; SOUSA, I.M.O.; TAMASHIRO, J.Y.; FOGLIO, M.A. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with Selective *in vitro* Anticancer Activity for

Prostate Cell Line. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. S1-S11, 2009.

SPINDOLA, H.L.; SERVAT, L.; DENNY, C.; RODRIGUES, R.A.F.; EBERLIN, M.N.; CABRAL, E.; SOUSA, I.M.O.; TAMASHIRO, J.Y.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M.A. Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6a,7b-dihydroxyvouacapan-17b-oate methyl Ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. **BMC Pharmacology**, v. 10, p.1-10, 2010.

Capítulo 1

Variabilidade química do óleo essencial dos
frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel
(Fabaceae) do Cerrado brasileiro

1 INTRODUÇÃO

A composição dos metabólitos secundários nas plantas é resultado do balanço entre biossíntese e transformações que ocorrem durante o crescimento, em decorrência principalmente de fatores genéticos, ambientais e do manejo agrônomo utilizado (CASTRO et al., 2002; BOTREL et al., 2010). Fatores ambientais têm grande influência sobre o desenvolvimento de plantas; particularmente para plantas aromáticas, tais fatores influenciam sobremaneira no teor e na composição química de óleos essenciais (CORRÊA JÚNIOR; SCHEFFER; MING, 2006; BOTREL et al., 2010).

O óleo essencial extraído pode variar em qualidade, quantidade e na composição química de acordo com o clima, composição do solo, órgão da planta, idade vegetativa e fase do ciclo circadiano (MASOTTI et al., 2003; ANGIONI et al., 2006; BAKALLI et al., 2008). Dessa forma, a fim de se obter óleos essenciais de composição constante deve-se extrair o óleo sob as mesmas condições, de um mesmo órgão da planta que vem crescendo em mesmo solo, sob o mesmo clima e coletados na mesma época (BAKALLI et al., 2008).

Os óleos essenciais têm sido largamente empregados por suas propriedades já observadas na natureza, ou seja, por suas atividades antibacteriana, antifúngica e inseticida. São conhecidos aproximadamente 3000 óleos essenciais, sendo que 300 destes são comercialmente importantes especialmente para as indústrias farmacêutica, agropecuária, alimentícia, sanitária, cosmética e de perfumes (SILVA et al., 2003; HAJHASHEMI; GHANNADI; SHARIF, 2003; PERRY et al., 2003).

Óleos essenciais são misturas naturais complexas que podem conter cerca de 20–60 componentes em concentrações muito diferentes. Eles são caracterizados por dois ou três componentes presentes em concentrações elevadas (20–70%) em comparação com os outros componentes presentes em quantidades vestigiais. Os componentes incluem dois grupos de origem biosintética distinta, o grupo principal é composto de terpenos e o outro de constituintes alifáticos aromáticos (fenilpropanóides). Os principais terpenos são os monoterpenos (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}), mas hemiterpenos (C_5), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) também são descritos (BAKKALI et al., 2008).

Geralmente, os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas do óleo essencial (CROTEAU et al., 2000; BETTS, 2001; PICHERSKY;

NOEL; DUDAREVA, 2006). Leonhardt et al. (2010) observaram o efeito anti-espasmódico do óleo essencial de *Pterodon polygalaeflorus* e de seu principal constituinte o composto β -cariofileno em íleo isolado de ratos.

O táxon genérico *Pterodon* (Leguminosae – sinonímia Fabaceae) é constituído por cinco espécies distribuídas no Brasil: *Pterodon abruptus* Vogel, *Pterodon apparicioi* Pederdoli, *Pterodon emarginatus* Vogel (sinonímia *Pterodon polygalaeflorus* Benth), *Pterodon emarginatus* Benth e *Pterodon pubescens* Benth (PIMENTA et al., 2006). Apesar de estas espécies terem sido estudadas exaustivamente do ponto de vista fitoquímico (OLIVEIRA, 2010), poucos foram os trabalhos onde se verificou rendimento de óleos essenciais e sua variabilidade química em diferentes localidades.

Os fatores de natureza genética têm uma relevante contribuição na ocorrência de polimorfismo químico em espécies vegetais. Uma mesma população de plantas morfologicamente indiferenciadas e sexualmente compatíveis, portanto caracterizadas, do ponto de vista biológico, dentro de uma mesma espécie, pode apresentar indivíduos produtores de óleos essenciais de composição química diferente, e até distinguíveis pelo aroma (CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2005; SIMÕES; SPITZER, 2004; PAULA, 2011). Uma das dificuldades de se desenvolver fitoterápicos que apresentem características de reprodutibilidade, lote a lote, da ação terapêutica é a variabilidade no teor de constituintes majoritários, decorrentes dos efeitos de sazonalidade e conseqüentemente da variabilidade química da matéria-prima (CARNEIRO et al., 2008).

A avaliação de um experimento químico envolve a análise de grande número de variáveis. Muitas vezes, um pequeno número destas variáveis contém as informações químicas mais relevantes, enquanto que a maioria das variáveis adiciona pouco ou nada à interpretação dos resultados em termos químicos. A decisão sobre quais variáveis são importantes é feita, geralmente, com base na intuição química ou na experiência, ou seja, baseado em critérios que são mais subjetivos que objetivos. A redução de variáveis através de critérios objetivos, permitindo a construção de gráficos bidimensionais contendo maior informação estatística, pode ser conseguida através da análise de componentes principais. Também é possível construir agrupamentos entre as amostras de acordo com suas similaridades, utilizando todas as variáveis disponíveis, e representá-los de maneira bidimensional através de um dendrograma. A análise de componentes principais e

de agrupamento hierárquico são técnicas de estatística multivariada complementares que têm grande aceitação na análise de dados químicos (MOITA-NETO e MOITA, 1998).

Assim, o objetivo desta fase do trabalho foi realizar a investigação do processo de extração do óleo essencial de *Pterodon emarginatus* Vogel em aparato tipo Clevenger e promover a análise qualitativa e quantitativa, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) do óleo essencial de 11 indivíduos de *P. emarginatus* que ocorrem naturalmente em 5 localidades do Cerrado brasileiro e avaliar a ocorrência de variabilidade química nessa espécie vegetal através de análise estatística multivariada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

As amostras de frutos de *P. emarginatus* foram coletadas nas cidades de Jussara – Goiás (JUS), Nova América – Goiás (NA), Campestre – Goiás (PES-02), Jaciara – Mato Grosso (MTOE) e Correntina – Bahia (PES-01) de 11 indivíduos, sendo três de Jussara, cinco de Nova América, um de Campestre, um de Mato Grosso e um de Correntina (Tabela 1). A identificação botânica foi realizada pelo Prof. Dr. José Realino de Paula da Universidade Federal de Goiás e uma exsicata foi depositada no Herbário da UFG sob número 41714. Os frutos foram triturados em moinho de facas Willye (Tecnal) e após processados foram acondicionados em frasco âmbar e mantidos em freezer à -20°C, para preservar o óleo essencial até o momento de extração.

Tabela 1 – Localização geográfica dos exemplares de *P. emarginatus* Vogel estudados neste trabalho.

Amostra	Origem (Localização)	Data da coleta (mês/ano)	Coordenadas Geográficas		
			Latitude (S)	Longitude (O)	Altitude (m)
PES – 01	Correntina - BA	09/2007	13° 22' 50"	44° 37' 02"	561
PES – 02	Campestre – GO	09/2009	16° 46' 01"	49° 42' 06"	612
JUS – 01	Jussara - GO	09/2007	15° 43' 11"	50° 52' 11"	319
JUS – 02	Jussara - GO	09/2007	15° 43' 13"	50° 52' 06"	317
JUS – 03	Jussara - GO	09/2007	15° 43' 57"	50° 51' 27"	311
NA – 01	Nova América - GO	09/2009	15° 00' 50"	49° 59' 03"	712
NA – 02	Nova América - GO	09/2009	15° 00' 55"	49° 59' 04"	710
NA – 03	Nova América - GO	09/2009	15° 00' 57"	49° 59' 05"	700
NA – 04	Nova América - GO	09/2009	15° 00' 58"	49° 59' 07"	717
NA – 05	Nova América - GO	09/2009	15° 00' 53"	49° 59' 07"	721
MTOE - 01	Jaciara - MT	09/2007	15° 58' 03"	54° 54' 51"	367

2.2 INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO E OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Os frutos triturados da amostra utilizada nesta investigação (PES-01) foram submetidos, à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger (Figura 1A), utilizando aproximadamente 60 g de material vegetal. Os tempos de extração 2, 4, 6 e 8 horas foram selecionados para avaliação de rendimento do óleo essencial e verificação da sua composição química monitorada por CG/EM. Após a extração, o óleo foi medido no tubo graduado do próprio aparato (Figura 1B) e acondicionado em frasco âmbar, mantido sob refrigeração (freezer -20°C) e ao abrigo de luz, para as análises posteriores. O rendimento em porcentagem (v/p) foi calculado em relação à massa inicial (g) de frutos empregados na extração.

Figura 1 – Aparato tipo Clevenger empregado na extração de óleos essenciais. A, processo de extração (hidrodestilação). B, tubo graduado do aparato com o volume de óleo extraído.



Fonte: Próprio autor.

2.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As amostras de óleo foram submetidas à análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) em um cromatógrafo Shimadzu QP 5050A, utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida CBP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). A vazão foi de 1,0 mL min⁻¹ para o Hélio como gás de arraste sob fluxo

constante, com temperatura inicial de 60°C, mantida por 2 minutos, e seguida de aquecimento, primeiramente à taxa de 3°C/min até 240°C, depois de 10°C/min até 280°C e, permanente de 280°C por 10min, sendo a energia de ionização de 70 eV. O volume de injeção foi de 1 µL da amostra diluída em CH₂CL₂ na proporção de 1:5. Os componentes individuais do óleo foram identificados por comparação dos espectros de massa e os índices de retenção foram calculados com referência a uma seqüência linear de n-alcanos C8 – C36 (ADAMS, 2007).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada para verificar a existência de variabilidade química no óleo essencial dos frutos de *P. emarginatus*. Para tanto, utilizou-se os programas estatísticos para Análise de Componentes Principais (PCA) e Agrupamento Hierárquico (HCA) o *Système SPAD pour Windows, version 5.5, Centre International de Statistique et d'Informatique Appliquées, Montreuil Cedex, France, 2002*. E para Análise de Discriminante Canônica o *SYSTAT for Windows, version 10, SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2000*.

A aplicação da análise por componentes principais (PCA) permite que os dados sejam projetados no espaço definido pelo primeiro e segundo plano fatorial, retendo significativa porcentagem de variância acumulada. A análise de fatores permite selecionar os componentes químicos mais significantes para o processo e reduzir o número de variáveis sem que se perdessem as informações. Para a seleção de variáveis, o número de autovalores residuais da matriz original (11 indivíduos x 34 constituintes = 374 dados) foi usado para estabelecer o número máximo de variáveis a serem removidas.

A análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) foi realizada para estudar as similaridades das amostras com base na distribuição dos componentes químicos do óleo. Os agrupamentos hierárquicos foram formados de acordo com o Método de Variância Mínima de Ward (WARD, 1963).

A análise de Discriminante Canônico (CDA) foi utilizada para propor a classificação de grupos, e o percentual de classificação correta foi determinado pelo teste de Jaccknife.

A significância para a Análise de Redundância Canônica foi determinada pelo teste de Monte Carlo (com 999 permutações no modelo reduzido). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no processo de investigação da extração do óleo essencial dos frutos de *P. emarginatus* mostram que o tempo mais adequado de extração em aparato tipo Clevenger para os frutos foi de 4 horas e que o aumento da massa a ser extraída mantém relação positiva com o volume final de óleo obtido, ou seja, independente da massa de amostra utilizada no processo extrativo do óleo essencial dos frutos de sucupira o rendimento de aproximadamente 1,66% (v/p) foi mantido.

As análises de PCA e HCA permitiram separar dois agrupamentos nos 11 indivíduos de *P. emarginatus*: Classe I, constituída por JUS-03, JUS-02, PES-02, NA-05, JUS-01, METOE e PES-01 caracterizada pelos hidrocarbonetos sesquiterpênicos β -cariofileno e β -elemeno; Classe II, composta por NA-01, NA-02, NA-03 e NA-04 discriminada pelas variáveis químicas α -copaeno, β e α -cubebeno, allo aromadendreno e γ -muuruleno.

A análise de discriminante canônico utilizando a técnica de validação cruzada discriminou de forma distintiva as Classes I e II com 100% de acerto. Os compostos β -cariofileno e α -copaeno foram os responsáveis pela caracterização das duas classes devido a seus elevados valores percentuais, o que sugere serem os componentes majoritários do óleo essencial de *P. emarginatus*.

Os dados obtidos neste trabalho até o momento não descritos na literatura, tem relevância inovadora, apresentam dados inéditos e mostram também que estudos futuros de domesticação e sazonalidade (relação com variáveis ambientais – índices climáticos), melhores condições de cultivo e genética relacionados a espécie *P. emarginatus* devem ser realizados no intuito de minimizar a variabilidade química observada no óleo essencial dos frutos a fim de se obter uma matéria-prima para futuros produtos fitoterápicos com maior padronização de sua composição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th ed. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4364–4370, 2003.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – Review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BENÍTEZ, N.P.; MELENDEZ, E.; STASHENKO, E.E. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia. **Botetim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v.8, p. 301-304, 2009.
- BETTS, T.J. Chemical characterization of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 936, p. 33–46, 2001.
- BOTREL, P.P.; PINTO, J.E.B.P.; ARAÚJO, A.C.C.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FIGUEIREDO, F.C; FERRI, P.H.; COSTA, D.P. Variações no teor e na composição de *Hyptis marrubioides* EPL. Cultivado no campo e em casa de vegetação. **Química Nova**, v. 33, p. 33-37. 2010.
- CARNEIRO, F.B.; JÚNIOR, I.D.; LOPES, P.Q.; MACÊDO, R.O. Variação na quantidade de β – cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 600-606, 2010.
- CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M.; Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas da *Lippia alba* (Mill). N.E.Br em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, p. 75-79, 2002.
- CORRÊA JÚNIOR, C.; SCHEFFER, M. C.; MING, L. C. Cultivo agroecológico de plantas medicinais, aromáticas e condimentares, Brasília, 2006. Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2006.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.), **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, 2000.
- CUNHA, A.P.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Fármacos aromáticos (plantas aromáticas e óleos essenciais). In: CUNHA, A.P. (Coord.). **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p. 339-401.

DUTRA, R.C.; BRAGA, F.G.; COIMBRA, E.S.; SILVA, A.D.; BARBOSA, N.R. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 429-435, 2009.

HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 67–71, 2003.

HARTMANN, T. Global harmonization of herbal health claims. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 80, p. 177-179, 1996.

LEGAUT, J.; DAHL, W.; DEBITON, E.; PICHETTE, A.; MADELMONT, J.C. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by α – humulene as possible mechanism of action. **Planta Medica**, v. 69, p. 402-407, 2003.

LEONHARDT, V.; LEAL-CARDOSO, J.H.; LAHLOU, S.; ALBUQUERQUE, A.A.C.; PORTO, R.S.; CELEDÔNIO, N.R.; OLIVEIRA, A.C.; PEREIRA, R.F.; SILVA, L.P.; GARCIA-TEÓFILO, T.M.N.; SILVA, A.P.F.S.; MAGALHÃES, P.J.C.; DUARTE, G.P.; COELHO-DE-SOUZA, A.N. Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent β – caryophyllene on rat isolated ileum. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 24, p. 749-758, 2010.

LINDROTH, R.L.; HSIA, M.T.S.; SCRIBER, J.M. Tropical plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, p. 681-682, 1987.

MASOTTI, V.; JUTEAU, F.; BESSIE'RE, J.M.; VIANO, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7115–7121, 2003.

MOITA-NETO, J.M.; MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, p. 467-469, 1998.

OLIVEIRA, P.C. **Obtenção e caracterização do extrato seco padronizado dos frutos da sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

PAULA, J.A.M. **Fitoquímica e atividades biológicas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae)**. 2011. 248 f. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

PERRY, N.S.; BOLLEN, C.; PERRY, E.K.; BALLARD, C. *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 651–659, 2003.

PICHERSKY, E.; NOEL, J.P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, p. 808–811, 2006.

PIMENTA, A.T.A.; SANTIAGO, G.M.P.; ARRIAGA, A.M.C.; MENEZES, G.H.A.; BEZERRA, S.B. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 501-505, 2006.

POLO, M.; CARVALHO, J.C.T.; MESQUITA, J.M.O.; SARTI, S.J.; SANTOS-FILHO, D.; SERTIÊ, J.A.A. Caracterização fitoquímica do extrato bruto hexânico e do óleo essencial dos frutos da espécie *Pterodon emarginatus* Vogel. **Revista de Farmácia e Odontologia de Alfenas**, v. 26, p. 45-49, 2004.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S.M.; DUARTE, V.G.; MACHADO, M.I.L.; MATOS, F.J.A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 277–283, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. (Org.). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 5ª ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. p. 467-495.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1996.

WARD, J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of American Statistical Association**, v. 58, p. 238-244, 1963.

Capítulo 2

Atividade antimicrobiana e composição química do óleo extraído dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae)

A formatação deste capítulo segue as normas pela revista Química Nova (*online*).

Atividade antimicrobiana e composição química do óleo extraído dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae)

Suzana Ferreira Alves*, Leonardo Luiz Borges, José Realino de Paula e Maria Teresa Freitas Bara

Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, Faculdade de Farmácia, Praça Universitária, 1166 – Leste Universitário, CEP 74605-220, Goiânia, Goiás, Brasil.

Frederico Severino Martins e Edemilson Cardoso da Conceição

Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação de Fitoterápicos, Faculdade de Farmácia, Praça Universitária, 1166 – Leste Universitário, CEP 74605-220, Goiânia, Goiás, Brasil.

Joelma Abadia Marciano de Paula

Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, BR153, No. 3105, Fazenda Barreiro do Meio, C.P. 459, CEP: 75132-903, Anápolis, GO, Brasil.

*E-mail: suzanafal@gmail.com

Antimicrobial activity and chemical composition of oil extracted from fruits of *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae)

Abstract

ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF OIL FROM FRUITS OF *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae). This study investigates the antimicrobial activity and chemical composition of total oil from fruits of *P. emarginatus*. The antimicrobial activity was evaluated using broth microdilution technique. The chemical characterization of fixed fractions of oil was held by GC-FID and the identification of components of volatile fraction of oil was by GC-MS. The samples showed antimicrobial activity against Gram-positive bacteria with MIC of 31.25 - 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The majority compounds in the samples were gamma linoleic acid and β – caryophyllene. This is the first report of the antimicrobial activity and chemical composition of total oil fractions of *P. emarginatus* fruits.

Keywords: medicinal plants, antimicrobial, therapeutic oils, Brazilian cerrado.

INTRODUÇÃO

Pterodon emarginatus Vogel (Fabaceae) é uma espécie arbórea comumente chamada de “Sucupira-branca”. É uma planta medicinal popular no Cerrado brasileiro.¹ Vários estudos têm demonstrado algumas propriedades terapêuticas dos óleos extraídos de suas sementes, das quais se destacam: antiviral, antiespasmódica, analgésica, antimicrobiana, cicatrização de feridas, expectorante, calmante, anti-séptico das vias respiratórias, larvicida, anti-helmíntico e anti-inflamatório.²

Embora as sementes de sucupira estejam disponíveis comercialmente e sendo amplamente utilizadas na medicina doméstica por suas propriedades anti-reumática,³ analgésica⁴ e anti-inflamatória⁵, apenas um pequeno número de trabalhos têm descrito diferentes tipos de flavonóides, alcalóides, triterpenos, esteróides e outros compostos secundários encontrados no gênero *Pterodon*.⁶

Óleos e extratos de plantas tem sido por muito tempo a base para muitas aplicações na medicina popular, incluindo a produção de anti-sépticos tópicos. Esta realidade foi a base para várias investigações científicas destinadas a confirmar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais.⁷ Há interesse em aumentar o conhecimento sobre a concentração inibitória dos óleos, em busca de equilibrar a aceitabilidade e efetividade da ação antimicrobiana.⁸

Esta vertente na pesquisa de novos compostos com atividade antimicrobiana tem levado os cientistas a investigar a corrida medicamento *versus* micro-organismos, pois desde o início dos anos 80 o número de agentes antimicrobianos em desenvolvimento diminuiu consideravelmente, enquanto os microrganismos resistentes a eles cresceram imensamente, uma vez que eles estão desenvolvendo uma série de mecanismos de resistência.⁹ O estudo sobre a resistência bacteriana é geralmente com base na importância epidemiológica de microrganismos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos fermentadores, responsáveis por diferentes processos etiológicos em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos.^{2,10}

Plantas que têm sido usadas como medicamentos ao longo de centenas de anos constituem uma escolha clara para o estudo. É interessante determinar se os seus usos tradicionais são apoiados por reais efeitos farmacológicos ou meramente baseados em folclore.¹¹

Neste contexto, este estudo procura avaliar a atividade antimicrobiana do óleo total dos frutos de *P. emarginatus* e descrever a composição química de suas frações fixa e volátil.

PARTE EXPERIMENTAL

Material Vegetal

Os frutos de *P. emarginatus* Vogel foram coletados em três locais diferentes na cidade de Jussara (GO) e em um local da cidade de Jaciara (MT), em setembro de 2007. As amostras foram identificadas pelo Prof. Dr. José Realino de Paula. A exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás (UFG – 41714).

Reagentes e Produtos Químicos

Padrões de ésteres metílicos de cáprico, láurico, caprílico, ácido araquídico, mirístico e linoléico foram adquiridos da Merck®. Hexano e Clorofórmio grau HPLC foram adquiridos da Vetec – Brasil. O reagente de diluição Dimetilsulfóxido (DMSO) grau PA e Polissorbato 80 (Tween 80® PS) foram adquiridos também da Vetec – Brasil. Caldo Müller – Hinton e o Ágar Sabouraud Dextrose foram obtidos de HIMEDIA. O meio RPMI 1640 foi obtido da GIBCO – Invitrogen Corporation. O caldo tryptic soy (Ágar Casoy) foi adquirido de ISOFAR/MicroMed. Além disso, os antibióticos controles vancomicina, gentamicina e itraconazol foram adquiridos da Sigma - Aldrich® (Sigma - Aldrich Co., Steinheim, Germany).

Extração e Análise Química da Fração volátil do óleo

Os óleos essenciais foram obtidos a partir de 60 g dos frutos moídos de cada local por hidrodestilação em aparato tipo Clevenger por 4 horas. As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) foram realizadas em equipamento Shimadzu QP 5050A, utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida CBP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A vazão foi de 1,0 mL min⁻¹ para o Hélio como gás de arraste sob fluxo constante, com temperatura inicial de 60°C, mantida por 2 minutos, e seguida de aquecimento, primeiramente à taxa de 3°C/min até 240°C, depois de 10°C/min até 280°C e, permanente de 280°C por 10min, sendo a energia de ionização de 70 eV. O volume de injeção foi de 1 µL da

amostra diluída em CH_2CL_2 na proporção de 1:5. Os componentes individuais do óleo foram caracterizados por comparação dos espectros de massa e os índices de retenção que foram calculados com referência a uma seqüência linear de n-alcenos C8 – C36.¹²

Extração e Análise Química da Fração Fixa do óleo

Os frutos foram secos em estufa com circulação de ar a 30°C durante 4 dias. A fração fixa foi obtida de acordo com método de Bligh e Dyer.¹³ Para análise por cromatografia gasosa para identificar os compostos da fração fixa, foi necessário realizar a esterificação dos lipídios, processados da seguinte forma: 0,5 g foram pesados e adicionado 20 mL de KOH 1M metanólico. O produto foi submetido à extração em banho-maria a 90°C com refluxo durante 1 hora. Em seguida, foi adicionado 40 mL de H_2SO_4 1M metanólico e a solução retornou ao refluxo em banho – maria por mais uma hora. A solução resultante foi particionada com hexano e esta fração foi usada nas análises cromatográficas. A análise de identificação dos componentes da fração fixa foi realizada em um cromatógrafo a gás Varian – 3900 equipado com detector FID e coluna capilar CP-WAX 57 CB de polietilenoglicol (Varian, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio com fluxo de 2 mL min^{-1} . A temperatura foi programada (140°C/5min; 2°C min^{-1} , 240°C/20 min). O volume injetado foi de 1 μL de cada amostra e dos padrões diluídos em hexano grau HPLC na proporção de 5 : 1000. Os dados foram analisados pelo software STAR 5.0 da Varian.

Análise Centesimal dos frutos

As análises das macromoléculas presentes nos frutos de *P. emarginatus* foram realizadas em triplicata seguindo os procedimentos descritos nas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.¹⁴ A determinação do teor de umidade foi realizada por secagem das amostras em estufa a 105°C, até peso constante, e as cinzas foram determinadas por incineração em forno (mufla) a 550°C. A determinação do teor de nitrogênio total das amostras foi baseada no método de Kjeldahl, usando do fator de conversão genérico 6,25 para converter em teor de proteína bruta quantificada. As frações de lipídeos totais foram extraídas de acordo com o procedimento descrito no método Soxhlet, com base em determinação gravimétrica

da quantidade de material dissolvido pelo solvente éter de petróleo. Os carboidratos totais foram calculados pela diferença, em outras palavras, 100 g dos frutos menos a soma total dos valores para umidade, proteínas, cinzas e de lipídios. O consumo total de energia das sementes processadas foi calculado multiplicando os valores obtidos por fatores de conversão apropriados: proteínas e carboidratos por 4 Kcal g⁻¹ e lipídios por 9 Kcal g⁻¹.¹⁵

Micro - organismos utilizados e as condições de crescimento

Para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo total, o estudo empregou amostras de microrganismos padrão e isolados clínicos doados pelo *Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública* da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG). Os microrganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus epidermidis* ATCC 12229, *Micrococcus roseus* ATCC 1740, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* (atropheus) ATCC 6633, *Enterobacter cloacae* HMA/FTA 502, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* isolado clínico SPMI, *Samonella spp.* ATCC 19430 e *Serratia marcescens* ATCC 14756 e os fungos leveduriformes foram *Candida albicans* isolado clínico 02, *Candida parapsilosis* isolado clínico 11A, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 28957, *Cryptococcus neoformans* isolado clínico L2 and *Cryptococcus gatti* isolado clínico L1. As bactérias foram cultivadas em Caldo Casoy a 37°C e mantidas em Ágar Casoy a 4°C. As leveduras foram cultivadas e mantidas em Ágar Sabouraud Dextrose.

Atividade antimicrobiana em ensaio in vitro

A concentração inibitória mínima (CIM) do óleo total e dos antibióticos de referência (vancomicina, gentamicina e itraconazol) foram determinadas por meio de técnicas de microdiluição em caldo Müller – Hinton para bactérias e RPMI para fungos, conforme preconizado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*). Método para bactérias (CLSI, 2009)¹⁶ e para fungos (CLSI, 2008)¹⁷. Este estudo foi realizado em microplacas de 96 poços em forma de “U” estéreis.

O óleo na concentração inicial de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi adicionado à primeira coluna da microplaca, e a partir desta coluna foram retirados $100 \mu\text{L}$ e transferidos para próxima coluna e assim sucessivamente empregando o método de microdiluição em série onde a última coluna tem concentração final de $0,97 \mu\text{g mL}^{-1}$, após a diluição seriada das amostras estas foram assepticamente misturadas com o inóculo preparado na mesma medida, a uma densidade ajustada de 0,5 da escala de MacFarland (10^6 células fúngicas ou 10^8 células bacterianas) e diluídas 1 : 10 para o procedimento de microdiluição em caldo. As microplacas de microtitulação foram incubadas a 37°C e as CIM foram lidas após 24 horas de incubação para bactérias, após 48 horas para *Candida* e após 72 horas de incubação para *Cryptococcus*. Dois pontos de susceptibilidade foram registrados para cada isolado, ou seja, os inóculos foram realizados em duplicata. A CIM é definida como a maior diluição do óleo que pode impedir o crescimento microbiano.

CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo sobre a atividade antimicrobiana do óleo total extraído dos frutos de *Pterodon emarginatus* e composição química das frações fixa e volátil desse óleo total. Foram identificados 12 componentes na fração fixa e 10 na fração volátil, sendo estes últimos de natureza terpênica, classificados como sesquiterpenos. Tomados em conjunto, os resultados aqui apresentados sugerem que o óleo extraído dos frutos de *P. emarginatus* apresentam inibição do crescimento microbiano, apoiando o uso desta espécie de planta como antimicrobiano na medicina popular. Além disso, os baixos valores de CIM (31,25 – 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para bactérias Gram-positivas representam um valor com expressiva contribuição para a caracterização da atividade antimicrobiana das frações de plantas medicinais da flora brasileira.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo CNPq, CAPES e REUNI.

REFERÊNCIAS

1. Paiva, E.A.S.; Oliveira, D.M.T.; Machado, S.R.; *Ann. Braz. Acad. Sci.* **2008**, 80, 455.
2. Oyedji, O.A.; Afolayan, A.J.; *J. Essential Oil Res.* **2006**, 18, 57.; Lima, I.O.; Oliveira, R.A.G.; Lima, E.O.; Farias, N.M.P.; Souza, E.L.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 197; Costa, J.G.M.; Rodrigues, F.F.G.; Angélico, E.C.; Silva, M.R.; Mota, M.L.; Santos, N.K.A.; Cardoso, A.L.H.; Lemos, T.L.G.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, 15, 304; Halcon, L.; Milkus, K.; *Am. J. Infec. Control.* **2004**, 32, 402; Nascimento, P.F.C; Nascimento, A.C.; Rodrigues, C.S.; Antonioli, A.R.; Santos, P.O.; Júnior, A.M.B.; Trindade, R.C.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, 17, 108.
3. Coelho, M.G.; Sabino, K.C.; Dalmau, S.R.; *Clin. Exper. Rheum.* **2004**, 22, 213.
4. Coelho, L.P.; Reis, P.A.; Castro, F.L.; Gayer, C.R.M.; Lopes, C.S.; Silva, M.C.C.; Sabino, K.C.C.; Todeschini, A.R.; Coelho, M.G.P.; *J. Ethnopharm.* **2005**, 98, 109.
5. Carvalho, J.C.T.; Sertié, J.A.A.; Barbosa, M.V.J.; Patrício, K.C.M.; Caputo, L.R.G.; Sarti, S.J.; Ferreira, L.P.; Bastos, J.K.; *J. Ethnopharm.* **1999**, 64, 127.
6. Hansen, D.; Haraguchi, M.; Alonso, A.; *Braz. J. Pharm. Sci.* **2010**, 46, 607.
7. Almeida, J.R.G.A.; Silva-Filho, R.N.; Nunes, X.P.; Dias, C.S.; Pereira, F.O.; Lima, E.O.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 638; Arruda, T.A.; Antunes, R.M.P.; Catão, R.M.R.; Lima, E.O.; Sousa, D.P.; Nunes, X.P.; Pereira, M.S.V.; Barbosa-Filho, J.M.; Cunha, E.V.L.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 307.
8. Nunes, X.P.; Maia, G.L.A.; Almeida, J.R.G.S.; Pereira, F.O.; Lima, E.O.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 642.
9. File Jr., T.M.; *Int. J. Exp. Clin. Chemoth.* **2001**, 47, 11.
10. Michelin, D.C.; Moreschi, P.E.; Lima, A.C.; Nascimento, G.G.F.; Paganelli, M.O.; Chaud, M.V.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, 15, 316; Oliveira, R.A.G.; Lima, E.O.; Vieira, W.L.; Freire, K.R.L.; Trajano, V.N.; Lima, I.O.; Souza, E.L.; Toledo, M.S.; Silva-Filho, R.N.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 77; Lima, M.R.F.; Ximenes, C.P.A.; Luna, J.S.; Sant'Ana, A.E.G.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 300;

- Antunes, R.M.P.; Lima, E.O.; Pereira, M.S.V.; Camara, C.A.; Arruda, T.A.; Catão, R.M.R.; Barbosa, T.P.; Nunes, X.P.; Dias, C.S.; Silva, T.M.S.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 517.
11. Holetz, F.B.; Pessini, G.L.; Sanches, N.R.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V.; Filho, B.P.D.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, 97, 1027.
 12. Adams, R.P.; *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*. 4th ed. Allured:Carol Stream, 2007.
 13. Bligh, E.G.; Dryer, W.J.; *Canand. J. Biochem. Physiol.* **1959**, 37, 911.
 14. Instituto Adolfo Lutz; Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 5^a Ed. São Paulo, Brazil, 2006.
 15. Instituto Adolfo Lutz; Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4^a Ed. Brasília, Brazil, 2005.
 16. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically. 8rd edn. Approved standard M07-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
 17. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3rd edn. Approved Standard M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
 18. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M.; *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46, 446.
 19. Janssen, A.M.; Scheffer, J.J.C.; Baerheim-Svensen, A.; *Planta Médica* **1987**, 53, 395.
 20. Pickman, A.K.; *Biochem. System. Ecology* **1986**, 12, 13.
 21. Maia, A.I.V.; Torres, M.C.M.; Pessoa, O.D.L.; Menezes, J.E.S.A.; Costa, S.M.O.; Nogueira, V.L.R.; Melo, V.M.M.; De Souza, E.B.; Cavalcante, M.G.B.; Albuquerque, M.R.J.R.; *Química Nova* **2010**, 33, 584.
 22. Dutra, R.C.; Braga, F.G.; Coimbra, E.S.; Silva, A.D.; Barbosa, N.R.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, 19, 429.
 23. Nascimento, G.G.F.; Locatelli, J.; Freitas, P.C.; Silva, G.L.; *Braz. J. Microbiol.* **2000**, 31, 247; Caetano, N.; Saraiva, A.; Pereira, R.; Carvalho, D.; Pimentel, M.C.B.; Maia, M.B.S.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2002**, 12, 132.

24. Agra, M.F.; França, P.F.; Barbosa-Filho, J.M.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 114.

APÊNDICE

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF OIL
EXTRACTED FROM FRUITS OF *Pterodon emarginatus* Vogel (FABACEAE)
Suzana Ferreira Alves*, Leonardo Luiz Borges, José Realino de Paula e Maria Teresa**

Freitas Bara

Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, Faculdade de Farmácia, Praça Universitária,
1166 – Leste Universitário, CEP 74605-220, Goiânia, Goiás, Brasil.

Frederico Severino Martins e Edemilson Cardoso da Conceição

Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação de Fitoterápicos, Faculdade de
Farmácia, Praça Universitária, 1166 – Leste Universitário, CEP 74605-220, Goiânia, Goiás,
Brasil.

Joelma Abadia Marciano de Paula

Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás,
BR153, No. 3105, Fazenda Barreiro do Meio, C.P. 459, CEP: 75132-903, Anápolis, GO,
Brasil.

**E-mail: suzanafal@gmail.com*

ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF OIL EXTRACTED FROM FRUITS OF *Pterodon emarginatus* Vogel (FABACEAE)

Abstract

ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF OIL FROM FRUITS OF *Pterodon emarginatus* Vogel. This study investigates the antimicrobial activity and chemical composition of total oil from fruits of *P. emarginatus*. The antimicrobial activity was evaluated using broth microdilution technique. The chemical characterization of fixed fractions of oil was held by GC-FID and the identification of components of volatile fraction of oil was by GC-MS. The samples showed antimicrobial activity against Gram-positive bacteria with MIC of 31.25 - 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The majority compounds in the samples were gamma linoleic acid and β – caryophyllene. This is the first report of the antimicrobial activity and chemical composition the fractions of oil total from fruits of *P. emarginatus*.

Keywords: medicinal plants, antimicrobial, therapeutic oils, Brazilian cerrado.

INTRODUCTION

Pterodon emarginatus Vogel is a tree species commonly known as “sucupira-branca”. It is a popular medicinal plant in the Brazilian Savannah.¹ Several studies have shown some therapeutic properties of oils extracted from its fruits, of which the following stand out: antiviral, antispasmodic, analgesic, antimicrobial, wound healing, expectorant, soothing, antiseptic of the respiratory tract, larvicide, anthelmintic, and anti-inflammatory.² Although ‘*sucupira*’ fruits are commercially available and are widely used in domestic medicine with anti-rheumatic,³ analgesic⁴ and anti-inflammatory properties,⁵ only a small number of papers have described the different flavonoids, alkaloids, triterpenes, steroids, and others secondary compounds found in the *Pterodon* genus.⁶

Oils and plant extracts have been for a long time the basis for many applications in folk medicine, including the production of topical antiseptics. This reality was the basis for several scientific investigations aimed at confirming the antimicrobial activity of essential oils.⁷ There is an interest in increasing the knowledge about the inhibitory concentrations of the oils, in search for balance the acceptability and effectiveness of the antimicrobial action.⁸

This strand in the research of new compounds with antimicrobial activity has led scientists to investigate the drug race *versus* microorganisms, as since early ‘80s the number of antimicrobials in development has decreased considerably while the microorganisms resistant to them has grown immeasurably, as they are increasingly developing a series of new resistance mechanisms.⁹ The study on bacterial resistance is usually based on the epidemiological importance of microorganisms, such as *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and yeast fungi, accountable for different etiological processes in immunocompetent and immunocompromised patients.^{2,10} Plants which have been used as medicines over hundreds of years constitute an clear choice for study. It is interesting to determine whether their traditional uses are supported by actual pharmacological effects or merely based on folklore.¹¹

In this context, this study seeks out to evaluate the antimicrobial activity of oil from fruits of *P. emarginatus* and describe the chemical composition of their fixed and volatile fractions.

EXPERIMENTAL

Plant Material

The fruits from *P. emarginatus* were collected in three different locations in the cities of Jussara (GO) and Jaciara (MT); in September 2007, they received botanic identification by Prof. Dr. José Realino de Paula . A voucher specimen has been deposited at the Herbarium of Universidade Federal de Goiás (UFG41 714).

Reagents and Chemicals

Standards of methyl esters of capric, lauric, caprylic, arachidic, myristic, and linoleic acids were purchased from Merck[®]. Hexane and the chloroform were of HPLC grade (Vetec-Brazil). The reagent of dilution Dimethylsulfoxide (DMSO) PA grade and Polissorbato 80 (Tween 80 P.S.) were acquired from Vetec-Brazil. Müller-Hinton Broth and sabouraud dextrose agar was obtained from HIMEDIA. RPMI Medium 1640 was obtained from GIBCO – Invitrogen Corporation. Tryptic Soy Broth (Casoy agar) was acquired the ISOFA/MicroMed. Moreover, the antibiotics controls vancomycin, gentamycin and itraconazol were purchased from Sigma-Aldrich[®] (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Germany).

Extraction and chemical analysis for volatile fraction

The essential oils were obtained from 60 g of fruits of each location by hydro-distillation using a Clevenger-type system for 4 h. The analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) were performed with Shimadzu QP5050A, equipped with a fused silica capillary column CBP-5 (30 m x 0.25 mm i.d.; film thickness 0.25 µm) .

The carrier gas was helium with 1.0 mL min^{-1} . The temperature was programmed ($60^{\circ}\text{C}/2 \text{ min}$; $3^{\circ}\text{C min}^{-1}/ 240^{\circ}\text{C}$; $10^{\circ}\text{C min}^{-1}/ 280^{\circ}\text{C}$; $280^{\circ}\text{C}/ 10 \text{ min}$) and ionization energy of 70 eV . The injected volume was $1 \mu\text{L}$ of each sample diluted in CH_2CL_2 in the proportion of 1:5. The chemical constituents of essential oils were identified in parallel of mass spectra and with retention rates reported in the literature for the components of essential oils.¹²

Extraction and chemical analysis for fixed fraction

The fruits were dried out in air circulation at 30°C for 4 days. The fixed fraction was obtained according to the Bligh and Dyer method.¹³ For gas chromatographic analysis to identify the total oil (fixed fraction), it was necessary to perform the esterification of the lipids, processed as follows: $0,5 \text{ g}$ were weighed and added 20 mL of $\text{KOH } 0,1\text{M}$ methanolic. The product was subjected to extraction in water bath at 90°C with reflux for one hour. Then, it was added 40 mL of H_2SO_4 1M methanolic and the solution returned to reflux in water bath at 90°C for another hour. The resulting solution was portioned with hexane, and this fraction was used in the chromatographic analysis. The analysis of identification of the oil constituents performed on a gas chromatograph Varian-3900 equipped with FID detector and capillary column CP-WAX 57 CB of polyethylene glycol (Varian, $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$). The carrier gas used was nitrogen with flux of 2 mL min^{-1} . The temperature was programmed ($140^{\circ}\text{C}/5\text{min}$; $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$, $240^{\circ}\text{C}/20 \text{ min}$). The injected volume was $1 \mu\text{L}$ of each sample and the standards diluted in Hexane grade HPLC in the proportion of 5:1000. The data were analyzed by software STAR 5.0 of the Varian.

Proximate analysis of fruits

The macromolecules analysis was held in triplicate and following the procedures described in the Analytical Standards of Institute Adolfo Lutz.¹⁴ The determination of

moisture content was carried out by drying the samples in an oven at 105 °C, until constant weight, and the ash was determined by incineration in an oven at 550 °C. The determination of total nitrogen content of samples was based on the Kjeldahl method, using the generic conversion factor 6.25 to convert the crude protein content quantified. The fractions of total lipids were extracted according to the procedure described in Soxhlet method, based on gravimetric determination of the amount of material dissolved by the solvent petroleum ether. The total carbohydrates were calculated by difference, in other words, 100 g of fruits the total sum of values for moisture, protein, lipid and ash. The total energy intake of processed foods was calculated by multiplying the values obtained by appropriate conversion factors: protein and carbohydrates by 4 Kcal g⁻¹, and lipids by 9 Kcal g⁻¹.¹⁵

Microorganisms used and growth conditions

To evaluate the antimicrobial activity of total oil, the study used microorganisms standard and clinical isolates donated by *Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública* of Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG). The microorganisms used were *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus epidermidis* ATCC 12229, *Micrococcus roseus* ATCC 1740, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* (atropheus) 6633, *Enterobacter cloacae* HMA/FTA 502, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* 8739, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* isolado clínico SPMI, *Samonella spp.* ATCC 19430 e *Serratia marcescens* ATCC 14756 and against yeasts fungi *Candida albicans* clinical isolate 02, *Candida parapsilosis* clinical isolate 11A, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *Cryptococcus neoformans* ATCC 28957, *Cryptococcus neoformans* clinical isolate L2 and *Cryptococcus gatti* clinical isolate L1. The bacteria were

grown in Casoy broth at 37°C and maintained on nutrient Casoy Agar slants at 4°C. The yeasts were grown and maintained on Sabouraud-dextrose agar.

In vitro antimicrobial activity assay

The minimum inhibitory concentrations (MIC) from total oil and reference antibiotics (vancomycin, gentamycin and itraconazol) were determined by microdilution techniques in Mueller-Hinton broth for bacteria following protocol established by the CLSI (2009)¹⁶ and RPMI for fungi methodology, as described by the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Intitute, 2008).¹⁷ This trial was conducted in sterile 96-well microplate with deep “U”.

Each fixed and volatiles fractions with initial concentration 2000 µg mL⁻¹ were added to the first column of the microplate, and from this column were removed 100 µL and transferred to the next column and so on serial dilution method to the last column with a final concentration of 0.97 µg mL⁻¹ was aseptically mixed with inoculums prepared in the same media at a density adjusted the 0,5 of McFarland scale (10⁶ yeasts or 10⁸ bacterial cells), and diluted 1:10 for the broth microdilution procedure. The microtiter trays were incubated at 37°C and the MIC's were recorded after 24h of incubation. Two susceptibility endpoints were recorded for each isolated. The MIC is defined as the highest dilution of the oil that can prevent microbial growth.

CONCLUSION

This is the first study on the antimicrobial activity of the total oil extracted from fruits of *Pterodon emarginatus* and chemical composition of fixed and volatile fractions of the fruits. Were identified 12 components in the fixed fraction and 10 in the volatile fraction, the latter being in nature terpenic classified as sesquiterpenos. Taken together, the results presented here, suggest that the oil extracted from fruits of *Pterodon emarginatus* show growth inhibition, supporting use of plant species in folk medicine as antimicrobial. Furthermore, the low MIC values ($31.25 - 250 \mu\text{g mL}^{-1}$) against Gram-positive bacteria represent a value with significant contribution to the characterization of the antimicrobial activity of the fractions of medicinal plants of the Brazilian flora.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNPq, CAPES and REUNI.

REFERENCES

1. Paiva, E.A.S.; Oliveira, D.M.T.; Machado, S.R.; *Ann. Braz. Acad. Sci.* **2008**, 80, 455.
2. Oyedji, O.A.; Afolayan, A.J.; *J. Essential Oil Res.* **2006**, 18, 57.; Lima, I.O.; Oliveira, R.A.G.; Lima, E.O.; Farias, N.M.P.; Souza, E.L.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 197; Costa, J.G.M.; Rodrigues, F.F.G.; Angélico, E.C.; Silva, M.R.; Mota, M.L.; Santos, N.K.A.; Cardoso, A.L.H.; Lemos, T.L.G.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, 15, 304; Halcon, L.; Milkus, K.; *Am. J. Infec. Control.* **2004**, 32, 402; Nascimento, P.F.C; Nascimento, A.C.; Rodrigues, C.S.; Antonioli, A.R.; Santos, P.O.; Júnior, A.M.B.; Trindade, R.C.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, 17, 108.
3. Coelho, M.G.; Sabino, K.C.; Dalmau, S.R.; *Clin. Exper. Rheum.* **2004**, 22, 213.
4. Coelho, L.P.; Reis, P.A.; Castro, F.L.; Gayer, C.R.M.; Lopes, C.S.; Silva, M.C.C.; Sabino, K.C.C.; Todeschini, A.R.; Coelho, M.G.P.; *J. Ethnopharm.* **2005**, 98, 109.

5. Carvalho, J.C.T.; Sertié, J.A.A.; Barbosa, M.V.J.; Patrício, K.C.M.; Caputo, L.R.G.; Sarti, S.J.; Ferreira, L.P.; Bastos, J.K.; *J. Ethnopharm.* **1999**, 64, 127.
6. Hansen, D.; Haraguchi, M.; Alonso, A.; *Braz. J. Pharm. Sci.* **2010**, 46, 607.
7. Almeida, J.R.G.A.; Silva-Filho, R.N.; Nunes, X.P.; Dias, C.S.; Pereira, F.O.; Lima, E.O.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 638; Arruda, T.A.; Antunes, R.M.P.; Catão, R.M.R.; Lima, E.O.; Sousa, D.P.; Nunes, X.P.; Pereira, M.S.V.; Barbosa-Filho, J.M.; Cunha, E.V.L.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 307.
8. Nunes, X.P.; Maia, G.L.A.; Almeida, J.R.G.S.; Pereira, F.O.; Lima, E.O.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 642.
9. File Jr., T.M.; *Int. J. Exp. Clin. Chemoth.* **2001**, 47, 11.
10. Michelin, D.C.; Moreschi, P.E.; Lima, A.C.; Nascimento, G.G.F.; Paganelli, M.O.; Chaud, M.V.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, 15, 316; Oliveira, R.A.G.; Lima, E.O.; Vieira, W.L.; Freire, K.R.L.; Trajano, V.N.; Lima, I.O.; Souza, E.L.; Toledo, M.S.; Silva-Filho, R.N.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 77; Lima, M.R.F.; Ximenes, C.P.A.; Luna, J.S.; Sant’Ana, A.E.G.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 300; Antunes, R.M.P.; Lima, E.O.; Pereira, M.S.V.; Camara, C.A.; Arruda, T.A.; Catão, R.M.R.; Barbosa, T.P.; Nunes, X.P.; Dias, C.S.; Silva, T.M.S.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 517.
11. Holetz, F.B.; Pessini, G.L.; Sanches, N.R.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V.; Filho, B.P.D.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, 97, 1027.
12. Adams, R.P.; *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*. 4th ed. Allured: Carol Stream, 2007.
13. Bligh, E.G.; Dryer, W.J.; *Canad. J. Biochem. Physiol.* **1959**, 37, 911.
14. Instituto Adolfo Lutz; Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 5^a Ed. São Paulo, Brazil, 2006.

15. Instituto Adolfo Lutz; Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4ª Ed. Brasília, Brazil, 2005.
16. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically. 8rd edn. Approved standard M07-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
17. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3rd edn. Approved Standard M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
18. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M.; *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46, 446.
19. Janssen, A.M.; Scheffer, J.J.C.; Baerheim-Svensen, A.; *Planta Médica* **1987**, 53, 395.
20. Pickman, A.K.; *Biochem. System. Ecology* **1986**, 12, 13.
21. Maia, A.I.V.; Torres, M.C.M.; Pessoa, O.D.L.; Menezes, J.E.S.A.; Costa, S.M.O.; Nogueira, V.L.R.; Melo, V.M.M.; De Souza, E.B.; Cavalcante, M.G.B.; Albuquerque, M.R.J.R.; *Química Nova* **2010**, 33, 584.
22. Dutra, R.C.; Braga, F.G.; Coimbra, E.S.; Silva, A.D.; Barbosa, N.R.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, 19, 429.
23. Nascimento, G.G.F.; Locatelli, J.; Freitas, P.C.; Silva, G.L.; *Braz. J. Microbiol.* **2000**, 31, 247; Caetano, N.; Saraiva, A.; Pereira, R.; Carvalho, D.; Pimentel, M.C.B.; Maia, M.B.S.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2002**, 12, 132.
24. Agra, M.F.; França, P.F.; Barbosa-Filho, J.M.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, 17, 114.

Capítulo 3

Obtenção de microcápsulas contendo o óleo
essencial dos frutos de *Pterodon emarginatus*
Vogel (Fabaceae)

1 INTRODUÇÃO

A natureza, em especial as plantas, tem sido fonte de agentes medicinais para o tratamento de um amplo espectro de doenças há milhares de anos (CRAGG et al., 2009). As informações da natureza e de compostos que, embora formalmente sintéticos, são derivados de produtos naturais, ou imitam estruturas de produtos naturais, podem ser usadas em uma variedade de maneiras para levar a novos compostos com possível potencial terapêutico (NEWMAN, 2008).

Hoje os fitoterápicos representam cerca de 15% do capital de mercado da indústria farmacêutica mundial (NIERO, 2010). No Brasil, esse mercado é o fator de atração e o ritmo de crescimento das vendas internas representam mais de 15% anuais, contra 4% do que evoluem as vendas dos medicamentos sintéticos (FEBRAFARMA, 2010). No Brasil, o uso de plantas medicinais vem se consolidando nos últimos tempos, em especial com a promulgação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006), da RENISUS (BRASIL, 2009) e da COMAFITO (2010).

A demanda por medicamentos à base de plantas vem crescendo mundialmente. Nos países desenvolvidos, como alternativa mais saudável, ou menos danosa de tratamento e em países em desenvolvimento, como resultante do não acesso aos medicamentos sintéticos. A ampliação do consumo levou a normatização do setor com implementação e constante revisão de normas técnicas para a produção e comercialização de medicamentos, visando garantir a segurança no uso e eficácia terapêutica aliada à qualidade do produto (FREITAS, 2007).

Os estudos e a crescente utilização dos fitoterápicos fizeram despertar em todo o mundo uma preocupação especial com a sua eficácia, pois além da influência do cultivo, o processamento inadequado das plantas pode ocasionar degradação dos seus constituintes, implicando na perda da atividade farmacológica. Como exemplo, pode-se citar o uso do aquecimento excessivo na secagem da planta ou na evaporação do solvente empregado na extração dos princípios ativos. A vida útil da matéria-prima também é limitada pela exposição ao oxigênio, umidade e luminosidade (HEINRICH et al., 2007).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza que, para a transformação de uma planta em medicamento deve-se visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua

ação biológica e a segurança de utilização, além de valorizar o seu potencial terapêutico. Portanto, a produção de medicamentos fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios envolvendo aspectos botânicos, agrônômicos, químicos, estudos farmacológicos e toxicológicos, além do desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas, para garantia da padronização do medicamento fitoterápico (SERVAT et al., 2010).

Todo fitoterápico é, por definição, um medicamento contendo ingredientes ativos complexos, em mistura. O conjunto dos constituintes é responsável pelo efeito benéfico que não pode ser resumido ao efeito de um só componente. Neste contexto, as interações sinérgicas são aquelas na qual a atividade combinada de duas ou mais substâncias é maior que aquela esperada pela somatória das suas atividades individuais. Interações sinérgicas entre os componentes de uma planta são consideradas a parte vital da sua eficácia terapêutica na fitoterapia. O conceito de sinergia (aplicado a uma planta) visa minimizar os riscos e efeitos colaterais do tratamento e potencializar o sucesso terapêutico, também é conhecido como ação polivalente para denotar efeitos cooperativos amplificados; tanto no sentido de aumentar a eficácia terapêutica quanto no de diminuir possíveis efeitos colaterais, ou preferencialmente ambos (NIERO et al., 2003).

Muitos princípios ativos presentes em produtos de origem natural são compostos instáveis como os óleos essenciais. Esses óleos podem interagir e volatilizar-se ou simplesmente oxidar-se (LEIMANN, 2008). Em sua grande maioria, compostos voláteis são encapsulados em agentes de cobertura sólidos com o intuito de aumentar sua proteção, controle de liberação do componente ativo, redução da evaporação e promover uma maior facilidade de manipulação (VERSIC, 1988; RISCH, 1988; RIBEIRO et al., 1997).

Constatada uma ação farmacológica e a caracterização fitoquímica de uma determinada planta medicinal podem-se iniciar estudos visando à obtenção de fitoterápicos que envolvem diversas etapas tecnológicas que iniciam na qualificação da matéria-prima vegetal, passando pelas operações de transformação até a forma farmacêutica final (GUIMARÃES et al., 2007).

1.1 ÓLEO ESSENCIAL DE *Pterodon emarginatus* Vogel

Os óleos essenciais também chamados de óleos voláteis são líquidos aromáticos obtidos a partir de material vegetal (flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutos e raízes) (GUENTHER et al., 1975). Eles podem ser obtidos por fermentação, expressão ou extração, mas o método de arraste a vapor é o mais comumente usado para fins comerciais (VAN DE BRAAK e LEIJTEN, 1999; BURT, 2004).

Os óleos essenciais são misturas complexas e seus constituintes podem pertencer as mais diversas classes de compostos, porém os terpenos e os fenilpropanóides são as classes de compostos mais comumente encontradas. Os terpenos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos, bem como os diterpenos, constituintes minoritários dos óleos essenciais (CASTRO et al., 2004; LOAYZA et al., 1995; CASTRO et al., 2010).

Pterodon emarginatus Vogel é uma espécie arbórea comumente conhecida como “sucupira-branca” e é bem conhecida como uma planta medicinal do cerrado das regiões brasileiras. Estruturas secretoras (ductos secretores) no pericarpo dos frutos e nas sementes de *P. emarginatus* produzem e acumulam uma substância resinosa com base terpênica e diterpênica (FASCIO et al., 1976), que demonstra atividade biológica como cercaricida (MORS et al., 1976), larvicidas (DE OMENA et al., 2006) e são usadas para diversos fins na medicina (ALMEIDA et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2001; PAIVA et al., 2008). De acordo com Almeida et al. (1998), o endocarpo alado é extremamente rico em óleos essenciais aromáticos que são usados no tratamento de reumatismo e diabetes.

O óleo essencial extraído dos frutos das espécies do gênero *Pterodon* é amplamente estudado e apresenta inúmeras atividades farmacológicas comprovadas. Evangelista et al. (2007) verificaram o efeito do óleo essencial de *Pterodon polygalaeiflorus* no tratamento de bronquites e amigdalites, através da indução de contrações geradas por um método de acoplamento eletromecânico na traquéia isolada de ratos e observaram que o óleo inibia as contorções, apresentando atividade antiespasmódica de musculatura lisa *in vitro*.

Menna-Barreto et al. (2008) realizaram um estudo com o óleo dos frutos de *Pterodon pubescens*, cujo constituinte majoritário do óleo era geranilgeraniol, sobre

sua atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e observaram que este constituinte era capaz de inibir a proliferação intracelular das formas amastigotas do parasita em concentrações que não afetavam a viabilidade da célula hospedeira de mamíferos.

Dutra et al. (2009a) demonstraram que o óleo essencial obtido das sementes de *P. emarginatus* inibiu o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 e apresentou expressiva atividade *in vitro* contra *Leishmania amazonensis*.

Dutra et al. (2009b) também avaliaram a atividade cicatrizante do óleo essencial de *Pterodon emarginatus* obtidos dos frutos e incorporado em creme base, na cicatrização de úlceras cutâneas experimentais em coelhos, e constataram que no 8º dia de tratamento as úlceras estavam completamente cicatrizadas. Esses autores descrevem que o óleo essencial apresentou os seguintes constituintes majoritários: *trans*-cariofileno (β -cariofileno) (35,9%); β - elemeno (15,3%); germacreno-D (9,8%); α -humuleno (6,8%); espatulenol (5,9%); biciclogermacreno (5,5%). Fernandes et al. (2003) demonstraram que os constituintes *trans*-cariofileno e α -humuleno apresentam efeito anti - inflamatório no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos por inibição na produção de TNF- α . Por esta razão, acredita-se que o efeito cicatrizante apresentado pelo óleo essencial neste estudo possa estar diretamente relacionado a estes constituintes que apresentam efeito anti-inflamatório comprovado, já que foi observada uma diminuição no número de células inflamatórias nas áreas tratadas por estes cremes.

Em decorrência dos inúmeros usos da sucupira na medicina popular para diversos fins terapêuticos um importante parâmetro é ser avaliado são os estudos de toxicidade. O óleo essencial das sementes de *P. pubescens* não resultou em nenhuma alteração macroscópica de tecidos corporais no homem e em outros animais testados; isto é, não se evidenciou efeito mutagênico ou tóxico (SABINO et al., 1999). Além disso, nenhum efeito capaz de provocar anormalidades cromossômicas (efeito clastogênico) foi observado quando os ratos foram submetidos a tratamento dérmico com óleo das sementes de *P. pubescens* no dorso e na cauda (DA LUZ DIAS et al., 1995).

Com a finalidade de aprimorar o *design* de novos produtos, é necessário que sejam agregados a eles novos valores e atributos. Uma das alternativas encontradas para este propósito é a inserção de microcápsulas em produtos industriais (KINDLEIN et al., 2007).

Dessa forma, é importante estudar a melhor forma de se veicular os óleos essenciais com o intuito de preservar sua integridade química e sua qualidade organoléptica, garantindo assim a manutenção de sua viabilidade biológica, ou seja, a conservação de suas propriedades farmacológicas. Neste sentido, propõe-se a microencapsulação do óleo essencial dos frutos de *Pterodon emarginatus* (Fabaceae).

1.2 MICROENCAPSULAÇÃO

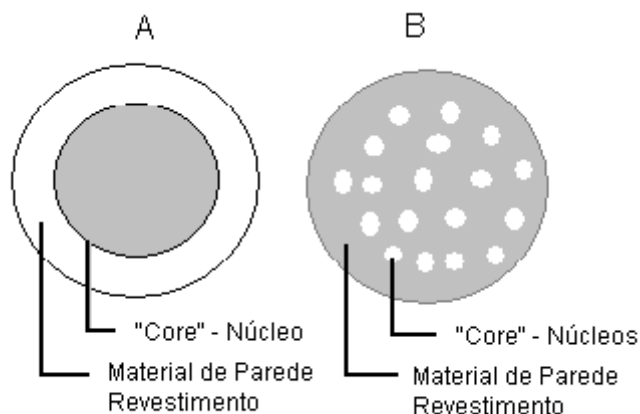
Os primeiros registros de tentativas de aplicação da técnica de microencapsulação datam dos anos 1930, mas o primeiro produto com material microencapsulado só surgiu em 1954. A empresa norte-americana *National Cash Register* (NCR) foi a pioneira, ao comercializar um papel de cópia sem carbono, que revolucionaria a indústria de formulários. Esse papel recebeu uma fina camada de microcápsulas de tinta, contendo solução de 2 a 6% de um pigmento adequado disperso em partículas com diâmetro de 1 até 10 μm . As primeiras pesquisas na área farmacêutica também aconteceram na década de 50 (SUAVE et al., 2006; RÉ, 2000).

Microencapsulação é uma técnica que foi desenvolvida há aproximadamente 60 anos e é definida como uma tecnologia de envolvimento de sólidos, líquidos ou materiais gasosos por películas poliméricas formando partículas (cápsulas seladas) que podem liberar seus conteúdos em quantidades controladas e em condições específicas (FANG et al., 2010; DESAI e PARK, 2005). O principal objetivo desta técnica é envolver o material sensível em uma cápsula e isolar fisicamente este material do meio ambiente, esta barreira pode conferir proteção contra oxigênio, água, luz; permitir um controle de liberação do material retido; e/ou evitar o contato com outros constituintes em uma mistura, pois geralmente o material de parede é feito de compostos que formam uma estrutura em rede (TURCHIULI et al., 2005).

A aplicação da microencapsulação consiste no isolamento do núcleo de seu entorno, o material dentro da microcápsula é referido como “core” enquanto a parede é chamada de revestimento ou membrana (TARUN et al., 2011). As microcápsulas podem variar de vários micrômetros de tamanho (0,2 – 500 μm) e podem apresentar várias formas dependendo dos materiais e métodos usados para prepará-las (BALASSA e FANGER, 1971).

Várias morfologias podem ser observadas durante o encapsulamento, mas as duas mais comumente obtidas são: as microcápsulas com núcleo único (sistema mononuclear) (Figura 1A) e aquelas que caracterizam - se por apresentar vários núcleos dispersos na matriz polimérica (Figura 1B) (FANG et al., 2010).

Figura 1 - Duas formas principais de encapsulamento: cápsula mononuclear (A) e núcleos dispersos na matriz polimérica (B)



Fonte: FANG et al., 2010.

A microencapsulação tem inúmeras aplicações industriais, entre elas, no setor farmacêutico serve para aumentar a estabilidade de um fármaco ou para modificar ou retardar sua liberação em locais específicos; no setor de alimentos, previnem a oxidação e perda de substâncias voláteis, pode também promover a alteração de textura, melhora a qualidade nutricional, aumenta a vida de prateleira ou controla as propriedades dos alimentos (RÉ, 2000); no setor agropecuário, na produção de pesticidas químicos, pois torna os produtos mais eficazes, reduzindo riscos de toxidez para o homem durante seu manuseio; no caso de biopesticidas, a microencapsulação mantém o poder do microrganismo de infectar a praga - alvo (PARK, 2002); e na indústria de cosméticos com vasta utilização em cremes hidratantes e emolientes, depilatórios, fotoprotetores, produtos para cabelo e maquiagem (RAMOS, 2006; VINETSKY e MADASSI, 1999; HAKIWS et al., 2000).

A escolha do método de encapsulação para uma aplicação específica depende de uma série de fatores, como: tamanho de partículas requerido, propriedades físicas e químicas do núcleo e da parede, aplicação do produto final, mecanismos desejados de liberação, escala de produção e custo (AZEREDO, 2005). Dentre os métodos relatados para microencapsulação de substâncias voláteis, a técnica mais empregada na indústria é a de *Spray Drying*, muito adequada no

encapsulamento de óleos e oleorresinas (BUFFO et al., 2002). Sua eficiência está baseada no princípio do aumento da área de contato entre o material a ser seco e o agente dessecante, ou seja, o ar quente. Baseado neste princípio atua na secagem por nebulização e a esfera é a forma que o material toma quando é atomizado por um bico de *spray*. Para esferas, quando diminuimos o seu diâmetro pela metade, temos um aumento de oito vezes na sua área superficial. Esta característica de gerar na nebulização uma alta área superficial por grama do líquido é inigualável no *spray dryer* (ROSA et al., 2010).

A secagem em *spray dryer* resulta em produtos de boa qualidade, com baixa atividade de água, com maior facilidade de transporte e armazenamento. As propriedades físico-químicas dos materiais produzidos por atomização dependem de algumas variáveis de processo como as características do líquido de alimentação (viscosidade, tamanho de partículas, taxa de fluxo) e do ar de secagem (temperatura, pressão) bem como o tipo de atomizador. Portanto, é importante avaliar bem as condições de secagem, a fim de se obter produtos com melhores características e com melhor rendimento (TONON et al., 2008). *Spray drying* é uma técnica econômica, flexível, de operação contínua e que produz partículas de boa qualidade. Uma limitação da tecnologia de *spray drying* é o número limitado de materiais de parede disponíveis, pois os materiais de parede devem ser solúveis em água em um nível aceitável (DESAI e PARK, 2005).

A seleção do material de parede é vital para eficiência de encapsulação no *spray dryer*. A escolha do agente encapsulante depende de uma série de fatores, entre eles a não reatividade com o material a ser encapsulado, o processo utilizado para a formação da microcápsula e o mecanismo de liberação ideal. Muitos materiais podem ser utilizados como cobertura para as microcápsulas, dentre eles: goma arábica, ágar, alginato e carragenana; os carboidratos (amido, amidos modificados, dextrinas e sacarose); as celuloses (carboximetilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose); os lipídios, (mono e diacilgliceróis, óleos e gorduras); os materiais inorgânicos sulfato de cálcio e silicatos; as proteínas do glúten, caseína, gelatina e albumina (FAVARO-TRINDADE et al., 2008; JACKSON e LEE, 1991).

As principais propriedades físico-químicas das microcápsulas que devem ser consideradas em sua caracterização, e as principais técnicas mais utilizadas para esse propósito são a estrutura geral, externa e interna (microscopia óptica, eletrônica e confocal); estrutura fina (difração de raios-X e análise térmica); tamanho e

distribuição das partículas; composição da parede e do núcleo (análise térmica, química, cromatografia e métodos espectroscópicos); rendimento e atividade do encapsulado. As propriedades físicas (compressão estática, resistência ao cisalhamento, mobilidade eletroforética); o comportamento de liberação *in vitro* e a estabilidade dependem das características intrínsecas da microcápsula e das condições utilizadas para estocagem (FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

Os óleos essenciais normalmente são encapsulados com a finalidade de aumentar significativamente a sua vida de prateleira, uma vez que a encapsulação pode prevenir a oxidação, a volatilização e a aglomeração destes, além de possibilitar a liberação controlada e a conversão de aromatizantes líquidos em sólidos (BERTOLINI et al., 2001). A microencapsulação de compostos aromáticos (produtos voláteis) em matrizes carreadoras tornou – se importante por fornecer proteção contra reações de degradação e por aumentar a estabilidade do núcleo aromático (KANAKDANDE et al., 2007).

1.2.1 MATERIAIS DE PAREDE: GOMA ARÁBICA E MALTODEXTRINA

Gomas são compostos de alta massa molecular, de natureza polissacarídica, parcial ou totalmente dispersíveis em água e insolúveis em solventes apolares. Essas substâncias ocorrem em certos órgãos da planta, como caule e raízes e são resultantes de lesões sofridas pelo vegetal devido a traumatismos e ação de micro - organismos (SIMÕES et al., 2004b).

As principais gomas, do ponto de vista econômico e industrial são a goma arábica (produzida por *Acacia senegal* (L.) Willd. e outras espécies do gênero, família Mimosaceae), goma caraia (extraída de *Sterculia tomentosa* Guill. et Perr. e *Sterculia urens* Roxb., família Sterculiaceae ou de *Cochlopermum gossypium* (L.) DC., família Bixaceae), goma gati obtida de *Anogeissus latifolia* (Roxb. ex DC.) Wall. ex Bedd., família Combretaceae e goma adraganta extraída de *Astracantha gummifera* (Labill.) Podl. (sin. *Astragalus gummifer* Labill.), família Fabaceae (LOPES et al., 1991).

A goma arábica, mais utilizada, é o produto do exsudado pelo tronco de espécies do gênero *Acacia*, espontâneas e cultivadas em diversas regiões tropicais e subtropicais. O material aparece nas árvores sob forma de fragmentos irregulares ou ovóides de dimensões variadas, incolores ou levemente amarelados, duros e friáveis. O constituinte majoritário é um polissacarídeo ácido, com ramificações

complexas, constituído de *D* – galactose (32%), *L* – arabinose (38%), ácido *D* – glicurônico (18%) e *L* – ramnose (12%) (TOOD et al., 1990). Goma arábica é usada principalmente em formulações farmacêuticas orais e tópicas, como um agente de suspensão e emulsificação, muitas vezes em combinação com goma adraganta. É também usada na preparação de pastilhas e como aglutinante em comprimidos, embora se usada sem cautela possa produzir comprimidos com um tempo de desintegração prolongada (ROWE e KIBBE, 2009). Também foi avaliada como um bioadesivo (ATAMMA et al. 2003); e tem sido utilizada em comprimidos de liberação modificada (BAHARDWAJ et al., 2000).

Goma arábica é um agente muito eficaz em processos de encapsulação, devido sua funcionalidade colóide. Produz emulsões estáveis com a maioria dos óleos em uma ampla faixa de pH. Goma arábica é compatível com a maioria das gomas, amidos, carboidratos e proteínas. O custo e a oferta limitada têm restringido o uso de goma arábica em processos de encapsulamento (KRISHNAN et al., 2005). Contudo, as pesquisas crescem na área de desenvolvimento de um polímero de baixo custo ou misturas de polímeros, com capacidade de encapsular aromas com a mesma ou maior eficiência que a goma arábica (KANAKDANDE et al., 2007).

O amido hidrolisado, chamado maltodextrina, quando o equivalente dextrose é inferior a 20, são frequentemente utilizados como material de parede, devido à seu baixo custo, sabor agradável, alta solubilidade em água (até 75%) e a baixa viscosidade das soluções que forma. Mas sua principal deficiência é a falta de capacidade emulsificante (TURCHIULI et al., 2005). O Food and Drug Administration (FDA) qualifica a maltodextrina $[(C_6H_{12}O_5)_n.H_2O]$ como um polímero sacarídeo nutritivo não doce que consiste de unidades de *D* – glicose ligadas principalmente por cadeia α (1-4). Apresenta – se como pó branco ou solução concentrada pela hidrólise parcial do amido de milho com ácidos e/ou enzimas.

As maltodextrinas possuem como propriedades funcionais a capacidade de estabilização das emulsões, mesmo não tendo capacidade emulsificante são combinadas com emulsificantes como goma arábica ou amidos especialmente modificados para fornecer a necessária estabilização da emulsão; a propriedade de formação de película, uma vez que na encapsulação de voláteis, a qualidade do produto final é afetada pela facilidade do material de parede de formar película ou membrana seletiva em torno do material ativo e pela qualidade da película; a maltodextrina com DE baixa não é muito higroscópica e, aromatizantes

microencapsulados com este material fornecem pós de escoamento livre, a higroscopicidade aumenta com o aumento da DE; a viscosidade das emulsões de maltodextrina é baixa e decresce com o aumento da DE. Além disso, têm excelente solubilidade em água fria e seu uso na microencapsulação de óleos essenciais é extensamente estudado (KEYNON e ANDERSON, 1988).

Portanto, o uso de misturas de goma arábica e maltodextrina aparecem para oferecer uma boa relação entre custo e eficácia. No caso do encapsulamento de substâncias voláteis por *spray drying*, tem sido demonstrado que a retenção dessas substâncias depende da relação entre goma arábica e maltodextrina, com uma ótima retenção para relações de peso entre 3 : 2 e 2 : 3 (BHANDARI et al., 1992). A mistura de goma arábica e maltodextrina foi relatada como eficaz na microencapsulação do óleo de cardamomo usando *spray dryer* (SANKARIKUTTY et al., 1988) e Zhang et al. (2007) utilizaram a mistura de maltodextrina (60%) e goma arábica (40%) para a microencapsulação das procianidinas das sementes de uva obtendo bons resultados e demonstrando que a estabilidade dos produtos foi, obviamente melhorada pela secagem em *spray dryer*.

Diante do exposto, o presente trabalho trata da microencapsulação do óleo essencial dos frutos de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel – Fabaceae) empregando a técnica de nebulização - *spray drying*, utilizando como material de parede goma arábica e maltodextrina, sendo este o primeiro estudo com aplicação tecnológica para desenvolvimento de um produto fitofarmacêutico a partir do óleo essencial de sucupira.

1.3 METODOLOGIA ANALÍTICA E VALIDAÇÃO

Os óleos essenciais são misturas complexas que têm em sua constituição compostos sesquiterpênicos (C₁₅) e na maioria das vezes, técnicas cromatográficas eficazes são necessárias para a separação ideal e identificação ou o isolamento desses componentes individuais (MERFORT, 2002).

No passado vários foram os trabalhos focados em métodos cromatográficos para análise de sesquiterpenos (BARRON, 1991). E nesse meio tempo novas metodologias analíticas têm sido desenvolvidas. Kubeczka (1991) propôs que os métodos analíticos aplicados à análise de óleos essenciais com foco em sesquiterpenos podem ser métodos cromatográficos como a cromatografia a gás (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia por fluido

supercrítico (SFC), incluindo técnica multidimensional e cromatografia de acoplamento resultando na separação dos componentes individuais.

A separação relativamente eficiente obtida por CG adiou a aplicação de CLAE para análise de compostos voláteis, como os sesquiterpenos (MERFORT, 2002). Contudo, análises em CLAE para essa classe de compostos tem sido bem descritas, por oferecem algumas vantagens em comparação com CG, como a possibilidade de análise de substâncias termolábeis (BOS et al., 1996). A restrição para a aplicação de CLAE na análise de sesquiterpenos é inerente ao número limitado de detectores comumente disponíveis, mas o acoplamento com o detector de arranjo de diodos (*Photodiode Array* – PDA) é bastante útil (MOREAU et al., 1992).

A técnica de CLAE para sesquiterpenos pode ser usada no controle de qualidade de plantas medicinais, quando estes compostos servirem como marcadores (HÄNSEL et al., 1982).

Independentemente da técnica cromatográfica ou da metodologia aplicada, um método analítico é seguro dentro de limites pré-estabelecidos, ou seja, a segurança de um método é definida por sua validação (GIL, 2007). A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada desde que sejam avaliados os parâmetros requeridos pela RE nº 899 de 29 de maio de 2003 de acordo com a categoria em que a substância de análise se enquadre (BRASIL, 2003).

Assim, buscou – se inovar com o desenvolvimento e validação de metodologia analítica CLAE para quantificação do marcador β -cariofileno no óleo essencial *in natura* e nas microcápsulas contendo o óleo essencial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Os frutos de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel) foram coletados (após queda espontânea) no município de Correntina, no estado da Bahia, Brasil, nos meses de agosto e setembro de 2007 a 13° 22' 50" Sul e 44° 37' 02" Oeste; 561 m de altitude, e doadas pelo Viveiro Ipê LTDA (Goiânia – Goiás) sob responsabilidade do Eng. Florestal Clayton Alves Trindade. Os frutos foram triturados em moinho de facas Willye (Tecnal) e o material moído foi armazenado em freezer a -20°C para evitar perda do óleo essencial.

2.1.1 MATERIAL ENCAPSULANTE

Foi empregado no processo de formação da parede das microcápsulas contendo o óleo essencial de *P. emarginatus*, goma arábica da marca Vetec® - Brasil de grau analítico (PA) e teor mínimo de pureza de 85% (Lote: 0905138; Fabricação: 08/2009 e Validade: 08/2014) e maltodextrina com equivalente dextrose de 4-7 da marca Sigma-Aldrich® Co.St.Louis (Lote: MKBD3622; Fabricação: 06/09/2010 e Validade: 14/12/2015).

2.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Os frutos triturados foram submetidos ao processo de hidrodestilação em aparato tipo Clevenger e ao processo de extração por arraste a vapor (Figura 2), durante o período de 4 horas. A técnica de extração por arraste a vapor foi empregada para obtenção do óleo essencial em larga escala. O rendimento em porcentagem (v/p) foi calculado em relação à massa inicial (g) dos frutos empregados na extração. Após a extração, o óleo foi acondicionado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração (freezer -20°C) e ao abrigo de luz, para as análises posteriores.

Figura 2 – Equipamento de arraste a vapor (Linax) – EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília - abril/2011).



Fonte: Próprio autor.

2.2.1 Hidrodestilação em Aparato de Clevenger

Uma massa de aproximadamente 60 g dos frutos foi transferida para balão de 1000 mL, foram adicionados 600 mL de água e o aquecimento a aproximadamente 100°C foi mantido durante todo o período de extração de 4 horas. O óleo essencial foi obtido em processo de hidrodestilação em aparato tipo Clevenger.

2.2.2 Arraste a vapor

Aproximadamente 450 g dos frutos moídos foram transferidos para o reservatório do equipamento de arraste a vapor que apresenta ciclo de água contínua vindo diretamente do sistema sanitário (torneira – água potável). Essa água não entra em contato com a amostra, a mesma é aquecida por uma camisa externa de calor, evapora e o vapor passa através do reservatório em que se encontram os frutos triturados e arrastam consigo as substâncias voláteis.

2.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE

2.3.1 Determinação da densidade do óleo essencial de sucupira

Para determinação da densidade relativa do óleo essencial foi utilizado picnômetro limpo e seco de 5 mL calibrado através da determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água recém destilada, a 25°C. Em seguida, o óleo essencial foi transferido para o picnômetro à temperatura de 25°C, o excesso de óleo foi removido e o picnômetro pesado, seguindo a técnica da Farmacopéia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010). Para o cálculo de densidade

obteve-se a diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa foi determinada pela razão entre a massa do óleo essencial e a massa de água, ambas a 25°C. O experimento foi realizado em triplicata.

2.3.2 Determinação do índice de refração do óleo essencial de sucupira

Uma alíquota do óleo essencial foi colocada sob a superfície do refratômetro (Shimadzu – Milton Roy Company), previamente calibrado com água destilada ($n_D^{20} = 1,3330$) e o índice determinado sob luz de sódio no comprimento de 589,3 nm (raia D a 25°C) segundo estabelecido na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010). Experimento realizado em triplicata.

2.3.3 Determinação do pH do óleo essencial de sucupira

O pH do óleo essencial foi medido em triplicata em um pHmetro da marca Tecnal modelo TEC-3MP a temperatura de 25°C, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0 (Vetec®, Brasil).

2.3.4 Verificação do perfil cromatográfico por CCD

O óleo essencial foi diluído em metanol PA na proporção de 10 µL para 1000 µL (1 : 100) e 20 µL da solução foi aplicado na cromatoplaça de sílica gel F₂₅₄ (Chromatoplates Alugram, Germany) de 4 x 10 cm e espessura de 0,25 cm. Para avaliação da presença do composto (E) – cariofileno (β – cariofileno), foi empregado a substância referência (-)-*trans*-caryophyllene (pureza $\geq 98,5\%$ Sigma – Aldrich®) na mesma proporção de 1 : 100 em metanol e aplicação de 10 µL na fase estacionária de sílica. A fase móvel usada foi composta de hexano PA : acetato de etila PA na proporção de 90 : 10 respectivamente. Após a corrida cromatográfica o cromatograma foi desenvolvido com solução de vanilina sulfúrica solução reagente (SR). O cálculo do fator de retenção (R_F) foi realizado dividindo – se a distância percorrida pela banda pela distância percorrida pela fase móvel.

2.4 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL POR CG/EM

As análises do óleo essencial para investigação do perfil cromatográfico por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu QP 5050A, utilizando-se uma coluna capilar de sílica

fundida CBP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). A vazão foi de 1,0 mL min⁻¹ para o Hélio como gás de arraste sob fluxo constante, com temperatura inicial de 60°C, mantida por 2 minutos, e depois aquecimento, primeiramente à taxa de 3°C/min até 240°C, seguida de 10°C/min até 280°C e, permanente de 280°C por 10min, sendo a energia de ionização de 70 eV. O volume de injeção foi de 1 μL da amostra diluída em CH₂CL₂ na proporção de 1 : 5. Os componentes individuais do óleo foram caracterizados por comparação dos espectros de massa e os índices de retenção foram calculados com referência a uma seqüência linear de n-alcanos C8 – C36 (ADAMS, 2007).

2.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO MARCADOR β -CARIOFILENO POR CLAE

O método foi desenvolvido em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters® (Massachussets, USA) equipado com bomba quaternária, módulo de separação e2695 com detector de *Photodiode Array* (PDA 2998) que permitiu a realização da varredura no UV-visível permitindo determinar máximos de absorção e definição do melhor comprimento de onda (λ) para detecção e quantificação do β -cariofileno, sendo estabelecido através da varredura o comprimento de onda fixo do método de 210 nm (λ = 210 nm). O sistema de processamento de dados foi o *Empower 2.0*. As etapas de desenvolvimento do método analítico de quantificação do marcador β -cariofileno estão representadas na Tabela 1. O método codificado como: “*OE Sucupira T10*” selecionado, foi submetido ao procedimento de validação conforme regulamentação da Resolução 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

A fase estacionária utilizada no desenvolvimento e na aplicação do método foi uma coluna C8 (Octilsilano, grupo *octyl* ligado à sílica) da Phenomenex® (250 mm x 4,6 mm, 5 μm , *Luna*) e a fase móvel selecionada (Tabela 1) foi composta por Acetonitrila (ACN) grau HPLC, Metanol (MetOH) grau HPLC e Água ultrapura (H₂O Milli-Q®) na razão de (75 : 10 : 15), o sistema foi mantido sob condição isocrática a temperatura ambiente. O fluxo do sistema foi de 1,3 mL min⁻¹ e o volume de injeção do padrão externo de β -cariofileno e do óleo essencial foi de 10 μL , o tempo de corrida foi de 21 minutos. A validação foi realizada de acordo com o preconizado

pela RE nº 899/2003 para Categoria I referente aos testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.

Tabela 1 – Etapas de desenvolvimento da metodologia analítica CLAE para quantificação do marcador β – cariofileno.

Código Método	Condições Cromatográficas	Resultado
OE Sucupira T01	Fase Estacionária: C8 Phenomenex [®] (250 x 4,6mm) Fase Móvel: ACN:MetOH (80:20) Fluxo: 1,0 mL min⁻¹ $\lambda = 210$ nm	Picos sobrepostos
OE Sucupira T02	Fase Estacionária: C8 Phenomenex [®] (250 x 4,6mm) Fase Móvel: ACN ácida 0,5%:MetOH (80:20)* Fluxo: 1,0 mL min⁻¹ $\lambda = 210$ nm	Não apareceram picos
OE Sucupira T03	Fase Estacionária: C8 Phenomenex [®] (250 x 4,6mm) Fase Móvel: ACN:MetOH (60:40)* Fluxo: 1,0 mL min⁻¹ $\lambda = 210$ nm	Divisão do pico do β -cariofileno em dois
OE Sucupira T04	Fase Estacionária: C8 Phenomenex [®] (250 x 4,6mm) Fase Móvel: ACN:MetOH (90:10)* Fluxo: 1,0 mL min⁻¹ $\lambda = 210$ nm	Separou melhor os picos
OE Sucupira T05	Fase Estacionária: C8 Phenomenex [®] (250 x 4,6mm) Fase Móvel: ACN:MetOH:H₂O (90:5:5)* Fluxo: 1,0 mL min⁻¹ $\lambda = 210$ nm	Levou a maior separação dos picos; picos mais isolados
OE Sucupira T06	Fase Estacionária: C8 Phenomenex [®] (250 x 4,6mm) Fase Móvel: ACN:MetOH:H ₂ O (90:5:5) Fluxo: 0,7 mL min⁻¹* $\lambda = 210$ nm	Pico do β -cariofileo quase isolado
OE Sucupira T07	Fase Estacionária: C8 Phenomenex [®] (250 x 4,6mm) Fase Móvel: ACN:MetOH:H₂O (80:10:10)* Fluxo: 0,7 mL min⁻¹ $\lambda = 210$ nm	Pico do β -cariofileno bem isolado; tempo de retenção elevado
OE Sucupira T08	Fase Estacionária: C8 Phenomenex [®] (250 x 4,6mm) Fase Móvel: ACN:MetOH:H ₂ O (80:10:10) Fluxo: 1,0 mL min⁻¹* $\lambda = 210$ nm	Pico bem isolado, porém houve pequena alteração do tempo de retenção.
OE Sucupira T09	Fase Estacionária: C8 Phenomenex [®] (250 x 4,6mm) Fase Móvel: ACN:MetOH:H₂O (75:10:15)* Fluxo: 1,0 mL min⁻¹ $\lambda = 210$ nm	Melhor resolução do pico; alto tempo de retenção
OE Sucupira T10	Fase Estacionária: C8 Phenomenex[®] (250 x 4,6mm) Fase Móvel: ACN:MetOH:H₂O (75:10:15) Fluxo: 1,3 mL min⁻¹* $\lambda = 210$ nm	Melhor resolução do pico e melhor tempo de retenção.

*Parâmetro avaliado

2.5.1 Conformidade do Sistema (“System suitability”)

Os parâmetros a serem medidos e seus limites recomendados, de acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA), estão na Tabela 2. Tipicamente, no

mínimo dois destes critérios são requeridos para garantir a conformidade do sistema. Neste trabalho, os parâmetros de conformidade do sistema avaliados foram a resolução (R_s), fator de cauda (TF) e o número de pratos teóricos (N).

Tabela 2 – Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações.

Parâmetro	Recomendação
Fator de retenção (k)	O pico deve estar bem separado de outros picos e do pico correspondente ao tempo de retenção de um composto não retido (t_M), $k > 2$
Repetitividade (RSD)	$RSD < 1\%$ para $n > 5$
Resolução (R_s)	$R_s > 2$ entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo (impureza, produto de degradação ou outras substâncias)
Fator de cauda (TF)	$TF \leq 2$
Número de pratos teóricos da coluna (N)	Em geral deve ser > 2000 para CLAE

Fonte: (FDA, 2001) e (RIBANI et al. 2004).

2.5.2 Validação de metodologia analítica

2.5.2.1 Seletividade

O parâmetro seletividade foi avaliado através de varredura pelo detector PDA na faixa de absorção no ultravioleta (UV) de 190 a 400 nm sendo determinado o perfil de absorção do diluente metanol grau HPLC, do padrão de β -cariofileno, e do óleo essencial de sucupira.

2.5.2.2 Linearidade e intervalo

No critério de linearidade, foram utilizadas sete concentrações diferentes que variam de 50% a 150% da concentração do teste, ou seja, dentro e nos extremos da faixa de aceitação, tanto para o padrão quanto para o óleo essencial. Foram utilizadas para a realização do teste 3 replicatas de cada concentração, dessa forma obteve-se três curvas de calibração com soluções de concentração de β -cariofileno entre 10 e 167 $\mu\text{g/mL}$ (10,41 $\mu\text{g/mL}$; 20,82 $\mu\text{g/mL}$; 41,65 $\mu\text{g/mL}$; 62,48 $\mu\text{g/mL}$; 83,31 $\mu\text{g/mL}$; 104,14 $\mu\text{g/mL}$; 166,33 $\mu\text{g/mL}$) preparadas em metanol grau HPLC. O desvio padrão relativo entre as áreas dos picos foi calculado e o coeficiente de correlação da curva de calibração estabelecido. A curva foi plotada no programa OriginPro8.

2.5.2.3 Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermediária)

A precisão foi avaliada pela determinação da concentração de três pontos da curva analítica (níveis baixo, médio e alto) em triplicata ao nível de repetibilidade. A precisão intermediária foi verificada da mesma forma por outro analista em dia diferente. As medidas estatísticas de tendência central (média), de variabilidade (desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR)) e as medidas de posição (máximo e mínimo) foram calculadas através do programa Microsoft Excel 2007 para Windows e os valores obtidos seguindo a especificação da RE nº 899/2003 deviam apresentar coeficiente de variação menor que 5% (CV < 5% ou DPR < 5%).

2.5.2.4 Exatidão

Foi verificada a exatidão adicionando-se quantidades conhecidas (concentração equivalente a 15,37 µg/mL) do padrão de β-cariofileno às soluções de óleo essencial em três concentrações diferentes: 50%, 100% e 150%, cobrindo a faixa de recuperação que varia de 90% a 110%. A exatidão do método foi reportada pela proximidade dos resultados obtidos das amostras de β-cariofileno em relação ao valor teórico, através da equação que segue:

$$Exatidão = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

2.5.2.5 Robustez

Considerando que o atributo robustez verifica a capacidade que um método analítico apresenta em fornecer resultados inalterados quando sujeito a pequenas mudanças, para avaliação deste parâmetro, foram analisadas as variações de fluxo, mudança na proporção dos componentes da fase móvel e alteração no comprimento de onda do método. O fluxo de 1,3 mL min⁻¹ foi alterado para 1,2 e 1,4 mL min⁻¹; a razão (ACN : MetOH : H₂O) na fase móvel de (75 : 10 : 15) foi modificada para (80 : 10 : 10) e (70 : 15 : 15) e os comprimentos de onda ficaram 209 nm e 211 nm. Calculou-se o desvio padrão relativo entre as áreas dos picos de β-cariofileno em cada alteração em relação à área do método original definindo-se DPR < 5%, já que a resolução não estabelece limite de variação.

2.5.2.6 Limites de detecção e quantificação

Foram confeccionadas três curvas de calibração contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação do marcador. Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) foram calculados pelas equações:

$$LD = DP_a \times 3 / IC \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = DP_a \times 10 / IC \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

DP_a: desvio padrão do intercepto com o eixo Y das três curvas de calibração construídas;

IC: é a inclinação da curva de calibração.

2.5.3 Co-validação da metodologia analítica para as microcápsulas

Visto que as microcápsulas formam um sistema diferenciado que contem o óleo essencial e consequentemente o marcador β-cariofileno é necessário a realização das análises de seletividade e precisão ao nível de repetibilidade para confirmação do uso do método proposto para quantificação do marcador nesta nova matriz.

2.5.3.1 Seletividade nas microcápsulas

Este parâmetro foi avaliado através de varredura pelo detector PDA na faixa de absorção no ultravioleta (UV) de 190 a 400 nm sendo determinado o perfil de absorção do diluente metanol grau HPLC, do padrão de β-cariofileno, e do óleo essencial de sucupira, do material de parede goma arábica matéria-prima diluída em metanol e da maltodextrina matéria-prima diluída em metanol grau HPLC.

2.5.3.2 Precisão (nível repetibilidade) para microcápsulas

A precisão foi avaliada pela determinação da concentração de três pontos da curva analítica (níveis baixo, médio e alto) em triplicata ao nível de repetibilidade para as microcápsulas. A extração do óleo essencial das microcápsulas foi realizada em ultrassom por 40 minutos, onde pesou-se 0,1 g de microcápsulas para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com metanol grau HPLC. Em

seguida, a solução foi filtrada em papel de filtro e em filtro de 0,45 µm (Millex®) e injetada no sistema para quantificação do marcador β–cariofileno.

2.5.4 Curva de calibração com o óleo essencial de *P. emarginatus*

Sabe-se que a substância pura dentro de um intervalo pré–estabelecido deve apresentar comportamento linear. Contudo, estudos buscam mostrar o perfil de marcadores definidos em matrizes complexas para verificação de seu comportamento linear ou não, avaliação de resposta linear do marcador no óleo essencial. Dessa forma, construiu-se uma curva analítica (65,01 µg/mL; 66,11 µg/mL; 104,14 µg/mL; 106,69 µg/mL 145,76 µg/mL) com o óleo essencial dos frutos de *P. emarginatus* para avaliação do comportamento do marcador β–cariofileno nesta matriz complexa. A curva foi plotada no programa OriginPro8.

2.6 OBTENÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

Foram preparados dois lotes de emulsões contendo óleo essencial (OE) : goma arábica (G) : maltodextrina DE (4-7) (M) em água destilada (p/p) nas proporções de 1 : 2 : 3,6 (E1) e 1 : 3 : 3,6 (E2); dois lotes de dispersões de óleo essencial : goma arábica em água destilada (p/p) nas proporções de 1 : 2 (E3) e 1 : 3 (E4); um lote de dispersão de óleo essencial : maltodextrina em água destilada (p/p) na proporção de 1 : 3,6 (E5). Primeiramente, o óleo essencial e a água destilada foram pesados juntos em um mesmo béquer, em seguida a goma arábica foi pulverizada sobre a mistura de água/óleo com o sistema sob agitação constante de ± 300 rpm em agitador mecânico convencional (Tecnal), após incorporação de toda goma arábica foi adicionada aos poucos a maltodextrina DE (4-7). Essa mistura emulsionada pela goma arábica e estabilizada pela maltodextrina foi submetida à agitação em um agitador mecânico digital (Tecnal TE 039/1) a 900 rpm por 40 minutos, afim de se obter uma emulsão homogênea e microcápsulas com menores diâmetros. As emulsões obtidas pela dispersão de somente um dos materiais de parede foram obtidas pela mesma técnica, contudo após a incorporação só da goma ou só da maltodextrina o material foi levado direto para agitação por 40 minutos.

As emulsões foram nebulizadas (atomizadas) e secas em um *spray dryer* LABMAQ modelo MSD 1.0, equipado com uma câmara cilíndrica de 50 cm da altura por 9 cm de diâmetro, o bico aspensor é do tipo duplo fluido e o sistema de

alimentação é feito por uma bomba peristáltica. As variáveis vazão de alimentação, tamanho do bico de aspersão (diâmetro do bico) e temperatura, foram selecionados através de triagem morfológica das microcápsulas e de seus tamanhos através de imagens obtidas por MEV e pelo processamento dessas imagens pelo Programa IMAGE J, a fim de se obter os parâmetros de secagem mais adequados (Tabela 3).

Tabela 3 – Avaliação dos parâmetros de secagem em *spray dryer* para obtenção de microcápsulas do óleo essencial de sucupira.

Secagem	Emulsão	Proporção dos componentes	Condições de Secagem
1	E2	OE : G : M (1 : 3 : 3,6)	Bico de 1,2 mm* Temperatura de entrada = 130°C Fluxo de alimentação = 4 mL/min Fluxo de ar = 40 L/min Pressão = 60 psi
2	E2	OE : G : M (1 : 3 : 3,6)	Bico de 1,0 mm* Temperatura de entrada = 130°C Fluxo de alimentação = 4 mL/min Fluxo de ar = 40 L/min Pressão = 60 psi
3	E2	OE : G : M (1 : 3 : 3,6)	Bico de 0,7 mm* Temperatura de entrada = 130°C Fluxo de alimentação = 4 mL/min Fluxo de ar = 40 L/min Pressão = 60 psi
4	E2	OE : G : M (1 : 3 : 3,6)	Bico de 1,2 mm Temperatura de entrada = 100°C* Fluxo de alimentação = 4 mL/min Fluxo de ar = 40 L/min Pressão = 60 psi
5	E2	OE : G : M (1 : 3 : 3,6)	Bico de 1,2 mm Temperatura de entrada = 160°C* Fluxo de alimentação = 4 mL/min Fluxo de ar = 40 L/min Pressão = 60 psi
6	E2	OE : G : M (1 : 3 : 3,6)	Bico de 1,2 mm Temperatura de entrada = 130°C Fluxo de alimentação = 5 mL/min* Fluxo de ar = 40 L/min Pressão = 60 psi

Nota: OE = Óleo essencial; G = goma arábica; M = Maltodextrina DE (4-7); E2 = emulsão 2;
*Parâmetro avaliado.

Os resultados de número e tamanho de partículas foram apresentados, após receberem tratamento em planilha eletrônica do Microsoft Excel 2007, os cálculos estão descritos detalhadamente no Item 2.9.

2.6.1 Determinação da viscosidade das emulsões

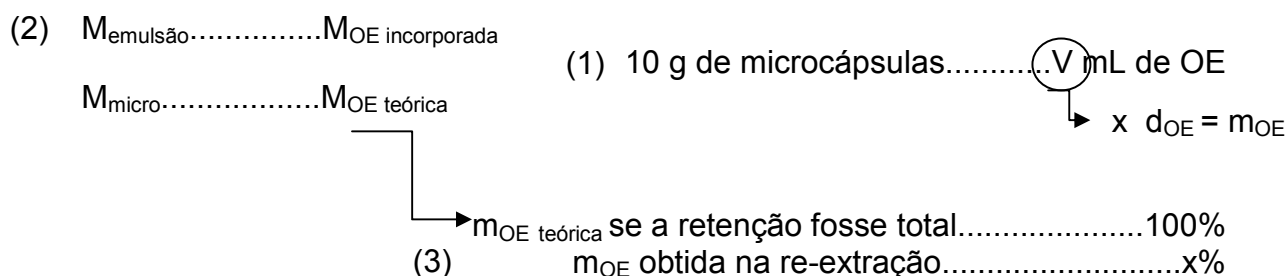
A viscosidade das emulsões mostra relação com o número e o tamanho das partículas formadas. O teste de viscosidade foi realizado em um viscosímetro de Brookfield da marca Quimis[®] utilizando aproximadamente 80 g de emulsão, com spindle 2 (S2) à temperatura média de 26°C.

2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA NAS MICROCÁPSULAS

A atividade de água (a_w) nas microcápsulas foi medida através do analisador de atividade de água da marca TESTO[®] (AG, Germany) modelo 650. Foram utilizados aproximadamente 250 mg de microcápsulas inseridas no frasco coletor do equipamento e a leitura da atividade de água da amostra foi realizada em triplicata, com o equipamento calibrado a temperatura média de 22,7°C.

2.8 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Aproximadamente 10 g de microcápsulas foram transferidas para um balão de fundo redondo de 250 mL ao qual foram adicionados 100 mL de água destilada, seguindo-se o processo de hidrodestilação em aparato tipo Clevenger durante 4 horas. A determinação do óleo total retido nas microcápsulas foi obtida pelo volume de óleo recolhido no aparato multiplicado pela densidade do óleo essencial (RAMOS, 2006; ANKER; REINECCIUS 1988). O percentual de óleo essencial total retido foi calculado segundo regra de três simples, levando-se em consideração o rendimento de microcápsulas (massa final) ao final do processo de secagem. Modelo:



Onde:

$M_{\text{emulsão}}$ = massa da emulsão antes da secagem em gramas;

M_{OE} = massa da óleo essencial incorporada na emulsão em gramas;

M_{micro} = massa de microcápsulas ao final do processo de secagem;

V = volume de óleo essencial obtido no aparato de Clevenger em mL;

d_{OE} = densidade da óleo essencial em g/mL;

m_{OE} = massa de óleo essencial em gramas.

2.9 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA

As partículas foram analisadas com o auxílio do programa de análise de imagens *IMAGE J* 1.36b. Foram avaliadas quatro imagens de cada processo de secagem de modo a varrer um amplo campo de observação. Primeiramente, as imagens foram convertidas do padrão RGB para imagens em escala de cinza 8-Bit de 640-480 pontos, apresentando níveis de cinza com intensidade entre 0 e 255. Cada imagem foi então binarizada, utilizando a mediana do histograma do nível de cinza como parâmetro de binarização (PUGNALONI et al., 2005). Após a escala das imagens foi determinada através de uma conversão de pontos para micrômetros e, então, foram feitas as medidas de área, circularidade e perímetro das estruturas delimitadas pelas micropartículas. Considerando estas como perfeitamente esféricas, pode-se calcular o diâmetro médio superficial das partículas. Em seguida, esses parâmetros receberam tratamento estatístico em planilha eletrônica (Microsoft Excel 2007) para cálculo do *sauter* [3,2] que é o parâmetro de diâmetro estatístico que relaciona volume e área. Os diâmetros: máximo e mínimo, encontrados nas amostras, demonstram o espalhamento da distribuição.

2.10 MORFOLOGIA DAS MICROCÁPSULAS

2.10.1 Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV)

As microcápsulas contendo o óleo essencial de *sucupira* foram distribuídas em uma fita de carbono própria para impregnação do material de estudo e submetidas à etapa de deposição de filmes de ouro na cápsula do equipamento Denton Vacuum (Desk V). Após a deposição dos filmes de ouro o material foi levado para análise no microscópio eletrônico de varredura (MEV), JEOL® modelo JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) do Instituto de Física da UFG (IF/UFG).

2.10.2 Difração de Raios – X (DRX)

A análise foi realizada em um difratômetro da marca Shimadzu (LabX DRX Diffractometer) modelo DRX - 6000 sob varredura de 2θ (ângulos de 10 a 80 graus). Essa análise foi realizada apenas para as microcápsulas obtidas de E2. Esta análise foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da UFG (IQ/UFG).

2.11 ESTUDO DE ESTABILIDADE

Aproximadamente 15 g de microcápsulas de E2 foram submetidas à temperatura de 25°C, sob condição de 60% de umidade relativa (UR), por um período de 45 dias em uma estufa de cultura (previamente limpa de forma asséptica) da marca FANEM modelo 002CB adaptada para simular a umidade de 60% (UR). A amostra foi colocada em frasco de plástico (PVC) âmbar hermeticamente fechado até o momento de cada coleta, que foram realizadas de 5 em 5 dias para monitoramento do marcador β -cariofileno.

A determinação quantitativa do teor de β -cariofileno nas microcápsulas foi baseada na técnica apresentada no Item 2.5.3.2 deste capítulo. A massa de 0,1 g de E2 coletada foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, completou-se o volume com metanol grau HPLC e a solução foi submetida à extração em ultrassom por 40 minutos. Em seguida, a solução foi filtrada em papel de filtro e em filtro de 0,45 μm (Millex®) e injetada no sistema para quantificação do marcador.

4 CONCLUSÕES

O óleo essencial dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel obtido pelo processo de hidrodestilação simples em aparato tipo Clevenger e pelo método de arraste a vapor, apresentou composição química semelhante em ambos os métodos e a identificação química dos componentes desta fração realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas indicou o composto (E)-cariofileno, também chamado *trans*-cariofileno e β -cariofileno como composto majoritário (20,73%).

Os parâmetros de qualidade físico-químicos conferiram identidade ao óleo essencial dos frutos de *P. emarginatus*, servindo de base para futuros procedimentos de controle de qualidade.

A metodologia CLAE desenvolvida e validada para quantificação do composto β -cariofileno no óleo essencial e nas microcápsulas demonstrou ser linear ($r = 0,9998$), precisa aos níveis de repetibilidade e precisão intermediária (DPR = 1,12% e DPR = 2,76%, respectivamente), exata segundo método de recuperação (91,66 a 104,58%), robusta e com eficiência quanto aos limites de detecção e quantificação.

As melhores condições de secagem bem como a melhor proporção dos materiais de parede foram definidas para as microcápsulas do óleo essencial dos frutos de *P. emarginatus* Vogel. Sendo as melhores condições a temperatura de entrada de 160°C; fluxo de alimentação de 4 mL/min; fluxo do ar de aspersão de 40 L/min; e pressão de 60 psi para *spray dryer* de bancada da LabMaq. Dos cinco lotes de emulsões produzidos e testados a emulsão E2 (1OE : 3G : 3,6M) apresentou as melhores características morfológicas e de eficiência de encapsulação com 98,63% de retenção da óleo essencial.

A quantificação do composto β -cariofileno no óleo essencial extraído das microcápsulas por CG/EM e por CLAE mostraram que o processo de secagem em *spray dryer* não reduziu o percentual microencapsulado deste marcador para as microcápsulas de E2, evidenciando a eficácia da técnica de *spray drying* para microencapsulação de substâncias voláteis neste caso. Mas para os outros 4 lotes de microcápsulas houve redução de 29,95% a 44,71%.

A utilização dos polímeros goma arábica e maltodextrina levou a formação de microcápsulas com maior capacidade de retenção do óleo essencial de sucupira

apresentando microcápsulas de superfície lisa, sem deformações ou porosidade aparente. As análises por MEV foram imprescindíveis aos resultados deste estudo e nos permitiu avaliar as características morfológicas e o tamanho das microcápsulas produzidas, sendo que a maioria está na faixa de 0 a 5 μm .

Os cinco lotes de microcápsulas obtidos apresentaram baixa atividade de água o que dificulta a contaminação por agentes microbianos, coalescência das partículas e hidrólise de alguns constituintes ($E1 = 0,163$; $E2 = 0,090$; $E3 = 0,142$; $E4 = 0,276$; e $E5 = 0,164$).

A análise de difração de raios-X permitiu confirmar a encapsulação do óleo essencial, visto o perfil característico de material amorfo.

O estudo de estabilidade preliminar a 25°C e 60%UR nas microcápsulas resultou na manutenção de 70,55% do marcador β -cariofileno no período de 45 dias, sendo que até o decréscimo mais acentuado ocorreu nos primeiros 10 dias de estudo e depois até o 25º dia. Após o 25º dia a taxa de decréscimo ou perda do marcador manteve – se estável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th ed. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- AGUILERA, J.M.; STANLEY, D.W. **Microstructural Principles of Food Processing and Engineering**. 2nd ed. Gaithersburg: Aspen Publisher Corporation, 1999.
- ALAMILLA-BELTRÁN, L.; CHANONA-PÉREZ, J.J.; JIMÉNEZ-APARICIO, A.R.; GUTIÉRREZ-LOPÉZ, G.F. Description of morphological changes of particles along spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 179-184, 2005.
- ALMEIDA, S.P.; PROENA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998.
- ANKER, M.H.; RENCCIOUS, G.A. Encapsulation orange oil: Influence of spray dryer air temperatures on retention of shelf life. In: RISCH, S.J.; RENECCIOUS, G.A. **Flavor Encapsulation**. Washington DC: American Chemical Society, 1988. p. 78-86.
- ASCHERI, D.P.R.; MARQUEZ, M.O.M.; MARTUCCI, E.T. Estudo das características de adsorção de água e da estabilidade das microcápsulas de óleo essencial de laranja na seleção do material de parede. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 1-6, 2003.
- ATTAMA, A.A.; ADIKNU, M.V.; OKOLI, N.D. Studies on bioadhesive granules. **STP Pharma Science**, v. 13, p. 177–181, 2003.
- AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, p. 89-97, 2005.
- BAHARDWAJ, T.R.; KANWAR, M.; LAI, R.; GUPTA, A. Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, p. 1025-1038, 2000.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BALASSA, L.L.; FANGER, G.O. Microencapsulation in food industry. **CRC Critical Reviews Food Technology**, v. 2, p. 245–265, 1971.
- BARBOSA, S.J.; FONSECA, K.S.; NORTE, A.R.; CANO-CHAUCA, M. Análise de difração de raios – X em suco de Manga em pó obtido por *spray drying*. **III Fórum de Gestão, Pesquisa, Ensino e Extensão**, Universidade Estadual de Montes Claros, 2009.
- BARRON, D. HPLC – using diol-bonded silica, an alternative to silica gel in the prefractionation of aroma extracts. **Zeitschrift for Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v. 193, p. 454-459, 1991.

BERTOLINI, A. C.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. Stability of monoterpenes of encapsulated in gum arabic by *spray-dring*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 780-785, 2001.

BHANDARI, B. R.; DUMOULIN, E. D.; RICHARD, H. M. J.; NOLEAU, I.; LEBERT, A. Flavor encapsulation by *spray drying*: application to citral and linalyl acetate. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 217– 221, 1992.

BOS, R.; WOERDENBAG, H.J.; HENDRIKS, H.; ZWAVING, J.H.; DE-SMET, P.A.G.M.; TITTEL, G.; WIKSTROM, H.V.; SCHEFFER, J.J.C. Analytical aspects of phytotherapeutic Valerian preparations. **Phytochemical Analysis**, v. 7, p. 143-151, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2003.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). DOQ-CGCRE-008 de 2003. **Orientações sobre Validação de Métodos e Ensaio Químicos**. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS)**. Portaria nº 971/GM/MS, de 3 de maio de 2006. Secretaria de Políticas da Saúde, Ministério da Saúde, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Decreto nº. 5.813, 22 de junho de 2006. Secretaria de Políticas da Saúde, Ministério da Saúde, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), 2009**. Disponível em: www.saude.gov.br/renisus. Acesso em: 27 maio 2010.

BRASIL. FARMACOPÉIA BRASILEIRA I, 5ª ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 2010.

BUFFO, R. A.; PROBST, K.; ZEHENTBAUER, G.; LUO, Z.; REINNECCIUS, G. A. Effect of agglomeration on the properties of spray-dried encapsulated flavors. **Journal of Flavour & Fragrance**, v. 17, p. 292–299, 2002.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CAI, Y.Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* - Betacyanin Pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 1248-1252, 2000.

CASTRO, H. G.; OLIVEIRA, L.O.; BARBOSA, L.C.A; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R.; NASCIMENTO, E.A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, v. 27, p. 55-57, 2004.

CASTRO, H.G.; PERINI, V.B.M.; SANTOS, G.R.; LEAL, T.C.A.B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, p. 308-314, abr/jun 2010.

CHANONA, P.J.J.; ALAMILLA, B.L.; FARRERA, R.R.R.; QUEVEDO, J.M.; AGUILERA, J.M.; GUTIÉRREZ, L.G.F. Description of the convective air-drying of a food model by means of the fractal theory. **Food Science and Technology International**, v. 10, p. 207-213, 2003.

CHAMBLEE, T.S.; CLARK, B.C.; RADFORD, T.; LACOBUCCI, G.A. General method for the high performance liquid chromatography prefractionation of essential oils and flavor mixtures for gas chromatographic-mass spectrometric analysis: Identification of new constituents in cold pressed lime oil. **Journal of Chromatography A**, v. 330, p. 141-151, 1985.

CLARK, B.C.; JONES, B.B.; JACOBUCI, J.A. Characterization of the hydroperoxides derived from singlet oxygen oxidation of (+) – limonene. **Tetrahedron Supplement**, v. 37, p. 405-409, 1981.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 3012-3043, 2009.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A.M.; ALMANSA-LÓPEZ, E.; EGEA-GONZÁLEZ, F.J.; CASTRO-CANO, M.L.; FRENICH, A.G.; MARTÍNEZ-VIDAL, J.L. Correction fuction on biased results due to matrix effects: Application to the routine analysis of pesticide residues. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, p. 281-301, 2003.

DA LUZ DIAS, F.; TAKAHASHI, C.S.; SAKAMOTO-HOJO, E.T.; VICHNEWSKI, W., SARTI, S.J. Genotoxicity of the natural cercaricides 'Sucupira' oil and eremanthine in mammalian cells in vitro and in vivo. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, p. 338–344, 1995.

DEBRUNNER, B.; NEUENSCHWANDER, M.; BRENNEISEN, R. Sesquiterpenes of *Petasites hybridus* (L.) G.M. et Sch.: distribution of sesquiterpenes over plant organs. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, p. 167-173, 1995.

DELADINO, L.; NAVARRO, A.S.; MARTINO, M.N. Microstructure of minerals and yerba mate extract co – crystallized with sucrose. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 410-415, 2010.

DE OMENA, M.C.; BENTO, E.S.; DE PAULA, J.E.; SANTANA, A.E.G. Larvicidal diterpenes from *Pterodon polygalaeiflorus*. **Vector – Borne and Zoonotic Diseases**, v. 6, p. 216-222, 2006.

DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p.1361-1394, 2005.

DUTRA, R.C.; BRAGA, F.G.; COIMBRA, E.S.; SILVA, A.D.; BARBOSA, N.R. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 429-435, 2009a.

DUTRA, R.C.; PITTELLA, F.; FERREIRA, A.S.; LARCHER, P.; FARIAS, R.E.; BARBOSA, N.R. Efeito cicatrizante das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel em modelos de úlceras dérmicas experimentais em coelhos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 375-382, 2009b.

ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of antocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota* L.) by spray dryer. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 805-812, 2007.

EVANGELISTA, G.L.; SOUZA, A.N.C.; SANTOS, C.F.; CARDOSO, J.H.L.; LOPES, E.A.B.; SANTOS, M.V.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P.J.C. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 515-522, 2007.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, p. 510-523, 2010.

FARAGO, P.V.; RAFFIN, R.P.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; ZAWADKI, S.F. Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 1298-1305, 2008.

FASCIO, M.; MORS, W.B.; GILBERT, B.; MAHJAN, J.R.; MONTEIRO, M.B.; DOS SANTOS FILHO, D.; VICHNEWSKI, W. Diterpenoids furans from *Pterodon* species. **Phytochemistry**, v.15, p. 201-203, 1976.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO, S.C.; ROCHA, G.A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 103-112, 2008.

Federação da Indústria Farmacêutica (FEBRAFARMA). Disponível em: www.febrafarma.org.br. Acessada em dezembro de 2010.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; CAMPOS, M.M.; ARAÚJO, J.G.V.C.; PESQUERO, J.L.; AVELLAR, M.C.; TEIXEIRA, M.M.; CALIXTRO, J.B. Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activatin factor (PAF) on the upregulation of kinin B1 receptors in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, p. 973-981, 2003.

FRASER, R. P.; DOMBROWSKI, N.; ROUTLEY, J. H. The atomization of a liquid sheet by an impinging air stream. **Chemical Engineering Science**, v. 18, p. 339-353, 1963.

FREITAS, A. Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. In: Área de Economia da Saúde e Desenvolvimento – Núcleo Nacional de Economia da Saúde. **Ministério da Saúde, Secretaria Executiva**. Brasília – DF , out/2007. p. 1-28.

GARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIM, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GULDEN, Y.; ONGEN, G.; JONGBOOM, R. O. J.; FEIL, H.; HENNIC, W. E. Modulated release of volatile compounds from starch matrixes via enzymatically-controlled degradation. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 305-311, 2002.

GUENTHER, E.; AUTHAUSEN, D. The constituents of essential oils. In: GUENTHER, E. et al. **The Essential Oils**, 2nd ed.; Krieger Publishing: Malabar, FL, 1975; Vol. II, p. 141-299.

GIL, E.S. Assuntos regulatórios e sistemas de qualidade. In: GIL, E.S. (Org.) **Controle de Qualidade Físico – Químico de Medicamentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Pharmabooks, 2007. p. 44-48.

GUIMARÃES, E. C. B. T.; RODRIGUES, C. R.; DIAS, L. R. S.; DORNELAS, C. B.; CASTRO, H. C.; CABRAL, L. M.; SANTOS, T. C. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para o controle químico da qualidade de fitoterápicos à base de extratos secos de alcachofra. **Revista Fitos**, v. 3, p. 64-77, 2007.

HÄNSEL, R.; SCHULZ, J. Valerensäuren und valerenal als leitstoffe des offizinellen Baldrians. **Deutsche Apotheker Zeituig**, v. 122, p. 215, 1982.

HAWKIS, S.; BLEDSOE, H.; DUCAN, M. Encapsulation technologies for fragrance and cosmetic industries. **Cosmetics Toiletries Manufacture Worldwide**, p. 99-105, 2000.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E. M. **Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy**, London: Churchill Livingstone, 2004. p. 309.

HEISLER, E.G.; SICILIANO, J.; KALAN, E.B.; OSMAN, S.F. High-Performance Liquid Chromatographic determination of stress-induced sesquiterpenes of the potato (*Solanum tuberosum*). **Journal of Chromatography A**, v. 210, p. 365-369, 1981.

HYVONEN, H.; TORKKELI, H.; HAKKINEN, V.M.; RIEKKOLA, M.L.; LEHTONEN, P.J. Two dimensional separation of the essential oil of chamomile by online HPLC-HRCG. **Acta Pharmaceutica Fennica**, v. 100, p. 269-273, 1991.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 24, p. 289-297, 1991.

JAFARI, S.M.; HE, Y.; BHANDARI, B. Effectiveness of encapsulating biopolymers to produce sub-micron emulsions by high energy emulsification techniques. **Food Research International**, v. 40, p. 862-873, 2007.

KANAKDANDE, D.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R.S. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 536-541, 2007.

KEYNON, M.M.; ANDERSON, R.J. Maltodextrins and low-dextrose-equivalence corn syrup solids: production and technology for the flavor industry. In: RISCH, SARA, J.; REINECCIUS, G.A. **Flavor encapsulation**. Washington, DC: American Chemical Society, 1988.

KINDLEIN, W.J.; ROLDO, L.; FLORES, M.D.F.; JOHANN, D.; HAMMESTER, L. Microcápsulas: Uso da microtecnologia no Design de produtos inovadores. **Anais do 8º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Design**, 2007.

KRISHNAN, S.; KSHIRSAGAR, A.C.; SINGHAL, R.S. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 309-315, 2005.

KUBECZKA, K.H. Flavor. In: SHREIER, P. (Ed.) **New Methods in Essential Oil analysis**. Berlin: Gruyter. 1991. p. 345.

LEE, S.M.; GARAS, N.A.; WAISS, A.J. High-Performance Liquid Chromatographic determination of sesquiterpenoid metabolites in *Verticillium dahlia* infected cotton stele. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 490-493, 1986.

LEIMANN, F.V. **Microencapsulação de óleo essencial de Capim limão utilizando o processo de coacervação simples**. 2008. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

LOAYZA, I.; ABUJDER, D.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G.; DESLAURIERS, H.; JEAN, F.I. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 381-389, 1995.

LOPES, L.; ANDRADE, C.T.; MANO, E.B. O valor das gomas para a indústria. **Ciência Hoje**, v. 12, p. 65-67, 1991.

MATTIJS, N.; PERRIN, C.; MAFTOUH, M.; MASSART, D.L.; VANDER-HEYDEN, Y. Definition of system implementation of strategies for method development of chiral separations in normal – or reversed – phase liquid chromatography using polysaccharide – based stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1041, p. 119-133, 2004.

MCNAMEE, B. F.; WHITE, L. E.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Effect of partial replacement of gum arabic with carbohydrates on its microencapsulation properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3385–3388, 2001.

MERFORT, I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpenes lactones. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 115-130, 2002.

MENNA-BARRETO, R.F.S.; LARANJA, G.A.T.; SILVA, M.C.C.; COELHO, M.G.P.; PAES, M.C.; OLIVEIRA, M.M.; CASTRO, S.L. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. **Parasitology Research**, v. 103, p. 111-117, 2008.

MEYER, V. **Praxis der Hochleistungs-Flussigchromatographie**. Frankfurt: Diesterweg, Sauerlander, 1979.

MOREAU, R.A.; PREISIG, C.L.; OSMAN, S.F. A rapid quantitative method for the analysis of sesquiterpene phytoalexins by high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 3, p. 125-128, 1992.

MORIM, PH.; CAUDE, M.; RICHARD, H.; ROSSET, R. Semipreparative separation of terpenoids from essential oils by high-performance liquid chromatography and their subsequent identification by gas-chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 363, p. 37-56, 1986.

MORS, W.B.; PELLEGRINO, J.; SANTOS-FILHO, M.F. Ação profilática do óleo dos frutos de sucupira-branca, *Pterodon pubescens* Benth., contra a infecção pelo *Schistosoma mansoni*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 38, p. 325–330, 1976.

MÜLLER, P.S. **Microencapsulação do óleo essencial de laranja**. 2011. 99f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos de Curitiba, Universidade Federal de Curitiba, Curitiba, 2011.

NEWMAN, D.J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery?. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 2589-2599, 2008.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.S.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; CECHINEL-FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: Niero, R. et al. (Org.). **Ciências Farmacêuticas – Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003. p. 38-41.

NIERO, R. Fármacos, Fitofármacos e fitoterápicos: abordagem econômica e de Mercado. In: BRESOLIN, T..M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e Medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Editora Santos, 2010. p. 1-15.

NISHII, Y.; YOSHIDA, T.; TANABE, Y. Enantiomeric resolution of a Germacrene – D derivate by Chiral high performance liquid chromatography. **Biosciences, Biotechnology and Biochemical**, v. 61, p. 547-548, 1997.

OAKLEY, D. E. Produce uniform particles by spray drying. **Chemical Engineering Progress**, v. 10, p. 48–54, 1997.

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

OLIVEIRA, P.C. **Obtenção e caracterização do extrato seco padronizado dos frutos da sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel – Fabaceae)**. 2010. 152f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

OSORIO, C.; ACEVEDO, B.; HILLERBRAND, S.; CARRIAZO, J.; WINTERHALTER, P.; MOLARES, A.N. Microencapsulation by spray drying of Antocyanin pigments from Corozo (*Bactris guineensis*) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6977-6985, 2010.

PAIVA, E.A.S.; OLIVEIRA, D.M.T.; MACHADO, S.R. Anatomy and ontogeny of the pericarp of *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae, Faboideae), with emphasis on secretory ducts. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 80, p. 455-465, 2008.

PARK, S.J.; SHIN, Y.S.; LEE, J.R. Preparation and Characterization of Microcapsules Containing Lemon Oil. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 241, p. 502-508, 2001.

PARK, K. Recent developments in hydrogels – Preface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p.1-9, 2002.

PÉREZ-ALONSO, C.; BÁEZ-GONZÁLEZ, J.G.; BERISTAIN, C.I.; VERNON-CARTER, E.J.; VIZCARRA-MENDOZA, M.G. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. **Carbohydrates Polymers**, v. 53, p.197-203, 2003.

QUISPE-CONDORI, S.; SALDAÑA, M.D.A.; TERNELLI, F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 1880-1887, 2011.

RAMOS, M.F.S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a óleo essencial de copaíba por Spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica**. 2006. 132f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

RANKELL, A. S.; LIEBERMAN, H. A., SCHIFFMAN, R. F. Secagem. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001, vol. 1, p. 83-112.

RATTES, A.L.R.; OLIVEIRA, W.P. Spray drying conditions and encapsulating composition of effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. **Power Tecnology**, v. 171, p. 1-4, 2007.

RÉ, M.I. Microencapsulação: Em busca de produtos inteligentes. **Ciência Hoje**, v. 162, p. 24-29, 2000.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, A.; ARNAUD, P.; FRAZAO, S.; VENANCIO, F.; CHAUMEIL, J.C. Development of vegetable extract by microencapsulation. **Journal of Microencapsulation**, v. 14, p. 735-742, 1997.

RISCH, S.J. Encapsulation of flavors by extrusion. In: RISCH, S.J. REINNECCIUS, G.A. **Flavor Encapsulation**. Washington D.C.: Americal Chemical Society, 1988. p. 103-109.

ROCHA, G.A.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, 2011. (Article in Press)

RODRIGUEZ-HUEZO, M. E.; PEDRIZA-ISLAS, R.; PRADO-BARRAGAN, L. A.; BERISTAIN, C. I.; VERNON-CARTER, E. J. Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. **Journal of Food Science**, v. 69, p. 351-359, 2004.

ROSA, E.D.; TSUKADA, M.; FREITAS, L.A.P. Secagem por atomização na indústria alimentícia: fundamentos e aplicações. Departamento de Engenharia – LABMAQ DO BRASIL, Ribeirão Preto – São Paulo. Disponível em: www.engenharia@labmagdobrasil.com.br . Acesso: janeiro de 2010.

ROWE, R.C.; KIBBE, A.H. Acaia. In: **Handbook of Pharmaceutical Excipient**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

SABINO, K. C. C.; GAYER, C. R. M.; VAZ, L. C. A.; SANTOS, L. R. L.; FELZENSZWALB, I.; COELHO, M. G. P. In vitro and in vivo toxicological study of the *Pterodon pubescens* seed oil. **Toxicology Letters**, v. 108, p.27-35, 1999.

SACHAN, N.K.; SINGH, B.; RAO, K.R. Controlled drug delivery through microencapsulation. **Malaysian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 4, p. 65-81, 2006.

SANKARIKUTTY, B.; SREEKUMAR, M. M.; NARAYANAN, C.S.; MATHEW, A. G. Studies on microencapsulation of cardamom oil by spray drying technique. **Journal of Food Science and Technology**, v. 25, p. 352–356, 1988.

SANTOS, A.P.; ZATTA, D.T.; MORAES, W.F.; BARA, M.T.F.; FERRI, P.H.; SILVA, M.R.R.; PAULA, J.R. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmcognosia**, v. 20, p. 891-896, 2010.

SERVAT, L.; SPINDOLA, H. M.; RODRIGUES, R. A. F.; FOGGIO, M. A. Microencapsulação: uma alternativa promissora para preservação de produtos naturais. **Revista Fitos**, v. 5, p. 52-57, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004a. p. 467-495.

SIMÕES, C.M.O.; VON POSER, G.L. Polissacarídeos. In: SIMÕES, C.M.O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004b. p. 497-517.

SUAVE, J.; DALLAGNOL, E.C.; PEZZINI, A.P.T.; SILVA, D.A.K.; MEIER, M.M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v. 7, p. 12-20, 2006.

SOOTTITANTAWAT, A.; BIGEARD, F.; YOSHII, H.; FURUTA, T.; OHKAWARA, M.; LINKO, P. Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated D – limonene by spray drying. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 6, p. 107-114, 2005.

TARUN, G.; ONKAR, S.; SAAHIL, A.; RSR, M. Patented Microencapsulation techniques and its application. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, p. 2097-2102, 2011.

TEIXEIRA, A.L.; BELINELO, V.J.; STEFANI, G.M.; REIS, G.T.; FERREIRA-ALVES, D.L.; PILÓ-VELOSO, D. Síntese de amidas derivadas do ácido 6 α ,7 β -Dihidroxivouacapan-17 β -óico isolado dos frutos de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, p. 37–44, 2001.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; FAJGELJ, A.; WILLETTS, P.; WOOD, R. Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, p. 337-348, 1999.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 88, p. 411-418, 2008.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico – químicas do suco de açai em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 444-450, 2009.

TOOD, P.A.; BENFIELD, P.; GOA, K.L. Guar gum: a review of its pharmacological properties, and use as a dietary adjunct in hypercholesterolemia. **Drugs**, v. 39, p. 917-928, 1990.

TREVENET, F. 1995. Acacia gums: Natural encapsulation agent for food products. In: RISH, S.J. and REINECCIUS, G.A. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. Washington, DC: American Chemical Society, v. 590, p. 51-59, 1995.

TRINDADE, M.A.; GROSSO, C.R.F. Stability of ascorbic acid encapsulated in the granules of rice starch and in gum Arabic. **Journal of Microencapsulation**, v. 17, p. 169-176, 2000.

TURCHIULI, C.; FUCHS, M.; BOHIN, M.; CUVELIER, M.E.; ORDONNAUD, C.; PEYRAT-MAILLARD, M.N.; DUMOULIN, E. Oil encapsulation by spray drying and fluidized bed agglomeration. **Innovate Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 29-35, 2005.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US – FDA); Guidance for Industry, **Bioanalytical Method Validation**, 2001.

VAN DE BRAAK, S.A.A.J.; LEIJTEN, G.C.J.J. Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. In: CBI, **Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries**, Rotterdam, 1999. p. 116.

VERSIC, R.J. Coacervation for flavor encapsulation. In: RISCH, S.J. REINNECCIUS, G.A. **Flavor encapsulation**. Washington DC.: American Chemical Society, 1988. p. 1-6.

VINETSKY, Y.; MAGDASSI, S. Microcapsules in Cosmetics. In: MAGDASSI, S.; TOUITOU, E. **Novel Cosmetics Delivery Systems**. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 295-314.

ZHANG, L.; MOU, D.; DU, Y. Procyanidins: extraction and micro-encapsulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 87, p. 2192-2197, 2007.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**: a thin layer chromatography atlas. 3rd ed. Berlin: Springer, 2001.

WILLUHN, G.; SCHNEIDER, R.; MATTHIESEN, U. Mexican arnica flowers: composition of the essential oil of the inflorescences of *Heteroteca inuloides*. **Deutsche Apotheker Zeituig**, v. 125, p. 1941-1944, 1985.

Capítulo 4

Atividades antimicrobiana, antinociceptiva e anti-inflamatória do óleo essencial e das microcápsulas contendo o óleo essencial dos frutos de *P. emarginatus* Vogel

1 INTRODUÇÃO

A ampla biodiversidade no território brasileiro coloca o país numa posição estratégica para o desenvolvimento racional e exploração sustentada de novos metabólitos com valor terapêutico. Certas áreas de vegetação, como a Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga, são ricas em biodiversidade e são, portanto, de grande interesse para descoberta de recursos naturais e compostos com atividade biológicas contra doenças (BASSO et al., 2005).

Muitas áreas estão envolvidas na pesquisa de novas substâncias oriundas de plantas, como a fitoquímica, que trabalha com o isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos; a etnobotânica e a etnofarmacologia, que buscam informações a partir do conhecimento de diferentes povos e etnias; e a farmacologia, que estuda os efeitos farmacológicos de extratos e dos constituintes químicos isolados (MACIEL et al., 2002). Nos últimos anos, no Brasil, várias pesquisas foram realizadas com contribuições relevantes sobre o assunto, não só quanto a aspectos fitoquímicos, mas também quanto à atividade biológica de plantas que ocorrem nos diferentes ecossistemas brasileiros (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006). Hansen et al. (2010) revisaram as propriedades farmacêuticas do gênero *Pterodon* sp. e destacaram os estudos mais relevantes já realizados no que se refere às propriedades biológicas de interesse terapêutico. Este gênero, comum no território brasileiro, e que compreende espécies cujos extratos, óleos e frações apresentam uma diversidade de atividades biológicas, é extensamente estudado quanto ao isolamento das substâncias ativas responsáveis por essas atividades e quanto aos mecanismos fisiológicos por qual agem.

Diante dos estudos *in vitro* e *in vivo* envolvendo as propriedades farmacológicas do gênero *Pterodon* e dos escassos projetos de desenvolvimento tecnológico para se chegar a um produto farmacêutico que agregue tais propriedades, desenvolveu-se as microcápsulas do óleo essencial dos frutos de *Pterodon emarginatus* e no presente capítulo avaliou-se a atividade antimicrobiana (*in vitro*) do óleo essencial de sucupira, e as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória (*in vivo*) do óleo essencial de sucupira e das microcápsulas contendo o óleo essencial, com o objetivo de analisar a manutenção da atividade biológica mesmo após todas as etapas de processamento pelas quais o óleo essencial foi submetido até chegar às microcápsulas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Os frutos de *P. emarginatus* Vogel (PES-01) que foram triturados e submetidos ao processo de hidrodestilação em aparato tipo Clevenger para obtenção do óleo essencial, bem como a identificação da composição química por CG/EM desta matéria-prima encontram-se no capítulo 3 itens 2.1, 2.2 e 2.4.

2.2 MICROCÁPSULAS

As microcápsulas de E2 (1OE : 3G : 3,6M) foram selecionadas para estudo das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, por terem apresentado as características mais adequadas de composição e morfologia, dentre as demais estudadas (Capítulo 3).

2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

2.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O óleo essencial foi submetido ao método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima segundo o recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) para os testes de susceptibilidade bacteriana (CLSI, 2009) e fúngica (CLSI, 2008).

2.3.2 Microrganismos e Reativação das culturas

Os microrganismos utilizados foram cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos cedidos pelo Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG).

Para reativação das culturas, as bactérias foram repicadas para Caldo Casoy e incubadas a 37°C por 24h em uma estufa de Cultura (FANEM modelo 002CB), em seguida repicadas para Agar Casoy inclinado e incubado a 37°C, por mais 24h. Os fungos foram repicados para Agar Sabouraud Dextrose e incubados a temperatura ambiente por 24 a 48h para *Candida* spp. e por 48 a 72h para *Cryptococcus* spp.

2.3.3 Determinação da CIM para bactérias

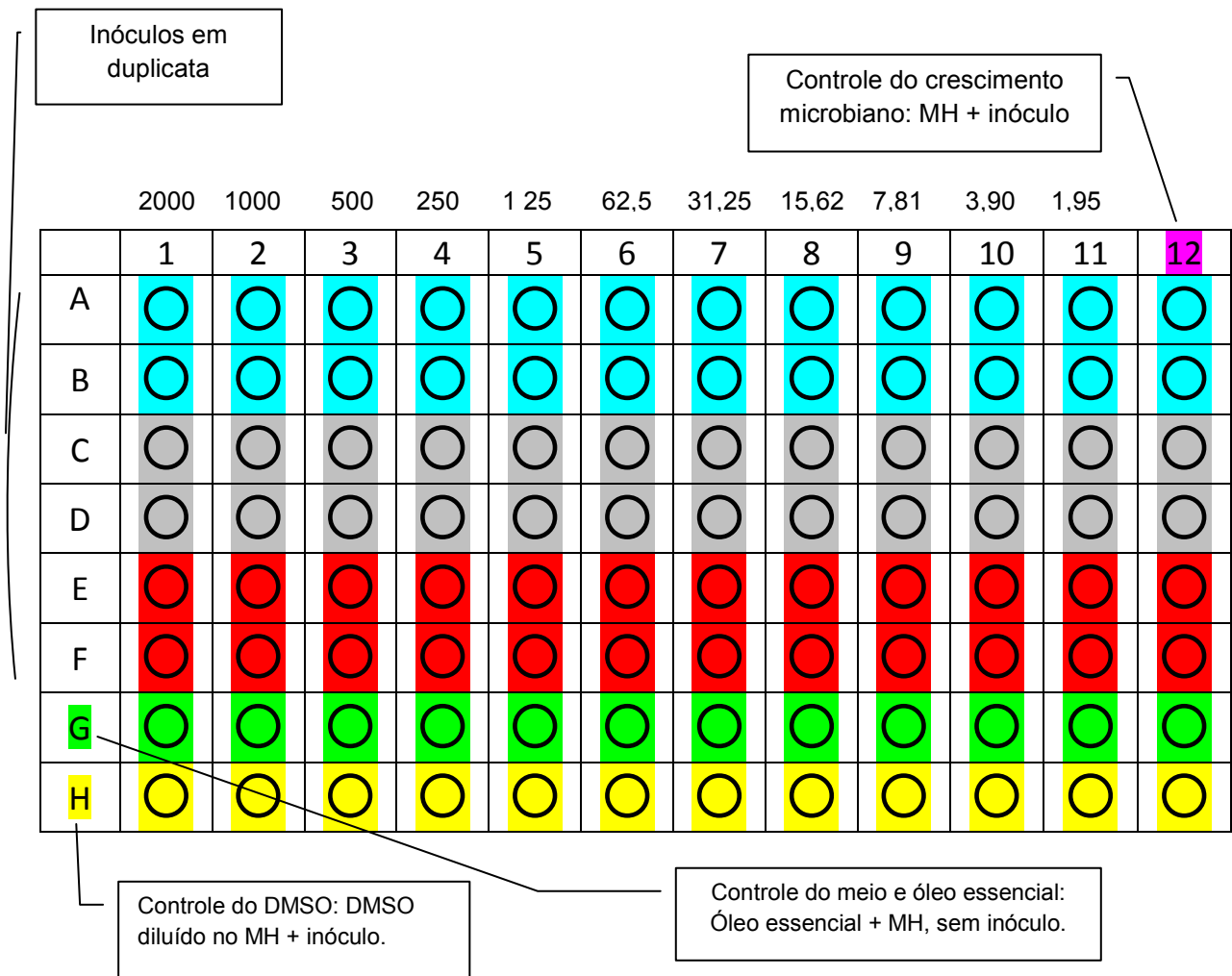
O óleo essencial foi solubilizado em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%, acrescentou-se 0,02% de Tween 80® e então foi diluído em caldo Müller Hinton (MH) obtendo-se uma concentração de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. O antibiótico vancomicina (Sigma – Aldrich®) na concentração de $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi utilizado como controle para as bactérias Gram – positivas e gentamicina na concentração de $128 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi empregada como controle para as bactérias Gram – negativas.

Nas microplacas estéreis de 96 poços em forma de “U” foram distribuídos em cada orifício 100 μL de caldo MH da coluna 2 a coluna 12. Na primeira coluna, da letra A a G foram colocados 200 μL do óleo essencial na concentração de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e na coluna H foram colocados 200 μL de DMSO a 10% preparado em caldo MH. Em seguida foram realizadas as diluições seriadas, sendo retirados 100 μL da coluna 1 e transferidos para a coluna 2, procedeu-se a homogenização dos orifícios da coluna 2 e sequencialmente 100 μL foram retirados e transferidos para a coluna 3, essa dinâmica foi realizada até a coluna 11 de onde foram descartados 100 μL . Na linha H cada poço continha DMSO diluído.

Os inóculos bacterianos foram preparados, suspendendo as cepas em solução salina estéril (NaCl a 0,85%) até obtenção de uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland, obtida por leitura em espectrofotômetro (Biospectro) a 625 nm (79,4% a 83,2% de Transmittância). Em seguida, preparou-se uma diluição 1 : 10 em salina a 0,85% de forma a se obter uma concentração de células bacterianas de 10^7 UFC mL^{-1} . Após a diluição dos inóculos, 5 μL de cada um dos inóculos foram adicionados na microplaca em duplicata, contudo não foram colocados na linha G, porque esta é a linha de controle de esterilidade do meio MH e do óleo essencial.

A diluição final dos inóculos nos poços ficou na faixa de $5 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$ ou $5 \times 10^4 \text{ UFC/poço}$. A linha H serviu como controle do DMSO e a coluna 12 como controle do crescimento microbiano (viabilidade da cepa). A Figura 1 apresenta esquematicamente o método de microdiluição em caldo descrita acima.

Figura 1 – Esquema aplicativo da técnica de microdiluição em caldo para teste de atividade antimicrobiana do óleo essencial para bactérias. As cores diferentes nas duplas de linhas de A a F indicam inóculos diferentes.



Fonte: Paula, J.A.M. e Sá, F.A., 2009.

As microplacas foram incubadas a 37°C por 24h. Aproximadamente 60 minutos antes de completar o período de incubação acrescentou-se aos orifícios 20 µL de cloreto de trifeníltetrazolím (TTC) a 0,5% e as microplacas foram reencubadas por mais 30 minutos, seguindo-se o procedimento de leitura. O aparecimento de coloração vermelha foi indicativo de crescimento bacteriano. A concentração inibitória mínima foi considerada a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano.

2.3.4 Determinação da CIM para fungos

O óleo essencial foi solubilizado em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%, acrescentou-se 0,02% de Tween 80® e então a mistura foi diluída em meio RPMI obtendo-se uma concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. O antifúngico itraconazol (Sigma – Aldrich®) na concentração de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi utilizada como controle para os fungos.

Nas microplacas estéreis de 96 poços em forma de “U” foram distribuídos em cada orifício 100 μL do meio RPMI da coluna 2 a coluna 12. Na primeira coluna, da letra A a G foram colocados 200 μL do óleo essencial na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e na coluna H foram colocados 200 μL de DMSO a 10% preparado em caldo MH. Em seguida foram realizadas as diluições seriadas, sendo retirados 100 μL da coluna 1 e transferidos para a coluna 2, procedeu-se a homogeneização dos orifícios da coluna 2 e sequencialmente 100 μL foram retirados e transferidos para a coluna 3, essa dinâmica foi realizada até a coluna 11 de onde foram descartados 100 μL . Na linha H cada poço continha DMSO diluído.

Os inóculos fúngicos foram preparados, ressuspensando as cepas em solução salina estéril (NaCl a 0,85%) até obtenção de uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland, obtida por leitura em espectrofotômetro (Biospectro) a 530 nm (85% de Transmitância). Em seguida, preparou-se uma diluição 1 : 50 em salina a 0,85% e a partir desta diluição preparou-se outra diluição de 1 : 20 de forma a se obter uma concentração de células fúngicas de $1-5 \times 10^3 \text{ UFC mL}^{-1}$. 100 μL de cada inóculo foram transferidos para cada poço, dessa forma o inóculo foi diluído 1 : 1 chegando-se a concentração desejada do inóculo de $0,5-2,5 \times 10^3 \text{ UFC mL}^{-1}$. A linha G não recebeu inóculo, pois trata-se do controle do óleo essencial e do meio RPMI. A linha H serviu como controle do DMSO e a coluna 12 como controle do crescimento microbiano (viabilidade da cepa). A Figura 2 apresenta esquematicamente o método de microdiluição em caldo para fungos descrita acima.

Ao término da inoculação as microplacas foram revestidas com papel *craft* e incubadas durante 48 h para espécies de *Candida* e 72 h para espécies de *Cryptococcus* à temperatura ambiente. Após o período de incubação a ocorrência de crescimento fúngico foi verificada visualmente. A CIM foi a menor concentração do óleo essencial de sucupira capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico.

2.4.1.2 Teste de dor induzida por Formalina

Foram utilizados grupos experimentais de oito camundongos tratados pela via oral com veículo (10 mL kg^{-1}), óleo essencial dos frutos de sucupira (OE) na dose de 300 mg kg^{-1} , microcápsulas (E2) do óleo essencial dos frutos de sucupira (MOE) nas doses de 0,5; 1,0 e $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ que equivalem a 490 mg kg^{-1} , 980 mg kg^{-1} e $1,96 \text{ g kg}^{-1}$ de óleo essencial contido nas microcápsulas respectivamente, indometacina (10 mg kg^{-1}) ou morfina (10 mg kg^{-1} , s.c). Após 60 minutos dos tratamentos pela via v.o. ou 30 minutos após o tratamento pela via s.c. foi aplicado na região intraplantar da pata posterior direita $20 \mu\text{L}$ de formalina 3% (v/v) (formaldeído 1,2% (v/v)). Em seguida, os animais foram observados individualmente durante 30 min em caixas de acrílico com fundo especular.

2.4.1.3 Teste da Placa Quente

Os animais foram divididos em grupos de 8 camundongos e tratados pela via oral com veículo (10 mL kg^{-1}), ou com microcápsulas (MOE) $1,0 \text{ g kg}^{-1}$ (980 mg kg^{-1} de OE), e pela via subcutânea com morfina (10 mg kg^{-1}). O tempo máximo permitido de permanência dos animais na placa quente foi de 30 segundos, para não causar danos teciduais aos animais. O tempo para a reatividade a dor foi medido em segundos nos tempos -60, -30, 0, 30, 60, 90 e 120 minutos após os tratamentos, sendo considerada como latência a dor.

Os animais foram colocados dentro de um funil de vidro sobre a superfície de uma placa de metal previamente aquecida a $55,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. O tempo em segundos que o animal levou para lambear, abanar ou levantar uma das patas traseiras sobre a placa previamente aquecida foi cronometrado e considerado como indicativo da latência a dor, conforme descrito por Woolfe e MacDonald (1944).

2.4.2 Atividade Anti – inflamatória

2.4.2.1 Pleurisia induzida por Carragenina

Segundo metodologia descrita por Saleh et al. (1999) com modificações, grupos de camundongos (n=9) receberam pelo plexo orbital, 200 μL de uma solução de azul de Evans a 2,5%, e foram tratados (v.o.) com veículo (10 mL kg^{-1}), ou com as microcápsulas do óleo essencial dos frutos de sucupira (MOE) na dose de 1,0 g kg^{-1} (980 mg kg^{-1} de OE) ou dexametasona (2 mg kg^{-1}). Uma hora após os tratamentos, os animais receberam uma injeção de carragenina 1% na cavidade pleural (100 μL /cavidade) pelo espaço intercostal das costelas inferiores da caixa torácica. Quatro horas após a aplicação do agente flogístico os animais foram submetidos à eutanásia, a cavidade torácica foi aberta e um pequeno corte foi feito no diafragma, logo abaixo do apêndice xifóide. Em seguida, a cavidade pleural foi lavada com 1 mL de solução de PBS (pH 7,6) heparinizado. O líquido recolhido foi depositado em tubos Eppendorf® imersos em gelo. Uma alíquota foi usada para fazer a contagem do número de leucócitos totais em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica. Outra alíquota foi utilizada para a determinação da concentração do azul de Evans em espectrofotômetro (600 nm).

2.4.3 Análise Estatística

Os dados foram expressos como médias $\pm$ erro padrão das médias. As diferenças entre dois grupos foram detectadas pelo teste t de Student e entre três ou mais grupos pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (SOKAL e ROHLF, 1981).

4 CONCLUSÕES

O óleo essencial dos frutos de sucupira (PES-01) tem fraca atividade antimicrobiana para bactérias Gram – positivas testadas, e foi inativo para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Tem fraca atividade para os fungos do gênero *Cryptococcus* testados. É inativo para as bactérias Gram – negativas e para os fungos do gênero *Candida*, testadas neste trabalho.

O óleo essencial de sucupira reduziu em 61,54% (300 mg kg⁻¹) à reatividade à dor, enquanto as microcápsulas contendo o óleo essencial reduziram 40,87% (1,0 g kg⁻¹) e 41,57% (2,0 g kg⁻¹) na primeira fase do teste de dor induzida por formalina, sugerindo, atividade antinociceptiva. Na segunda fase do teste de indução de dor por formalina, o óleo essencial inibiu 52,35% da dor relacionada aos mediadores da inflamação e as microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira reduziram de 25,86% a 55,60% da dor.

As microcápsulas na dose de 1,0 g kg⁻¹ demonstraram atividade antinociceptiva no modelo de placa quente, sugerindo atividade analgésica central.

Na pleurisia induzida por carragenina as microcápsulas contendo o óleo essencial de sucupira reduziram 25,44% da migração total de leucócitos e diminuíram significativamente a concentração de azul Evans em 24,18%, o que demonstra importante atividade anti-inflamatória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e terapêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BASSO, L.A.; PEREIRA DA SILVA, L.H.; FETT-NETO, A.G.; AZEVEDO JR, W.F.; MOREIRA, I.S.; PALMA, M.S.; CALIXTO, J.B.; ASTOLFI FILHO, S.; DOS SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, D.S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases- a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 575-606, 2005.

BENITÉZ, N.P.; MELENDEZ, E.; STASHENKO, E.E.. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 8, p. 301-304, 2009.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CARTER, R.B. Differentiation of analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: effect of behavioral endpoint. **Pain**, v. 24, p. 211-220, 1991.

CARVALHO, J.C.T.; SERTIÉ, J.A.A.; BARBOSA, M.V.J.; PATRÍCIO, K.C.M.; CAPUTO, L.R.G.; SARTI, S.J.; FERREIRA, L.P.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vogel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 127-133, 1999.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. 3rd edn. Approved Standard M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically**. 8th edn. Approved standard M07-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.

DUTRA, R.C.; TREVIZANI, R.; PITTELLA, F.; BARBOSA, N.R. Anti-nociceptive activity of the essential oil and fractions of *Pterodon emarginatus* Vogel seeds. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 865-870, 2008.

DUTRA, R.C.; BRAGA, F.G.; COIMBRA, E.S.; SILVA, A.D.; BARBOSA, N.R. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 429-435, 2009a.

DUTRA, R.C.; FAVA, M.B.; ALVES, C.C.; FERREIRA, A.P.; BARBOSA, N.R. Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 243-250, 2009b.

EL HADRI, A.; DEL RÍO, M.A.G.; SANZ, J.; COLOMA, A.G.; IDAOMAR, M.; OZONAS, B.R.; GONZÁLEZ, J.B.; REUS, M.I.S. Cytotoxic activity of α – humuleno and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. **Real Academia Nacional de Farmácia – Espanha**, v. 76, p. 343-356, 2010.

EVANGELISTA, G.L.; SOUZA, A.N.C.; SANTOS, C.F.; CARDOSO, J.H.L.; LOPES, E.A.B.; SANTOS, M.V.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P.J.C. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 515-522, 2007.

HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of ‘sucupira’ (*Pterodon* spp.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 4, p. 607-616, 2010.

HUNSKAAR S, HOLE K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

KUBO, I.; CHAUDHURI, S.K.; KUBO, Y.; SANCHEZ, Y.; OGURA, T.; SAITO, T.; ISHIKAWA, H.; HARAGUCHI, H. Cytotoxic and oxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. **Planta Medica**, v. 62, p. 427-430, 1996.

LEAL, L.K.; FERREIRA, A.A.; BEZERRA, G.A.; MATOS, F.J.; VIANA, G.S. Anti-nociceptive, anti-inflammatory and bronchodilatador activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 151-159, 2000.

LEONHARDT, V.; LEAL-CARDOSO, J.H.; LAHLOU, S.; ALBUQUERQUE, A.A.C.; PORTO, R.S.; CELEDÔNIO, N.R.; OLIVEIRA, A.C.; PEREIRA, R.F.; SILVA, L.P.; GARCIA-TEÓFILO, T.M.N.; SILVA, A.P.F.S.; MAGALHÃES, P.J.C.; DUARTE, G.P.; COELHO-DE-SOUZA, A.N. Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent β – caryophyllene on rat isolated ileum. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 24, p. 749-758, 2010.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F.; GRYNBERG, N.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAIA, A.I.V.; TORRES, M.C.M.; PESSOA, O.D.L.; MENEZES, J.E.S.A.; COSTA, S.M.O.; NOGUEIRA, V.L.R.; MELO, V.M.M.; DE SOUZA, E.B.; CAVALCANTE, M.G.B.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia*

remotiflora e *Vernonia brasiliana*: Composição química e atividade biológica. **Química Nova**, v. 33, p. 584 – 586, 2010.

MORAES, W.F.; MATOS, L.G.; NASCIMENTO, M.V.M.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F.; CUNHA, L.C.; VALADARES, M.C.; COSTA, E.A. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of *Pterodon emarginatus* stem bark alcohol extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 146-150, 2009.

MORAES, W.F.; GALDINO, P.M.; NASCIMENTO, M.V.M.; VANDERLINE, F.A.; BARA, M.T.F.; COSTA, E.A.; PAULA, J.R. Triterpenes involved in the anti-inflammatory effect ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. **Journal of Natural Medicines**, Springer (Article in Press).

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.N.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, P.O.; BARBOSA-JÚNIOR, A.M.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 108-113, 2007.

OLIVEIRA, P.C. **Obtenção e caracterização do extrato seco padronizado dos frutos da sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel – Fabaceae)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; PIANOWISK, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbanaceae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2, p. 323-333, 2007.

RAMOS, M.F.S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a óleo essencial de copaíba por Spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

SALEH, T. S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides**, v. 20, p. 949-956, 1999.

SILVA, M.C.; GAYER, C.R.; LOPES, C.S.; CALIXTO, N.O.; REIS, P.A.; PASSAES, C.P.; PAES, M.C.; DALMAU, S.R.; SABINO, K.C.; TODESCHINI, A.R.; COELHO, M.G. Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 135-141, 2004.

SILVA, C.M.; BOLZAN, A.A.; MALLMANN, C.A.; POZZATTI, P.; ALVES, S.H.; HEINZMANN, B.M. Sesquiterpenoids of *Senecio bonariensis* Hook. & Arn., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 87-92, 2010.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry: the Principles and Practice of Statistics in Biological Research**. New York: W.H. Freeman and Corporation, 1981.

SPINDOLA, H. M.; SERVAT, L.; DENNY, C.; RODRIGUES, R. A. F.; EBERLIN, M. N.; CABRAL, E.; SOUZA, I. M. O.; TAMASHIRO, J. Y.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. **BMC Pharmacology**, v.10, p. 1-10, 2010.

TAMBE, Y.; TSUJIUCHI, H.; HONDA, G.; IKESHIRO, Y.; TANAKA, S. Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, β – caryophyllene. **Planta Medica**, v. 62, p. 469-470, 1996.

ZHENG, G.Q.; KENNEY, P.M.; LAM, L.K.T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 999-1003, 1992.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, p. 300-307, 1944.

Conclusão Geral

Conclusão Geral

Os dados gerados neste estudo permitiram chegar às seguintes conclusões:

- O óleo essencial de *P. emarginatus* apresenta variabilidade química, até o momento não relatada na literatura.
- O óleo total dos frutos de *P. emarginatus* apresentam pronunciada atividade antimicrobiana para bactérias Gram-positivas (31,25 – 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e para *Enterobacter aerogenes* ATCC 13028 (125 - 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e fraca atividade para bactérias Gram-negativas e fungos do gênero *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp..
- A análise do processo de microencapsulação do óleo essencial de *P. emarginatus*, sugere que a condição mais adequada para microencapsulação em *spray dryer* seja bico aspersor de 1,2 mm de diâmetro, fluxo de alimentação da emulsão no sistema de 4 mL/min e temperatura de entrada de 160°C, fluxo de ar de 40 L/min e pressão de 60 psi, para equipamento de *spray dryer* de bancada dentro das condições avaliadas neste estudo.
- A avaliação da proporção de material de parede mais adequada para obtenção das microcápsulas contendo o óleo essencial de *P. emarginatus*, indicam que a dispersão de 1 : 3 : 3,6 de óleo essencial, para goma arábica e maltodextrina DE (4-7), respectivamente, levou a obtenção de microcápsulas de superfície regular e lisas, esféricas e de baixa higroscopicidade.
- O óleo essencial de PES-01 utilizado no processo de microencapsulação, quando testado quanto a sua atividade antimicrobiana, apresentou fraca atividade antimicrobiana (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para bactérias Gram-positivas, sendo inativo para *S. aureus* ATCC 25923. Foi inativo também para bactérias Gram-negativas e para os fungos do gênero *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp..
- O óleo essencial de *P. emarginatus*, bem como as microcápsulas contendo o óleo essencial, apresentaram pronunciada atividade antinociceptiva na 1ª e 2ª fase do teste da formalina e a análise das microcápsulas no teste da placa quente indicou ação analgésica central. As microcápsulas contendo o óleo essencial de *P. emarginatus* também apresentaram pronunciada atividade anti-inflamatória no teste de pleurisia induzida por carragenina (25,44%) e por azul de Evans (24,18%) na redução da migração de leucócitos. Esses efeitos

podem estar relacionados com os compostos sesquiterpênicos presentes, em especial β -cariofileno e α -humuleno.