



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

**NATASHA QUEIROZ CARDOSO**

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE EXTRATOS  
VEGETAIS PADRONIZADOS A PARTIR DE *Lafoensia pacari*  
A. St. - Hill (Lythraceae)**

**Goiânia/GO**

**2013**



**NATASHA QUEIROZ CARDOSO**

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE EXTRATOS  
VEGETAIS PADRONIZADOS A PARTIR DE *Lafoensia pacari*  
A. St. - Hill (Lythraceae)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia / Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição

**Goiânia/GO**

**2013**

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

Cardoso, Natasha Queiroz

C268d      Desenvolvimento tecnológico de extratos vegetais padronizados a partir da *Lafoensia pacari* A. St.-Hill (Lythraceae). [manuscrito] / Natasha Queiroz Cardoso. - 2013  
94 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2013.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. *Lafoensia pacari* – Extrato seco. 2. Plantas medicinais – Ácido elágico. 3. *Lafoensia pacari* – Extrato padronizado. I. Título.

CDU: 615.01:582.776.1

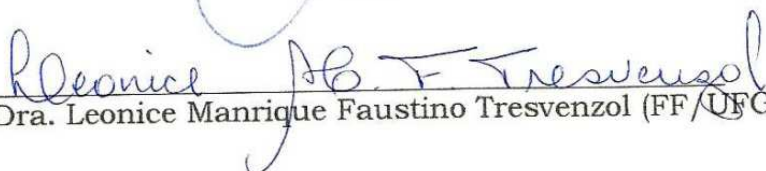
## Folha de Aprovação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 28 de fevereiro de 2013, pela mestranda Natasha Queiroz Cardoso.

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição (FF/UFG)  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Otávio Carréra Silva Júnior (UFPA)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Leonice Manrique Faustino Tresvenzol (FF/UFG)

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho, às pessoas mais importantes de minha vida. Aos meus pais que sempre me ensinaram a lutar pela educação e meus ideais com muita dignidade e ética. E ao meu esposo que sempre me apoiou e amparou nesta caminhada.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade e força durante esta jornada.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN/FF/UFG), que generosamente proporcionaram a troca de conhecimento e experiências em nossas pesquisas diárias. Em especial ao Gerlon Almeida, Jordana Nunes, Nathalia Pedroso e Thiago Levi a minha gratidão por toda contribuição e amizade.

Aos professores do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN/FF/UFG) que me acolheram e orientaram durante este trabalho.

A professora Leonice Manrique Faustino Tresvenzol pela atenção e contribuição para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LAMMAR/IF/UFG), pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura do extrato seco padronizado.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, na pessoa da Prof<sup>a</sup>. Dra. Marize Campos Valadares Bozini, pela oportunidade de crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Rede Animal Sustentável pelo auxílio financeiro.

**“A persistência é o menor caminho do êxito”.**

**(Charles Chaplin)**

## RESUMO

*Lafoensia pacari* A. St.-Hill (Lythraceae) é conhecida popularmente como dedaleiro, didal, mangabeira-brava ou pacari, é utilizada pela população brasileira como febrífugo, cicatrizante e tônico. Estudos comprovaram as atividades antioxidante, antiinflamatória, antinoceptiva e antiedematogênica dos extratos provenientes das cascas do caule, sendo o ácido elágico um dos responsáveis pelas mesmas. O presente trabalho teve como objetivo a obtenção tecnológica de extrato seco padronizado a partir da casca do caule de *L. pacari*. A droga vegetal foi testada por diversos ensaios de controle de qualidade, de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª edição, que garantiram a caracterização da droga vegetal e posteriormente a obtenção dos extratos líquidos e secos padronizados. O método de extração escolhido foi a percolação lenta com solução hidroalcoólica 80% como solvente e velocidade de 7 gotas por min.. O extrato líquido padronizado apresentou densidade de 0,986 g/mL, teor de sólidos de 12,49 % (m/m), pH 3,53 e teor alcoólico de 44,80% (v/v). O teor de ácido elágico encontrado no extrato líquido foi de 3,84%(m/m). A secagem por nebulização/atomização foi realizada por planejamento experimental de univariada e em seguida pelo planejamento fracionário 2<sup>5-2</sup> com replicatas. Durante o processo os adjuvantes utilizados foram a maltodextrina e o aerosil, demonstrando que nas condições ótimas encontradas a maltodextrina apresenta maior proteção e concentração de ácido elágico no extrato.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais. Ácido elágico. Extrato seco. Extrato padronizado. *Lafoensia pacari*.

## ABSTRACT

*Lafoensia pacari* A. St.-Hill (Lythraceae) popularly known as dedaleiro, didal, or mad-mangabeira pacari, is used by the Brazilian population as a febrifuge, tonic and healing. Studies have shown the antioxidant, anti-inflammatory, and antinoceptiva antiedematogenic extracts from the stem bark, ellagic acid being one of those responsible for the same. This study aimed to obtain dry extract standardized technology from the stem bark of *L. pacari*. The drug was tested for various quality control tests, according to the Brazilian Pharmacopoeia 5th edition, which ensured the characterization of plant drug and subsequently obtaining the liquid and dry extracts standardized. The extraction method was chosen slow percolation with 80% hydroalcoholic solution as a solvent and velocity of 7 drops per min .. The liquid extract standardized had a density of 0.986 g / mL solids content of 12.49% (w / w), pH 3.53 and an alcohol content of 44.80% (v / v). The content of ellagic acid found in liquid extract was 3.84% (m / m). The spray drying / atomization was performed by experimental design of univariate and then by planning a fractional 5-2 with 2 replicates. During the process the adjuvants were used maltodextrin and aerosil, demonstrating that the optimal conditions found maltodextrin provides greater protection and ellagic acid concentration in the extract.

**Keywords:** Medicinal plants. Ellagic acid. Dry extract. Standardized extract. *Lafoensia pacari*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Aspectos botânicos da <i>Lafoensia pacari</i> A. St. Hil: (A) Aspecto geral da planta; (B) Casca do caule .....	24
<b>Figure 2:</b> Reação de hidrólise da peduncalagina .....	26
<b>Figure 3:</b> Ácido elágico esterificado.....	27
<b>Figura 4:</b> Ácido elágico glicosilado .....	27
<b>Figura 6:</b> Aspecto geral da casca do caule de <i>L. pacari</i> .....	49
<b>Figura 7:</b> Microscopia dos pós da casca do caule de <i>L. pacari</i> : (A) Grão de Amido; (B) Cristais; (C) Fibras.....	49
<b>Figura 8:</b> Perfil cromatográfico – CCD – dos pós da casca do caule de <i>L. pacari</i> FM: tolueno, acetato de etila, ácido fórmico e metanol (3:3:1,3:0,7v/v/v/v).....	52
<b>Figura 9:</b> Cromatogramas do padrão de ácido elágico (A) e ácido elágico na droga vegetal de <i>L. pacari</i> (B). .....	53
<b>Figura 10:</b> Espectros de absorção na região UV-visível do padrão de ácido elágico (A) e ácido elágico na casca do caule de <i>L. pacari</i> (B). .....	54
<b>Figura 11:</b> Gráfico da otimização do processo de extração do ácido elágico de <i>L. pacari</i> .....	57
<b>Figura 12:</b> Perfil cromatográfico – CCD – do extrato líquido de <i>L. pacari</i> FM: tolueno, acetato de etila, ácido fórmico e metanol (3:3:1,3:0,7v/v/v/v).....	63
<b>Figura 13:</b> Cromatogramas do padrão de ácido elágico (A) e ácido elágico no extrato líquido de <i>L. pacari</i> (B). .....	64
<b>Figura 14:</b> As Figuras (A) e (B) apresentam respectivamente os espectros de absorção na região UV-visível do padrão de ácido elágico e do ácido elágico na casca do caule de <i>L. pacari</i> derivados dos cromatogramas da Figura 13.....	65

<b>Figura 15:</b> Cromatogramas de varredura na faixa de 210 a 400 nm do padrão de ácido elágico (A), do extrato líquido de <i>L. pacari</i> (B) e do solvente etanol 80% v/v (C). .....	67
<b>Figura 16:</b> Curva TG correspondente ao ácido elágico. ....	75
<b>Figura 17:</b> Fotomicrografia do extrato seco de <i>L. pacari</i> sem adjuvante .....	81
<b>Figura 18:</b> Fotomicrografia do extrato seco de <i>L. pacari</i> com maltodextrina .....	82
<b>Figura 19:</b> Fotomicrografia do extrato seco de <i>L. pacari</i> com dióxido de silício coloidal .....	82
<b>Figura 21:</b> Gráfico dos resíduos .....	85

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Fatores codificados e seus níveis no planejamento fatorial $2^3$ mais pontos estrela e central.....	35
<b>Tabela 2:</b> Variações nas condições cromatográficas na quantificação do ácido elágico por CLAE .....	43
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros constantes do processo de secagem .....	45
<b>Tabela 4:</b> Parâmetros do processo de secagem do extrato seco de <i>L. pacari</i> .....	45
<b>Tabela 5:</b> Variáveis e níveis do Planejamento fatorial de $2^{5-2}$ com replicatas.....	46
<b>Tabela 6:</b> Planejamento Composto Central para a obtenção do extrato líquido de <i>L. pacari</i> .....	56
<b>Tabela 7:</b> Estatística com superfície de resposta .....	57
<b>Tabela 8:</b> Parâmetros físico-químicos do extrato líquido da casca do caule <i>L. pacari</i> .....	59
<b>Tabela 9:</b> Resultados dos testes de susceptibilidade antibacteriana e antifúngica para o extrato líquido das cascas do caule de <i>Lafoensia pacari</i> St. Hil.....	61
<b>Tabela 10:</b> Parâmetros do System suitability obtidos para os cromatogramas da amostra da casca do caule de <i>L. pacari</i> e padrão de ácido elágico:.....	66
<b>Tabela 11:</b> Valores referentes à triplicata da curva padrão do padrão de ácido elágico .....	68
<b>Tabela 12:</b> Dados referentes à triplicata da curva padrão do extrato líquido de <i>L. pacari</i> .....	70
<b>Tabela 13:</b> Repetibilidade do método analítico para doseamento de ácido elágico no extrato líquido de <i>L. pacari</i> .....	71

<b>Tabela 14:</b> Precisão intermediária do método analítico para doseamento de ácido elágico no extrato líquido de <i>L. pacari</i> .....	72
<b>Tabela 15:</b> Resultados dos teores da amostra e da adição padrão da Linearidade da amostra .....	73
<b>Tabela 16:</b> Resultados da recuperação do padrão de ácido elágico no extrato líquido de <i>L. pacari</i> .....	73
<b>Tabela 17:</b> Robustez do método analítico para doseamento de ácido elágico no extrato líquido de <i>L. pacari</i> .....	74
<b>Tabela 18:</b> Valores da perda de massa calculados a partir da curva TG. ....	76
<b>Tabela 19:</b> Valores da perda de massa calculados a partir da curva TG. ....	76
<b>Tabela 20:</b> Parâmetro de ar de secagem do planejamento experimental univariada .....	77
<b>Tabela 21:</b> Parâmetro do ar comprimido do planejamento experimental univariada	78
<b>Tabela 22:</b> Parâmetro de temperatura do planejamento experimental univariada....	78
<b>Tabela 23:</b> Parâmetro de adjuvante do planejamento experimental univariada .....	79
<b>Tabela 24:</b> Melhores condições de secagem do planejamento experimental univariada.....	80
<b>Tabela 25:</b> Aplicação dos adjuvantes nas melhores condições.....	80
<b>Tabela 26:</b> Planejamento fatorial de $2^{5-2}$ com replicatas .....	83
<b>Tabela 27:</b> Tabela de ANOVA do planejamento fatorial de $2^{5-2}$ com replicatas .....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA:** Análise de variância
- ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ADD PAD:** Adição Padrão
- AE:** Ácido Elágico
- CCD:** Cromatografia em Camada Delgada
- CG:** Cromatografia Gasosa
- CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CMD:** Concentração Média Determinada
- CV:** Coeficiente de variação
- DP:** Desvio padrão
- D/S:** Relação droga / solvente
- FAT. COD.:** Fator Codificado
- FDA:** *Food and Drug Administration*
- FM:** Fase móvel
- GRAD. ALCOOL:** Graduação Alcólica
- MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura
- N:** Número de pratos teóricos
- P.A.:** Para análise (produtos químicos de grau analítico)
- PLAN. FATORIAL:** Planejamento Fatorial
- pH:** Potencial hidrogeniônico
- PVDF:** Fluoreto de polivinilideno
- r:** coeficiente de correlação linear
- R:** Resolução
- R<sub>f</sub>:** Fator de retenção

**T:** Fator de cauda

**t:** Tempo

**TG:** Termogravimetria

**UV:** Ultra violeta

**VALOR COD:** Valor Codificado

**V/V:** Volume/Volume

**µm:** Micrometro

**µL:** Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1. <i>LAFOENSIA PACARI</i> A. ST. HIL. (LYTHRACEAE) .....	23
<b>1.1.1. Atividade biológica</b> .....	24
1.2. ELAGITANINOS E ÁCIDO ELÁGICO .....	25
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	29
3.1. OBJETIVO GERAL .....	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1. MATERIAL VEGETAL .....	30
4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES .....	30
4.3. MÉTODOS .....	30
<b>4.3.1. Caracterização do material vegetal</b> .....	30
4.3.1.1. Análise Macroscópica da casca do caule.....	30
4.3.1.2. Análise microscópica dos pós .....	31
4.3.1.3. Análise sensorial e organoléptica.....	31
4.3.1.4. Pesquisa de material estranho .....	31
4.3.1.5. Análise Granulométrica .....	31
4.3.1.6. Determinação do Índice de Intumescência.....	32
4.3.1.7. Determinação do teor de cinzas totais .....	32
4.3.1.8. Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido.....	32
4.3.1.9. Determinação da perda por dessecação.....	33
4.3.1.10. Determinação do perfil cromatográfico do pó da casca do caule de <i>L. pacari</i> por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	33
4.3.1.11. Determinação do teor de ácido elágico na droga vegetal por CLAE .....	34
<b>4.3.2. Obtenção e caracterização do extrato líquido de <i>L. pacari</i></b> .....	34
4.3.2.1. Obtenção do extrato líquido.....	36
4.4. CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO LÍQUIDO .....	36
<b>4.4.1. Determinação do pH</b> .....	36
<b>4.4.2. Determinação da densidade relativa</b> .....	36
<b>4.4.3. Determinação da viscosidade</b> .....	36

<b>4.4.4. Determinação do teor alcoólico</b> .....	37
<b>4.4.5. Determinação do teor de sólidos</b> .....	37
<b>4.4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana</b> .....	37
4.4.6.1 Microrganismos utilizados e condição de crescimento.....	37
4.4.6.2 Atividade antimicrobiana em ensaio in vitro .....	38
4.4.6.3 Controles .....	39
<b>4.4.7. Determinação do perfil cromatográfico do extrato líquido por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</b> .....	39
<b>4.4.8. Quantificação de ácido elágico no extrato líquido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e validação da metodologia analítica</b> .....	40
4.4.8.1. Sistema cromatográfico.....	40
4.4.8.2. Determinação das condições cromatográficas.....	40
<b>4.4.9. Validação da metodologia analítica</b> .....	40
4.4.9.1. Seletividade .....	41
4.4.9.2. Linearidade.....	41
4.4.9.3. Precisão .....	42
4.4.9.4. Exatidão .....	42
4.4.9.5. Robustez .....	43
<b>4.4.10. Determinação do teor de ácido elágico no extrato líquido de <i>L. pacari</i></b> .....	43
<b>4.4.11. Obtenção e caracterização dos extratos secos de <i>L. pacari</i></b> .....	44
4.4.11.1. Análise termogravimétrica (TG) do ácido elágico.....	44
4.4.11.2. Avaliação da influência dos parâmetros de secagem na obtenção dos extratos secos .....	45
4.4.11.3. Caracterização do extrato seco de <i>L. pacari</i> .....	47
4.4.11.4. Determinação do teor de ácido elágico no extrato seco por CLAE .....	47
<b>4.4.12 Determinação do teor de voláteis</b> .....	47
<b>4.4.13 Determinação da atividade de água</b> .....	47
<b>4.4.14. Microscopia eletrônica de varredura</b> .....	48
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
5.1. ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	49
5.2. INVESTIGAÇÃO MICROSCÓPICA DOS PÓS .....	49
5.3. ANÁLISE SENSORIAL E ORGANOLÉPTICA.....	50
5.4. PESQUISA DE MATERIAL ESTRANHO .....	50

5.5. DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA .....	50
5.6. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE INTUMESCÊNCIA.....	51
5.7. DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS.....	51
5.8. DETERMINAÇÃO DE CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO .....	51
5.9. DETERMINAÇÃO DA PERDA POR DESSECAÇÃO.....	51
5.10. DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS PÓS DA CASCA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) .....	52
5.11. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO ELÁGICO NA DROGA VEGETAL POR CLAE .....	53
5.12. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LÍQUIDO DE <i>L. PACARI</i>	55
<b>5.12.1. Otimização do processo de extração</b> .....	55
5.13. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LÍQUIDO DA CASCA DO CAULE DE <i>L. PACARI</i> .....	58
<b>5.13.1. Caracterização do extrato líquido de <i>L. pacari</i></b> .....	58
5.14. DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO LÍQUIDO DE <i>L. PACARI</i> .....	62
5.15. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO NO EXTRATO LÍQUIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA .....	63
<b>5.15.1. Condições cromatográficas e system suitability</b> .....	63
5.16. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	66
<b>5.16.1. Seletividade</b> .....	66
<b>5.16.2. Linearidade</b> .....	68
5.16.2.1. Linearidade para o padrão de ácido elágico.....	68
5.16.2.2. Linearidade do ácido elágico presente no extrato líquido de <i>L. pacari</i> .....	69
<b>5.16.3. Precisão</b> .....	71
<b>5.16.4. Exatidão</b> .....	72
<b>5.16.5. Robustez</b> .....	73
5.17. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO ELÁGICO NO EXTRATO LÍQUIDO DE <i>L. PACARI</i> .....	75
5.18. DESENVOLVIMENTO DA SECAGEM POR NEBULIZAÇÃO DO EXTRATO LÍQUIDO DE <i>L. PACARI</i> .....	75

<b>5.18.1. Avaliação do efeito da temperatura sobre o ácido elágico para determinação das condições de secagem - Análise termogravimétrica (TG) do ácido elágico (Sigma®).....</b>	<b>75</b>
<b>5.18.2. Obtenção e caracterização do extrato seco padronizado a partir do extrato líquido de <i>L. pacari</i> por nebulização/atomização .....</b>	<b>77</b>
5.19. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE VOLÁTEIS.....	80
5.20. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA.....	81
5.21. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS EXTRATOS SECOS PADRONIZADOS.....	81
5.22. PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO $2^{5-2}$ COM REPLICATAS .....	83
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O uso dos recursos naturais é uma prática aplicada desde os primórdios da humanidade. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas talvez tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O Brasil por ser o país de maior biodiversidade do mundo tem atraído à atenção da comunidade científica e das indústrias farmacêuticas. Dentre os biomas brasileiros, o Cerrado destaca-se por sua vasta extensão e biodiversidade, sendo caracterizado como a segunda maior formação vegetal brasileira em extensão, possui uma das mais ricas e diversas floras do mundo, com cerca de 11.627 espécies vasculares de plantas superiores nativas. (CALIXTO, 2005; MENDONÇA, 2008)

À primeira vista, as paisagens deste bioma podem parecer monótonas, porém o mesmo apresenta uma riqueza excepcional de microambientes, recursos genéticos, geodiversidade e conhecimentos tradicionais. Entretanto, encontra-se ameaçado pelo desordenado desenvolvimento humano, em consequência da acelerada e intensa ocupação econômica, destacando-se a ampliação da fronteira agrícola e a exploração mineral. De maneira geral, a exploração não planejada desta região leva a destruição do conhecimento relacionado à biodiversidade e geodiversidade, causando enormes prejuízos ao Brasil (SAWYER, 2002).

Na área farmacêutica, as plantas e os extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância como fonte de matérias-primas para a produção de medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2001).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são referendadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. Portanto, assim como os medicamentos sintéticos, estes devem garantir a qualidade, eficácia, composição padronizada e segurança de uso para a população (BRASIL, 2010).

A produção de medicamentos fitoterápicos passa por várias etapas relacionadas à droga vegetal, tais como as condições de cultivo, época de coleta, metodologias de extração, operações unitárias de secagem, armazenamento, complexidade química e desenvolvimento de formas farmacêuticas (CALIXTO, 2000).

O desenvolvimento de fitoterápicos caminha junto com os procedimentos de controle de qualidade que procura avaliar as drogas vegetais quanto à identificação correta, análises qualitativas e quantitativas de marcadores químicos, impurezas e falsificações, segundo as monografias das farmacopeias e/ou publicações científicas (PACHÚ, 2007).

Para assegurar a qualidade do produto fitoterápico, em seu desenvolvimento, é necessário o uso de metodologias analíticas validadas, tanto para o controle de matéria-prima vegetal quanto para produtos tecnológicos intermediários (SOUZA, 2004), como por exemplo, os extratos padronizados na forma líquida e seca. Os extratos líquidos podem ser obtidos por percolação, maceração e extração por micro-ondas. Já os extratos secos são obtidos por secagem em estufa, leito de jorro, leito fluidizado, liofilizador ou spray dryer (CARVALHO et al., 2008).

Os extratos líquidos podem ser incorporados na forma farmacêutica final, porém, por apresentarem algumas desvantagens quanto a estabilidade e características organolépticas, o uso de extratos secos como matéria prima na produção de medicamentos fitoterápicos tem sido a opção mais utilizada pela indústria farmacêutica, já que apresentam melhor farmacocinética, maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, maior concentração de compostos ativos e maior capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas (CARVALHO et al., 2008; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Para fins industriais, o interesse pelos extratos secos tem aumentado, pois as formas farmacêuticas sólidas apresentam precisão de dosagem e facilidade de manuseio, transporte e armazenagem. Assim, no Brasil grande parte dos medicamentos estão registrados na forma sólida (PACHÚ, 2007).

O processo de secagem por *spray dryer* foi escolhido para a obtenção dos extratos secos de *L. pacari* por se tratar de um processo de secagem rápido com tamanho de partículas passível de ser controlado; custos de produção baixos; versatilidade da técnica, capacidade de gerar um produto com especificações precisas e de qualidade (GEORGETTI et al., 2008) e seu frequente uso na indústria farmacêutica e alimentícia (AULTON, 2002). Isso acontece devido ao baixo risco de degradação química durante a operação, o curto tempo de contato do líquido disperso com a fonte de calor; a versatilidade na obtenção de pós, grânulos ou aglomerados; no elevado rendimento por tempo de produção e o baixo custo, quando comparada a outras técnicas que empreguem calor (SILVA, 2006).

Para a obtenção dos extratos secos foi empregado *spray dryer* de escala laboratorial modelo MSD 1.0 (LABMAQ<sup>®</sup> do Brasil Ltda.) com regime de fluxo co-corrente, equipado com: bomba peristáltica e um atomizador pneumático; soprador circular para fornecimento do ar de secagem e temperatura regulada por um termostato digital do tipo PID; câmara de secagem cilíndrica de vidro borosilicato com 160 mm de diâmetro e 645 mm de comprimento; ciclone de aço inoxidável e frasco coletor de vidro.

A otimização dos parâmetros de secagem é indispensável na obtenção de extratos secos com melhores características físico-químicas e aumento do rendimento da operação. Dentre os fatores que devem ser investigados destacam-se: temperaturas de entrada e saída, velocidade de fluxo de alimentação, seleção do adjuvante tecnológico, assim como os teores de resíduo seco do extrato fluído a ser nebulizado (GAUDY et al., 1991; PAULA et al., 1998).

Para a secagem de extratos derivados de plantas, a seleção e o uso adequado de adjuvantes no processo de *spray drying* é uma fase de fundamental importância, visto que determina a estabilidade e a qualidade dos mesmos, podendo inclusive afetar as características de biodisponibilidade (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). São utilizados como adjuvantes neste processo: amido, ciclodextrinas, dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcico, gelatina, goma arábica, lactose, maltodextrina entre outros (SILVA JÚNIOR et al., 2006).

Para a realização da secagem neste trabalho, a maltodextrina e o dióxido de silício coloidal foram selecionados como adjuvantes. A opção por estes adjuvantes

está relacionada a sua empregabilidade no setor alimentício e pelo alto poder sorvente que contribui para a redução da higroscopicidade , além disso, busca verificar aquele que forneça melhores resultados tecnológicos para obtenção de produtos farmacêuticos, preservando ainda a composição química da planta (SOUZA, 1997).

Portanto, o desenvolvimento de produto vegetal padronizado, com características químicas, físicas, físico-químicas e tecnológicas definidas é vital para o desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e de formas farmacêuticas que contemplem a composição química da droga vegetal e satisfaçam os parâmetros farmacêuticos básicos de qualidade e reprodutibilidade na preparação do produto de uso medicinal (AGUADO et al., 2006).

Neste trabalho foi proposto a obtenção tecnológica de extratos padronizados com a *Lafoensia pacari*, nativa do cerrado.

#### 1.1. *LAFOENSIA PACARI* A. ST. HIL. (LYTHRACEAE)

A família Lythraceae está enquadrada na ordem Myrtales, subclasse Rosidae, classe Magnoliopsida e divisão Magnoliophyta (CRONQUIST, 1981). Esta família apresenta cerca de 20 gêneros, em geral, constituídos por árvores e arbustos, com ampla distribuição geográfica, sendo que a maior parte encontra-se nos trópicos e subtropicais de todo o mundo (JOLY, 2002).

*L. pacari* (Figura 1) é uma árvore de fitofisionomia de cerrado sentido restrito, cerradão, mata ciliar, mata seca (SILVA JÚNIOR, 2005) e florestas de altitude (LORENZI, 1992). Ocorre com frequência em 10 estados brasileiros como Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e Tocantins (RATTER, BRIDGEWATER, RIBEIRO, 2001). Também pode ser encontrada em floresta semi-decídua e savana arbórea no Paraguai e Bolívia (CARVALHO, 1994).

**Figura 1:** Aspectos botânicos da *Lafoensia pacari* A. St. Hil: (A) Aspecto geral da planta; (B) Casca do caule



**FONTE:** COELHO, 2008

Essa planta é conhecida popularmente no Brasil como: mangabeira-brava e mangaba-brava (MS); pacuri, pau-de-bicho, pé-de-pinto e pacari-do-mato, (MG); pequi-amarelo (BA); mangaba brava, pacari e dedal (GO) (CARVALHO, 1994; PROENÇA et al., 2000), e como morosyvo, no Paraguai (CARVALHO, 1994).

É utilizada pela população brasileira no tratamento de câncer (SÓLON et al., 2000), dores na coluna, gastrite e úlcera (NUNES et al., 2003), como antidiarréico (COELHO et al., 2005), antipirético, cicatrizante e tônico (MUNDO; DUARTE, 2007).

### **1.1.1. Atividade biológica**

A ampla utilização desta planta é um forte indicativo de que ela contém em sua composição química substâncias com aplicações terapêuticas. Na prospecção fitoquímica verificou-se que as folhas apresentaram esteróides, triterpenos e taninos. E na casca do caule há a presença de saponinas, esteróides, triterpenóides, flavonoides, taninos e fenóis (SOUZA JÚNIOR; RUDOLF, 1996; TAMASHIRO FILHO, 1999; SÓLON, 2000). Dentre os compostos fenólicos identificados destaca-se o ácido elágico. Lima et al. (2006) e Porfírio et al. (2009) em estudos realizados

com extratos obtidos das folhas e casca do caule de *L. pacari* relataram atividade antimicrobiana. Enquanto, Müller et al. (2007) verificaram atividade contra o vírus *herpes simplex* tipo 1.

Rogério et al. (2003, 2006, 2007 e Matos et al (2008) relataram atividades anti-inflamatória e analgésica. Matos et al. (2008) também observaram que o extrato líquido da casca do caule de *L. pacari* contem compostos com atividades depressora do SNC. Nascimento et al.(2011), também confirmaram a atividade antinoceptiva e anti-inflamatória, e ainda destacaram que a ação analgésica é independente da atividade anti-inflamatória e do ácido elágico.

Silva Júnior et al.(2010) verificaram a atividade antifúngica, do extrato bruto, das frações e do ácido elágico obtidos da casca do caule de *L. pacari*. Concluíram que todos os meios testados exibiram atividade contra *Candida* spp. e *Saccharomyces cerevisiae* porém não detectaram ação contra fungos filamentosos e dermatófitos.

De acordo com Galdino, et al.(2010) o extrato hidroalcoólico da casca do caule de *L. pacari* produziu atividade depressora do sistema nervoso central sem alterar a coordenação motora de camundongos albinos suíços.

## 1.2. ELAGITANINOS E ÁCIDO ELÁGICO

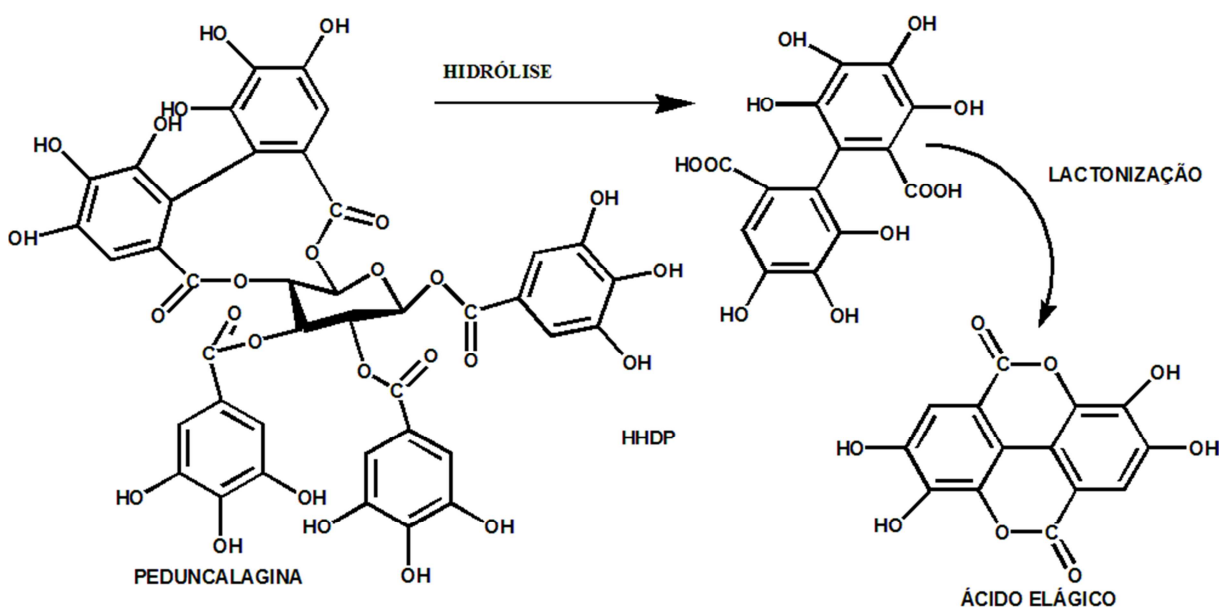
Os elagitaninos correspondem a uma classe de polifenóis, amorfos, com sabor adstringente que atuam como ácidos fracos e são encontrados em vacúolos no citoplasma. São encontrados em diferentes partes da planta como caule, folhas, cascas e frutos. A concentração de elagitaninos no vegetal é estabelecida pela quantidade de ácido elágico livre e hidrolisado. Estes compostos caracterizam-se por serem hidrossolúveis, possuem alto peso molecular e apresentarem propriedades que induzem a precipitação de proteínas e alcalóides. São formados de ésteres do ácido hexahidroxi-difênico (HHDP) e um polioliol, geralmente, a glicose (ASCACIO-VALDÉS; BUENROSTRO-FIGUEROA; AGUILERA-CARBO, 2011).

Encontrados em muitas árvores economicamente importantes (carvalhos, eucaliptos), frutas (morangos, amoras, framboesas), e em castanhas (nozes). Os elagitaninos são considerados fisiologicamente importantes para proteção das plantas contra patógenos (CLIFFORD; 2000).

São nutrientes de alta relevância na dieta humana, já que há provas da sua ação na prevenção de doenças degenerativas, como câncer e doenças cardiovasculares, devido as suas propriedades antioxidantes. A atividade antioxidante dos compostos polifenólicos é devida, principalmente às suas propriedades redox, importante na absorção e neutralização dos radicais livres (ASCACIO-VALDÉS; BUENROSTRO-FIGUEROA; AGUILERA-CARBO, 2011).

Outra característica dos elagitaninos é a sua capacidade de sofrer hidrólise e reações de polimerização. A hidrólise de elagitaninos contendo o grupamento hexahidroxiifenol produz o ácido elágico por lactonização (Figura 2) (HELM, 2001).

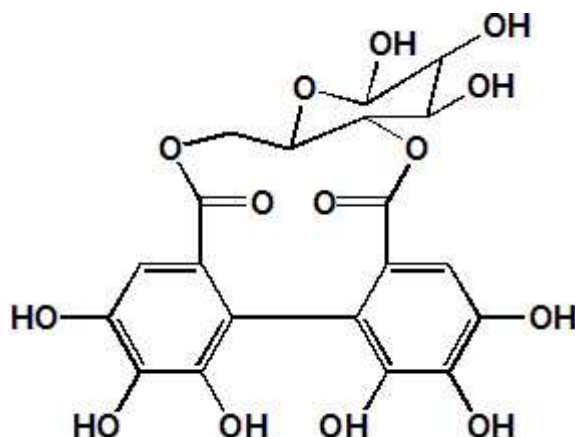
**Figure 2:** Reação de hidrólise da peduncalagina



Fonte: AGUILERA-CARBÓ 2008.

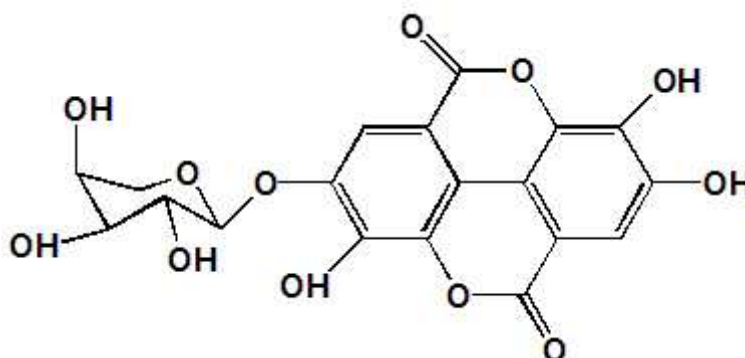
O ácido elágico está presente em algumas frutas e castanhas tais como: o morango (*Fragaria ananassa*), a framboesa (*Rubus idaeus* L.), a romã (*Punica granatum* L.), a amora-preta (*Morus nigra* L.) e em algumas sementes como as nozes (*Juglans regia* L.) e as avelãs (*Corylus avellana* L.). (CLIFFORD, 2000). Estruturalmente, o ácido elágico corresponde a uma dilactona de ácido gálico e pode ser encontrado na forma de elagitaninos (Figura 3) e glicosilada (Figura 4);

**Figure 3:** Ácido elágico esterificado



Fonte: HELM, 2001.

**Figura 4:** Ácido elágico glicosilado



Fonte: PINTO, 2008.

Altamente termo-estável (ponto de fusão 359°C) o ácido elágico possui duas lactonas que podem atuar como doadores de elétrons fornecendo assim uma característica hidrofílica. Com peso molecular de 338,2 g/mol e elevada capacidade antioxidante, com aplicações em diferentes áreas da indústria alimentícia (ASCACIO-VALDÉS; BUENROSTRO-FIGUEROA; AGUILERA-CARBO, 2011).

Alguns estudos indicam diversas atividades biológicas do ácido elágico, tais como: antitumoral, antiviral, antioxidante e antimicrobiana (ASCACIO-VALDÉS; BUENROSTRO-FIGUEROA; AGUILERA-CARBO, 2011; ROGERIO et al., 2003; SÓLON et al. (2000).

## 2. JUSTIFICATIVA

Como essa espécie vegetal apresenta uma grande utilização popular e várias atividades biológicas reportadas na literatura, verificou-se a necessidade do desenvolvimento tecnológico de extratos vegetais padronizados. Além disso, não foram encontrados na literatura científica dados que possibilitem a obtenção e padronização de insumos tecnológicos de extratos vegetais padronizados a partir da casca do caule de *L. pacari*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a obtenção tecnológica de extratos vegetais padronizados a partir da casca do caule de *L. pacari*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a matéria-prima vegetal;
- Obter e caracterizar o extrato líquido da casca do caule de *L. pacari* através de parâmetros físico-químicos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato líquido;
- Desenvolver método analítico para a identificação e quantificação do ácido elágico no extrato líquido de *L. pacari*;
- Padronizar e otimizar o método de secagem para obtenção do extrato seco.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. MATERIAL VEGETAL**

A coleta das cascas do caule de *L. pacari* foi realizada no município de Niquelândia em Goiás a 14°20' 50.58" de latitude sul, 48°04' 26.53" longitude oeste e altitude de 1837 m.

O material foi identificado pelo professor Dr. José Realino de Paula e uma exsicata depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás sob registro de nº43186.

As cascas do caule foram coletadas manualmente e em seguida foram higienizadas, estabilizadas e desidratadas em estufa (Solab Científica®) com circulação forçada de ar a 40°C. Após a desidratação o material seco foi triturado em moinho de facas (Willy) e acondicionado ao abrigo de luz e umidade.

### **4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES**

Os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e grau cromatográfico.

### **4.3. MÉTODOS**

#### **4.3.1. Caracterização do material vegetal**

Para a caracterização e controle de qualidade do material vegetal foram utilizados os seguintes parâmetros: análise macroscópica da casca do caule, análise microscópica dos pós, análise sensorial e organoléptica, análise granulométrica, determinação do índice de intumescência, determinação do teor de cinzas totais, determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido e determinação da perda por dessecação.

##### **4.3.1.1. Análise Macroscópica da casca do caule**

Foram observados os aspectos morfológicos da casca do caule de *L. pacari* como cor, forma e superfície conforme Oliveira, Akisue, Akise (1996) e Farmacopéia do Cerrado (BRASIL, 2010).

#### 4.3.1.2. Análise microscópica dos pós

O pó das cascas do caule foi analisado seguindo os procedimentos da Farmacopéia Brasileira 5ª Edição (2010) e utilizando microscópio trinocular (Zeiss Axiostar Plus®) acoplado a câmera fotográfica (Canon Power Shot G10). As imagens obtidas foram processadas através do software Axio Vision 4.8 com escalas mantidas nas mesmas condições ópticas.

#### 4.3.1.3. Análise sensorial e organoléptica

Foram observados cor e odor conforme estabelecido pela Farmacopéia Brasileira, 5ª Edição (2010).

#### 4.3.1.4. Pesquisa de material estranho

Uma amostra do pó das cascas de *L. pacari* foi espalhada sobre uma superfície plana e analisada inicialmente a olho nu e posteriormente com o auxílio de uma lente de aumento, visando detectar a presença de material estranho na mesma. O material separado foi pesado e a porcentagem de matéria estranha foi determinada com base no peso da amostra submetida ao ensaio conforme Farmacopéia Brasileira, 5ª Edição (2010).

#### 4.3.1.5. Análise Granulométrica

Uma amostra de 25 g do pó da casca do caule de *L. pacari* foi pesada em balança semi-analítica e colocada sobre um conjunto de tamises de aço inox previamente pesados, composto de malhas de 710, 355, 300, 250, 180 e 106 µm, provido de tampa e recipiente para a coleta do pó. O conjunto de tamises foi posicionado sobre agitador mecânico (Bertel®), submetido a vibrações em

velocidade padronizada por 20 min. Em seguida, as porções de pó retidas em cada um dos tamises foram pesadas separadamente para avaliar o tamanho das partículas e conseqüentemente classificá-las de acordo com a Farmacopéia Brasileira, 5ª Edição (2010).

A análise foi realizada em triplicata e os valores apresentados e utilizados nos cálculos referem-se à média dos valores obtidos.

#### 4.3.1.6. Determinação do Índice de Intumescência

As análises foram realizadas em água e em solução etanólica a 80%. Para ambas pesou-se 1 g de amostra do pó da casca do caule de *L. pacari* em balança semi-analítica, e adicionou-se a uma proveta contendo 25 mL de solvente. Agitou-se a proveta em pequenos intervalos por 1 h e após 3 h de repouso, à temperatura ambiente, o volume final ocupado pelo material vegetal calculado. Os resultados foram obtidos em triplicata para cada teste e representados pela média e desvio padrão.

#### 4.3.1.7. Determinação do teor de cinzas totais

A análise seguiu conforme os procedimentos da Farmacopéia, 5ª Edição (2010). Em três cadinhos previamente calcinados, resfriados e pesados foram colocadas, 3 g da amostra de pó da casca do caule de *L. pacari*. Em seguida, as amostras foram incineradas a 600 °C, durante 3 h em mufla modelo (EDG Equipamentos® - Edgcon1P) até a obtenção das cinzas. Após serem resfriados em dessecador os cadinhos foram pesados e calculou-se a porcentagem de cinzas em relação à amostra seca ao ar. Os resultados foram obtidos em triplicata para cada teste e representados pela média e desvio padrão.

#### 4.3.1.8. Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido

Realizada de acordo com a Farmacopéia Brasileira, 5ª Edição (2010). O resíduo obtido no ensaio de cinzas totais foi fervido durante 5 minutos com 25 mL de

ácido clorídrico 7% (p/v), em um cadinho coberto com vidro de relógio. O vidro de relógio foi lavado com 5 mL de água quente e as amostras (resíduo + lavagem do vidro de relógio) foram filtradas em papel de filtro isento de cinzas. Em seguida, lavou-se o papel de filtro com água quente até pH neutro e transferiu para o cadinho original, cujo conteúdo foi secado sob chapa quente e incinerado em mufla a 500 °C, durante 4 h. O teor de cinzas insolúveis em ácido foi calculado como percentual pela média de três determinações em relação à droga seca ao ar.

#### 4.3.1.9. Determinação da perda por dessecação

Realizada de acordo com a Farmacopéia Brasileira, 5ª Edição (2010). A determinação da quantidade de substância volátil presente no pó da casca do caule de *L. pacari* foi realizada utilizando balança de infravermelho com lâmpada de halogênio. Cerca de 1 g do pó da casca do caule de *L. pacari* foi colocada em uma balança marca (Ohaus, Florham Park, USA modelo MB 35) a temperatura de 105°C. A perda por dessecação foi registrada, e a porcentagem expressa como média e desvio padrão dos valores encontrados.

#### 4.3.1.10. Determinação do perfil cromatográfico do pó da casca do caule de *L. pacari* por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Aproximadamente 60 mg do pó da casca do caule foi submetido à extração com 10 mL de metanol P.A. por 15 min em ultrassom. Amostras deste extrato e do padrão de ácido elágico (Sigma Aldrich® – 95%) foram aplicadas com o auxílio de uma micropipeta automática, na extremidade inferior de uma cromatoplaça de alumínio impregnada com sílica gel 60F<sub>254</sub> (Merck). A cromatoplaça foi colocada em uma cuba cromatográfica previamente saturada com o vapor da fase móvel composta por tolueno, acetato de etila, ácido fórmico e metanol (3:3:1,3:0,7v/v/v/v).

Após a eluição, a cromatoplaça foi seca à temperatura ambiente e revelada com cloreto férrico 1%. A análise foi realizada através da comparação das características do R<sub>f</sub> da banda da amostra do extrato do pó da casca do caule de *L. pacari* com o da banda do padrão de ácido elágico.

#### 4.3.1.11. Determinação do teor de ácido elágico na droga vegetal por CLAE

A quantificação do ácido elágico na droga vegetal foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) conforme condições cromatográficas utilizadas na validação do método para determinação do teor de ácido elágico no extrato líquido de *L. pacari*. Para esta análise pesou-se 50 mg da droga vegetal, transferiu para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com etanol a 80%. As amostras foram submetidas a banho de ultrassom por 30 min. Em seguida, foram filtradas em membrana de 0,45 µm e submetidas à análise por CLAE. A determinação do teor de ácido elágico na droga vegetal foi realizada em triplicata e o ácido elágico da amostra foi identificado por comparação com o tempo de retenção e espectros de UV em relação ao padrão de ácido elágico.

#### 4.3.2. Obtenção e caracterização do extrato líquido de *L. pacari*

Estudos prévios foram realizados para definir as melhores condições da percolação.

Para avaliar a técnica de extração, na preparação do extrato hidroalcoólico de *L. pacari*, a maximização dos resultados foi obtida por meio de aplicação de estudos fatoriais, determinando a influência da relação droga/solvente (D/S), tempo de extração e graduação alcoólica.

O planejamento fatorial para o estudo do processo de extração foi o composto central rotacional inscrito, o qual consiste em um fatorial  $2^3$  completo mais seis pontos centrais e seis experimentos estrela, totalizando vinte experimentos. Para a construção da matriz de ensaios, foram consideradas 3 variáveis independentes: relação droga/solvente (X1); tempo (X2); graduação alcoólica (X3) e o teor de ácido elágico como variável dependente.

Os níveis dos fatores estudados estão apresentados na Tabela 1 que mostra os valores codificados e não-codificados de cada fator.

Os fatores foram codificados para permitir a análise de variância (ANOVA) seguindo a regra de codificação dada pela Equação 1:

$$\text{Valor cod.} = \frac{(\text{valor não codificado} - (0,5 \times (\text{maior valor} + \text{menor valor})))}{0,5 \times (\text{maior valor} - \text{menor valor})} \quad (1)$$

**Tabela 1:** Fatores codificados e seus níveis no planejamento fatorial  $2^3$  mais pontos estrela e central.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
X <sub>1</sub> . D/S (mg/mL)	1/6	1/8	1/10
X <sub>2</sub> . t (min)	30	60	90
X <sub>3</sub> . Grad. Alcool.(%)	65	75	85

**Legenda:** D/S – droga solvente; t - tempo; Grad. Alcool – Graduação Alcólica

Os demais fatores codificados nos valores de -1,682 a +1,682 representam o planejamento estrela.

A análise estatística dos dados experimentais foi realizada por análise de variância (ANOVA) usando a metodologia de superfície de resposta, empregando o software *Excel 2010* (Microsoft, USA). Os gráficos foram obtidos empregando o software *Octave* (Versão 3.2.2). A função de resposta aplicada foi obtida por regressão múltipla, conforme a Equação 2:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_1^2 + \beta_5 X_2^2 + \beta_6 X_3^2 + \beta_7 X_1 X_2 + \beta_8 X_1 X_3 + \beta_9 X_2 X_3 \quad (2)$$

Em que: Y = variável dependente;

$\beta_0$  = constante;

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$  = coeficientes polinomiais lineares;

$\beta_4, \beta_5, \beta_6$  = coeficientes polinomiais quadráticos;

$\beta_7, \beta_8, \beta_9$  = coeficientes de interação entre as variáveis de processo estudadas;

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub> = valores codificados das variáveis D/S - proporção droga solvente; T - tempo; Grad. Alcool – Graduação Alcólica.

#### 4.3.2.1. Obtenção do extrato líquido

Assim, 1000g do pó da casca do caule de *L. pacari* foram submetidos a maceração por 24 h e em seguida percolado com solução hidroalcoólica 80% em temperatura ambiente com gotejamento de 7 gotas por min o até esgotamento.

A percolação foi acompanhada por CCD, conforme condições definidas no item 4.3.1.10 e o tempo necessário para o esgotamento total foi de 45 dias.

O extrato percolado foi concentrado em rotaevaporador industrial (Buchi® – modelo R-220 SE), sob as seguintes condições de pressão, temperatura e rotação 80 mbar, 40 °C e 70 rpm respectivamente até a proporção droga : solvente 1:2. O material recolhido foi mantido sob refrigeração e ao abrigo de luz.

### 4.4. CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO LÍQUIDO

#### 4.4.1. Determinação do pH

A determinação do pH do extrato líquido das cascas do caule de *L. pacari* foi realizada conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010). Foi utilizado um potenciômetro (Tecnal–model TEC 3-MP) previamente calibrado com soluções tampão 4,0 e 7,0. O resultado foi apresentado como média e desvio padrão dos valores encontrados.

#### 4.4.2. Determinação da densidade relativa

A densidade foi determinada pelo método do picnômetro, descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010). O resultado foi apresentado como média e desvio padrão dos valores encontrados.

#### 4.4.3. Determinação da viscosidade

A viscosidade do extrato líquido de *L. pacari* foi determinada por viscosímetro Brookfield - DV-III a uma velocidade de 100 rpm, torque de 14% e utilizando spindle LV1. O resultado foi apresentado como média dos valores obtidos.

#### **4.4.4. Determinação do teor alcoólico**

A determinação do teor alcoólico do extrato líquido das cascas do caule de *L. pacari* foi realizada em cromatógrafo a gás Varian 3900, com injetor manual, usando como padrão interno solução de propanol a 500 ppm. Na análise cromatográfica foi utilizada uma coluna Phenomenex - ZB-5 ( 30 m X 0,25mm X 0,25 µm). As condições cromatográficas de análise foram: temperatura do forno: 45°C por 2,5 minutos. E a temperatura foi aumentada até atingir 220°C a cada 35°C/min, sendo esta temperatura mantida por mais 1 min. Fluxo dos gases de queima, do detector FID: 300 mL/min para o ar sintético e 30 mL/min para o Hidrogênio. Gás de Make-up: Nitrogênio, a 29 mL/min e a vazão do gás de arraste (N<sub>2</sub>) de 1 mL/min e divisão de fluxo de 1:30. O ensaio foi realizado em triplicata e o resultado foi apresentado como média e desvio padrão dos valores encontrados.

Para a análise utilizou-se como padrão, etanol absoluto a 500 µL/L (500 ppm), diluente, a dimetilformamida e como amostra, o extrato líquido numa concentração de 1000 ppm (100 µL de amostra para um balão de 100 mL). O ensaio foi realizado em triplicata e o resultado foi apresentado como média e desvio padrão dos valores encontrados.

#### **4.4.5. Determinação do teor de sólidos**

O teor de sólidos no extrato líquido foi verificado através de uma balança com lâmpada de halogênio. Cerca de 1 mL do extrato líquido das cascas do caule de *L. pacari* foi colocado em uma balança (Ohaus<sup>®</sup> MB35), e submetida a alta temperatura (105°C). O valor obtido em percentual, no display da balança foi subtraído de 100%, resultando em teor de sólidos. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos como média e desvio padrão.

#### **4.4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana**

##### **4.4.6.1 Microrganismos utilizados e condição de crescimento**

Para avaliar a atividade antimicrobiana do extrato líquido de *L. pacari*, o ensaio testou amostras de microrganismos padrão e isolados clínicos fornecidos

pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG).

Os microrganismos utilizados para este ensaio foram *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus epidermidis* ATCC 12229, *Micrococcus roseus* ATCC 1740, *Micrococcus luteus* ATCC 934, *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 *Cryptococcus sp* ATCC D, *Cryptococcus gatti* L48, *Cryptococcus neoformans* L3, *Candida albicans* 63U, *Candida parapsilosis* 86U, *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

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.

#### 4.4.6.3 Atividade antimicrobiana em ensaio in vitro

A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio de técnicas de microdiluição em caldo Mueller – Hinton para bactérias e RPMI para fungos, conforme preconizado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), sendo o método proposto para bactérias o CLSI (2009) e para fungos o CLSI (2008). Este estudo foi realizado em microplacas de 96 poços em forma de “U” estéreis.

O extrato líquido de *L. pacari* na concentração inicial de 2000 µg mL<sup>-1</sup> para bactérias e 1000 µg mL<sup>-1</sup> para fungos foi adicionado a primeira coluna da microplaca e a partir desta coluna foram retirados 100 µL 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 µg mL<sup>-1</sup>.

Após a diluição seriada, as amostras foram misturadas com o inóculo preparado de acordo com a escala 0,5 de McFarland 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 h de incubação para bactérias, após 48 h para *Candida* e após 72 h de incubação para *Cryptococcus*.

Uma hora antes do término do período de incubação acrescentou-se, a cada um dos orifícios, 20 µL de cloreto de trifetil tetrazolium (TTC) a 0,5% e re-incubou-se as placas a 35°C por aproximadamente 30 min. A presença de uma coloração vermelha foi considerada prova de crescimento microbiano. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano, ou seja, a do orifício de menor concentração onde não se verifica coloração vermelha.

#### 4.4.6.3 Controles

- ✓ Linha G- Controle da contaminação do meio de cultura e dos extratos, recebeu extrato e caldo MH, mas não recebeu inóculo.
- ✓ Linha H- Controle do DMSO. Realizou-se diluição seriada semelhante a do extrato líquido e adicionou-se o inóculo.
- ✓ Coluna 12- Controle do crescimento microbiano. Apenas recebeu meio de cultura e inóculo.

#### **4.4.7. Determinação do perfil cromatográfico do extrato líquido por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

Uma alíquota de 600µL foi utilizada no preparo da análise. Amostras deste extrato e do padrão de ácido elágico (Sigma Aldrich® – 95%) foram aplicadas com micropipeta automática na extremidade inferior de uma cromatoplaça de alumínio impregnada com sílica gel 60F254 (Merck). A cromatoplaça foi colocada em uma cuba cromatográfica previamente saturada com o vapor da fase móvel composta por tolueno, acetato de etila, ácido fórmico e metanol (3:3:1,3:0,7v/v/v/v).

Após a eluição, a cromatoplaça foi seca à temperatura ambiente e exposta em uma câmara UV (Spectroline) e as manchas reveladas sob luz ultravioleta a 365 nm. A análise foi realizada através da comparação entre a banda do padrão de ácido elágico com a banda da amostra do extrato líquido da casca do caule de *L. pacari*.

#### **4.4.8. Quantificação de ácido elágico no extrato líquido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e validação da metodologia analítica**

##### **4.4.8.1. Sistema cromatográfico**

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters (Massachusetts, USA) equipado com bomba quaternária, módulo de separação e2695, detector de arranjo de diodos (PDA) 2998 e sistema de processamento de dados Empower 2.0. Uma coluna cromatográfica RP-18, 3 $\mu$ , 250 x 4.6mm (Phenomenex) foi utilizada nos ensaios.

Os parâmetros de adequabilidade do sistema (*system suitability*): fator de cauda (T); resolução (R); número de pratos teóricos (N) e repetibilidade do padrão foram avaliados conforme especificações do FDA (*Food and Drug Administration*, 1994).

##### **4.4.8.2. Determinação das condições cromatográficas**

A metodologia desenvolvida para a determinação do teor de ácido elágico a partir da casca do caule de *L. pacari* foi baseada na metodologia analítica descrita por Chaibub et al. (2012). A fase móvel foi uma mistura de solvente A - 30% (acetonitrila) e B - 70% (água acidificada com 0,5% (v / v) de ácido orto-fosfórico) mantida a um fluxo de 0.5 mL min<sup>-1</sup> sob condições isocráticas. Alíquotas de 10  $\mu$ L foram mantidas como o volume de injeção em todas as análises. O comprimento de onda de leitura foi de 252 nm, proveniente do estudo do cromatograma de varredura do padrão de ácido elágico na faixa de 210 a 400 nm. A coluna cromatográfica foi mantida a 30°C. O tempo de corrida tanto para as amostras quanto para o padrão foi de 12 min. Todas as soluções foram preparadas com o solvente etanol 80% v/v e filtradas em membrana de 0,45 $\mu$ m (Millex<sup>®</sup> - Millipore); a fase móvel foi filtrada em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45 $\mu$ m (Millipore).

#### **4.4.9. Validação da metodologia analítica**

O método analítico desenvolvido para a determinação do teor de ácido elágico no extrato líquido de *L. pacari* foi validado conforme as especificações da

Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003) contemplando os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

#### 4.4.9.1. Seletividade

A seletividade do método foi verificada pela análise dos cromatogramas de varredura de 210 a 400 nm do solvente utilizado (etanol 80% v/v), da solução do padrão a uma concentração de 0,01591 mg/mL e da solução de extrato líquido a 100% da concentração estabelecida no método.

#### 4.4.9.2. Linearidade

Este ensaio é estabelecido pela análise de um gráfico em função da concentração. Existindo uma relação linear, é possível plotar uma curva de calibração e obter uma equação da reta com o coeficiente de correlação linear ( $r$ ).

##### **a) Linearidade para o padrão de ácido elágico:**

Para a determinação da linearidade foi necessária a obtenção de três curvas padrão preparadas em dias consecutivos. Uma solução mãe de 3,7 mg de ácido elágico foi transferida para um balão de 10 mL. Completou-se o balão com etanol a 80% v/v e a partir dela preparou-se diluições sucessivas nas concentrações de 0,00111 a 0,029045 mg/mL constituindo o intervalo linear. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45  $\mu$ m e injetadas em triplicata no cromatógrafo. Os resultados foram avaliados mediante cálculo do coeficiente de variação (CV) entre os pontos da curva e do coeficiente de correlação linear ( $r$ ).

##### **b) Linearidade para o ácido elágico na amostra do extrato líquido:**

Para a determinação da linearidade foi necessária a obtenção de três curvas padrão preparadas em dias consecutivos, através da diluição de alíquota de 200, 300, 400, 500, 600  $\mu$ L do extrato em 100 mL de etanol a 80% v/v, que compreendem respectivamente 50, 75, 100, 125 e 150 % do volume estabelecido para o método.

As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm e injetadas em triplicata no cromatógrafo. Os resultados foram avaliados mediante cálculo do coeficiente de variação (CV) entre os pontos da curva e do coeficiente de correlação linear (r).

#### 4.4.9.3. Precisão

Para cada nível avaliado foram realizadas seis determinações a 100% da concentração teste, assim, 400 µL de extrato foram diluídos para 100 mL com etanol 80% v/v. A repetibilidade foi calculada por meio do coeficiente de variação – Equação 3 – entre seis análises realizadas em um mesmo dia e por um único analista. A precisão intermediária foi calculada por meio do coeficiente de variação entre doze resultados das análises realizadas em dias diferentes e por analistas diferentes.

$$CV\% = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (3)$$

Onde: DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

#### 4.4.9.4. Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação do padrão e expressa em porcentagem pelo valor encontrado entre extrapolação da reta de adição padrão (valor verdadeiro) aos da amostra, que foram preparadas na faixa da linearidade. Foram preparadas quinze determinações de amostra do extrato líquido de *L. pacari* contemplando o intervalo linear de 50% a 150%, sendo cinco pontos em triplicata.

Para encontrar o percentual de recuperação, primeiramente realizou-se a linearidade das amostras do extrato líquido e na concentração de 100% (499,6 µg/mL) foram adicionados diferentes concentrações de soluções de padrão de ácido elágico ( 4; 8; 12; 16; 20 µg/ mL) obtendo-se a equação da reta que através desta encontrou-se o valor verdadeiro, sendo este o resultado da divisão dos coeficientes da reta (b/a).

O cálculo da exatidão foi expresso em função da Equação 4, onde o teor da amostra sem adição padrão corresponde à linearidade da amostra e o teor com adição padrão corresponde as amostras da concentração de 100%.

Equação 4:

$$\text{Exatidão(\%)} = \frac{\text{Teor da amostra sem adição padrão}}{\text{Teor com adição padrão}} \times 100 \quad (4)$$

#### 4.4.9.5. Robustez

Foi avaliada mediante pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, conforme Tabela 2. Os parâmetros avaliados foram: temperatura da coluna, fluxo da fase móvel e composição da fase móvel. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados de soluções analisadas nas condições usuais descritas no método, por meio do coeficiente de variação (CV%).

**Tabela 2:** Variações nas condições cromatográficas na quantificação do ácido elágico por CLAE

Parâmetro	Condições	Condições (Normal)	Condições
Temperatura da coluna	28°C	25°C	32°C
Fluxo da fase móvel	0,4mL/min	0,5mL/min	0,6mL/min
Composição da fase móvel	28% ACN : 72% Água acidificada com ácido ortofosfórico	30% ACN : 70% Água acidificada com ácido ortofosfórico	32% ACN : 68% de Água acidificada com ácido ortofosfórico

#### 4.4.10. Determinação do teor de ácido elágico no extrato líquido de *L. pacari*

A quantificação do ácido elágico no extrato líquido foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) conforme condições

cromatográficas utilizadas na validação do método para determinação do teor de ácido elágico no extrato líquido de *L. pacari* no item 4.4.8. Para esta análise 400 µL de extrato foi transferido para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com etanol a 80%. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm e submetidas à análise por CLAE. A determinação do teor de ácido elágico (AE) no extrato líquido foi realizada em triplicata.

O teor de ácido elágico foi calculado através da curva padrão de ácido elágico obtida na determinação da linearidade do padrão.

#### **4.4.11. Obtenção e caracterização dos extratos secos de *L. pacari***

Para obtenção e caracterização dos extratos secos de *L. pacari* foram utilizados os seguintes parâmetros: análise termogravimétrica do ácido elágico, avaliação dos parâmetros de secagem, determinação do teor de ácido elágico no extrato seco, determinação do teor de voláteis, determinação da atividade de água e microscopia eletrônica de varredura.

##### **4.4.11.1. Análise termogravimétrica (TG) do ácido elágico**

Durante o processo de secagem por *spray drying* utiliza-se temperaturas elevadas, assim, a análise termogravimétrica foi realizada com o intuito de ser uma avaliação previa da sensibilidade térmica das substâncias químicas do extrato e com isso poder determinar as condições ideais de trabalho na qual não há degradação.

Uma amostra sólida do padrão de ácido elágico de 9,05 mg, foi utilizada para a determinação da curva termogravimétrica em equipamento SHIMADZU® (Modelo DTG-60H).

As condições operacionais foram: cadinho de platina, razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>, no intervalo de 50 a 600°C, em atmosfera de ar sintético, com vazão média de 50 mL min<sup>-1</sup>. A curva de perda de massa foi obtida com o emprego do software Origin Pro 8.

#### 4.4.11.2. Avaliação da influência dos parâmetros de secagem na obtenção dos extratos secos

Na secagem para a obtenção do extrato seco de *L. pacari* foram utilizados dois tipos de adjuvantes, a maltodextrina e o aerosil. As condições operacionais empregadas foram definidas utilizando a técnica de planejamento experimental, com o objetivo de verificar os efeitos de alguns parâmetros do processo tais como: temperatura do ar de secagem, vazão do ar comprimido, vazão do ar de secagem e proporção de adjuvante de secagem em relação ao resíduo seco do extrato líquido. Os parâmetros que foram mantidos constantes durante o processo de secagem foram: a pressão do ar comprimido, diâmetro do bico aspersor e vazão do ar de secagem. Os valores para os parâmetros que se mantiveram constante se encontram na Tabela 3:

**Tabela 3:** Parâmetros constantes do processo de secagem

Parâmetro	Valor
Pressão do ar comprimido	4 Kgf/cm <sup>2</sup>
Diâmetro do bico aspersor	1,2 mm
Vazão do ar de secagem	4 mL/min

Realizaram-se 20 experimentos, com cada adjuvante, conforme as condições estabelecidas descritas na Tabela 4:

**Tabela 4:** Parâmetros do processo de secagem do extrato seco de *L. pacari*

Fator	Ar de sec. (mL/min)	Ar compr. (L/min)	Temp. (°C)	Adjuvante (%)
1	2,5	30	120	5
2	3,0	35	130	10
3	3,5	40	140	15
4	4,0	45	150	20
5	4,5	50	160	25

Após o planejamento de univariada, foi desenvolvido um planejamento fatorial fracionário de  $2^{5-2}$  com replicatas, baseado nas condições do planejamento anterior. Para a construção da matriz de ensaios, foram considerado 5 parâmetros sendo avaliado nas seguintes condições, como apresentado na **tabela 5**, tendo o teor de ácido elágico como variável dependente.

**Tabela 5:** Variáveis e níveis do Planejamento fatorial de  $2^{5-2}$  com replicatas

Fatores	Condições	
A	MALTODEXTRINA	AEROSIL
B	15%	25%
C	130°C	120°C
D	2,5mL/min	3,5mL/min
E	30L/min	40L/min

**Legenda:** A – Tipo de Adjuvante, B – Concentração do Adjuvante, C – Temperatura, D- Ar de Secagem e E – Ar Comprimido.

A análise estatística dos dados experimentais foi realizada por análise de variância (ANOVA) usando a metodologia de superfície de resposta. Os gráficos foram obtidos empregando o software Octave (Versão 3.2.2). A função de resposta aplicada foi obtida por regressão múltipla, conforme Equação 5:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_4x_1^2 + \beta_5x_2^2 + \beta_6x_3^2 + \beta_7x_1x_2 + \beta_8x_1x_3 + \beta_9x_2x_3 \quad (5)$$

Em que: Y = variável dependente;

$\beta_0$  = constante;

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$  = coeficientes polinomiais lineares;

$\beta_4, \beta_5, \beta_6$  = coeficientes polinomiais quadráticos;

$\beta_7, \beta_8, \beta_9$  = coeficientes de interação entre as variáveis de processo estudadas;

X1, X2 e X3 = valores codificados das variáveis

#### 4.4.11.3. Caracterização do extrato seco de *L. pacari*

Os extratos secos obtidos foram acondicionados, em frascos de vidro âmbar mantidos a temperatura ambiente, em dessecador, até a sua caracterização.

#### 4.4.11.4. Determinação do teor de ácido elágico no extrato seco por CLAE

A determinação do teor de ácido elágico nos extratos obtidos através do processo de secagem por spray drying foi realizada por CLAE conforme condições cromatográficas utilizadas na validação do método para determinação do teor de ácido elágico no extrato líquido de *L. pacari* (item 4.4.8). Para este teste pesou-se cerca de 25 mg de cada extrato, transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL e solubilizou-se em etanol 80% v/v. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm e 10 µL foram injetados em triplicata no cromatógrafo.

O teor percentual de ácido elágico no extrato seco foi calculado, através da curva padrão de ácido elágico obtido na determinação da linearidade do padrão e considerando-se as diluições da amostra.

#### **4.4.13. Determinação do teor de voláteis**

A determinação da quantidade de substância volátil presente nos extratos secos foi realizada por pesagem em balança de infravermelho com lâmpada de halogênio. Aproximadamente 0,5 g de amostra foram colocados em uma balança (Ohaus<sup>®</sup>MB35), e submetida a alta temperatura (105°C). O experimento foi realizado em duplicata.

#### **4.4.13. Determinação da atividade de água**

A determinação da atividade de água foi realizada utilizando equipamento medidor de atividade de água (Testo<sup>®</sup> - modelo 650), segundo orientações do fabricante e à temperatura constante de 23°C ± 0,2. Os ensaios foram realizados em duplicata.

#### **4.4.14 Microscopia eletrônica de varredura**

A análise da morfologia das partículas constituintes dos extratos secos foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução / UFG. Empregou-se nesta análise aparelho Jeol, (JSM – 6610), equipado com EDS (Thermo scientific NSS Spectral Imaging).

As amostras para a análise no MEV foram depositadas sobre fita dupla-face condutora de carbono, e esta fixada no porta amostra ("stub"). Em seguida, foram recobertas com um filme fino de ouro usando um *sputter* (Denton Vacuum – Desk V).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ANÁLISE MACROSCÓPICA

A casca do caule de *L. pacari* (Figura 6) se apresenta como um conjunto de escamas e está constituída por várias camadas de cascas finas de cor amarelo-avermelhada, com superfície externa em forma de cicatrizes e superfície interna bastante fibrosa. Tais características estão de acordo com Oliveira, (1996) e Farmacopéia do Cerrado (BRASIL, 2010).

**Figura 5:** Aspecto geral da casca do caule de *L. pacari*



**Legenda:** Casca do caule de *L. pacari*. **Fonte:** Farmacopéia do Cerrado (BRASIL, 2010).

### 5.2. INVESTIGAÇÃO MICROSCÓPICA DOS PÓS

Na microscopia dos pós foi observado grãos de amido, cristais e fibras na (Figura 7).

**Figura 6:** Microscopia dos pós da casca do caule de *L. pacari*: (A) Grão de Amido; (B) Cristais; (C) Fibras.



**Fonte:** Próprio autor.

Mundo (2007) também relatou a presença de fibras e de amiloplastos com cristais no pó das cascas do caule de *L. pacari*.

### 5.3. ANÁLISE SENSORIAL E ORGANOLÉPTICA

O pó da casca do caule apresenta coloração amarelada sem odor e sabor amargo.

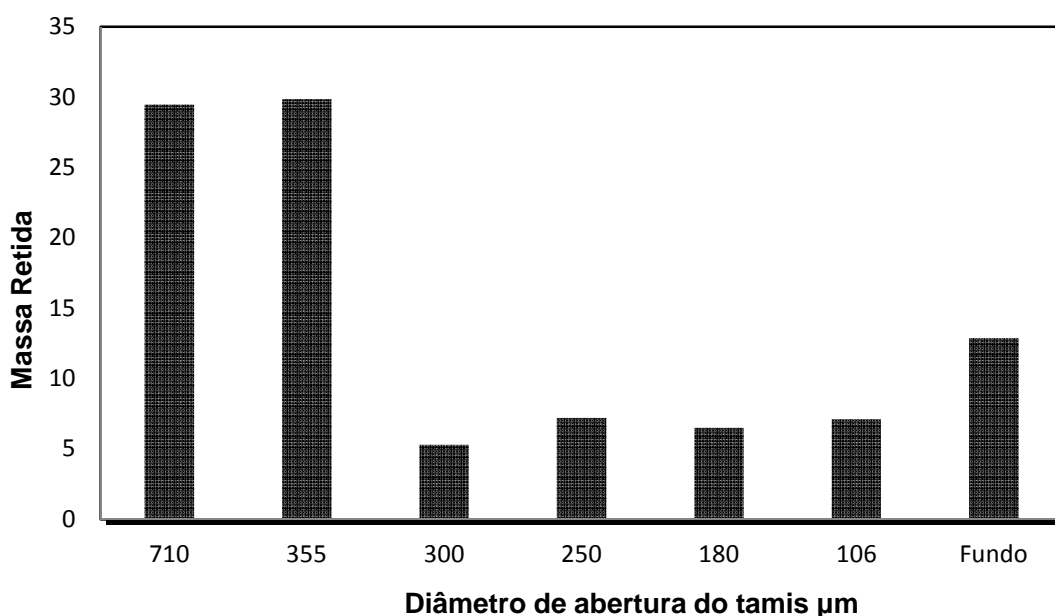
### 5.4. PESQUISA DE MATERIAL ESTRANHO

Não foi encontrado material estranho em *L. pacari*.

### 5.5. DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA

A distribuição granulométrica do pó da casca do caule de *L. pacari* permitiu classificá-lo como pó grosso, com um tamanho médio de partícula (D50) de 453,99  $\mu\text{m}$  de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª Edição (2010) no (Gráfico 1).

**Gráfico 1:** Distribuição granulométrica do pó da casca do caule de *L. pacari*



Fonte: Próprio autor.

A determinação da distribuição granulométrica está relacionada com o processo de extração utilizado neste trabalho. O grau de divisão das partículas caracteriza a presença de partículas grandes (pó grosso), o que pode levar a

resistência do solvente para penetrar no material analisado, tornando assim a extração mais lenta (MARQUES; VIGO, 2009).

## 5.6. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE INTUMESCÊNCIA

Os índices de intumescência encontrados em água e solução etanólica a 80% (v/v) foram de  $1,6 \pm 0,0$  mL e  $1,8 \pm 0,0$  mL por grama de amostra. Este resultado indica que no material analisado há pouca presença de mucilagens. Já que, estudos realizados por Pereira et al. (2011) apresenta valores considerados elevados para o índice de intumescência no valor de  $7,1 \pm 0,8544$  mL e  $7,95 \pm 0,2186$  mL.

Este parâmetro influencia na preparação dos percoladores, pois fornece um indicativo de intumescimento do pó quando em contato com o sistema solvente, permitindo perceber o volume extra de solvente que pode ser adicionado durante o processo de percolação (COUTO et al 2009; POSER, 2004).

## 5.7. DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS

Ao avaliar o teor de cinzas totais pretende-se verificar as impurezas inorgânicas não-voláteis que podem atuar como contaminantes. O resultado obtido foi de 0,80 de cinzas totais, com o desvio padrão de 0,0254%.

## 5.8. DETERMINAÇÃO DE CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO

O teor de cinzas insolúveis em ácido determina o teor de sílica e/ou constituintes silícicos da amostra. O valor obtido foi de  $0,16 \pm 0,00\%$  indicando que o material analisado apresenta uma pequena quantidade de cinzas provenientes da contaminação ambiental.

## 5.9. DETERMINAÇÃO DA PERDA POR DESSECAÇÃO

O teor de voláteis nas cascas do caule de *L. pacari* foi de 8,95%. Segundo Farmacopéia Brasileira 5ª Edição (2010), o teor de voláteis para drogas vegetais deve estar na faixa de 8 a 14%. O índice de voláteis dentro do limite especificado

indica que o processo de secagem foi adequado, não propiciando um microambiente favorável ao surgimento de microrganismos e insetos, e a consequente deterioração da matéria prima vegetal (COUTO et al, 2009).

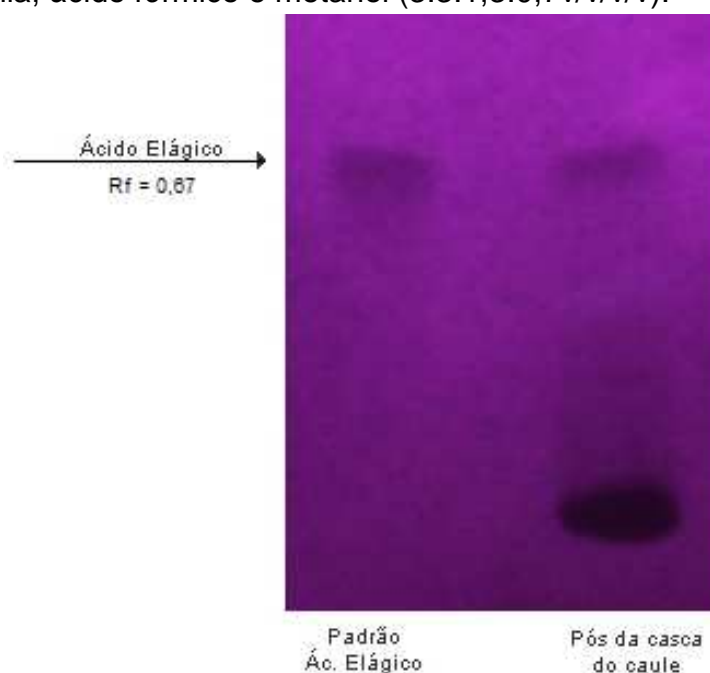
Os índices de intumescência, o teor de cinzas totais, o teor de cinzas insolúveis em ácido e a perda por dessecação podem se constituir em dados para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal constituída pelas cascas do caule de *L. pacari*.

#### 5.10. DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS PÓS DA CASCA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A Cromatografia em Camada Delgada é uma das técnicas pioneiras no âmbito das técnicas de separação, e ainda hoje é muito utilizada para a identificação de espécies químicas presentes em matrizes complexas como os extratos vegetais por ser rápido, simples e baixo custo.

A Figura 8 mostra o perfil cromatográfico do pó da casca do caule de *L. pacari* e mostra uma banda da amostra com o mesmo Rf do padrão de ácido elágico.

**Figura 7:** Perfil cromatográfico – CCD – dos pós da casca do caule de *L. pacari* FM: tolueno, acetato de etila, ácido fórmico e metanol (3:3:1,3:0,7v/v/v/v).



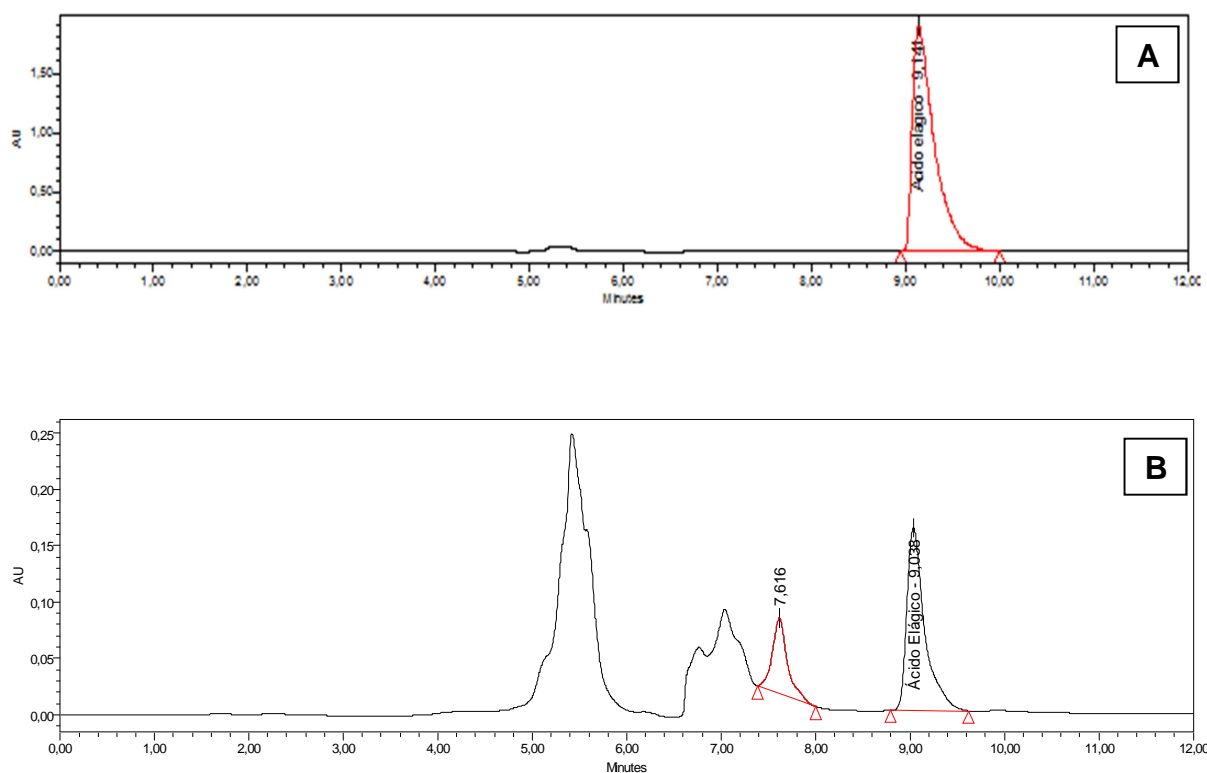
Fonte: Próprio autor.

## 5.11. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO ELÁGICO NA DROGA VEGETAL POR CLAE

A quantificação do teor de ácido elágico na casca do caule de *L. pacari* foi realizada a partir das áreas integradas do pico das amostras e o resultado para esta análise foi de 1,200%.

Os cromatogramas obtidos para a solução padrão de ácido elágico e amostra da droga vegetal são mostrados na Figura 9, sendo o tempo de retenção do padrão de ácido elágico de 9,14 min e o do ácido elágico na droga vegetal de 9,03 min.

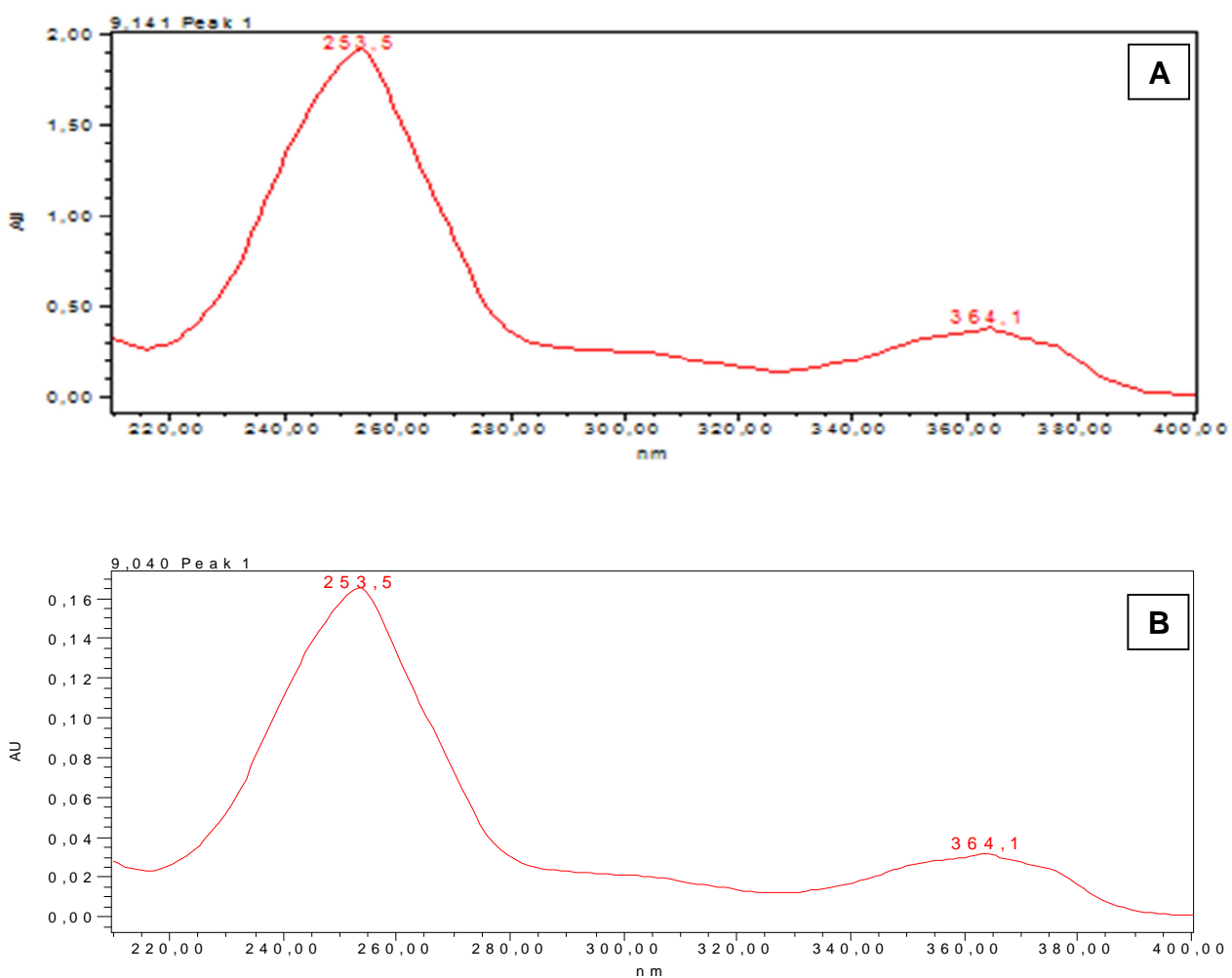
**Figura 8:** Cromatogramas do padrão de ácido elágico (A) e ácido elágico na droga vegetal de *L. pacari* (B).



**Legenda:** Condições cromatográficas: Fase móvel A - 30% (ACN) e B - 70% Solução ácida de ácido orto-fosfórico 0,5%, volume de injeção 10  $\mu$ L, fluxo isocrático de 0,5mL/min-1. Detector de arranjo diodos (PDA), coluna cromatográfica (C18, RP18, 3  $\mu$ m, 4,6 x 250 mm). Fonte: Próprio autor.

A Figura 10 apresenta os espectros de absorção na região UV-visível do padrão de ácido elágico (A) e do ácido elágico na casca do caule de *L. pacari* (B) derivados dos cromatogramas mostrados na Figura 9.

**Figura 9:** Espectros de absorção na região UV-visível do padrão de ácido elágico (A) e ácido elágico na casca do caule de *L. pacari* (B).



**Legenda:** Condições cromatográficas: Fase móvel A - 30% (ACN) e B - 70% Solução ácida de ácido orto-fosfórico 0,5%, volume de injeção 10  $\mu$ L, fluxo isocrático de 0,5mL/min-1. Detector de arranjo diodos (PDA), coluna cromatográfica C18 (RP18) 3  $\mu$ m (4,6 x 250 mm). Fonte: Próprio autor.

## 5.12. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LÍQUIDO DE *L. PACARI*

O método de extração empregado foi à percolação à temperatura ambiente, por se tratar de uma operação dinâmica capaz de promover uma extração exaustiva das substâncias presentes na amostra. Devido o material vegetal analisado ser rico em polifénóis, e essas substâncias poderem sofrer modificações estruturais, não foi utilizada a extração à quente, mantendo assim a estabilidade do material (ALVES, 2006)

A mistura etanol/água 80%(v/v) foi escolhida como líquido extrator devido a sua eficácia na extração de compostos fenólicos de materiais vegetais conforme relatados por Pereira et al. (2006), e Alves (2006) e também por se tratar de um solvente seguro para uso farmacêutico (HONG, 2010).

O esgotamento do pó da casca do caule de *L. pacari* em relação ao marcador ácido elágico, foi alcançado após 45 dias de percolação e obteve-se 5 L de extrato líquido concentrado.

### 5.12.1. Otimização do processo de extração

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos no planejamento composto central para a extração do extrato líquido da casca do caule de *L. pacari*.

**Tabela 6:** Planejamento Composto Central para a obtenção do extrato líquido de *L. pacari*

<b>Experimento</b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>recup.(%)</b>
1	1	1	1	46,20490
2	1	1	-1	46,96162
3	1	-1	1	42,94930
4	1	-1	-1	40,41474
5	-1	1	1	50,62627
6	-1	1	-1	52,26210
7	-1	-1	1	46,37765
8	-1	-1	-1	47,72139
9	0	0	0	47,40092
10	0	0	0	46,91633
11	0	0	0	47,76504
12	0	0	0	47,07645
13	0	0	0	47,45165
14	0	0	0	47,77472
15	0	0	-1,682	45,90965
16	0	0	1,682	47,25651
17	0	-1,682	0	44,62526
18	0	1,682	0	51,45150
19	-1,682	0	0	55,02020
20	1,682	0	0	42,49331

A recuperação foi dada utilizando o líquido de extração, após diluição, dividido pela quantidade total de marcador presente na droga vegetal, conforme estabelecido pelo método quantitativo. A análise estatística originou o seguinte modelo matemático:

$$Y = 47,434 - 3,040X_1 + 2,202X_2, \text{ com } p < 0,05.$$

Onde  $X_1$  é o valor codificado da relação D/S e  $X_2$  é o valor codificado do tempo.

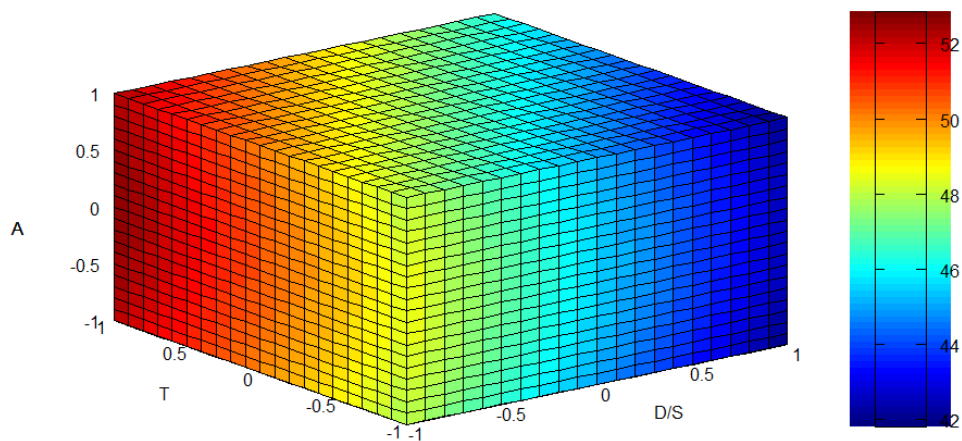
Na Tabela 7 têm-se o modelo estatístico de ANOVA seguindo a metodologia de superfícies de resposta.

**Tabela 7:** Estatística com superfície de resposta

	<b>Coefficientes</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Stat t</b>	<b>valor-P</b>
<b>Interseção</b>	47,434	0,439	108,028	1,13E-16
X <sub>1</sub>	-3,040	0,291	-10,437	1,07E-06
X <sub>2</sub>	2,202	0,291	7,558	1,93E-05
X <sub>3</sub>	0,078	0,291	0,267	0,795
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,243	0,284	0,857	0,412
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-0,011	0,284	-0,039	0,970
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	-0,527	0,284	-1,856	0,093
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,127	0,381	0,333	0,746
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,595	0,381	1,562	0,149
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	-0,448	0,381	-1,177	0,267

O gráfico obtido a partir da equação gerada, pelo método dos mínimos quadrados, foi o cubo representado pela Figura 11.

**Figura 10:** Gráfico da otimização do processo de extração do ácido elágico de *L. pacari*



**Fonte:** Próprio autor

No eixo X estão os valores codificados da relação Droga/Solvente e como se vê, para altos valores de X a extração é menor. Ou seja, quando a mistura está muito concentrada, o solvente não é capaz de solubilizar, ou extrair, o marcador. No eixo Y os valores codificados são referentes ao tempo. E quanto maiores os tempos de extração maior é a extração do marcador. Já no eixo Z os valores codificados são da graduação alcóolica e eles apresentam ser não significativo.

Para obter a condição ideal de extração verificou-se que todos os experimentos realizados dentro do espaço amostral escolhido, resultaram em baixa recuperação do marcador. Ou seja, notou-se que a extração em pequeno período de tempo não seria eficiente para essa droga vegetal, ainda que se utilizasse o ultrassom, pois o ácido elágico não seria extraído. Pelas análises verificou-se a necessidade de grande volume de solvente e extração lenta.

Optou-se, então, por uma extração por percolação, por vários dias consecutivos e com renovação de solvente.

### 5.13. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LÍQUIDO DA CASCA DO CAULE DE *L. PACARI*

#### 5.13.1. Caracterização do extrato líquido de *L. pacari*

A caracterização físico-química do extrato líquido da casca do caule de *L. pacari* permitiu a sua padronização e a utilização do ácido elágico como marcador químico. Os resultados dos parâmetros avaliados para a caracterização físico-química do extrato líquido estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8:** Parâmetros físico-químicos do extrato líquido da casca do caule *L. pacari*

<b>Parâmetro avaliado</b>	<b>Resultado <math>\pm</math> dp*</b>	<b>CV(%)</b>
pH	3,53 $\pm$ 0,006	0,164
Densidade relativa (g/mL)	0,986 $\pm$ 0,0004	0,042
Viscosidade (mPas)	8,40	-
Teor de sólidos (% p/p)	12,49	2,160
Teor alcólico	44,80%	

\*dp = Desvio padrão de análises realizadas em triplicata

As características do produto final obtido por nebulização/atomização são influenciadas pelas propriedades do material de entrada. Assim, a caracterização preliminar do material a ser seco é uma etapa de grande importância (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

O pH é um parâmetro importante no processo de padronização das soluções extrativas e na estabilidade dos componentes das formulações farmacêuticas. (CAMELO, 2010; LUBI; SATO; GAENSLY, 2003). O valor encontrado para o pH (3,53) é justificado pela presença de compostos ácidos no extrato líquido, como o ácido elágico.

A baixa viscosidade do extrato obtido foi satisfatória para o processo de secagem contribuindo para a formação de partículas com diâmetros menores (SOARES, 2002) e menor custo, pois a viscosidade do extrato influencia diretamente no tamanho da partícula do extrato seco a ser formado (SHAW, 1997), gastando menos energia ou menor pressão (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Para melhor eficiência do processo de secagem é importante que o material de entrada apresente elevado teor de sólidos já que esta característica exerce influência direta na produtividade do pó. Ele pode ser aumentado mediante a adição de adjuvantes de secagem que poderão contribuir para a redução da perda dos compostos de interesse, bem como, para a manutenção dos níveis destes compostos durante o processo de armazenagem do extrato seco (CAI, 2000).

O alto teor alcoólico encontrado no extrato final influencia na eficiência do processo de secagem, possibilitando o uso de temperaturas menores, gerando conseqüentemente um menor gasto de produção (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

### 5.13.2. Avaliação da atividade antimicrobiana

Na Tabela 9 são apresentados os valores de CIM obtidos para o extrato líquido das cascas do caule de *L. pacari* relativos as atividades antibacteriana e antifúngica. Pode-se concluir que este extrato apresentou atividade antibacteriana moderada com CIM de 250 – 500  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  contra *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Bacillus subtilis* (atropheus) ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* isolado clinico SPMI, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 934, *Micrococcus roseus* ATCC 1740, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus epidermidis* ATCC 12229 e *Enterobacter cloacae* HMA/FTA 502. A atividade fraca com CIM de 1000  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  foi obtida contra *Serratia marcescens* ATCC 14756. O extrato não apresentou atividade antimicrobiana contra *Samonella spp.* ATCC 19430 e *Escherichia coli* ATCC 11229.

Em relação aos fungos o extrato líquido apresentou boa atividade antifúngica sobre as cepas de *Cryptococcus sp* ATCC D, *Cryptococcus gatti* L48, *Cryptococcus neoformans* L3, *Candida albicans* 63U, *Candida parapsilosis* 86U, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 com CIM de 7,81 – 31,25  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ .

Os resultados da atividade antimicrobiana do extrato líquido foram classificados de acordo Holetz et al. (2002). Para esses pesquisadores CIM < 100  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  são considerados como tendo um bom potencial inibitório; de 100 – 500  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  atividade inibitória moderada; 500 – 1000  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  atividade fraca e > 1000  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  como inativa.

**Tabela 9:** Resultados dos testes de susceptibilidade antibacteriana e antifúngica para o extrato líquido das cascas do caule de *Lafoensia pacari* St. Hil

<b>Microrganismos</b>	<b>CIM* (<math>\mu\text{g. mL}^{-1}</math>)</b>
<b>Bactérias</b>	
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	250
<i>Bacillus subtilis</i> (atropheus) ATCC 6633	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolado clinico SPMI	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	250
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	250
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 934	250
<i>Micrococcus roseus</i> ATCC 1740	250
<i>Enterobacter cloacae</i> HMA/FTA 502	250
<i>Streptococcus epidermidis</i> ATCC 12229	250
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	500
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	500
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 14756	1000
<i>Samonella spp.</i> ATCC 19430	2000
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	2000
<b>Fungos</b>	
<i>Cryptococcus sp</i> ATCC D	31,25
<i>Cryptococcus gatti</i> L48	15,62
<i>Cryptococcus neoformans</i> L3	15,62
<i>Candida albicans</i> 63U	31,25
<i>Candida parapsilosis</i> 86U	7,81
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	15,62

\*CIM: Concentração Inibitória Mínima

Nesse trabalho obteve-se atividade antibacteriana moderada, entretanto, Nascimento (2000) e Porfírio (2009) relataram atividade antimicrobiana para o extrato líquido de *L. pacari*. Esta diferença pode estar relacionada às metodologias utilizadas nos testes, no preparo do extrato e nos microorganismos testados.

Porfírio (2009) utilizou extrato da folha e da casca do caule de *L. pacari*. A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de difusão em meio sólido (Kirby-Bauer) modificado obtendo-se CIM de 125  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Metodologia semelhante foi utilizada por Nascimento (2000) e a CIM relatada foi de 200  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ .

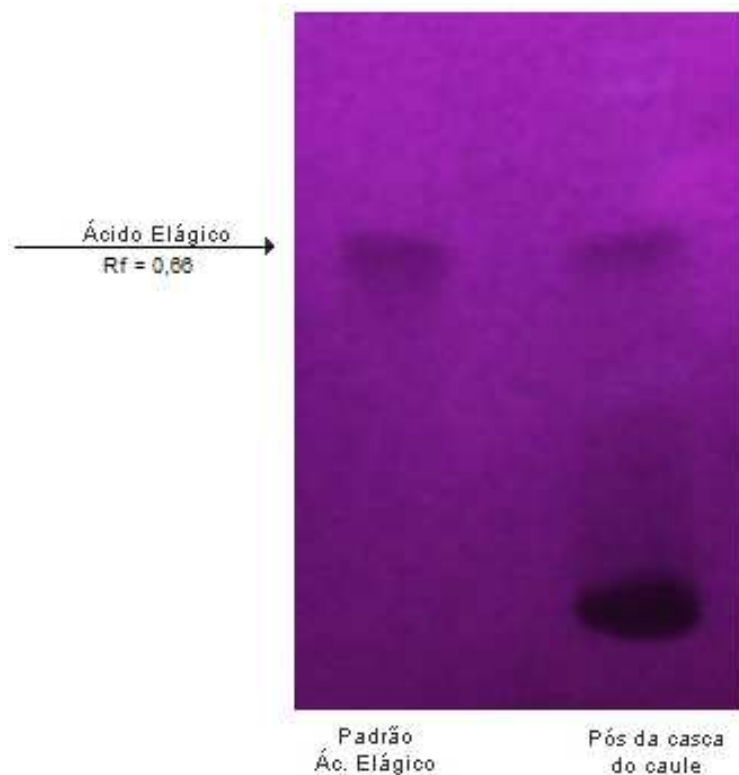
Se foram considerados os critérios de Holetz et al. (2002) as CIM obtidas por esses autores seriam classificadas como moderadas.

As CIM para os fungos testados mostram que o extrato líquido das cascas do caule de *L. pacari* apresentou boa ação antifúngica. Esses resultados foram superiores aos relatados por Silva Júnior (2010), que obteve CIM entre 250 – 1000  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *Candida spp* e *Saccharomyces Cerevisiae*.

#### 5.14. DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO LÍQUIDO DE *L. PACARI*

A Figura 12 apresenta o perfil cromatográfico do extrato líquido de *L. pacari* e mostra uma banda da amostra com o mesmo R<sub>f</sub> do padrão de ácido elágico. Este resultado permite dizer que a solução hidroalcoólica 80% e a percolação extraiu o ácido elágico, marcador desejado.

**Figura 11:** Perfil cromatográfico – CCD – do extrato líquido de *L. pacari* FM: tolueno, acetato de etila, ácido fórmico e metanol (3:3:1,3:0,7v/v/v/v).



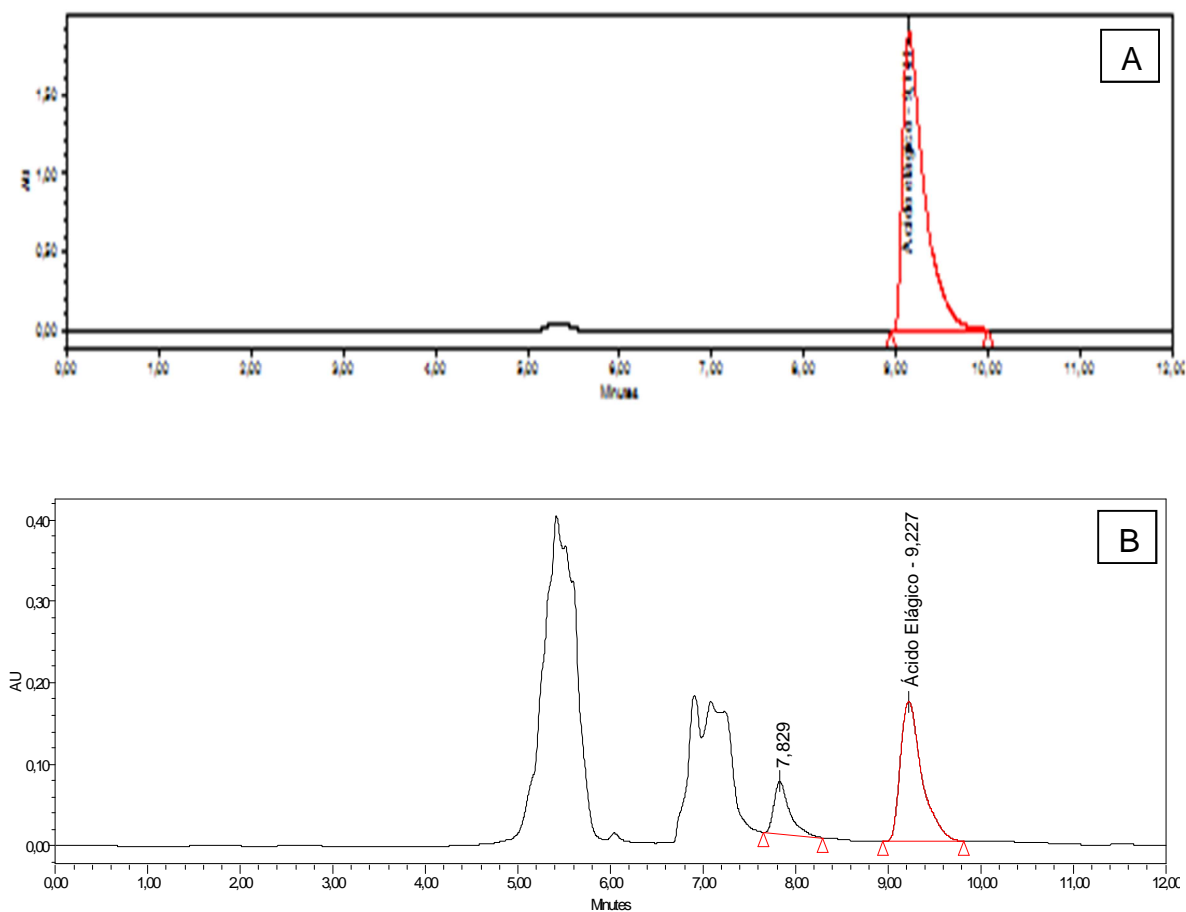
**Fonte:** Próprio autor.

## 5.15. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO NO EXTRATO LÍQUIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

### 5.15.1. Condições cromatográficas e system suitability

De acordo com as condições cromatográficas estabelecidas foram obtidos cromatogramas para o padrão de ácido elágico e extrato líquido de *L. pacari*, como apresentada na Figura 13 (A) e (B), respectivamente.

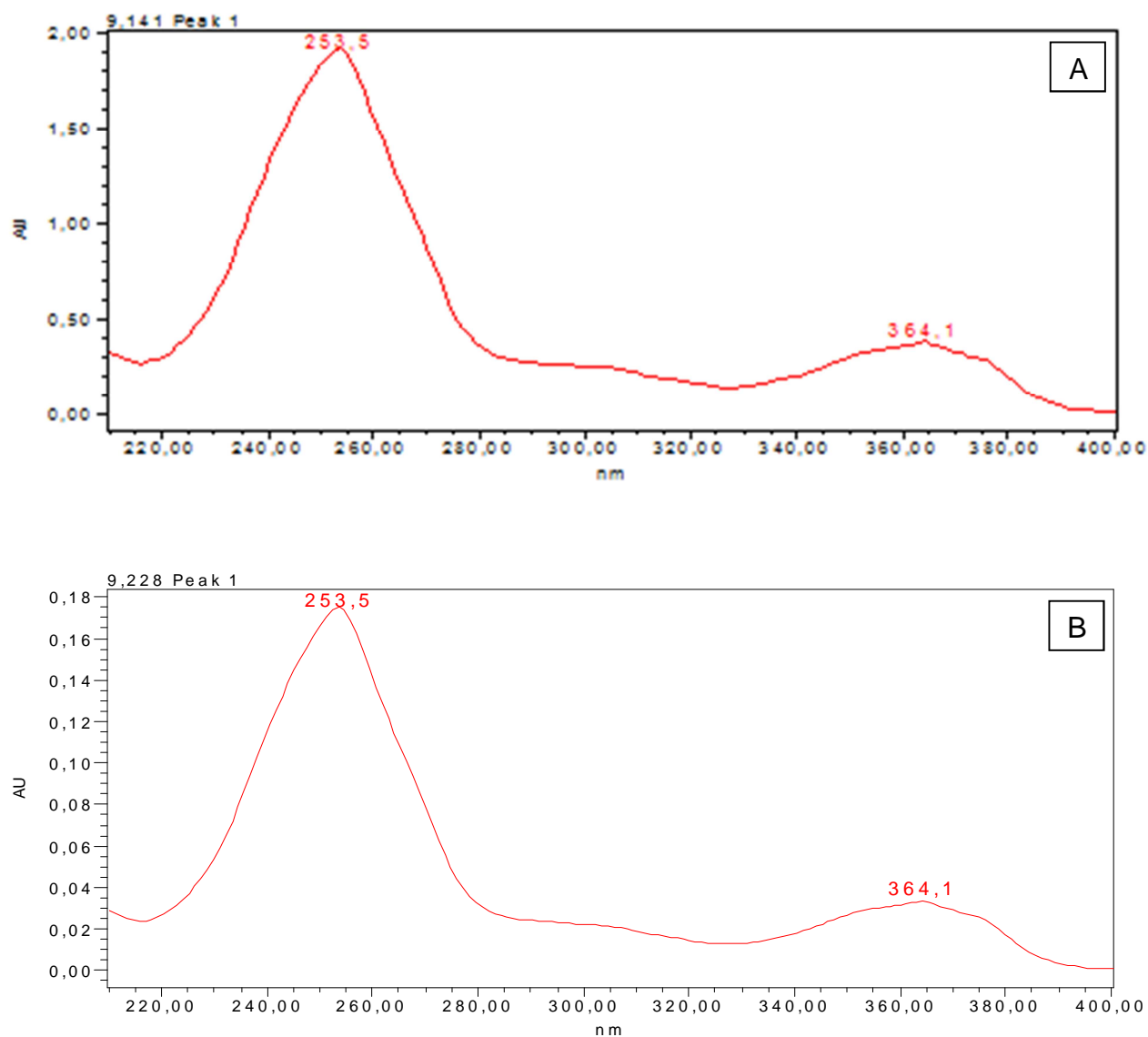
**Figura 12:** Cromatogramas do padrão de ácido elágico (A) e ácido elágico no extrato líquido de *L. pacari* (B).



**Legenda:** Condições cromatográficas: Fase móvel A - 30% (ACN) e B - 70% Solução ácida de ácido orto-fosfórico 0,5%, volume de injeção 10  $\mu$ L, fluxo isocrático de 0,5mL/min-1. Detector de arranjo diodos (PDA), coluna cromatográfica C18 (RP18) 3  $\mu$ m (4,6 x 250 mm). Fonte: Próprio autor.

A Figura 14 (A) e (B) apresenta, respectivamente, os espectros de varredura do ácido elágico no padrão e na amostra.

**Figura 13:** As Figuras (A) e (B) apresentam respectivamente os espectros de absorção na região UV-visível do padrão de ácido elágico e do ácido elágico na casca do caule de *L. pacari* derivados dos cromatogramas da Figura 13.



**Legenda:** Condições cromatográficas: Fase móvel A - 30% (ACN) e B - 70% Solução ácida de ácido orto-fosfórico 0,5%, volume de injeção 10  $\mu$ L, fluxo isocrático de 0,5mL/min-1. Detector de arranjo diodos (PDA), coluna cromatográfica C18 (RP18) 3  $\mu$ m (4,6 x 250 mm). Fonte: Próprio autor.

Os resultados dos parâmetros de adequabilidade do sistema (System suitability), referente a estes cromatogramas são apresentados na Tabela 10 e estão de acordo com os parâmetros recomendados pela FDA (1994). Estes parâmetros

foram investigados com intuito de assegurar o desempenho do sistema durante as análises e definir as melhores condições cromatográficas. De acordo com os parâmetros obtidos do System suitability verifica-se que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis.

**Tabela 10:** Parâmetros do System suitability obtidos para os cromatogramas da amostra da casca do caule de *L. pacari* e padrão de ácido elágico:

<b>Amostra</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>N</b>
Padrão de ácido elágico	-	1,26	25813
Extrato líquido	3,04	1,66	12876
Especificações da literatura	> 2,0	≤ 2,0	> 2000

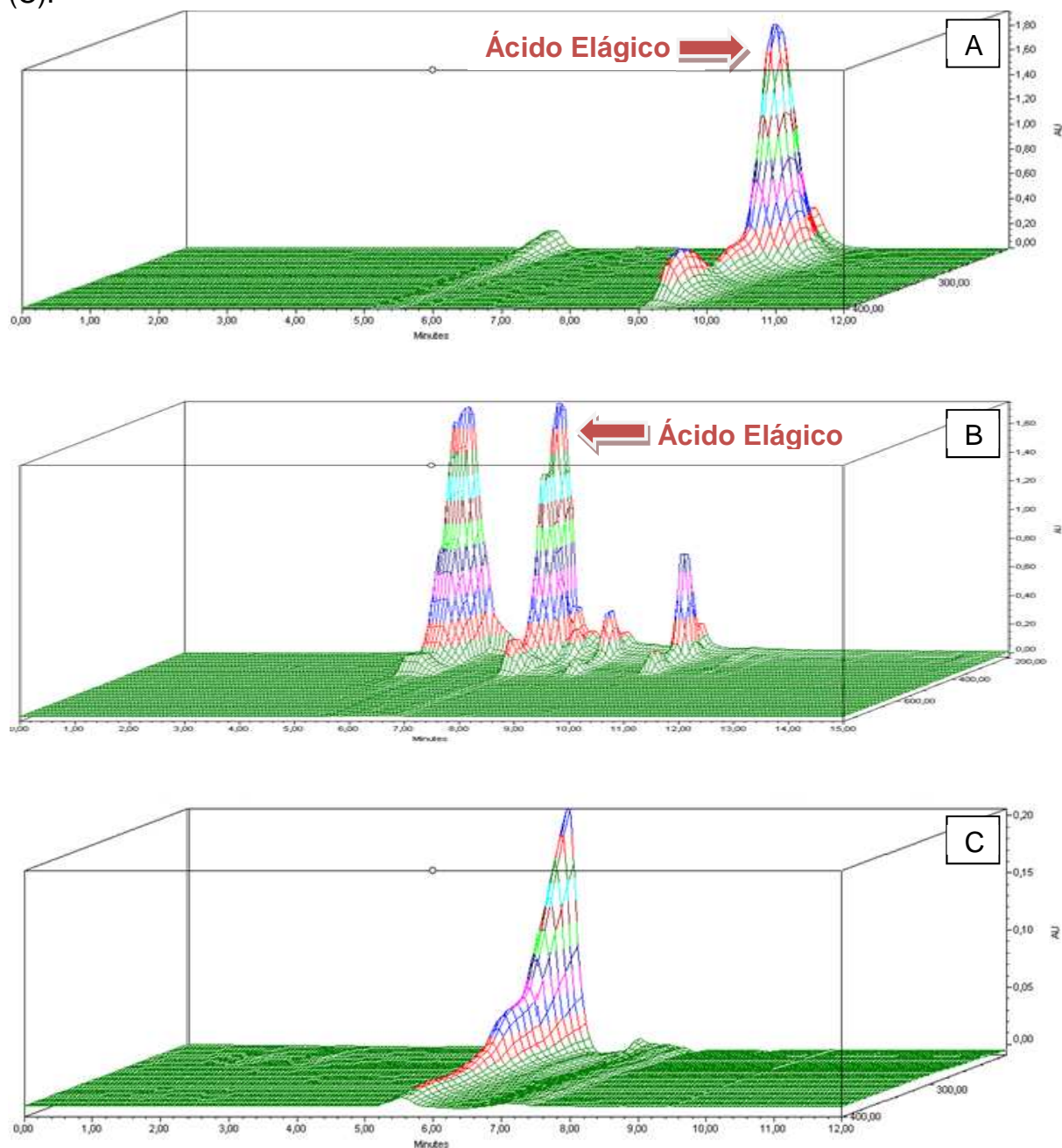
Legenda: **R** = resolução; **T**= fator de cauda; **N** = pratos teóricos;

## 5.16. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

### 5.16.1. Seletividade

A seletividade do método foi comprovada mediante a obtenção dos cromatogramas de varredura da solução do padrão de ácido elágico, do extrato líquido e do solvente (etanol 80% v/v) representados na Figura 15.

**Figura 14:** Cromatogramas de varredura na faixa de 210 a 400 nm do padrão de ácido elágico (A), do extrato líquido de *L. pacari* (B) e do solvente etanol 80% v/v (C).



**Legenda:** Condições cromatográficas: Fase móvel A - 30% (ACN) e B - 70% Solução ácida de ácido orto-fosfórico 0,5%, volume de injeção 10  $\mu$ L, fluxo isocrático de 0,5mL/min-1. Detector de arranjo diodos (PDA), coluna cromatográfica C18 (RP18) 3  $\mu$ m (4,6 x 250 mm). Fonte: Próprio autor.

De acordo com os resultados apresentados, verifica-se que o método foi seletivo para a quantificação do ácido elágico no extrato líquido de *L. pacari*, uma vez que a pureza do pico pode ser observada comparando-se o cromatograma de

varredura da amostra e do padrão no tempo de retenção correspondente ao pico do ácido elágico em 9,1 min para padrão e 9,2 min para o extrato líquido, conforme Figura 15 (A) e (B). O cromatograma do solvente utilizado não apresentou pico no tempo equivalente ao tempo de retenção do ácido elágico conforme Figura 16 (C).

## 5.16.2. Linearidade

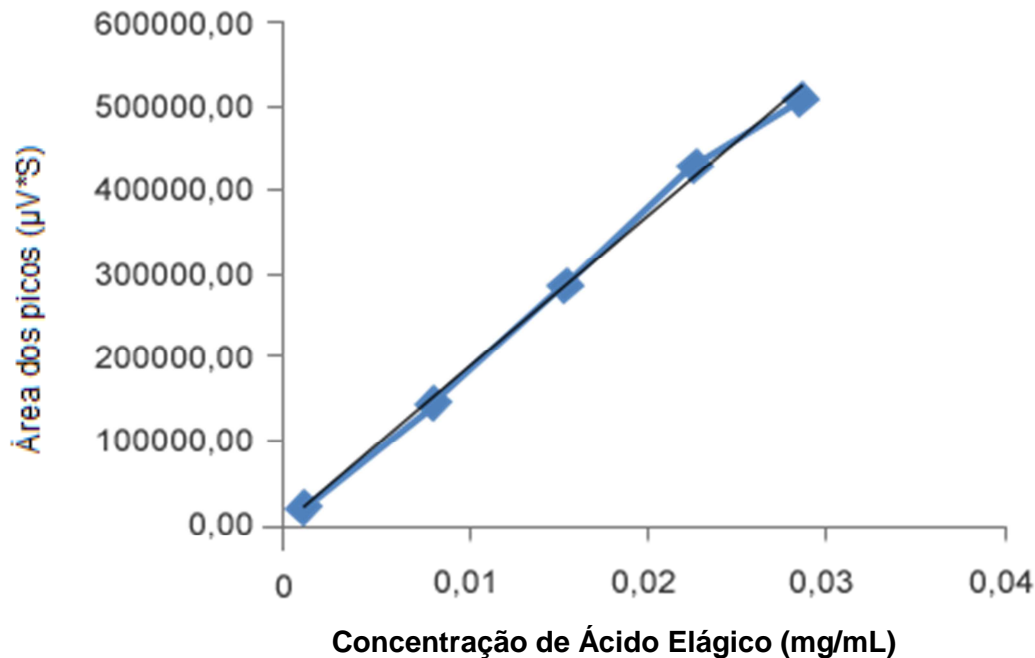
### 5.16.2.1. Linearidade para o padrão de ácido elágico

A linearidade foi determinada mediante a análise do coeficiente de correlação linear ( $r$ ), obtido pela curva de calibração. A metodologia analítica desenvolvida mostrou linearidade uma vez que foi capaz de apresentar resultados diretamente proporcionais às concentrações de ácido elágico presente nas soluções com coeficientes de correlação médio ( $r$ ) igual a 0,9990. Esta correlação foi verificada na faixa de concentração de 0,00111 a 0,029045 mg/mL utilizando-se cinco concentrações para a construção de cada curva, sendo analisadas três curvas padrão. Os dados referentes à triplicata da curva padrão estão expostos na Tabela 10. A equação da reta obtida com os valores médios das áreas foi  $y = 177691795,95563x + 1845,42840$ .

**Tabela 11:** Valores referentes à triplicata da curva padrão do padrão de ácido elágico

Conc. (mg/mL)	Área 1 ( $\mu\text{V}\cdot\text{S}$ )	Área 2 ( $\mu\text{V}\cdot\text{S}$ )	Área 3 ( $\mu\text{V}\cdot\text{S}$ )	Área Média ( $\mu\text{V}\cdot\text{S}$ )	DP	CV (%)
0,00111	199705	204192	205170	203022,33	2914,215	1,435416
0,00851	1446342	1488031	1446964	1460445,67	23891,62	1,635913
0,01591	2855482	2852909	2829593	2845994,67	14262,4	0,501139
0,02331	4261804	4264814	4305344	4277320,67	24315,54	0,568476
0,029045	4929287	4991623	5264998	5061969,33	178569,1	3,527661

**Gráfico 2:** Linearidade do padrão de ácido elágico



**Fonte:** Proprio autor.

#### 5.16.2.2. Linearidade do ácido elágico presente no extrato líquido de *L. pacari*

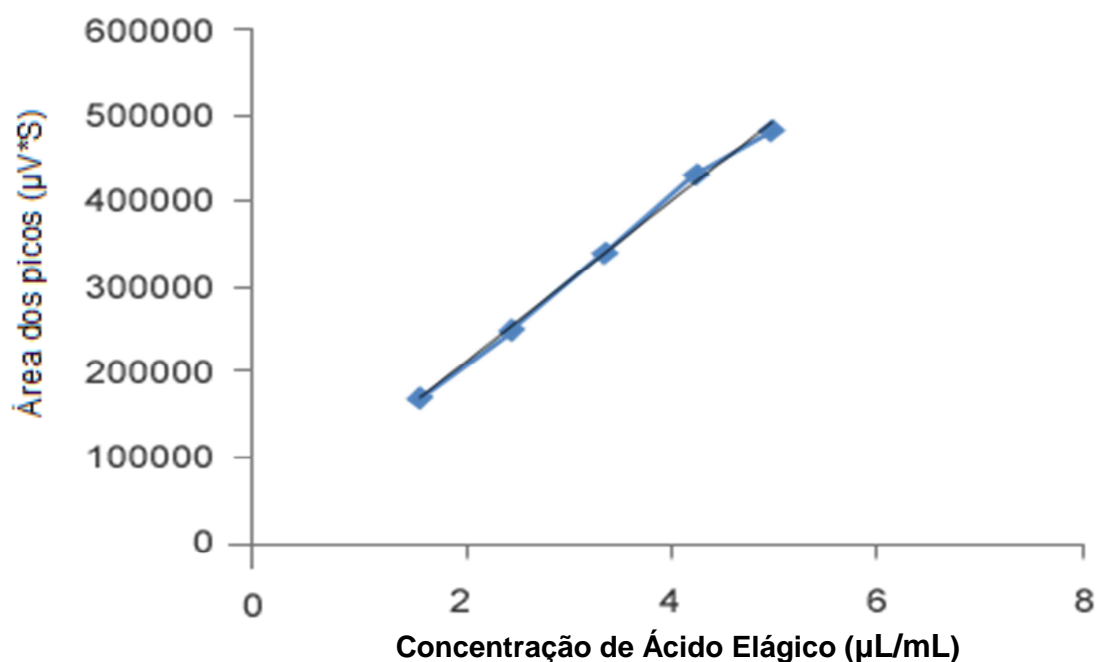
A metodologia analítica desenvolvida para expressar o teor de ácido elágico do extrato líquido mostrou linearidade uma vez que foi capaz de apresentar resultados diretamente proporcionais às concentrações de ácido elágico presente nas soluções com coeficientes de correlação médio ( $r$ ) igual a 0,9966.

Este resultado indica que a linearidade no intervalo de concentração testada do extrato líquido para quantificação do ácido elágico está de acordo com as especificações da RE 899, embora a linearidade da amostra não seja solicitada pelo Guia de Validação da ANVISA (BRASIL, 2003). Os dados referentes à triplicata da curva padrão estão dispostos na Tabela 12. A equação da reta obtida com os valores médios das áreas foi  $y = 767908x + 370933$ .

**Tabela 12:** Dados referentes à triplicata da curva padrão do extrato líquido de *L. pacari*

Conc. (µL/mL)	Área 1 (µV*S)	Área 2 (µV*S)	Área 3 (µV*S)	Área Média (µV*S)	DP	CV (%)
2	1822698	1814057	1825341	1820698,67	5901,708594	0,324145
3	2722762	2685247	2779826	2729278,33	47625,03292	1,744968
4	3492571	3490596	3435611	3472926	32330,82237	0,930939
5	4373163	4404007	4213134	4330101,33	102463,9248	2,366317
6	4918110	4809975	4851401	4859828,67	54557,89338	1,12263

**Gráfico 3:** Linearidade da amostra de *L. pacari*.



Fonte: Proprio autor.

### 5.16.3. Precisão

Os ensaios realizados para análise de repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficiente de variação de 2,820% e 4,229%, respectivamente (tabelas 13 e 14). Os valores obtidos comprovam a precisão do método desenvolvido tanto em nível de repetibilidade quanto em nível de precisão intermediária, uma vez que o coeficiente de variação entre os resultados das replicatas realizadas foram < 5%, conforme especificação da ANVISA (Brasil, 2003).

**Tabela 13:** Repetibilidade do método analítico para doseamento de ácido elágico no extrato líquido de *L. pacari*

Análise	Área ( $\mu V \cdot S$ )	Conc. $\mu L/mL$	Teor (%)	Teor médio (%)	DP	CV (%)
1	3606791	0,0203	4,063			
2	3588060	0,0202	4,043			
3	3553500	0,0200	4,000			
4	3668738	0,0206	4,130	3,991	112,9065	2,829
5	3424665	0,0193	3,856			
6	3426432	0,0193	3,856			

**Tabela 14:** Precisão intermediária do método analítico para doseamento de ácido elágico no extrato líquido de *L. pacari*

Análise	Área ( $\mu\text{V}^*\text{S}$ )	Conc. $\mu\text{L}/\text{mL}$	Teor (%)	Teor médio (%)	DP	CV (%)
1	3606791	0,0203	4,063			
2	3588060	0,0202	4,043			
3	3553500	0,0200	4,000			
4	3668738	0,0206	4,130	3,861	163,286	4,229
5	3424665	0,0193	3,856			
6	3426432	0,0193	3,856			
7	3286889	0,0185	3,701			
8	3245445	0,0182	3,654			
9	3362766	0,0190	3,786			
10	3281116	0,0184	3,694			
11	3285385	0,0185	3,701			
12	3422131	0,0192	3,853			

#### 5.16.4. Exatidão

Os resultados obtidos para a determinação da exatidão pelo teste de recuperação são mostrados nas Tabelas 15 e 16.

O percentual de recuperação médio variou de 94,818 a 106,803% comprovando que o método desenvolvido é exato.

**Tabela 15:** Resultados dos teores da amostra e da adição padrão da Linearidade da amostra

Amostra	Teor das amostras (%) 1	Teor das amostras (%) 2	Teor das amostras (%) 3	Teor Médio sem adição padrão (%)	Desv. Pad	CV
50%	4,102	4,083	4,11	4,102	0,013	0,324
75%	4,087	4,030	4,17	4,087	0,072	1,750
100%	3,932	3,930	3,87	3,930	0,036	0,927
125%	3,939	3,967	3,80	3,939	0,092	2,344
150%	3,692	3,611	3,64	3,642	0,041	1,125

**Tabela 16:** Resultados da recuperação do padrão de ácido elágico no extrato líquido de *L. pacari*

Amostra	Teor Médio sem adição padrão (%)	Teor com adição padrão da concentração 100% (%)	Exatidão
50%	4,102		106,803
75%	4,087		106,398
100%	3,930	3,841	102,318
125%	3,939		102,561
150%	3,642		94,818

#### 5.16.5. Robustez

Os parâmetros de robustez analisados nesta validação estão descritos na Tabela 17 e os resultados da área do pico obtido para o ácido elágico no extrato líquido do método alterado foram comparados com a área do pico deste marcador pelo método original, sendo estabelecido neste estudo o coeficiente de variação entre as áreas menor ou igual a 5% ( $CV \leq 5\%$ ).

**Tabela 17:** Robustez do método analítico para doseamento de ácido elágico no extrato líquido de *L. pacari*

	<b>Área 1</b> <b>(<math>\mu\text{V}\cdot\text{S}</math>)</b>	<b>Área 2</b> <b>(<math>\mu\text{V}\cdot\text{S}</math>)</b>	<b>Área 3</b> <b>(<math>\mu\text{V}\cdot\text{S}</math>)</b>	<b>Área Média</b> <b>(<math>\mu\text{V}\cdot\text{S}</math>)</b>	<b>DV</b>	<b>CV</b>	<b>Robustez</b>
Condição Normal	5417885	5447903	5472823	5446203,667	-	-	
T 32°C	6280017	6235379	6169100	6228165,333	55809,26	0,8960786	114,358
T 28°C	6199033	6178989	6097816	6158612,667	53596,8	0,8702738	113,081
FM 28 % ACN: 72% Água Acidificada	5841837	5829757	5757953	5809849	45347,3	0,7805246	106,677
FM 32% ACN : 68 Água Acidificada	6297869	6227876	6408919	6311554,667	91294,11	1,44646	115,889
Fluxo 0,4 mL/min	5599891	5463057	5473366	5512104,667	76199,73	1,3824072	101,210
Fluxo 0,6 mL/min	5123265	5213214	5196904	5177794,333	47922,75	0,9255438	95,072

## 5.17. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO ELÁGICO NO EXTRATO LÍQUIDO DE *L. PACARI*

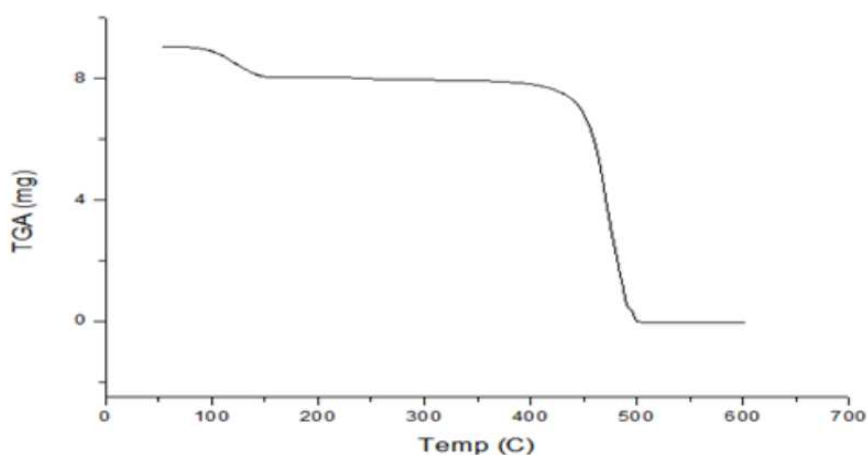
A quantificação do teor de ácido elágico na casca do caule de *L. pacari* foi realizada a partir das áreas integradas do pico das amostras e o resultado para esta análise demonstrou um teor de 3,84%.

## 5.18. DESENVOLVIMENTO DA SECAGEM POR NEBULIZAÇÃO DO EXTRATO LÍQUIDO DE *L. PACARI*

### 5.18.1. Avaliação do efeito da temperatura sobre o ácido elágico para determinação das condições de secagem - Análise termogravimétrica (TG) do ácido elágico (Sigma®).

A curva termogravimétrica da amostra de padrão de ácido elágico está representada na Figura 16.

**Figura 15:** Curva TG correspondente ao ácido elágico.



**Legenda:** Razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>, vazão média de 50 mL min<sup>-1</sup> em atmosfera de ar sintético (intervalo de temperatura de 50°C - 600°C ). Fonte: Oliveira, 2012.

Nesta curva foi registrada a perda de massa em duas etapas sendo, a primeira no intervalo de temperatura de 55,91 - 393,96°C (Tabela 18) com perda de

13,25%. E a segunda no intervalo de temperatura de 393,96 - 500°C (Tabela 19) com perda total da amostra de 100%.

**Tabela 18:** Valores da perda de massa calculados a partir da curva TG.

<b>Temperatura</b>	<b>Massa</b>	<b>Diferença em relação à massa inicial (mg)</b>	<b>Perda de massa (%)</b>
55,91°C	9,05 mg	0,15 mg	1,65%
110,08°C	8,76 mg	0,29 mg	3,20%
120,12°	8,55 mg	0,50 mg	5,52%
130,13°C	8,33 mg	0,72 mg	7,95%
140,03°C	8,17 mg	0,88 mg	9,72%
150,08°C	8,06 mg	0,99 mg	10,93%
393,96°C	7,85 mg	1,2 mg	13,25%

**Legenda:** Perda de massa (%) em relação ao intervalo de temp. 150°C - 393,96°C.

Durante o primeiro procedimento, a perda de massa (10,93%) entre as temperaturas de 55,91 - 150,08°C deve-se à perda de água. E entre 150,08 – 393,96°C a perda (2,36%) de massa pode ser decorrente de água residual e/ou início de decomposição da amostra.

**Tabela 19:** Valores da perda de massa calculados a partir da curva TG.

<b>Temperatura</b>	<b>Massa</b>	<b>Diferença em relação à massa inicial (mg)</b>	<b>Perda de massa (%)</b>
393,96°C	7,85 mg	1,2 mg	13,25%
500,03°C	0 mg	9,05 mg	100%

**Legenda:** Perda de massa (%) em relação ao intervalo de temp. 393,96°C – 500°C.

A perda de massa total até aproximadamente 500 °C foi de 100%.

Os resultados da análise termogravimétrica demonstram que o ácido elágico é um composto químico altamente resistente a temperaturas elevadas. Logo, a faixa segura de trabalho para realizar experimentos que utilizam a temperatura como variável é até 393,96 °C.

### 5.18.2. Obtenção e caracterização do extrato seco padronizado a partir do extrato líquido de *L. pacari* por nebulização/atomização

Sabendo que a qualidade dos produtos obtidos por nebulização/atomização é fortemente influenciada pelos parâmetros de secagem, foi utilizado um planejamento experimental univariado seguido de um planejamento fatorial fracionário com objetivo de otimizar o processo de obtenção dos extratos secos visando a produção de extratos com melhores características, principalmente em relação ao teor de ácido elágico (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Os resultados da análise univariada estão apresentados seguindo as Tabelas 20, 21, 22 e 23 e em seguida, são apresentadas as condições ideais dos parâmetros testados: ar de secagem, ar comprimido, temperatura e proporção de adjuvante.

**Tabela 20:** Parâmetro de ar de secagem do planejamento experimental univariada

Valor em mL/min	AR DE SECAGEM (mL/min)			
	MALTODEXTRINA		AEROSIL	
	Área	Teor de Ácido Elágico (%)	Área	Teor de Ácido Elágico (%)
2,5	4138270	2,739	4261573	2,820
3	4219318	2,792	4088616	2,706
3,5	4050311	2,680	4242909	2,808
4	4214304	2,789	4188202	2,772
4,5	4151369	2,747	4213898	2,789
DP	-	0,046	-	0,045

**Tabela 21:** Parâmetro do ar comprimido do planejamento experimental univariada

Valor em L/min	AR COMPRIMIDO (L/min)			
	MALTODEXTRINA		AEROSIL	
	Área	Teor de Ácido Elágico (%)	Área	Teor de Ácido Elágico (%)
30	4227425	2,798	4281467	2,833
35	4294636	2,842	4155770	2,750
40	3947668	2,612	4275147	2,829
45	4055299	2,684	4199111	2,779
50	3949089	2,613	4269484	2,826
DP	-	0,106	-	0,037

**Tabela 22:** Parâmetro de temperatura do planejamento experimental univariada

Valor em °C	TEMPERATURA (°C)			
	MALTODEXTRINA		AEROSIL	
	Área	Teor de Ácido Elágico (%)	Área	Teor de Ácido Elágico (%)
120	4188617	2,772	4039958	2,674
130	4289385	2,839	4185062	2,770
140	4128652	2,732	3876503	2,565
150	4086325	2,704	4101191	2,714
160	4256407	2,817	4117051	2,725
DP	-	0,0562	-	0,0773

**Tabela 23:** Parâmetro de adjuvante do planejamento experimental univariada

Valor em %	ADJUVANTE (%)			
	MALTODEXTRINA		AEROSIL	
	Área	Teor de Ácido Elágico (%)	Área	Teor de Ácido Elágico (%)
5	4262879	2,524	5616281	3,326
10	4235412	2,647	5446153	3,404
15	4131210	2,734	5112582	3,384
20	4069723	2,862	4771805	3,356
25	4612550	3,460	4742263	3,557
DP	-	0,0898	-	0,3649

Foi utilizada uma análise estatística univariada para avaliar o processo de secagem. Porém, por não apresentar dados suficientes, já que os resultados do teor de ácido elágico não foram realizados em replicata, este planejamento não pode ser analisado estatisticamente. Representando apenas um ponto de partida para a construção de um novo planejamento fatorial.

Após a realização do planejamento experimental univariada encontram-se as melhores condições de trabalho. Visto que para escolher esta situação analisou-se o custo que cada parâmetro poderia gerar num processo industrial e a maior proporção de ácido elágico. Na Tabela 24 apresenta as condições que se destacaram e na Tabela 25 encontra-se aplicação dos adjuvantes nas melhores condições de secagem.

**Tabela 24:** Melhores condições de secagem do planejamento experimental univariada

<b>Melhores condições de secagem</b>	
Adjuvante	25%
Temperatura	130°C
Ar Comprimido	30L/min
Ar de Secagem.	2,5mL/min

**Tabela 25:** Aplicação dos adjuvantes nas melhores condições

<b>Aplicação dos adjuvantes nas condições ótimas</b>		
	<b>Área</b>	<b>Teor de ácido elágico (%)</b>
Maltodextrina	4853903	3,212
Aerosil	4662417	3,086
Sem adjuvante	5871077	3,886

De acordo com as condições estabelecidas percebe-se que dos dois adjuvantes utilizados a maltodextrina se comporta melhor em relação ao dióxido de silício coloidal, pois conferiu maior proteção e concentração de ácido elágico. E na de sem adjuvante o teor de ácido elágico é superior a todas as outras devido a processos de hidrólise.

#### 5.19. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE VOLÁTEIS

O teor de voláteis sofreu variação de 4,93 a 7,3% quando a maltodextrina foi usada como adjuvante de secagem e de 4,78 a 6,80% quando o adjuvante utilizado foi o dióxido de silício coloidal. Logo, para ambos os adjuvantes os valores encontrados superaram o limite de 5% estabelecido por Aulton (2001). Fato este que pode ser justificado pela higroscopicidade dos pós obtidos após processo de secagem. Porém para melhor definir este estudo será necessário análises mais específicas que envolvam isoterma de sorção.

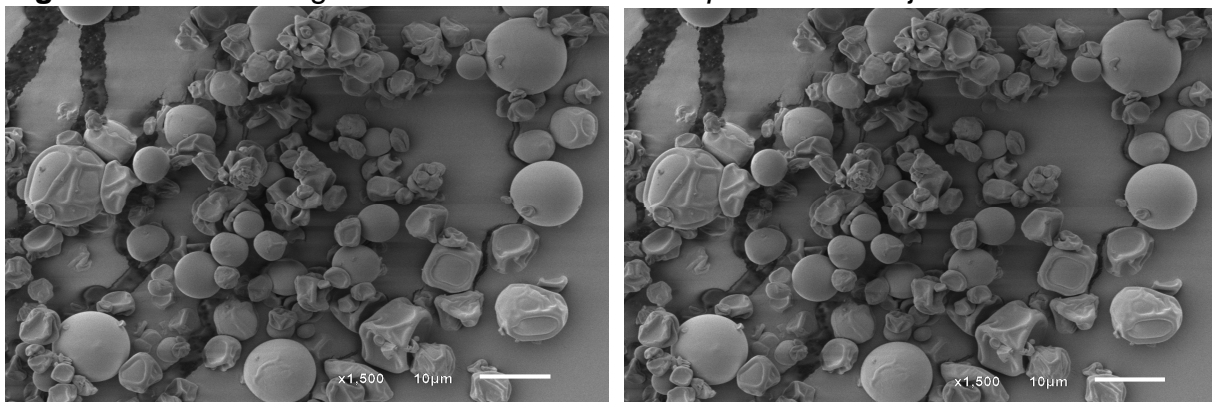
## 5.20. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA

A variação da atividade de água foi de 0,172 a 0,333 quando o adjuvante utilizado foi a maltodextrina e de 0,177 a 0,286 quando o dióxido de silício coloidal é empregado. De acordo com Aulton (2001) os valores da atividade de água para produtos secos são aceitáveis quando estão abaixo de 0,5. Portanto o extrato obtido está de acordo com a especificação e os valores encontrados neste trabalho não comprometem a qualidade do extrato seco, já que valores superiores a 0,5 podem proporcionar ambiente favorável a contaminação microbiana e capazes comprometer a estabilidade química e física do material.

## 5.21. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS EXTRATOS SECOS PADRONIZADOS

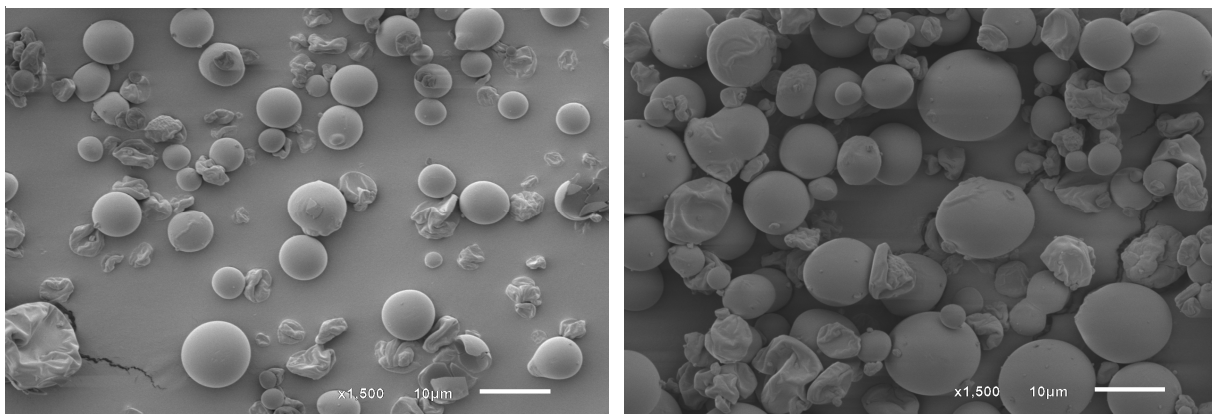
Para a análise da forma das partículas constituintes dos extratos secos realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) escolheu-se os extratos que apresentaram maior teor de ácido elágico nas condições ótimas, sendo representado na Figura 17 para o extrato seco sem adjuvante, na Figura 18 o extrato seco com maltodextrina e na Figura 19 o extrato seco com o dióxido de silício coloidal.

**Figura 16:** Fotomicrografia do extrato seco de *L. pacari* sem adjuvante



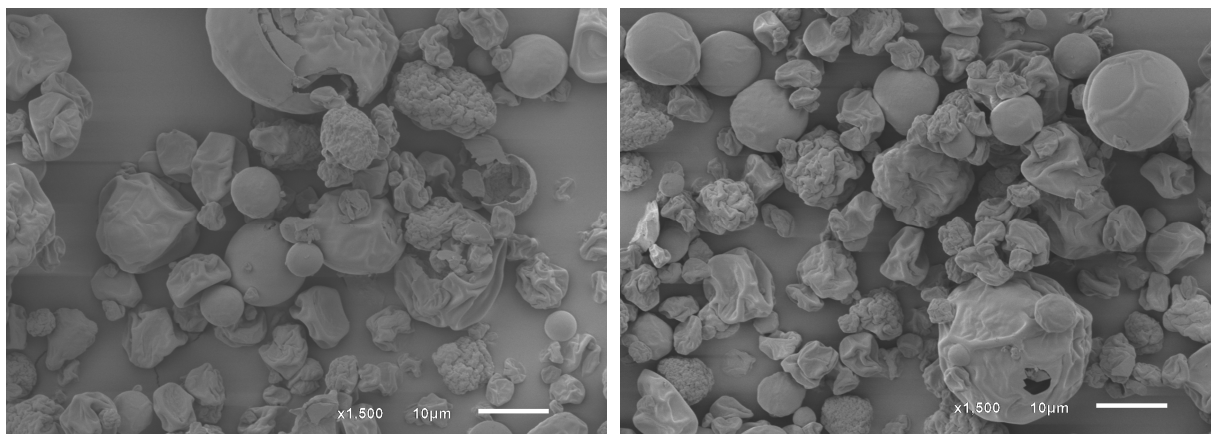
**Legenda:** Condições da análise: SEI = signal; 4,0kV = Acc. Voltage; SS30 = Spotsize; (x2200) = aumento; 10 µm = escala do campo de imagem. Fonte: Labmic.

**Figura 17:** Fotomicrografia do extrato seco de *L. pacari* com maltodextrina



**Legenda:** Condições da análise: SEI = signal; 4,0kV = Acc. Voltage; SS30 = Spotsize; (x2200) = aumento; 10 µm = escala do campo de imagem. Fonte: Labmic.

**Figura 18:** Fotomicrografia do extrato seco de *L. pacari* com dióxido de silício coloidal



**Legenda:** Condições da análise: SEI = signal; 4,0kV = Acc. Voltage; SS30 = Spotsize; (x2200) = aumento; 10 µm = escala do campo de imagem. Fonte: Labmic.

As imagens dos extratos secos revelaram partículas irregulares em tamanho e forma, além de apresentarem tendência para aglomeração. As imagens do extrato seco sem adjuvante (Figura 17) e as imagens que utilizaram a maltodextrina (Figura 18) como adjuvante apresentaram o destaque para as partículas esféricas com superfícies lisas. Já as imagens com o dióxido de silício coloidal (Figura 19) apresentaram a formação de aglomerados com superfície rugosa.

Este resultado apresenta a influência da concentração de dióxido de silício coloidal na redução da higroscopicidade dos produtos secos, permitindo a obtenção de aglomerados mais rugosos (Carvalho, 1997). E como as características do material a ser seco influência na formação das gotículas, vistas na fotomicrografia, já

que dependendo da elasticidade e da permeabilidade deste serão produzidos distintos materiais secos como esferas intactas, com superfície lisa ou fragmentada, sólidas ou ocas (Rankell et al., 2001).

## 5.22. PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO $2^{5-2}$ COM REPLICATAS

A tabela 26 apresenta os resultados obtidos no planejamento fracionário para avaliar o teor de ácido elágico no extrato líquido da casca do caule de *L. pacari* durante o processo de secagem.

**Tabela 26:** Planejamento fatorial de  $2^{5-2}$  com replicatas

Std	Run	Fator 1 A:TIPO ADJ	Fator 2: B:CONC ADJ %	Fator 3: C:TEMP. (°C)	Fator 4: D: AR SEC. (ml/min)	Fator 5: E: AR COMPR. (L/min)	Resposta TEOR %
10	3	MALTODEXTRINA	15,00	130,00	3,50	30,00	3,495
14	5	MALTODEXTRINA	25,00	130,00	2,50	30,00	3,200
5	8	MALTODEXTRINA	25,00	120,00	2,50	40,00	3,290
9	9	MALTODEXTRINA	15,00	130,00	3,50	30,00	3,621
2	10	MALTODEXTRINA	15,00	120,00	3,50	40,00	3,557
13	13	MALTODEXTRINA	25,00	130,00	2,50	30,00	3,119
1	14	MALTODEXTRINA	15,00	120,00	3,50	40,00	3,196
6	16	MALTODEXTRINA	25,00	120,00	2,50	40,00	3,474
16	1	AEROSIL	25,00	130,00	3,50	40,00	3,121
7	2	AEROSIL	25,00	120,00	3,50	30,00	3,180
12	4	AEROSIL	15,00	130,00	2,50	40,00	3,374
8	6	AEROSIL	25,00	120,00	3,50	30,00	3,081
15	7	AEROSIL	25,00	130,00	3,50	40,00	3,220
11	11	AEROSIL	15,00	130,00	2,50	40,00	3,430
4	12	AEROSIL	15,00	120,00	2,50	30,00	3,428
3	15	AEROSIL	15,00	120,00	2,50	30,00	3,116

E na Tabela 27 apresenta o modelo estatístico de ANOVA seguindo a metodologia de superfícies de resposta.

**Tabela 27:** Tabela de ANOVA do planejamento fatorial de  $2^{5-2}$  com replicatas

<b>ANOVA for selected factorial model</b>						
<b>Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]</b>						
<b>Source</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>df</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F Value</b>	<b>p-value Prob &gt; F</b>	
Model	0,27	4	0,069	3,99	0,0307	significant
A-TIPO ADJ	0,063	1	0,063	3,65	0,0826	
B-CONC ADJ	0,15	1	0,15	8,53	0,0139	
C-TEMP	4,16E-03	1	4,16E-03	0,24	6,33E-01	
BC	0,061	1	0,061	3,55	0,0864	
Residual	0,19	11	0,017			
Lack of Fit	0,036	3	0,012	0,62	0,6193	not significant
Pure Error	0,15	8	0,019			
Cor Total	0,46	15				

De acordo com os dados apresentados pelo teste de ANOVA (Tabela 27), pode-se concluir que o valor de F 3,99 indica que o modelo é significativo e existe apenas uma chance de 3,07% de ocorrer devido ao ruído.

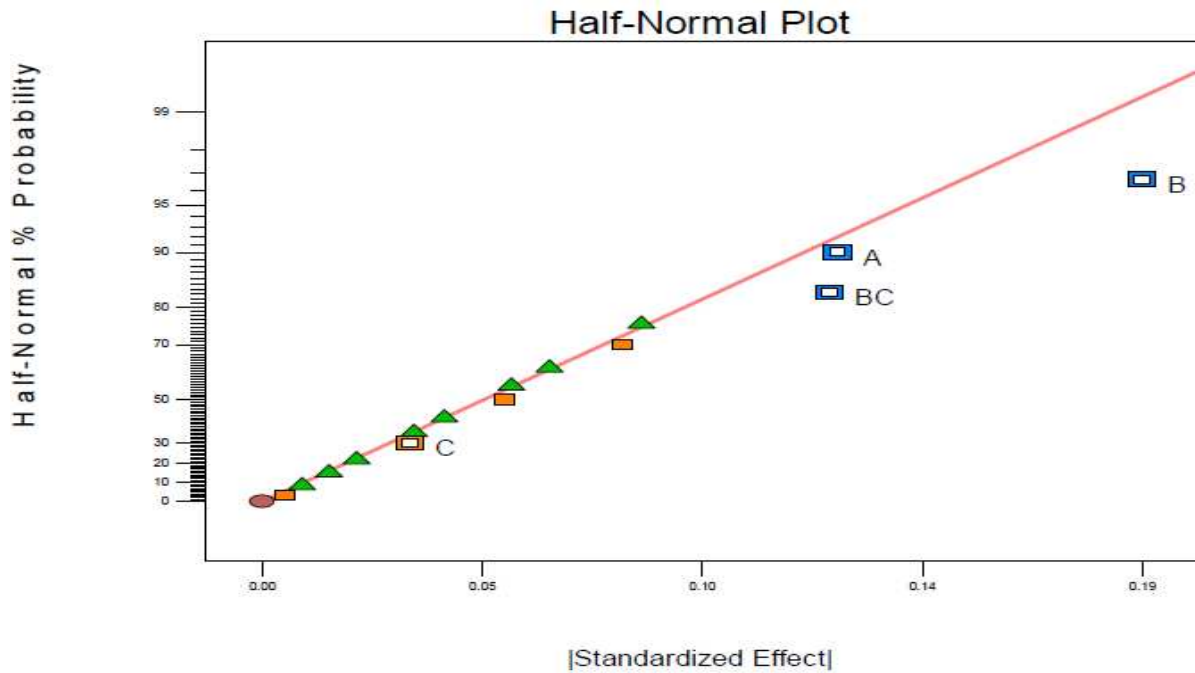
As variáveis A (tipo de adjuvante); B (concentração do adjuvante) e BC (interação entre a concentração do adjuvante e a temperatura) são consideradas significativas, pois apresentam um  $p < 0,1$ .

E a interação entre BC acontece apesar de C (temperatura) não ser significativa pois, como o adjuvante apresenta uma elevada significância, a temperatura ao reagir sofre o efeito desta variável tornando esta interação significativa.

A equação matemática que define este modelo é:  $Y = 3,31 - 0,063X_1 - 0,096X_2 + 0,016X_3 - 0,082 X_2X_3$ .

O gráfico obtido a partir de ANOVA está representado pela Figura 21.

**Figura 19:** Gráfico dos resíduos



**Fonte:** Próprio autor.

Diante do gráfico, percebe-se que a variável B (concentração do adjuvante) é a mais significativa de todas. Confirmando a importância no uso de adjuvantes durante o processo de secagem, uma vez que a seleção e o uso adequado de adjuvantes no processo de spray pode determinar a estabilidade e a qualidade dos mesmos, inclusive influenciando nas características de biodisponibilidade do extrato seco. (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho visou a obtenção tecnológica de extratos vegetais padronizados a partir da casca do caule de *L. pacari*. Para a realização do mesmo, diversas etapas foram avaliadas e a partir delas foram obtidas as seguintes conclusões:

a) Os ensaios realizados avaliaram parâmetros de controle de qualidade mostrando estarem adequados para o desenvolvimento de produtos intermediários de qualidade.

b) A técnica de percolação e a graduação alcoólica do líquido extrator foram estabelecidas mediante a otimização do método de extração que através de estudos com planejamentos fatoriais concluiu que o processo pode ser realizado com álcool a 80%.

c) A identificação e quantificação do marcador se fez pela avaliação dos espectros de IV e dos cromatogramas de CLAE com tempo de retenção de 9 min.

d) Os testes físico – químico contribuíram para a caracterização e padronização do extrato líquido, revelando que o mesmo têm parâmetros aceitáveis para ser submetido ao processo de secagem por nebulização/atomização.

e) Os resultados da atividade antibacteriana sugerem que *L. pacari* apresenta inibição do crescimento microbiano. Os baixos valores de CIM da planta para fungos revelam significativa contribuição para caracterização de sua ação antimicrobiana.

f) O processo de secagem permitiu encontrar uma condição ideal de trabalho com proporção de adjuvante a 25%, temperatura 130°C , vazão do ar comprimido 30L/min e do ar de secagem 2,5 mL/min, sendo avaliado nesta condição o teor de ácido elágico e o baixo custo do procedimento. E, estatisticamente, a variável concentração do adjuvante é a que mais exerce influência no processo.

g) As análises por CLAE do extrato seco revelaram que o processo de secagem não causou danos significativos em seus perfis cromatográficos. Os valores de atividade de água estão dentro dos limites sugeridos pela literatura, embora os de teor de voláteis tenham superado o limite estabelecido. E as fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostraram predomínio de partículas esféricas com características de superfície influenciadas pelo uso de adjuvantes de secagem.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUADO, M. et al. Diseño de comprimidos de extrato de *Aloysia polystachya* por compresión directa. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, 2006. n. 02, p. 225-230.

ALVES, P. M. et al . Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação in vitro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, 2006.

AULTON, M.E. Drying. In:\_\_\_\_\_. **Pharmaceutics: The science of dosage form design**. 2.ed., p. 379-396, 2002.

BORLAUG, N.E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey (ed.). **Global warming and other eco-myths**. 2002. p. 29-60.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº14, de 31 de março de 2010 - Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 de abril. 2010.

\_\_\_\_\_,\_\_\_\_\_. Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. 2010. v. 1. Poder Executivo, Brasília, DF. p. 500-524.

CAI, Y.Z; CORKE, H. Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments.**Journal of Food Science**, v. 65, n. 6, p. 1248-1252, 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.

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, 2000. p.179-89.

CAMELO, S. R. P. **Estudos de pré-formulação e formulação de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Pará, Belém, Pará. 2010.

CARVALHO E.L.S. **Desenvolvimento de produtos secos nebulizados de *aytenus ilicifolia* Martius ex Reissek – Celastraceae (espineira-santa)**, 2007. 133p. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2007.

CARVALHO, A.C.B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA, CNPF. Colombo, 1994. 640p.

Disponível em: <[http://www.cnpf.embrapa.br/pauloernani/temp/index\\_especies.htm](http://www.cnpf.embrapa.br/pauloernani/temp/index_especies.htm)>. Acesso em: 22 ago. 2005.

CARVALHO, J. C. T. et al. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al.. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 518-535, 2010.  
CHAIBUB, B.A. et al. Estudo de caracterização físico-química e da atividade antiinflamatória do extrato liofilizado das folhas de *Lafoensia pacari* August Saint-Hilaire (Lytraceae) In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO CONPEEX, p.358-362., 2012, Goiânia.

CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Ellagitannins nature, occurrence and dietary burden. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.80, 2000, p. 1118-1125.

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.

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.

COELHO, F. B. R. et al. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada na comunidade do Jalapão - TO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, suplemento v. 2, p. 52-55, 2005.

COELHO, M. F. B. Plantas Medicinais: mais um aliado para o tratamento de alergias. Disponível em: <[http://www.labjor.unicamp.br/midiaciencia/article.php3?id\\_article=616](http://www.labjor.unicamp.br/midiaciencia/article.php3?id_article=616)>. Acesso em 01 jan. 2013.

COUTO, R. O. et al. Caracterização Físico-Química do pó das folhas de *Eugenia Dysenterica* DC. ( Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.4, n. 3, p. 59-69, 2009

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1981. p.1260.

Farmacopéia do Cerrado 1ª edição , 2010, v 1, 352p. (BRASIL, 2010).

Food and Drug Administration (FDA). REVIEWER GUIDANCE, **Validation of Chromatographic Methods**, Center for Drug Evaluation and Research, 1994. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>

GALDINO, P. M. et al . Central activities of hydroalcoholic extract from *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. stem bark. **Brazilian Journal Pharmacy Science**, São Paulo, v. 46, n. 3, Sept. 2010 .

Gaudy D. et al. Rôle de l'adjuvant dans l'optimization de la production d'un extrait sec vegetal nébulisé: "cas de l'extrait de Noix Vomique". **Pharm Acta Helv.** v. 66, p. 5-10. 1991.

GEORGETTI, S.R. et al. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. **LWT Food Science and Technology**, v. 41, n.2, p.1521–1527, 2008.

HELM, R.F.; LEI, Z.; JERVIS, JUDITH. Use of Methanolysis for the Determination of Total Ellagic and Gallic Acid Contents of Wood and Food Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.1165 -1168, 2001.

Hong, E.; Kim, G-H. Comparison of extraction conditions for phenolic, flavonoid content and determination of rosmarinic acid from **Perilla frutescens** var. **acuta**. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n, 7, p. 1353-1359, 2010.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 13 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. p. 599.

SILVA JUNIOR, I. F. et al. Artigo Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St. -Hil., *Lythraceae*, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 3, p. 422-428, 2010.

LIMA, M. R. et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 105, n. 1-2, p. 137-147, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. p. 352.

LUBI, N. C. et al. Desenvolvimento de forma farmacêutica líquida de uso oral, isenta de substâncias glicogênicas, com extrato fluido de *Mikania glomerata* Sprengel - Asteraceae (guaco). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.13, supl. 1, p. 43-46. 2003.

MATOS, L. G. et al. anti-inflamatórios, anti-nociceptiva e sedativo efeitos de *Lafoensia pacari* (pacari) extrato aquoso **Pharm. Biol.**, v.46, n.5, p.341-346, 2008.

MARQUES, L.C.; VIGO, C.L.S. Preparação e Padronização de extratos vegetais. In: LEITE, J.P.V. (Ed.). **Fitoterapia**: Bases científicas e tecnológicas. Editora Atheneu. p.169-204. 2009.

MENDONÇA, R.C., FELFILI, J.M., WALTER, B.M.T., SILVA-Jr., M.C., REZENDE, A.V., FILGUEIRAS, T.S., NOGUEIRA, P.E. & FAGG, C.W. 2008. Flora vascular do cerrado: *Checklist* com 12.356 espécies. In Cerrado: ecologia e flora (S.M. Sano, S.P. Almeida & J.F. Ribeiro, ed.). EMBRAPA-CPAC, Planaltina, p.417-1279.

MUNDO, S. R.; DUARTE, M. R. Morfoanatomia foliar e caulinar de dedaleiro: *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.4, p.522-529 2007.

MÜLLER, V. et al. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. **Phytother. Res.**, v.21, n.10, p.970-974, 2007.

NASCIMENTO, M. V. M. et al. Antinociceptive effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. independent of anti-inflammatory activity of ellagic acid. **Journal of Natural Medicines**, v.65, p. 448-454. 2011.

NASCIMENTO, G. G. F. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal Microbiology** v. 31, p. 247-256. 2000.

NUNES, G. P. et al. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 83-92, 2003.

OLIVEIRA, F. et al. **Farmacognosia**. Atheneu. Rio de Janeiro, p. 264- 265,1996.

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

OLIVEIRA, T. L. Quality control of *Psidium guajava* L . cv . “ Pedro Sato ” leaf powder and obtaining its standard ethanolic extract. **Journal of Pharmacy Research**. v. 5, n. 4, p. 2338-2343, 2012.

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

Paula, I. C. et al. Development of ointment formulations prepared with *Achyrocline satureioides* spray-dried extracts. **Drug Dev Ind Pharm**. v. 24, p. 235-241. 1998.

PEREIRA, J. V. et al. Artigo Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn . sobre microrganismos do biofilme dental. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 1, p. 88-93, 2006.

PEREIRA, C. B. et al. Controle de qualidade físico químico e dosagem de polifenóis totais e flavonóides nas folhas de *Morus alba* ( MORACEAE ). *Revista Saúde Santa Maria*. v. 37, n. 2 p. 57-68, 2011.

PINTO, M.S. **Compostos bioativos de cultivares brasileiras de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)**: caracterização e estudo da biodisponibilidade dos derivados de ácido elágico. 2008. 117f. Dissertação (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – USP, 2008.

POFÍRIO, Z. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 03, p. 785-789, 2009.

POSER, G.L.V-P. Polissacarídeos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. Ed. Porto Alegre, Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 498-517, 2004.

RANKELL AS, LIEBERMAN HÁ, SCHIFFMAN RF. Secagem. In: Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Vol 1. Lisboa: Calouste Gulbenkian, p. 83-112, 2001.

RATTER, J. A. et al. Woody species found in cerrado (broad sense) habitat from 170 locations in cerrado ecosystems. **Bol. Herbario-Ezechias Paulo Heringer**, Brasília, v. 7, p. 5-112, 2001.

ROGERIO, A. P. et al. *Lafoensia pacari* extrato inibe a produção de IL-5 na toxocaríase. **Parasite Immunology**. v.25, n.7, p.393-400, 2003.

ROGERIO, A. P. et al., Anti-inflamatória, analgésica e anti- efeitos edematosas de *Lafoensia pacari* e extrato ácido elágico. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.58, n.9, p.1265-1273, 2006.

ROGERIO, A. P. et al., efeitos anti-inflamatórios de *Lafoensia pacari* e do ácido elágico em um modelo murino de asma *Eur. Journal of Pharmacy and Pharmacology*. V.508, n.1-2, p.262-270, 2007.

SAWYER, D. População, meio ambiente e desenvolvimento sustentável no cerrado. In: HOGAN, D. J. et al. 2002. **Migração e ambiente no Centro-Oeste**. Campinas, NEPO/UNICAMP: PRONEX, p. 279-299.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões C. M. O. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: 2001, p. 301-332.

SILVA, J.O. et al. Caracterização físico-química do extrato fluído e seco por nebulização de *Symplytum officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.2, n.16. 2006.

SILVA JÚNIOR, M.C. **100 Árvores do cerrado: guia de campo**. Brasília: Ed. Rede de sementes do cerrado, 2005.

SILVA JUNIOR, I. F. et al . Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.20, n.3, 2010.

SHAW, F. V. Spray drying as an alternative granulation technique. In: **Parikj DM. Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology**. Nova York: Marcel Dekker, p. 75-96. 1997.

SOARES, L. A. L. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek – Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final**. 2002. 285 f. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. Porto Alegre, 2002.

SÓLON, S. et al. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, p. 173-178, 2000

SOUZA, T.P., **Desenvolvimento tecnológico e otimização de formas farmacêuticas sólidas contendo ao teor de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae)**, 2004. Tese PhD, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SOUZA JÚNIOR, P.T.; RUDOLF, S. Estudo químico preliminar dos constituintes farmacologicamente ativos da casca do caule da *Lafoensia pacari* St. Hil. (mangava brava). In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 4., **Resumos...** Cuiabá: UFMT.MCT/CNPq, 1996. p.65.

TAMASHIRO FILHO, P. **Avaliação da atividade antiúlcera do extrato bruto metanólico de *Lafoensia pacari* St.Hil. (mangava brava)**. 1999. 128 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública e Ambiente) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 1999.

VIEGAS, J. C. et al. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. 2006. v.29, n. 2, p. 326-337.