



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROESTRU-
TURADO CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE
CECROPIA GLAZIOVII SNETH (EMBAÚBA)**

DANIELA PAULA AREND

Florianópolis, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROESTRUTURADO CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE *CECROPIA GLAZIOVII* SNETH (EMBAÚBA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE em Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Angela Machado de Campos
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Gomes dos Santos

DANIELA PAULA AREND

Florianópolis – SC
2010

A681d Arend, Daniela Paula

Desenvolvimento de Sistema Microestruturado contendo extrato padronizado de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba) [dissertação] / Daniela Paula Arend ; orientadora, Angela Machado de Campos. - Florianópolis, SC, 2010. 174 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Cecropia glaziovii*. 3. Micropartículas. 4. Ácido Clorogênico. 5. Ácido cafeico. 6. Atividade anti-diabética. 7. Extrato padronizado. 8. Vaso dilatador. I. Campos, Angela Machado de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos que são meus tesouros, Laís e Caio,
aos meus inestimáveis e amados pais, Roswitha e Danilo.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da CAPES (bolsa de Mestrado), no Laboratório de Farmacotécnica do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, em colaboração com os seguintes laboratórios: Laboratório de Hormônios e Transdução de Sinais do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina e do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, locais em que foram realizados os testes farmacológicos.

“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas”.
(Nietzsche)

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, a Deus pela minha vida, pelos desafios, obstáculos e conquistas.

À minha família, especialmente meus pais pelo apoio, incentivo, segurança, dedicação e exemplos de vida, ética, justiça e determinação. Aos meus filhos pela paciência, carinho, entusiasmo e alegria de viver, sem eles eu não estaria aqui hoje.

Às Profa. Angela, Ana e Diva pela confiança inicial, orientação, amizade, suporte e discussões construtivas.

A todos os professores que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho com seus ensinamentos e profundo conhecimento, suas sugestões e apoio. Prof. Flávio Reginatto, Eloir Paulo Schenkel, Marcos Segatto, Fátima Barreto, Elenara Lemos-Senna, Rosane Budal, Miriam Falkenberg, Simone Cardoso, Valdecir Laura.

Aos funcionários que sempre contribuíram e muito com o meu trabalho: Sandrinha, Nilson (por todas as suas “invenções”), Solange, Claudinha, Bruno e Rodrigo.

Aos colegas de laboratório: Juliana Bidone, Carine Dal Pizzol, Daiane Nemen, Letícia Mazzarino, Cristiana Dora (Kiki), Mariana Dalagnol, Luis Felipe, Bianca. Ao Felipe Tasca, pela ajuda com as figuras e programa Design Expert®.

Aos colegas de mestrado que tanto me ajudaram e incentivaram, em especial: Geison com toda a sua paciência, Mônica, Fábio, Tati Loira, Francielly, Tati Morena, Gustavo Baiano, Danielle, Mariana, Poliane, Luisa, Bruno, Rafa, Larissa, Paulo, Gislaïne, Silvana, Jadel, Karin, Rodrigo, Letícia, Taty, Iza, Thiaguinho.

Às alunas de iniciação científica que me ajudaram nos experimentos: Duda e Narjara. E aos outros alunos de iniciação que também participaram do meu dia-a-dia: Fernanda, Mariana, Paula, Cassiana, Gabriela.

Aos meus alunos por me mostrarem o quanto é valiosa a troca de conhecimento.

RESUMO

A *Cecropia glaziovii* Sneth, popularmente conhecida como embaúba, é utilizada na medicina popular visando os efeitos diurético, anti-hipertensivo, antiinflamatório, expectorante, antiasmático e antitérmico. Esta planta é principalmente encontrada em áreas de reflorestamento e na Mata Atlântica brasileira. O presente trabalho tem como objetivo a padronização de soluções extrativas de *Cecropia glaziovii* e posteriormente realizar um estudo preliminar para a encapsulação dos extratos padronizados em um sistema microestruturado. A influência dos fatores tecnológicos como teor etanólico, tempo e temperatura sobre a extração de compostos fenólicos foi avaliada para os métodos estudados, maceração e decocção. As soluções foram preparadas utilizando delineamento fatorial 2^2 com ponto central e avaliadas quanto ao seu resíduo seco, pH, teor de fenólicos totais, teor de ácido clorogênico e ácido cafeico, sendo estas duas substâncias consideradas como marcadores químicos e doseados por metodologia validada de CLAE. Os extratos obtidos com 20% de etanol apresentaram elevada concentração de ácido cafeico, substância que praticamente não está presente nas outras soluções extrativas. Em função deste resultado, foram realizados estudos para avaliação da influência da temperatura e da presença de conservante sobre os teores dos marcadores químicos durante o processo extrativo, sendo para isto elaborados dois delineamentos fatoriais 2^3 . A atividade dos extratos brutos no tratamento do diabetes e da hipertensão foi avaliada. Os extratos obtidos por maceração foram efetivos na redução da glicemia em ratos hiperglicêmicos e apresentaram surpreendente atividade vasorrelaxadora. A atividade farmacológica serviu como fator de escolha dos extratos a serem microencapsulados em sistema polimérico, utilizando a técnica de dupla emulsão (A/O/A) com evaporação/extração do solvente. Para avaliação da interferência dos diferentes fatores na formulação das micropartículas foi utilizado o delineamento fatorial 2^4 . As micropartículas foram avaliadas quanto ao seu rendimento, formação, aparência, tamanho e eficiência de encapsulação.

Palavras-chave *Cecropia glaziovii* Sneth, micropartículas, ácido clorogênico, ácido cafeico, atividade anti-diabética, extrato padronizado, vaso dilatador.

ABSTRACT

Cecropia glaziovii Sneth, known as embaúba, is used in folk medicine as diuretic, antihypertensive, anti-inflammatory, expectorant, as relief for asthma and fever. This plant is mainly found in reforestation areas and Brazilian Atlantic Rain Forest. The present work aims to develop *Cecropia glaziovii* padronized extracts and lately perform preliminary extracts encapsulation in microstructured system. The influence of some technological factors as ethanol concentration, time and temperature extraction above phenolic compounds was evaluated in studied methods, maceration and decoction. The extractive solutions were prepared employing a 2^2 factorial design with central point and evaluated as dry residue, pH, total phenolics content, chlorogenic and caffeic acids concentration, both considered as chemical markers and the assay was carried out by HPLC validated methodology. In the 20% ethanolic extracts a great amount of caffeic acid was observed, compound that was not detected in the extracts with higher ethanolic concentrations. In order to investigate this result, the influence of temperature and the presence of a preservative on chemical markers content during extraction process were evaluated according to a two 2^3 factorial designs. The antidiabetic and antihypertensive activity of the extracts were evaluated. The extracts obtained by maceration reduced glucose level on blood samples in hyperglycemic rats and showed surprisingly vasodilator activity. The pharmacological activity was used as a factor to choose the extracts for microencapsulation in polymeric system, using double emulsion technique (W/O/W) with solvent evaporation/extraction. In order to investigate the influence of different factors in microparticles formulation a 2^4 factorial design was performed. Microparticles were evaluated as yield, formation, aspect, size and encapsulation efficiency.

Keywords *Cecropia glaziovii* Sneth, microparticles, chlorogenic acid, caffeic acid, antidiabetics activity, standard extract, vasodilator.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1. Análise granulométrica por tamisação da matéria-prima vegetal moída | 38 |
| TABELA 2. Linearização do diâmetro granulométrico médio obtido através do modelo de probitos..... | 40 |
| TABELA 3. Limites microbiológicos preconizados pela OMS para as diferentes categorias relacionadas ao material vegetal de acordo com a sua utilização e características. | 43 |
| TABELA 4. Programação da fase móvel para CLAE..... | 48 |
| TABELA 5. Delineamento fatorial 2^2 para obtenção das soluções extrativas por maceração a temperatura ambiente. Fatores avaliados: concentração de etanol e tempo | 51 |
| TABELA 6. Delineamento fatorial 2^2 para obtenção das soluções extrativas por decocção utilizando água purificada como líquido extrator. Fatores avaliados: temperatura e tempo..... | 52 |
| TABELA 7. Dados de linearidade dos marcadores químicos obtidos para a validação do método de CLAE..... | 59 |
| TABELA 8. Dados de precisão: repetibilidade e precisão intermediária dos marcadores químicos obtidos para a validação do método de CLAE | 61 |
| TABELA 9. Dados de exatidão do doseamento dos marcadores químicos nos extratos utilizados para a validação do método de CLAE | 62 |
| TABELA 10. Limites de quantificação e detecção dos marcadores químicos obtidos para a validação do método de CLAE | 62 |
| TABELA 11. Resultados da caracterização dos extratos obtidos por maceração usando o delineamento fatorial 2^2 | 63 |
| TABELA 12. Análise de variância dos resultados da caracterização dos extratos obtidos por maceração usando o delineamento fatorial 2^2 ($p \leq 0,05$)..... | 64 |
| TABELA 13. Resultados da caracterização dos extratos obtidos por decocção usando o delineamento fatorial 2^2 | 64 |
| TABELA 14. Análise de variância dos resultados da caracterização dos extratos obtidos por decocção usando o delineamento fatorial 2^2 ($p \leq 0,05$)..... | 65 |
| TABELA 15. Delineamento fatorial 2^3 para obtenção das soluções extrativas e respectivas condições extrativas, destinadas à avaliação da influência da temperatura no processo extrativo dos marcadores químicos..... | 91 |

| | |
|---|-----|
| TABELA 16. Delineamento fatorial 2 ³ para obtenção das soluções extrativas destinadas à avaliação da influência do conservante no processo extrativo dos marcadores químicos..... | 92 |
| TABELA 17. Densidade dos extratos obtidos por maceração 8d20, 6d50 e 8d80..... | 94 |
| TABELA 18. Áreas médias dos picos de ácido clorogênico e ácido cafeico obtidas de diferentes diluições do extrato 8d20 para determinação da linearidade das respostas por CLAE..... | 95 |
| TABELA 19. Áreas médias dos picos de ácido clorogênico e ácido cafeico obtidas de diferentes diluições do extrato 6d50 para determinação da linearidade das respostas por CLAE..... | 97 |
| TABELA 20. Áreas médias dos picos de ácido clorogênico e ácido cafeico obtidas de diferentes diluições do extrato 8d80 para determinação da linearidade das respostas por CLAE..... | 100 |
| TABELA 21. Resultados de quantificação dos marcadores químicos ácido clorogênico e ácido cafeico nos extratos obtidos por delineamento fatorial 2 ³ em diferentes condições extrativas, destinadas à avaliação da influência da temperatura no processo extrativo dos marcadores | 104 |
| TABELA 22. Análise de variância dos resultados de quantificação dos marcadores químicos ácido clorogênico e ácido cafeico nos extratos obtidos por maceração utilizando delineamento fatorial 2 ³ em diferentes condições extrativas, destinadas à avaliação da influência da temperatura e da presença de conservante no processo extrativo dos marcadores ($p \leq 0,05$)..... | 107 |
| TABELA 23. Resultados de quantificação dos marcadores químicos nos extratos obtidos por delineamento fatorial 2 ³ em presença ou ausência de conservante, destinados à avaliação da influência deste no processo extrativo dos marcadores | 109 |
| TABELA 24. Nomenclatura estabelecida para identificação da concentração e do tipo de extrato incorporado em cada uma das formulações..... | 116 |
| TABELA 25. Fatores e níveis utilizados no estudo de formulação: delineamento fatorial 2 ⁴ | 118 |
| TABELA 26. Delineamento fatorial 2 ⁴ para obtenção das micropartículas poliméricas destinado a avaliação dos fatores concentração do polímero, tipo de extrato, concentração do extrato e velocidade de agitação da primeira emulsão..... | 119 |
| TABELA 27. Resultados da caracterização das micropartículas obtidas usando o delineamento fatorial 2 ⁴ | 123 |

| | |
|---|-----|
| TABELA 28. Análise de variância dos resultados da caracterização das micropartículas obtidas usando o delineamento fatorial 2^4 ($p \leq 0,05$) | 124 |
|---|-----|

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. Equilíbrio protolítico de ácidos polifenólicos..... | 6 |
| FIGURA 2. Estrutura química do ácido cafeico | 7 |
| FIGURA 3. Estrutura química do ácido quínico | 8 |
| FIGURA 4. Estrutura química do ácido clorogênico | 8 |
| FIGURA 5. Esquema geral dos quatro passos principais do processo de preparo de micropartículas por extração/evaporação do solvente | 18 |
| FIGURA 6. Estrutura molecular do Eudragit® RS100..... | 25 |
| FIGURA 7. Distribuição granulométrica referente à fração retida obtida através da análise granulométrica | 39 |
| FIGURA 8. Curvas cumulativas de retenção e passagem após tamização da matéria-prima vegetal moída..... | 40 |
| FIGURA 9. Representação gráfica da linearização do diâmetro granulométrico médio obtido através do modelo de probitos | 41 |
| FIGURA 10. Sobreposição de cromatogramas dos primeiros 8 minutos das soluções extrativas obtidas por maceração (4d20, 8d20, 6d50 e 8d80) | 56 |
| FIGURA 11. Cromatograma típico obtido por CLAE do ácido cafeico e respectivo espectro obtido com detector DAD na região de 180 a 400 nm..... | 57 |
| FIGURA 12. Cromatograma do extrato 4d20 salientando o pico do ácido cafeico e seu espectro, obtido com detector DAD na região de 180 a 400 nm..... | 58 |
| FIGURA 13. Curva analítica média do ácido clorogênico obtida por CLAE | 60 |
| FIGURA 14. Curva analítica média do ácido cafeico obtida por CLAE | 60 |
| FIGURA 15. Representação gráfica dos fatores concentração de etanol e tempo dos extratos obtidos por maceração para resíduo seco..... | 66 |
| FIGURA 16. Representação gráfica dos fatores temperatura e tempo dos extratos obtidos por decocção para resíduo seco..... | 67 |
| FIGURA 17. Gráfico tridimensional dos resultados obtidos para o ensaio de pH relacionando os fatores concentração de etanol e tempo dos extratos obtidos por maceração..... | 68 |
| FIGURA 18. Representação gráfica dos fatores temperatura e tempo dos extratos obtidos por decocção para o ensaio de pH..... | 69 |
| FIGURA 19. Curva analítica média do ácido gálico obtida por espectrofotometria UV/Vis. Detecção: 765 nm | 71 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 20. Gráfico tridimensional dos resultados obtidos para o ensaio de fenólicos totais relacionando os fatores concentração de etanol e tempo dos extratos obtidos por maceração..... | 72 |
| FIGURA 21. Representação gráfica dos fatores temperatura e tempo dos extratos obtidos por decocção para o ensaio de fenólicos totais.. | 73 |
| FIGURA 22. Gráfico de interação entre os fatores concentração de etanol e tempo dos extratos obtidos por maceração para o doseamento de ácido clorogênico | 74 |
| FIGURA 23. Gráfico de interação após aplicação de raiz quadrada, entre os fatores concentração de etanol e tempo dos extratos obtidos por maceração para o doseamento de ácido cafeico..... | 75 |
| FIGURA 24. Gráfico de interação entre os fatores temperatura e tempo dos extratos obtidos por decocção para o doseamento de ácido clorogênico..... | 76 |
| FIGURA 25. Gráfico de interação entre os fatores temperatura e tempo dos extratos obtidos por decocção para o doseamento de ácido cafeico..... | 77 |
| FIGURA 26. Gráfico comparativo do efeito agudo entre os marcadores químicos (isolados e em associação) e os extratos obtidos por maceração na curva de tolerância à glicose oral. Administração dos extratos liofilizados por gavagem: 400 mg/kg | 79 |
| FIGURA 27. Gráfico comparativo do efeito agudo entre os marcadores químicos (isolados e em associação) e os extratos obtidos por decocção na curva de tolerância à glicose oral. Administração dos extratos liofilizados por gavagem: 400 mg/kg | 81 |
| FIGURA 28. Alteração percentual da glicemia em ratos diabéticos após administração dos extratos obtidos por maceração (400 mg/kg) e dos marcadores químicos isolados e em associação | 83 |
| FIGURA 29. Alteração percentual da glicemia em ratos diabéticos após administração dos extratos obtidos por decocção (400 mg/kg) e dos marcadores químicos isolados e em associação | 84 |
| FIGURA 30. Curvas concentração resposta cumulativas aos extratos liofilizados obtidos por maceração e por decocção (0,1 – 1000 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato, contraídos previamente com fenilefrina (1 µM). Cada ponto representa média ± EPM de 6 experimentos..... | 86 |
| FIGURA 31. Curva média de linearidade do extrato 8d20 para análise do marcador químico ácido clorogênico obtida por CLAE | 95 |
| FIGURA 32. Curva média de linearidade do extrato 8d20 para análise do marcador químico ácido cafeico obtida por CLAE..... | 96 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 33. Curva média de linearidade do extrato 6d50 para análise do marcador químico ácido clorogênico obtida por CLAE..... | 98 |
| FIGURA 34. Curva média corrigida de linearidade do extrato 6d50 para análise do marcador químico ácido clorogênico obtida por CLAE | 98 |
| FIGURA 35. Curva média de linearidade do extrato 6d50 para análise do marcador químico ácido cafeico obtida por CLAE..... | 99 |
| FIGURA 36. Curva média de linearidade do extrato 8d80 para análise do marcador químico ácido clorogênico obtida por CLAE..... | 100 |
| FIGURA 37. Curva média corrigida de linearidade do extrato 8d80 para análise do marcador químico ácido clorogênico obtida por CLAE | 101 |
| FIGURA 38. Perfil cromatográfico do extrato 8d80 a 758,20 mg/mL obtido por CLAE. Fase móvel em sistema de gradiente, fluxo 1,0 mL/min., detecção a 330nm..... | 102 |
| FIGURA 39. Gráficos tridimensionais dos resultados obtidos na quantificação dos marcadores químicos ácido clorogênico e ácido cafeico no estudo de estabilidade relacionando os fatores concentração de etanol, tempo e avaliação da influência da temperatura dos extratos obtidos por maceração | 106 |
| FIGURA 40. Gráficos tridimensionais dos resultados obtidos na quantificação dos marcadores químicos ácido clorogênico e ácido cafeico no estudo de estabilidade relacionando os fatores concentração de etanol, tempo e avaliação da presença de conservante dos extratos obtidos por maceração | 110 |
| FIGURA 41. Gráfico de interação entre os fatores concentração de polímero e concentração de extrato das micropartículas obtidas para a determinação do rendimento, utilizando os EM | 125 |
| FIGURA 42. Representação em cubo da influência dos fatores concentração do polímero, tipo de extrato e concentração do extrato sobre os resultados de rendimento das micropartículas . | 126 |
| FIGURA 43. Microfotografias obtidas por MEV das micropartículas para avaliação da formação e da aparência | 127 |
| FIGURA 44. Gráficos de interação entre os fatores concentração de polímero, concentração de extrato e velocidade de agitação da 1° emulsão para avaliação da formação das micropartículas, utilizando os EM | 128 |
| FIGURA 45. Gráfico de interação entre os fatores concentração de polímero e velocidade de agitação da 1° emulsão para avaliação da aparência das micropartículas, utilizando os EM4..... | 129 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 46. Representação em cubo da influência dos fatores concentração do polímero, concentração do extrato e velocidade de agitação da 1° emulsão sobre os resultados de tamanho de micropartículas..... | 130 |
| FIGURA 47. Curva analítica média do ácido cafeico obtida por espectrofotometria UV/Vis. Detecção: 328 nm | 131 |
| FIGURA 48. Gráfico de interação entre os fatores tipo de extrato e concentração do extrato para avaliação da eficiência de encapsulação das micropartículas, utilizando os EM..... | 132 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------|--|
| ACF | Ácido cafeico |
| ACG | Ácido clorogênico |
| ACN | Acetonitrila |
| AINE | Antiinflamatório não esteróide |
| ANOVA | Análise de variância |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| CCR | Curva concentração resposta |
| Ceme | Central de Medicamentos |
| CG | Classe granulométrica |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CPQBA | Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas |
| DAD | Diode Array Detector: detecção ultravioleta por arranjo de diodos |
| DCI | Disease - Consensus Index |
| DG | Diâmetro granulométrico médio |
| DM | Diabetes mellitus |
| dp | Desvio padrão |
| DPR | Desvio padrão relativo |
| E | Exatidão |
| ECA | Enzima conversora da angiotensina |
| ED | Extrato obtido por decocção |
| EE | Eficiência de encapsulação |
| EM | Extrato obtido por maceração |
| EPM | Erro padrão da média |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| ET | Endotelina |
| EtOH | Etanol |
| EXP | Experimento/n° amostra definido pelo delineamento |
| fd | Fator de diluição |
| FR | Fração retida |
| FRA | Fração retida acumulada |
| FP | Fração de passagem |
| GLUT | Facilitador do transporte de glicose |
| HTA | Hipertensão arterial |
| HVLP | Polivinilidenfluorido |
| IC | Inclinação da curva analítica |
| ICH | International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of |

| | |
|-----------------------------|---|
| | Pharmaceuticals for Human Use |
| IDF | International Diabetes Federation |
| LD | Limite de detecção |
| Log P | Coefficiente de partição óleo/água |
| LQ | Limite de quantificação |
| m | Massa |
| MCP | Micropartículas |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| O ₂ ⁻ | Radical ânion superóxido |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| ON | Óxido nítrico |
| OPAS | Organização Pan-Americana da Saúde |
| PA | Pressão arterial |
| PD | Perda por dessecação |
| PM | Peso molecular |
| pKa | Constante de dissociação acídica |
| PPPM | Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais |
| PVA | Álcool polivinílico |
| r | Coefficiente de correlação |
| RS | Resíduo seco |
| SBD | Sociedade Brasileira de Diabetes |
| SBH | Sociedade Brasileira de Hipertensão |
| SGLT1 | Transportador de glicose ativo |
| TE | Teor de extrativos |
| UNICAMP | Universidade de Campinas |
| USP | United States Pharmacopeia |
| UV | Ultravioleta |
| WHO | World Health Organization |
| Δ | Intervalo de abertura de malha |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| OBJETIVOS | 29 |
| CAPÍTULO 1..... | 31 |
| Caracterização da <i>Cecropia glaziovii</i> | 31 |
| 1. Apresentação | 32 |
| 2. Materiais e Métodos | 32 |
| 2.1. Material | 32 |
| 2.1.1. Matérias-primas..... | 32 |
| 2.1.2. Solventes, soluções e reagentes..... | 32 |
| 2.1.3. Equipamentos..... | 33 |
| 2.2. Metodologia | 33 |
| 2.2.1. Aquisição do material vegetal de estudo..... | 33 |
| 2.2.2. Moagem do material vegetal..... | 33 |
| 2.2.3. Perda por dessecação..... | 34 |
| 2.2.4. Teor de extrativos..... | 34 |
| 2.2.5. Granulometria..... | 34 |
| 2.2.6. Cinzas totais | 35 |
| 2.2.7. Avaliação da qualidade microbiológica da matéria-prima vegetal | 35 |
| 2.2.7.1. Pré-tratamento do material a ser examinado | 35 |
| 2.2.7.2. Determinação numérica de formas viáveis..... | 36 |
| 3. Resultados e Discussão | 36 |
| 3.1. Perda por dessecação..... | 37 |
| 3.2. Teor de extrativos..... | 37 |
| 3.3. Granulometria..... | 38 |
| 3.4. Cinzas Totais..... | 41 |
| 3.5. Qualidade microbiológica do material | 41 |
| CAPÍTULO 2..... | 45 |
| Padronização das soluções extrativas..... | 45 |

| | |
|--|----|
| 1. Apresentação..... | 46 |
| 2. Materiais e Métodos..... | 46 |
| 2.1. Material..... | 46 |
| 2.1.1. Matérias-primas | 46 |
| 2.1.2. Solventes, soluções e reagentes..... | 46 |
| 2.1.3. Aparelhos, equipamentos e materiais especiais | 47 |
| 2.2. Metodologia | 47 |
| 2.2.1. Validação da metodologia analítica por CLAE..... | 47 |
| 2.2.2. Delineamento experimental | 50 |
| 2.2.3. Preparo das soluções extrativas..... | 52 |
| 2.2.4. Análise das soluções extrativas | 52 |
| 2.2.4.1. Resíduo seco | 52 |
| 2.2.4.2. pH..... | 53 |
| 2.2.4.3. Fenólicos totais | 53 |
| 2.2.5. Doseamento por CLAE dos marcadores químicos | 54 |
| 2.2.6. Liofilização das soluções extrativas..... | 54 |
| 2.2.7. Avaliação <i>in vivo</i> da atividade anti-diabética..... | 54 |
| 2.2.8. Avaliação <i>ex vivo</i> da atividade anti-hipertensiva | 55 |
| 3. Resultados e Discussão | 55 |
| 3.1. Validação da metodologia analítica por CLAE..... | 58 |
| 3.1.1. Linearidade | 58 |
| 3.1.2. Precisão | 61 |
| 3.1.3. Exatidão | 61 |
| 3.1.4. Limite de quantificação e limite de detecção..... | 62 |
| 3.2. Análise das soluções extrativas: Maceração e Decocção..... | 63 |
| 3.3. Avaliação <i>in vivo</i> da atividade anti-diabética..... | 77 |
| 3.3.1. Avaliação dos EM em animais hiperglicêmicos | 78 |
| 3.3.2. Avaliação dos ED em animais hiperglicêmicos | 80 |
| 3.3.3. Avaliação dos extratos obtidos em animais diabéticos | 81 |

| | |
|---|-----|
| 3.4. Avaliação <i>ex vivo</i> da atividade anti-hipertensiva | 84 |
| CAPÍTULO 3..... | 87 |
| Monitoramento dos teores dos marcadores químicos nas soluções extrativas | 87 |
| 1. Apresentação | 88 |
| 2. Materiais e Métodos | 88 |
| 2.1. Material | 88 |
| 2.1.1. Matérias-primas..... | 88 |
| 2.1.2. Solventes, soluções e reagentes..... | 88 |
| 2.1.3. Aparelhos, equipamentos e materiais especiais..... | 89 |
| 2.2. Metodologia | 89 |
| 2.2.1. Linearidade das respostas por CLAE das soluções extrativas..... | 89 |
| 2.2.2. Estabilidade das soluções extrativas..... | 90 |
| 3. Resultados e Discussão | 92 |
| 3.1. Linearidade das respostas por CLAE das soluções extrativas..... | 93 |
| 3.2. Estabilidade das soluções extrativas..... | 103 |
| CAPÍTULO 4..... | 113 |
| Desenvolvimento do sistema microestruturado | 113 |
| 1. Apresentação | 114 |
| 2. Materiais e Métodos | 114 |
| 2.1. Material | 114 |
| 2.1.1. Matérias-primas..... | 114 |
| 2.1.2. Solventes, soluções e reagentes..... | 114 |
| 2.1.3. Aparelhos e equipamentos..... | 115 |
| 2.2. Metodologia | 115 |
| 2.2.1. Preparo dos extratos | 115 |
| 2.2.2. Preparo das micropartículas | 116 |
| 2.2.3. Rendimento | 120 |
| 2.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... | 120 |
| 2.2.4.1. Formação e aparência das micropartículas..... | 120 |

| | |
|---|-----|
| 2.2.4.2. Tamanho de partícula..... | 120 |
| 2.2.5. Eficiência de encapsulação (EE)..... | 120 |
| 3. Resultados e Discussão | 121 |
| 3.1. Rendimento | 124 |
| 3.2. Formação..... | 126 |
| 3.3. Aparência | 128 |
| 3.4. Tamanho de partícula..... | 129 |
| 3.5. Eficiência de encapsulação | 130 |
| CONCLUSÕES | 133 |
| REFERÊNCIAS | 137 |
| ANEXOS / APÊNDICES | 157 |

Introdução geral

APRESENTAÇÃO

Entre as doenças não transmissíveis de maior impacto sobre o SUS encontram-se o Diabetes melito e a hipertensão arterial (OPAS, 2004). O tratamento destas patologias crônicas necessita de atenção prioritária quanto ao desenvolvimento científico, tecnológico e de inovação, visando diminuir custos e qualificar as condições de vida da população. Como estratégias de prevenção, incluem-se a educação e modificações do estilo de vida da população, complementadas por terapias medicamentosas, quando necessário (SBD, 2007; SBH, 2002).

Vários segmentos da população utilizam plantas medicinais como adjuvantes ao tratamento de diversas patologias (VEIGA JÚNIOR, 2005). Entre as espécies nativas do Estado de Santa Catarina, destaca-se a *Cecropia glaziovii* Sneth, amplamente utilizada na medicina tradicional na forma de infusão (chá) como anti-hipertensiva, cardiotônica, anti-inflamatório, expectorante, antiasmático e antitérmico. Sua atividade hipotensora foi comprovada em humanos e os resultados de sua toxicidade aguda e crônica foram considerados promissores (LIMALANDMAN, 2007; NINAHUAMAN, 2007; STANGE, 2009).

Contudo, a possibilidade de variação na composição e nos teores dos constituintes ativos a partir deste tipo de preparação, aliada aos riscos inerentes à utilização de um produto não padronizado, conduz à necessidade de estudos fitoquímicos, toxicológicos, farmacológicos e tecnológicos.

O desenvolvimento de um extrato padronizado, através da utilização de técnicas apropriadas e de substâncias auxiliares ou adjuvantes, viria conferir qualidade ao produto intermediário, aspecto essencial para garantir um produto final estável, seguro e terapêuticamente eficaz.

Por outro lado, a decisão sobre o tipo de forma farmacêutica onde um fármaco será incluído envolve a avaliação de sistemas que possibilitem o maior aproveitamento do potencial terapêutico do mesmo. Particularidades que poderiam comprometer a eficácia do tratamento, tais como irregularidade de absorção, toxicidade elevada, estreita faixa terapêutica, rápida metabolização ou ainda utilização em esquemas terapêuticos de longa duração devem ser consideradas. Em se tratando de administração rotineira, como é o caso de agentes hipoglicemiantes (CHEN, 1998), a via oral representa uma estratégia adequada para liberação de fármacos, evitando o inconveniente da dor e de possíveis consequências indesejáveis após aplicações invasivas (ANSEL, 2007; AULTON, 2005). No entanto, a administração oral de fármacos constitui-se num grande desafio, uma vez que a biodisponibilidade por esta

via é complexa. A pesquisa e o desenvolvimento de sistemas cada vez mais adequados para veicular fármacos pela via oral é uma necessidade que se impõe àqueles envolvidos com a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos (ANSEL, 2007). A obtenção de sistemas terapêuticos capazes de modular a liberação de fármacos tem constituído, nos últimos anos, uma estratégia promissora para a melhoria do perfil biofarmacêutico de medicamentos.

As micropartículas são sistemas farmacêuticos altamente recomendados para o tratamento de patologias crônicas devido à elevada capacidade de controle de liberação do fármaco, o que acarreta um prolongamento da manutenção da concentração plasmática em níveis terapêuticos, redução de flutuações das concentrações séricas dos fármacos e, conseqüentemente, uma redução do número de doses diárias (RAVI KUMAR, 2000).

Assim, com o objetivo de aliar-se a estratégia promissora dos sistemas microestruturados quanto à melhoria do perfil biofarmacêutico e o potencial terapêutico de uma planta tradicionalmente utilizada para o tratamento da Hipertensão Arterial e Diabetes melito, esta linha de pesquisa propõe o desenvolvimento de sistemas fitoterápicos microestruturados contendo extratos da espécie *Cecropia glaziovii* Sneth. Além das vantagens biofarmacêuticas, esses sistemas terapêuticos constituiriam uma inovação tecnológica em nível mundial, considerando a quase inexistência de investigação científica constatada na literatura para a associação de extratos vegetais e sistemas microestruturados.

Dentro deste contexto, este trabalho visou inicialmente o desenvolvimento extratos padronizados de *C. glaziovii* de forma a maximizar sua atividade anti-diabética e hipoglicemiante. Para isto, um planejamento experimental foi conduzido para estudar a influência dos fatores envolvidos na extração, entre eles método de extração, tempo, líquido extrator, temperatura, e a possível interação entre eles. Como marcadores analíticos e biológicos foram selecionados os ácidos fenólicos, por sua abundância e conhecida atividade tanto no Diabetes melito como na Hipertensão arterial. O biomonitoramento dos extratos e marcadores para ambas as atividades foi considerado como o principal critério de seleção de um ou mais extratos para os estudos de microencapsulação. Dentro desta proposta ainda foi realizado um estudo preliminar de microencapsulação dos extratos selecionados, utilizando para isto o polímero Eudragit® RS100.

REVISÃO DA LITERATURA

A flora americana representa a mais rica do mundo com relação à atividade farmacológica, sendo várias espécies levadas para Europa a partir do século XVI. Ainda hoje o Brasil permanece como um importante fornecedor de matéria-prima vegetal para o mercado farmacêutico internacional, além da sua população tanto rural quanto urbana, utilizar essas plantas como medicação caseira (BRANDÃO, 2008).

O gênero *Cecropia* proveniente da família *Urticaceae* (HADIAH, 2008; SYTSMA, 2002), é considerado pioneiro e a sua presença em florestas primárias é limitada a grandes espaços em formação, sendo mais comum em florestas perturbadas ou áreas de reflorestamento (PAULILO, 2007).

As principais aplicações populares de espécies de *Cecropia* são na medicina tradicional, destacando-se o uso das folhas, além de cascas e brotos. De maneira geral, este gênero é usado no tratamento de problemas respiratórios, como tosse, asma e bronquite, pressão alta, diabetes, inflamações, além de empregado como diurético e cardiotônico (DI STASI, 2002; LORENZI, 2008; MORS, 2000; PIO CORRÊA, 1978; SIMÕES, 1998). Esta relevância pode ser comprovada pela inclusão de *Cecropia hololeuca*, identificada como imbaúba, na 1ª edição da *Pharmacopeia Brasileira* (PHARMACOPEIA, 1926).

Várias espécies deste gênero vêm sendo utilizadas como plantas medicinais. A *Cecropia hololeuca* é citada como adjuvante no tratamento da malária, em casos de febre alta e sintomas neurológicos, além de outros tratamentos: diurética, anti-hipertensiva, sedativa, refrescante, antiinflamatória, expectorante, antiasmática, supressão da tosse, anti-térmica (BOTSARIS, 2007). *Cecropia peltata* usada no tratamento do diabetes, apesar do mecanismo de ação ainda não ter sido elucidado (ANDRADE-CETTO, 2006).

Em 2001 Andrade-Cetto e col. relataram o preparo de extratos com as folhas de *Cecropia obtusifolia*, planta usada tradicionalmente para o tratamento do diabetes, os quais diminuíram a concentração plasmática de glicose em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina. O maior constituinte desses extratos foi identificado como sendo o ácido clorogênico, composto também presente no café e outros vegetais e que apresentaram efeito hipoglicemiante (ANDRADE-CETTO, 2007; HERRERA-ARELLANO, 2004; JOHNSTON, 2003).

***Cecropia glaziovii* Sneth**

A *Cecropia glaziovii* Sneth. é utilizada pela população como hipotensora, cardiotônica, diurética, anti-diabética, antiasmática e na bronquite (NICOLAU, 1988 apud HEBERLÉ, 2000).

Em 1986 a Ceme (Central de Medicamentos) definiu o elenco final de 74 espécies vegetais medicinais, selecionadas para a realização dos estudos farmacológicos pré-clínicos, clínicos e toxicológicos, pelo Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais (PPPM). Essas plantas serviriam para o tratamento alternativo ou auxiliar de doenças da população brasileira. A *Cecropia glaziovii* foi uma destas espécies selecionadas. Em 1991, o PPPM publicou um *folder* confirmando as ações hipotensora e anti-hipertensiva da *C. glaziovii*, bem como a inexistência de efeito tóxico (BRASIL, 2006).

Numa prospecção fitoquímica da *Cecropia glaziovii* Sneth já foi relatada a presença de polifenóis, taninos, esteróides, triterpenos, flavonóides e saponinas nas amostras avaliadas em diferentes épocas do ano (LUENGAS-CAICEDO, 2007).

Alguns estudos farmacológicos desenvolvidos no Brasil foram realizados com a espécie *C. glaziovii* Sneth, indicando que o extrato aquoso apresentou efeitos broncodilatador (DELARCINA JÚNIOR, 2007), anti-hipertensivo (LIMA-LANDMAN, 2007) e antidepressivo (ROCHA, 2007), provavelmente atribuídos aos compostos majoritários catequinas, procianidinas e flavonóides presentes nesse extrato (TANA-E, 2007). Estes dois últimos compostos também foram os responsáveis por comprovar a ação anti-hipertensiva dessa espécie em estudo de Luengas-Caicedo (2002), desenvolvido com animais e humanos.

Compostos polifenólicos

Os compostos fenólicos ou simplesmente polifenóis, são um dos mais importantes grupos de substâncias que ocorrem em plantas, fazendo parte do seu metabolismo secundário, os quais apresentam como característica principal a presença de múltiplos grupos funcionais do tipo fenol. Exercem papel importante na morfologia e fisiologia vegetais, na medida em que estão relacionados a diversos aspectos do crescimento, reprodução vegetal e defesa contra infecções e danos, principalmente contra estresse fotossintético e formação de espécies reativas de oxigênio. Baseado em sua estrutura química, os polifenóis podem ser divididos em pelo menos dez diferentes classes, sendo que as principais são os flavonóides, taninos e ácidos fenólicos e derivados (tanto benzói-

cos quanto cinâmicos) com mais de 5000 compostos já descritos (MAURICIO, 2006; PYRZYNSKA, 2009).

A susceptibilidade à degradação dos compostos fenólicos estruturalmente diferentes de plantas depende fortemente do pH e da estrutura do fenol (FRIEDMAN, 2000).

A constante de dissociação acídica (pKa) dos ácidos fenólicos é um parâmetro físico-químico biologicamente importante no que diz respeito a suas características farmacocinéticas e de toxicidade pois constitui um dado importante para entender certos fenômenos químicos como a atividade e a taxa de reação, absorção biológica e ligação a receptores em nível molecular (BELTRÁN, 2003; HERRERO-MARTINEZ, 2008). Várias moléculas biologicamente ativas estão completamente ou parcialmente ionizadas em pH fisiológico e sabe-se que a presença de grupos ionizados é necessária para a atividade biológica, solubilidade ou ambos (OZKORUCUKLU, 2009).

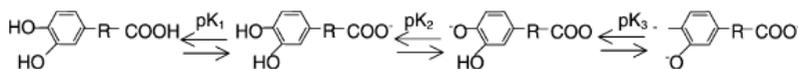


Figura 1. Equilíbrio protolítico de ácidos polifenólicos (BELTRÁN, 2003)

Os ácidos fenólicos já foram amplamente estudados, tendo sido demonstradas a atividade antiinflamatória, anticarcinogênica e antimutagênica, proteção contra doenças cardiovasculares devido à ação antioxidante entre outros (DINIZ, 2007; MOTA, 2008).

Além dos efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos, vem aumentando as pesquisas relacionadas aos seus efeitos de alterar a absorção de glicose no intestino, sob os mais variados mecanismos de ação, bem como o metabolismo de carboidratos (JOHNSTON, 2003; WANG, 2008).

O primeiro representante de interesse desta classe é o ácido cafeico (ACF), que apresenta dois grupos OH fenólicos. Quimicamente conhecido como ácido 3,4-diidroxicinâmico, apresenta fórmula estrutural $C_9H_8O_4$ (figura 2) e massa molecular (MM) igual a 180. Sua solubilidade em água é baixa, sendo 2,92 g/L a 50 °C e 0,98 g/L a 25 °C (GONTHIER, 2006; Sigma-Aldrich; MOTA, 2008).

Alguns estudos levantam a possibilidade do ACF ser sensível ao calor, podendo dar lugar a produtos de decomposição térmica (DIMBERG, 1996; MAURICIO, 2006).

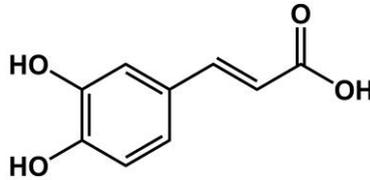


Figura 2. Estrutura química do ácido cafeico

A absorção do seu espectro de UV é fortemente alterada pelo pH. Isto sugere que os dois grupamentos OH fenólicos adjacentes que estão ligados ao anel benzênico são responsáveis pelas mudanças observadas. Importante observar que a mudança é tempo dependente e irreversível (FRIEDMAN, 2000).

O ACF apresenta três pKa: 4,4; 8,5 e 11,2 (AMORATI, 2006). Considerando os dois primeiros pKa, estima-se que em pH 7,2 já ocorra a desprotonação de parte das hidroxilas fenólicas (MAURICIO, 2006).

O segundo representante de interesse é o ácido clorogênico (ACG), um éster conjugado do ácido quínico com o ácido cafeico (ASTHER, 2005; OLTHOF, 2001; RICE-EVANS, 1996).

O termo ácido clorogênico parece ter sido introduzido em 1846 por Payen para designar um composto fenólico com função ácida, de estrutura ainda desconhecida, que conferia cor verde ao meio aquoso quando em meio levemente alcalino e exposto ao ar. Esse ácido foi isolado em 1907 na forma de um complexo cristalino, denominado clorogenato de cafeína, a partir do qual se preparou um ácido puro. A estrutura química para este composto foi estabelecida por Fischer como ácido 3-cafeoilquínico (atualmente conhecido como ácido 5-cafeoilquínico). Mais tarde, outros compostos fenólicos ácidos foram isolados, caracterizados quanto à estrutura química e agrupados na mesma família. Atualmente, o termo ACG é usado para designar ésteres do ácido trans-cinâmico com o ácido quínico (ácido 1L-1(OH),3,4,5- tetra-hidróxi-ciclo-hexanóico) (BASTOS DE MARIA, 2004).

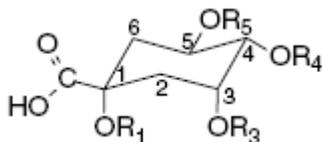


Figura 3. Estrutura química do ácido quínico (CLIFFORD, 2006)

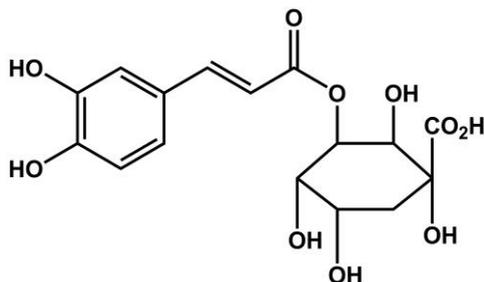


Figura 4. Estrutura química do ácido clorogênico

Quimicamente conhecido como ácido 5-cafeoilquínico, possui fórmula estrutural $C_{16}H_{18}O_9$ e MM igual a 354. Sua solubilidade em água é muito baixa, sendo $245,34 \mu\text{g/mL}$ a temperatura ambiente. Apresenta ainda coeficiente de partição óleo/água ($\log P$) igual a 0,30 e pK_a igual a 2,66 (DINIZ, 2007; GONTHIER, 2006; Sigma – Aldrich; XI-ANG, 2008).

O isômero mais comumente encontrado nas plantas é o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (CLIFFORD, 1999) e também é o único comercialmente disponível.

Os resultados de absorção para o ácido clorogênico são bem similares aos do ACF. As mudanças espectrais observadas em pH elevados são irreversíveis, quando o pH é reduzido de 10 para 7. Estas observações sugerem que a esterificação do grupamento carboxílico do ácido cafeico com o ácido quínico não muda a susceptibilidade da molécula quanto ao efeito do pH. O fato das mudanças espectrais serem irreversíveis sugere que estes compostos sofrem mudanças químicas sob a influência do pH. Em contraste, foi observada a estabilidade de uma solução aquosa de ACG aquecida a 90°C por 1 hora (FRIEDMAN, 2000).

A estabilização do ACG é uma das preocupações mais importantes para a sua utilização (SHI, 2007). Ainda são poucas as informações,

mas acredita-se que os cinamatos são liberados (dos conjugados) por hidrólise e subsequente descarboxilação por aquecimento ou ação de microorganismos. Essa perda de ácido clorogênico ainda é divergente, dependendo da planta estudada e do tipo de processamento que o material vegetal sofre, sendo inclusive dependente do tempo (CLIFFORD, 2000). Vários estudos foram realizados buscando entender o processo de degradação e absorção do ACG e apesar destes não definirem exatamente o mecanismo de absorção, todos declaram haver um papel fundamental da microbiota fecal para a quebra da ligação éster e absorção posterior do ACF (ANDREASEN, 2001; COUTEAU, 2001; GONTHIER, 2006; NARDINI, 2002; PLUMB, 1999).

A literatura que trata da degradação enzimática do ACG ou da habilidade de bactérias colônicas humanas produzirem esterases capazes de hidrolisá-lo, bem como a biodisponibilidade deste em humanos ainda não é conclusiva (ASTHER, 2005; JOHNSTON, 2003), mas Olthof e col. (2001) mostraram que a absorção de 33 % do ACG e 95 % do ACF administrado a pacientes ocorreu no intestino delgado. O trabalho ainda estabeleceu que a absorção do ACG é três vezes mais lenta do que a do ACF (OLTHOF, 2001).

Quanto à estabilidade, estudos demonstram que ao estocarem tanto o fruto quanto o suco de espinheiro branco (Hawthorn) a 40 °C por 6 meses, houve degradação do ACG inicialmente presente, sendo mais expressivo nos frutos (40 %), provavelmente devido à oxidação e/ou degradação por enzimas presentes nos mesmos. Estas enzimas seriam inativadas pelo processo de preparo do suco (por aquecimento). Já à temperatura ambiente (em torno de 23 °C) houve uma diminuição de 30 % do ACG. Apenas em baixas temperaturas (em torno de 4°C) é que o ACG manteve-se estável (CHANG, 2006).

Os possíveis mecanismos de degradação dos fenólicos podem estar relacionados à oxidação, hidrólise ou isomerização (CHANG, 2006).

Sabe-se que o ACG hidrolisa em ACF e ácido quínico em meio aquoso alcalino, sendo esta reação descrita como de primeira ordem. Esta hidrólise depende da temperatura, do tempo e do pH estudado. Quanto maior a temperatura e maior o pH, mais rápida a velocidade de hidrólise (TONG, 2009).

Diabetes melito

O Diabetes melito (DM) é a desordem endócrina mais comum e a estimativa da Federação Internacional de Diabetes (IDF) é de que em duas décadas haverá um crescimento mundial no número de doentes, em

torno de 285 milhões em 2009, para 440 milhões em 2030, quantidade essa maior do que a população do México, Estados Unidos e Canadá juntos (IDF, 2009).

As mortes relacionadas ao diabetes estão em torno de 9,0 % da mortalidade global (ANDRADE-CETTO, 2008a). Este número é considerado bastante subestimado, uma vez que o diabetes não é mencionado na declaração de óbito pelo fato de serem atribuídas às suas complicações, particularmente as cardiovasculares e cerebrovasculares, as causas da morte (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES – SBD, 2007).

O número de indivíduos diabéticos está aumentando devido ao crescimento e ao envelhecimento populacional, à maior urbanização, à crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como à maior sobrevida do paciente com diabetes (SBD, 2007). Sua natureza crônica, a gravidade de suas complicações e os meios necessários para controlá-las tornam o diabetes uma doença muito onerosa, não apenas para os indivíduos afetados e suas famílias, mas também para o sistema de saúde (SBD, 2007). Além disso, devem ser considerados os custos intangíveis (dor, ansiedade, inconveniência e perda de qualidade de vida, por exemplo), que apresentam grande impacto na vida das pessoas com diabetes, e os gastos indiretos causados pela diminuição da produtividade devido à perda de habilidades (retinopatias, nefropatias, neuropatias, microangiopatias, doenças cardíacas, cegueira e amputações não traumáticas) e a mortalidade prematura da população economicamente ativa (ANDRADE-CETTO, 2006; BARCELÓ, 2003; HERRERA-ARELLANO, 2004).

O DM não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia. A classificação mais recente, proposta pela OMS inclui 4 classes: a) DM tipo 1, caracterizada pela insuficiente produção de insulina pelo pâncreas; b) DM tipo 2, que começa com um período de resistência à insulina e aumento da secreção pancreática de insulina pelas células β normais (ANDRADE-CETTO, 2008b), sendo esta responsável pelo acometimento de 90-95 % dos diabéticos; c) outros tipos específicos de DM e d) DM gestacional (SBD, 2007). Diabetes é uma doença crônica que requer um tratamento medicamentoso contínuo e que representa um fator de risco significativo na aterosclerose (BARCELÓ, 2003; SAID, 2008).

Estudos mostram o aumento significativo do diabetes tipo 2 em jovens e crianças e a sua associação com a obesidade (GABBAY, 2003), predispondo a um alto risco cardiovascular (CERCATO, 2004). Vale lembrar que a prevalência de hipertensão em diabéticos é pelo menos

duas vezes maior do que na população em geral (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO - SBH, 2002).

Existem evidências de que as alterações no estilo de vida, com ênfase na alimentação e na redução da atividade física, estão associadas ao acentuado aumento na prevalência do DM2 (SBD, 2007). Neste contexto da doença ocorre a compensação da resistência à insulina pelo aumento da sua secreção; entretanto a exposição excessiva das células β a altos níveis de glicose causa a disfunção destas que prejudica a secreção de insulina e sua biossíntese. Desta forma as células não são mais capazes de atender a demanda periférica, falhando na manutenção requerida pelo organismo (ANDRADE-CETTO, 2008b; UN, 2006). O diabetes do tipo 2, portanto, caracteriza-se pela disfunção das células pancreáticas β acompanhada de resistência à insulina.

O objetivo de se tratar o diabetes por via oral é alcançar a normoglicemia, evitando futuras complicações. Manter a glicose sob níveis próximos ao normal (glicose no plasma pré-prandial (antes da refeição) – 90 – 130 mg/dL e o pico pós-prandial de glicose no plasma < 180 mg/dL) já demonstrou diminuir significativamente o risco de complicações a longo prazo (ANDRADE-CETTO, 2008a).

Inibidores de α -glicosidase estão entre os medicamentos disponíveis para diminuição da glicose. A enzima α -glicosidase está localizada nas microvilosidades do intestino delgado e é requerida para a quebra dos carboidratos e absorção dos monossacarídeos. Os inibidores da α -glicosidase retardam, mas não previnem a absorção dos carboidratos ingeridos, reduzindo a glicose pós-prandial e os picos de insulina (ANDRADE-CETTO, 2008a). Alguns autores mencionam que os flavonóides e polifenóis, assim como os seus açúcares derivados, são tidos como os responsáveis pela inibição da α -glicosidase. Os ácidos fenólicos presentes no extrato de *C. obtusifolia* (ACG e isoorientina) inibiram a α -glicosidase, diminuindo a absorção de glicose no intestino; mas nenhum outro possível mecanismo de ação foi descartado (ANDRADE-CETTO, 2008a).

Outros estudos estabelecem os benefícios obtidos por consumidores de café (tanto cafeinado quanto descafeinado) na diminuição dos riscos de se desenvolver o diabetes tipo 2, havendo várias evidências de que são outros compostos do café que não a cafeína, que promovem os efeitos benéficos no metabolismo da glicose. Componentes estes como o ACG, que já demonstrou efeito na homeostase da glicose em modelos animais e na diminuição da pressão arterial (VAN DAM, 2008); e o ACF que promoveu a alteração do metabolismo da glicose (UN, 2006).

As substâncias e o(s) mecanismo(s) permanecem incertos, embora haja algumas evidências de estudos *in vitro* que o ACG possa dissipar o gradiente eletroquímico de Na^+ , o qual promove a força de ativação de absorção da glicose (WANG, 2008). Desta forma há o potencial desse composto de proteger contra o desenvolvimento do diabetes tipo 2 e da síndrome metabólica. Estudos demonstraram que, em níveis normais de alimentação, a concentração de ACG presente no café (bebida) e no suco de maçã induz uma modificação significativa na secreção de hormônio gastrointestinal de voluntários, bem como a tolerância a glicose. Os mecanismos bioquímicos para esta proteção não estão claros, mas estudos *in vitro* com vários polifenóis puros sugerem o retardo da absorção intestinal da glicose pela inibição do transportador de glicose ativo (SGLT1) e/ou do facilitador do transporte de glicose (GLUT) como um dos possíveis mecanismos (WANG, 2008; WELSCH, 1989).

WELSCH e colaboradores (1989) verificaram que a 1 mM o ACF reduziu a absorção de glicose em torno de 35 – 40 % e o ACG diminuiu 80% independente do seu estado de oxidação. Também evidenciaram que a permeabilidade da membrana das microvilosidades não foi alterada e que o ACG não atua diretamente no carreador de glicose, mas pode reduzir a absorção de glicose por alterar o gradiente eletroquímico de Na^+ , que fornece a força para ativar o acúmulo de glicose.

Ainda, interações hidrofóbicas podem contribuir para a perda da capacidade de transportar glicose. Uma vez que a maioria dos fenólicos possui alto coeficiente de partição octanol/água e permeia rapidamente a bicamada lipídica, distúrbios na membrana causados pela interação com fosfolípidos ou outros componentes da membrana podem também ser um fator causador. Desta forma, o efeito do ACG e do ACF pode vir de um ou da combinação de vários mecanismos, envolvendo desde a interação direta com o transportador ou uma associação indireta com a membrana.

Um fator patogênico importante no desenvolvimento das complicações do diabetes é o estresse oxidativo (UN, 2006), estando o diabetes associado ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e na redução das defesas antioxidativas (GAYATHRI, 2008; SAID, 2008).

A redução na lipoperoxidação pode ser atribuída à atividade oxidante de vários compostos fitoquímicos presentes nos extratos vegetais, sugerindo que a maior função dos extratos é proteger tecidos vitais como fígado, rins, pâncreas e cérebro de danos e, desta forma, reduzir os efeitos posteriores do diabetes (GAYATHRI, 2008). Antioxidantes, os quais incluem compostos fenólicos e polifenólicos, ao eliminarem radi-

cais livres poderão ser úteis na prevenção ou atraso no desenvolvimento de aterosclerose, diabetes e obesidade (LANDRAULT, 2003).

Os tratamentos atuais do diabetes focam o controle e o retorno dos níveis de glicose no sangue a um nível normal. Os fármacos clinicamente usados no tratamento do diabetes podem ser divididos em insulina, secretagogo de insulina, fatores de aumento da sensibilidade a insulina, fator de crescimento insulino-mimético, inibidores da aldose redutase, inibidores da α -glicosidase e inibidores de glicação de proteínas. De maneira geral esses fármacos são responsáveis por promover diversos efeitos colaterais (LI, 2004).

Inúmeras espécies de plantas com comprovadas propriedades hipoglicemiantes apresentam uma composição química rica em flavonóides, um grupo de compostos fenólicos amplamente encontrados em plantas. Muitos estudos demonstraram o efeito hipoglicemiante de flavonóides isolados e de frações enriquecidas com flavonóides (CAZAROLLI, 2006; De SOUSA, 2004; HNATYSZYN, 2002; JORGE, 2004; KAMALAKKANNAN, 2006; SRINIVASAN, 2005; ZANATTA, 2007; ZANATTA, 2008).

Hipertensão arterial

Na grande maioria dos casos, a hipertensão arterial (HTA) é considerada essencial, isto é, ela é uma doença por si mesma. O aparecimento da hipertensão é favorecido por excesso de peso, sedentarismo, elevada ingestão de sal, baixa ingestão de potássio e consumo excessivo de álcool. No grupo com pressão limítrofe também contribuem para o aumento do risco cardiovascular as dislipidemias, intolerância à glicose e diabetes, tabagismo, menopausa e estresse emocional (SBH, 2002).

A hipertensão arterial apresenta elevado custo médico-social, principalmente por sua participação em complicações como doenças cerebrovasculares, doença arterial coronária, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica, doença vascular de extremidades (SBH, 2002). A hipertensão arterial é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, explicando 40 % das mortes por acidente vascular encefálico e 25 % daquelas por doença arterial coronariana (SBH, 2002).

A partir da década de 60, as doenças cardiovasculares superaram as infecto-contagiosas como primeira causa de morte no Brasil. Em 1998, foram registrados 930 mil óbitos no país. Desse total, as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 27 %. Excluindo-se os óbitos

por causas mal definidas e por violência, tal cifra aproxima-se de 40 % (SBH, 2002).

A medida da pressão arterial é comprovadamente o elemento chave para estabelecer o diagnóstico da doença, sendo o critério atual de diagnóstico uma pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg (SBH, 2002).

O objetivo primordial do tratamento da hipertensão arterial é a redução da morbidade e da mortalidade cardiovasculares do paciente hipertenso, aumentadas em decorrência dos altos níveis tensionais e de outros fatores agravantes (SBH, 2002).

A hipertensão arterial também está associada à disfunção endotelial, a qual é causada pela produção de radicais livres de oxigênio que destroem o óxido nítrico (ON), impossibilitando os seus efeitos protetores na parede vascular (ALCÂNTARA, 2003; GRIEDLING, 2003). Em condições fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas de maneira controlada, em baixas concentrações, e funcionam como moléculas sinalizadoras regulando a contração e o relaxamento das células do músculo liso vascular e o seu crescimento. Sob condições patológicas a produção aumentada de ERO leva à disfunção endotelial, aumentando a contratilidade, o crescimento e a apoptose do músculo liso vascular, migração de monócitos, peroxidação lipídica, inflamação, e aumentando a deposição de proteínas da matriz extracelular, contribuindo para o dano vascular na doença cardiovascular (GRIEDLING, 2003; TOUYZ, 2004a).

O endotélio tem uma função autócrina/parácrina, reguladora da secreção de substâncias que controlam o tônus e a estrutura vascular (ALCÂNTARA, 2003; MONCADA, 2006; RUBIO, 2004).

O fator relaxante melhor caracterizado e mais importante é o ON, derivado da L-arginina pela atividade da sintetase do ON endotelial. O ON tem uma produção e liberação basais, e uma outra dependente da influência de vários agonistas, entre eles acetilcolina (ALCÂNTARA, 2003; MONCADA, 2006).

As ERO possuem um papel fisiopatológico importante no desenvolvimento da hipertensão, em parte devido ao excesso de O_2^- e diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (ON). O tratamento com antioxidantes melhora a estrutura e função vascular, prevenindo o dano ao órgão alvo, e reduzindo a pressão arterial em modelos animais e na hipertensão humana (TOUYZ, 2004a; TOUYZ, 2004b).

Os anti-hipertensivos em uso em nosso meio podem ser divididos em seis grupos: diuréticos, inibidores adrenérgicos, vasodilatadores diretos, inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), bloqueadores dos canais de cálcio e antagonistas do receptor AT_1 da angio-

tensina II. Qualquer grupo de medicamentos, com exceção dos vasodilatadores de ação direta, pode ser apropriado para o controle da pressão arterial em monoterapia inicial, especialmente para pacientes com hipertensão arterial em estágio I (leve) que não responderam às medidas não-medicamentosas. Entretanto, a monoterapia inicial é eficaz em apenas 40 % a 50 % dos casos. Para pacientes em estágio II e III, pode-se considerar o uso de associações de fármacos anti-hipertensivos como terapia inicial (SBH, 2002).

Além do tratamento medicamentoso, existe o tratamento não medicamentoso recomendado pela SBH e que associa a reeducação alimentar para redução de peso, redução no consumo de sódio, bebidas alcoólicas e tabagismo, suplementação de potássio, cálcio e magnésio e exercícios físicos (SBH, 2002). A população, de maneira geral, adota o uso de plantas medicinais como adjuvante para a redução da hipertensão.

Lima-Landman e colaboradores (2007) estudaram extratos aquosos e frações butanólicas de *C. glaziovii* e observaram uma atividade anti-hipertensiva da espécie em ratos normotensivos e hipertensos de maneira tempo e dose dependente. Dando continuidade a este trabalho, Ninahuaman e colaboradores (2007) investigaram um possível mecanismo de ação, e concluíram que este não está relacionado a inibição da ECA, porém não foi possível elucidar o mecanismo pelo qual esta planta atua.

Liberação modificada de fármacos: micropartículas

A liberação modificada de fármacos tem despertado grande interesse como uma estratégia promissora para a melhoria do perfil biofarmacêutico de medicamentos, pois oferece inúmeras vantagens em relação aos sistemas convencionais de dosagem de medicamentos. Entre elas pode-se citar a redução do número de doses diárias do medicamento, levando à redução de flutuações das concentrações séricas dos fármacos e à manutenção da concentração plasmática em níveis terapêuticos e, por consequência, à redução da toxicidade e uma maior conveniência para os pacientes, uma vez que os efeitos colaterais gerados pelos sistemas convencionais de administração podem ser minimizados pelas pequenas quantidades de substância ativa circulantes. Do ponto de vista econômico, sistemas de liberação modificada de medicamentos são potencialmente mais baratos, pois geram uma maior eficiência de aplicação do fármaco, permitindo que tratamentos que não eram possíveis se tornassem rotineiros (LANGER, 1981; RAFFIN, 2009; RAVI KUMAR, 2000).

Entre os sistemas capazes de modificar eficientemente a liberação de um fármaco destacam-se as micropartículas. O desenvolvimento de micropartículas a partir de polímeros naturais ou sintéticos tem sido considerado uma boa estratégia para obter formas farmacêuticas de liberação modulada. As micropartículas são partículas sólidas com tamanho que varia entre 1 e 1000 μm (RAVI KUMAR, 2000). Subdividem-se em microcápsulas, sistemas reservatório contendo a substância ativa revestida por polímeros de espessuras variáveis, que constituem a membrana da cápsula, e em microsferas, sistemas matriciais nos quais o fármaco se encontra uniformemente disperso e/ou dissolvido numa rede polimérica (SILVA, 2003).

O mecanismo de liberação do fármaco encapsulado no interior da partícula envolve processos de natureza difusional e/ou a degradação enzimática da rede polimérica previamente formada (BATYCKY, 1997; LINHARD, 1988). De todos os sistemas farmacêuticos disponíveis, as micropartículas apresentam a maior capacidade de controle de liberação do fármaco, possibilitando uma otimização da posologia, através da redução do número de doses diárias. Assim, estes sistemas são particularmente interessantes para o tratamento de patologias crônicas (GERWIN, 2006; KIM, 2005).

As vantagens mais específicas destes sistemas são a liberação precisa de baixas doses de fármacos potentes, redução da concentração do fármaco em outros locais que não os órgãos ou tecidos alvo e proteção dos compostos lábeis, antes e depois da administração, até exercerem a sua ação farmacológica (SILVA, 2003).

Porém algumas desvantagens deste sistema de liberação modificada também são observadas como a baixa eficiência de encapsulação de fármacos hidrofílicos, uma rápida liberação inicial (tipo *burst*), utilização de solventes orgânicos que poderão permanecer residualmente nas micropartículas (JAIN, 2000), é um processo mais caro do que os convencionais, as micropartículas podem apresentar aglomerados e em caso de reação adversa, o estado inicial somente será recuperado após total liberação do fármaco (PICOS, 2000).

Um grande número de técnicas tem sido desenvolvido para a obtenção das micropartículas, tendo em vista que a técnica ideal deve ser simples, reprodutível, rápida, fácil de ser transposta à escala industrial e deve ser pouco dependente das características de solubilidade do fármaco e polímero; mas sobretudo deve minimizar a perda da atividade biológica (SILVA, 2003).

A técnica escolhida deve assegurar a estabilidade e a atividade biológica da substância ativa durante e ao final do processo de encapsulação. Ao final deste processo a maior parte das micropartículas deve possuir tamanhos não superiores a 250 μm (idealmente este valor deve estar abaixo de 125 μm), uma alta eficiência de encapsulação e não devem exibir agregados ou aderência. Além disso, a qualidade das micropartículas bem como o perfil da liberação da substância ativa devem ser reprodutíveis (JAIN, 2000).

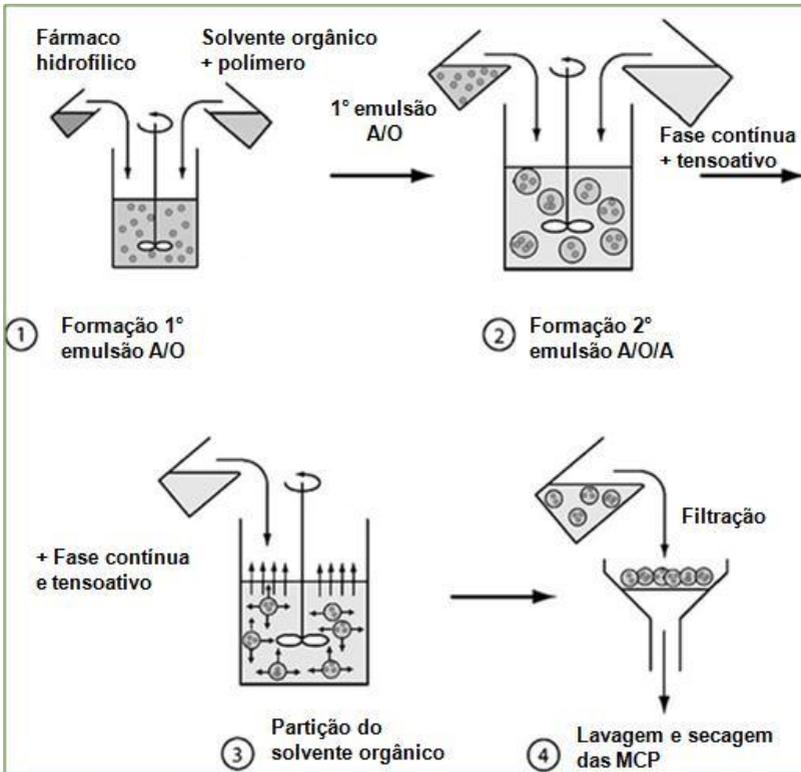
Vários são os métodos de preparação de micropartículas, podendo-se citar coacervação, polimerização interfacial, *spray-drying*, etc., entre este destacando-se a emulsificação/evaporação do solvente.

A técnica de emulsificação seguida de evaporação do solvente tem sido muito utilizada devido à simplicidade dos procedimentos envolvidos na obtenção das partículas, além de representar a possibilidade de modular as características físico-químicas das partículas pela escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação. Esta técnica não requer temperaturas elevadas nem agentes que induzam a separação de fases e é possível atingir tamanhos de partícula controlados na faixa nano e micrométrica (FREITAS, 2005). No entanto, muitas vezes são necessárias modificações desta técnica para obter valores satisfatórios de eficiência de encapsulação. No caso de substâncias ativas hidrofílicas, a adaptação mais utilizada é a utilização de dupla emulsão A/O/A.

Processo por Dupla Emulsão (A/O/A)

Este método consiste na preparação de uma emulsão em três fases água/óleo/água (A/O/A) e é mais adequado para promover a encapsulação de fármacos hidrofílicos (JAIN, 2000).

O preparo das micropartículas associa o processo de dupla emulsão à extração/evaporação do solvente, que basicamente consiste em 4 passos principais: a) dissolução ou dispersão do composto bioativo frequentemente em uma fase orgânica contendo o material formador da matriz, formando uma emulsão água/óleo; b) emulsificação desta emulsão (A/O) numa segunda fase contínua (normalmente aquosa) imiscível com a primeira, com vigorosa agitação obtém-se uma emulsão água/óleo/água (A/O/A); c) extração do solvente da fase dispersa pela fase contínua, o qual é opcionalmente acompanhado pela evaporação do solvente, transformando as gotas em micropartículas sólidas; d) coleta e secagem das micropartículas (FREITAS, 2005; JAIN, 2000) (figura 5).



(FREITAS, 2005)

Figura 5. Esquema geral dos quatro passos principais do processo de preparo de micropartículas por extração/evaporação do solvente

Este processo apresenta como desvantagens o fato de ser composto de várias etapas e rígidos controles dos vários parâmetros envolvidos como a temperatura e a viscosidade do disperso na fase contínua (A/O). Além destes, outros fatores também afetam diretamente a obtenção das micropartículas. Pode-se citar, por exemplo, a natureza, a concentração e a solubilidade do fármaco, a massa molar do polímero, a razão fármaco/polímero, o solvente utilizado, a concentração e a natureza do emulsionante, agitação e velocidade do processo de emulsificação (JALIL, 1990).

Outra desvantagem está relacionada à dificuldade na encapsulação de altas concentrações de fármacos hidrofílicos (JAIN, 2000; JALIL, 1990; TAKADA, 1995). Por isso, compostos bioativos podem

ainda ser adicionados à solução do material da matriz usando a co-dissolução em um solvente comum, dispersão de um material sólido finamente pulverizado ou emulsificação de uma solução aquosa do composto ativo imiscível com a solução do material da matriz (FREITAS, 2005).

A microencapsulação de compostos hidrofílicos por dispersão destes compostos aquosos em uma solução orgânica do material da matriz foi mais eficiente com emulsões A/O microfinas, isto é, numa razão menor do diâmetro das gotas de material bioativo em micropartículas. Aumentando o volume da fase aquosa interna diminui-se a eficiência de encapsulação devido à coalescência das gotas e aumento da probabilidade de contato entre a solução interna do fármaco e a fase de extração externa resultando em perda de fármaco, além do aumento da liberação tipo *burst* e porosidade das micropartículas (FREITAS, 2005).

Para uma encapsulação eficiente de fármacos dissolvidos em uma fase aquosa a ser dispersa em uma solução orgânica com a matriz, é requerida a estabilização da emulsão A/O, muitas vezes com o uso de surfactantes. Estes devem ser escolhidos com cautela, uma vez que a coencapsulação de surfactantes pode afetar negativamente a eficiência de encapsulação e liberação do fármaco (FREITAS, 2005).

O passo de formação da gota determina o tamanho e a polidispersão das micropartículas resultantes. O tamanho das micropartículas pode afetar a velocidade de liberação do fármaco, eficiência de encapsulação, possibilidade de o produto ser injetável, possibilidade de ser fagocitado *in vivo* e biodistribuição das partículas após injeção subcutânea (FREITAS, 2005; ROSCA, 2004).

Agitação

É o método mais direto para gerar gotas de dispersão do fármaco/matriz na fase contínua para subsequente extração do solvente, onde uma velocidade específica produzirá o tamanho de gotas desejado. Normalmente com o aumento da velocidade, tem-se a diminuição do tamanho das gotas e, por conseguinte, a diminuição das micropartículas. A extensão da redução das micropartículas obtidas depende da viscosidade das fases dispersa e contínua, da tensão interfacial entre as fases, a razão entre seus volumes, a geometria e o número de pás do agitador e a razão do tamanho entre as pás e o recipiente onde as micropartículas são preparadas (FREITAS, 2005). Quanto maior a viscosidade, maior é a força de cisalhamento necessária para reduzir o tamanho das gotas, podendo torná-las maiores. Essa viscosidade pode ser aumentada em fun-

ção do aumento da concentração ou da massa molecular da matriz, que pode ser desejado para restringir a migração do fármaco para a fase contínua, aumentando assim a encapsulação. Além disso, quanto menor o diâmetro do recipiente, mais vigorosa torna-se a agitação resultando em menor polidispersão das micropartículas (FREITAS, 2005).

Para prevenir a coalescência das gotas de dispersão fármaco/matriz, um ativo de superfície ou espessante, como o PVA, pode ser necessário, sendo este adicionado à fase contínua. O aumento da concentração do estabilizante pode levar a diminuição das micropartículas (FREITAS, 2005). Os emulsionantes também são fatores críticos em processos de extração/evaporação de solvente, pois suas propriedades físico-químicas e estruturais e sua concentração influenciam diretamente nas características das micropartículas (SPENLEHAUER, 1986). Os emulsionantes proporcionam uma camada fina protetora ao redor das gotículas de solvente/polímero e princípio ativo diminuindo a coalescência e a coagulação durante o processo de fabricação. Quando se está eliminando o solvente, os emulsionantes mantêm as gotículas em sua configuração esférica, prevenindo também a ocorrência de agregados.

Quanto à razão entre os volumes da fase dispersa e contínua, os trabalhos são conflitantes. Enquanto alguns reportam a diminuição do tamanho das micropartículas com a diminuição do volume da fase contínua; outros dizem não ter observado efeito significativo desta variação (FREITAS, 2005).

Remoção do solvente

Já é bem conhecido que a emulsificação evaporação do solvente é de maneira geral um processo de dois passos: emulsificação de uma solução polimérica contendo a substância encapsulada, seguida pela solidificação das partículas através da evaporação do solvente e precipitação do polímero (ROSCA, 2004).

Tanto na extração quanto na evaporação do solvente, o solvente da fase dispersa (dispersão fármaco/matriz) deve ser pouco miscível na fase contínua, assim a partição para a fase contínua pode ocorrer conduzindo à precipitação do material da matriz. Na evaporação do solvente, a capacidade da fase contínua é insuficiente para dissolver todo o volume do solvente da fase dispersa. Consequentemente, o solvente deve evaporar da superfície da dispersão para produzir micropartículas suficientemente duras. Na extração do solvente, a quantidade e composição da fase contínua são escolhidas de tal forma que todo o volume do solvente da fase dispersa possa ser dissolvido (FREITAS, 2005).

Geralmente, a fase contínua que seja um não-solvente para o composto bioativo microencapsulado é preferida. Enquanto que para compostos lipofílicos, soluções aquosas podem ser confortavelmente escolhidas, o uso de líquidos orgânicos (hidrofóbicos) como fase contínua para a encapsulação de compostos hidrofílicos é mais delicada. Fluidos de extração hidrofóbicos podem não ser prontamente removidos do produto final, causando potencialmente resíduos indesejados. Sendo assim, soluções aquosas são frequentemente usadas como fase contínua, mesmo para a microencapsulação de compostos hidrofílicos. Aqui, a perda de compostos bioativos é tipicamente prevenida pelo aumento da concentração da solução do material da matriz; o aumento da viscosidade resultante restringe a migração do composto bioativo das micropartículas em solidificação para a fase externa, devido à baixa difusão e aumento da estabilidade da dispersão fármaco/matriz. Outra maneira de prevenir a perda do material bioativo para a fase contínua inclui a adaptação do pH da fase contínua para diminuir a solubilidade do composto bioativo ou a adição de eletrólitos para aumentar a pressão osmótica da fase contínua.

A razão ideal de remoção do solvente depende da variedade dos fatores como o tipo de material da matriz, fármaco e solvente, assim como o perfil de liberação desejado. Exemplo, a solidificação mais rápida das micropartículas será preferida se o fármaco é facilmente particionado para a fase contínua. Por outro lado, uma solidificação mais lenta favorece a formação de micropartículas mais densas em detrimento das porosas, afetando a liberação do fármaco (FREITAS, 2005).

Uma vez iniciada a eliminação do solvente, o processo é acelerado pela precipitação do polímero e o solvente remanescente é praticamente expulso das microgotas gerando as micropartículas finais (ROSCA, 2004). Para as concentrações usuais de polímero (1 – 10 % m/V), há um significativo encolhimento durante a formação das micropartículas, sendo assim o diâmetro final destas é várias vezes menor do que o diâmetro da microgota correspondente (ROSCA, 2004).

Evaporação do solvente

A velocidade de remoção do solvente volátil do meio de solidificação das micropartículas pode ser controlada pela temperatura da dispersão das mesmas. Temperaturas mais altas facilitarão a evaporação do solvente da fase contínua, mantendo um alto gradiente de concentração para o solvente entre as micropartículas e a fase contínua (FREITAS, 2005).

Como uma alternativa para as elevadas temperaturas, a redução da pressão é algumas vezes utilizada para promover a evaporação do solvente. A lenta remoção do solvente à pressão atmosférica favorece a formação de matrizes poliméricas cristalinas em detrimento das amorfas, as quais prevalecem em condições de pressão reduzida. No estado amorfo, dados indicam uma dispersão molecular do polímero e do fármaco, diminuindo a velocidade de liberação tardia. A eficiência de encapsulação não foi afetada pelo modo de remoção do solvente (FREITAS, 2005).

Tirando vantagem da rápida eliminação do solvente, o tempo de evaporação pode ser reduzido significativamente se a emulsão inicial é vertida em uma quantidade suficientemente grande de fase aquosa para que o solvente não exceda seu limite de solubilidade (ROSCA, 2004).

A eficiência de encapsulação é afetada pelo rápido encolhimento evitando a drenagem da substância encapsulada durante a expulsão do solvente. Alta concentração de polímero aumenta a eficiência de encapsulação, principalmente através do menor encolhimento e prolongada polimerização das cadeias do polímero (ROSCA, 2004).

Já é bem conhecido que micropartículas preparadas por emulsão evaporação do solvente apresentam liberação inicial tipo *burst* devido à localização superficial da substância encapsulada (ROSCA, 2004).

Uma das razões para a obtenção de diferentes morfologias das micropartículas é a gota da emulsão com diferentes quantidades de fase aquosa interna: pode conter uma microgota de fase aquosa encapsulada e com mais de uma microgota. Esta composição de gotas se comporta de maneiras diferentes durante a eliminação do solvente, conseqüentemente conduzindo a diferentes morfologias (ROSCA, 2004).

Extração do solvente

A extração do solvente é frequentemente realizada em dois passos. Primeiro, a dispersão fármaco/matriz é misturada a uma pequena quantidade de fase contínua para obter uma emulsão de tamanho de gota desejado (distribuição). Em seguida, mais fase contínua é adicionada numa quantidade suficiente para absorver todo o solvente extraído das micropartículas solidificadas (FREITAS, 2005).

A rápida formação de uma película na periferia das micropartículas reduz a perda de fármaco para a fase contínua, o que é especialmente importante quando esta última é um bom solvente para o fármaco. A combinação da evaporação do solvente e sua extração é sugerida para aumentar a eficiência econômica do processo de microencapsulação.

Após a formação da emulsão, uma quantidade suficiente de um fluido extrator é adicionada para induzir a formação da película na periferia das micropartículas enquanto o solvente remanescente é removido por evaporação. Este passo de formação da película minimiza a perda de fármaco durante a fase sucessiva de evaporação. Os dois passos de evaporação/extração do solvente podem ser combinados usando uma mistura de solventes (FREITAS, 2005).

Durante a eliminação do solvente e encolhimento das microgotas internalizadas coalescentes e a recente parede de polímero formada ao redor destas pode iniciar a expulsão da fase aquosa internalizada. Seu diâmetro é um parâmetro global que abrange todos os parâmetros da formulação: energia de emulsificação, concentração do polímero, concentração do tensoativo, volume das fases, viscosidade das fases, entre outros (ROSCA, 2004).

A eficiência de encapsulação está diretamente relacionada à extensão de encapsulação da primeira emulsão; assim, para o sucesso da encapsulação, é necessário escolher as condições de formulação que produzam microgotas de uma primeira emulsão com o menor diâmetro do que o da segunda emulsão (ROSCA, 2004).

Dependendo das condições de formulação, a fase aquosa interna é parcialmente perdida durante a eliminação do solvente e encolhimento através de “buracos” na superfície. Ainda, durante a evaporação do solvente, a substância encapsulada remanescente é continuamente particionada com a fase aquosa externa através desses “buracos”. Estes vão contribuir decisivamente para a liberação *burst* inicial (ROSCA, 2004). Nem a extração nem a evaporação do solvente requerem temperaturas elevadas ou agentes de indução de separação de fases. O controle de tamanho de partículas de nano a micrômetros pode ser conseguido, mas a seleção cuidadosa das condições de encapsulamento e dos materiais utilizados é necessária para atingir altas eficiências de encapsulação e níveis residuais de solventes (FREITAS, 2005).

Recolhimento (colheita, obtenção) das microsferas e secagem

A separação das micropartículas solidificadas da fase contínua é tanto realizada por filtração quanto por centrifugação. As partículas podem então ser lavadas com líquido apropriado para remover substâncias aderidas, como estabilizantes de dispersão ou fármaco não encapsulado. A lavagem pode envolver elevadas temperaturas ou o uso de agentes de extração para reduzir a quantidade de solvente residual nas micropartículas. Finalmente, as micropartículas são secas em temperatura

ambiente, sob pressão reduzida, por aquecimento ou por liofilização para render um pó com bom fluxo. O procedimento de secagem remove não somente a fase contínua e lava o fluido aderido à superfície das micropartículas, mas também traços de solventes e da fase contínua do interior das partículas. Desta forma as condições e a velocidade de secagem influenciam a quantidade de resíduo de solvente e de umidade, morfologia e porosidade das micropartículas, assim como a recristalização do fármaco no interior das esferas e pode, desta forma, afetar o comportamento de liberação do produto final (FREITAS, 2005).

Polímero

Eudragit[®] é o nome comercial adotado pela Röhm Pharma Polymers (Degussa) para os polímeros derivados do ácido metacrílico. Os diferentes copolímeros possuem diversos substituintes, o que lhes confere diferentes características para as mais diversas finalidades. Esses derivados podem ser utilizados como polímeros de revestimento (RIEDEL, 2005; KRISHNAMACHARI, 2007), na produção de *pellets* (BECKERT, 1996), em associação a polímeros naturais na formação de filmes resistentes a degradação gastrointestinal (BENEKE, 2009; VERVOORT, 1996), como carreadores inertes no preparo de microsferas como sistema de liberação oral com ação específica na região do cólon (KENDALL, 2009; LAMPRECHT, 2003, 2004 e 2005), dispersões sólidas contendo fármacos hidrofílicos para redução de efeitos colaterais (PIGNATELLO, 2001), nanosuspensões com AINE incorporados para o tratamento intraocular (PIGNATELLO, 2002a, 2002b e 2006), microsferas contendo verapamil para o tratamento de doenças cardiovasculares (KILIÇARSLAN, 2003), associados a ciclodextrinas na encapsulação de glutathione (LOPEDOTA, 2007 e 2009; TRAPANI, 2007), preparo de micropartículas de uso parenteral (JIAO, 2002), entre muitas outras finalidades.

O Eudragit[®] RS100 é um copolímero dos ácidos acrílico e metacrílico (etilacrilato, metil-metacrilato e clorotrimetilamônioetilmetacrilato), com baixa quantidade de grupamentos quaternários de amônia (4,5 – 6,8 %) (PIGNATELLO, 2001, 2002a, 2002b e 2006; VACHON, 1998). Insolúvel em pH fisiológico, mas intumescce em água, além de representar um bom material para dispersão de fármacos (TRAPANI, 2007). Por possuir 5 % de grupos funcionais de amônio quaternário (carregado positivamente) sua permeabilidade é pH independente (JIAO, 2002; KILIÇARSLAN, 2003; VACHON, 1998). Possui características mucoadesivas, sendo um polímero não-biodegradável

(LOPEDOTA, 2009). Possui massa molecular aproximada de 150.000 Da (DEGUSSA, 1999).

Sua estrutura molecular é representada na figura 6.

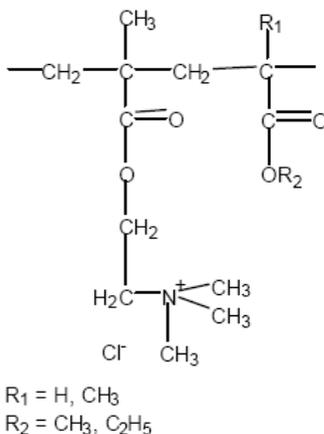


Figura 6. Estrutura molecular do Eudragit[®] RS100

Praticamente insolúvel em éter de petróleo, hidróxido de sódio 1,0 N e água. 1,0 g de Eudragit[®] RS100 dissolve em 7,0 g de metanol aquoso, etanol e isopropanol (contendo aproximadamente 3,0 % de água), assim como em acetona, acetato de etila e cloreto de metileno (DEGUSSA, 1999).

Vários estudos têm demonstrado a importância da utilização de sistemas particulados (micro e nano-estruturados) buscando a estabilização dos compostos ativos de extratos vegetais, assim como um sistema de liberação adequado ao tecido alvo e melhora das características organolépticas dos ativos presentes nos extratos vegetais (BORODINA, 2008; CHAN, in press; KOSARAJU, 2006 e 2008; LACATUSU, 2009; SCALIA, 2009; ZHANG, 2007).

Planejamento experimental como ferramenta no desenvolvimento galênico

O objetivo do desenho experimental é planejar e conduzir experimentos com o intuito de extrair o máximo de informações dos resultados obtidos com um número reduzido de experimentos. A idéia básica é alterar todos os fatores relevantes simultaneamente, baseado num planejamento de experimentos e então conectá-los e interpretá-los usando modelos matemáticos (GABRIELSSON, 2002).

O delineamento chamado *full factorial* possui como objetivo examinar os fatores de um processo ou otimizá-lo, sendo que as variáveis que influenciam as respostas são o centro das nossas atenções (GABRIELSSON, 2002).

As variáveis receberão valores máximos e mínimos baseado em conhecimento prévio. Todas as variáveis são alteradas simultaneamente para cobrir a área total de interesse com o menor número possível de experimentos. Outra razão importante para se utilizar o delineamento fatorial é a possibilidade de se avaliar a interação entre os fatores nos resultados obtidos. O ponto central, o valor médio de cada variável, é também incluído para se detectar uma possível curvatura na região experimental. A dimensão e o sinal (+ ou -) dos coeficientes de regressão dos valores selecionados assim como dos pontos centrais indicam a influência das variáveis nas respostas (GABRIELSSON, 2002).

Num delineamento experimental *full factorial*, todas as combinações dos valores extremos estão incluídos nos experimentos. Se existem k variáveis, o número de experimentos será 2^k . Para a validação estatística de um experimento, normalmente o ponto central será repetido pelo menos três vezes. Os experimentos são realizados numa ordem aleatória para eliminar erros sistemáticos (GABRIELSSON, 2002).

Algumas tentativas foram feitas tentando correlacionar estatisticamente os fatores que podem interferir na extração dos marcadores químicos, na estabilidade dos extratos obtidos, na formação das micropartículas. Um desenho experimental pode ser usado para reduzir o número de variáveis a um tamanho manuseável, onde outros experimentos poderão ser realizados usando os fatores como chaves para um melhor entendimento do processo. Esta estratégia de reduzir o número de variáveis permite que os experimentos estejam focados no incremento do processo e a união de vários fatores de interesse numa única formulação. A análise estatística usando a regressão linear não somente elucida o significado de cada parâmetro, como também fornece uma equação para cada propriedade em estudo. As equações permitem uma otimiza-

ção das propriedades desejadas levando em consideração somente os parâmetros significativos (ABREU, 2008).

O programa Design Expert foi utilizado como um suporte para avaliação dos delineamentos experimentais realizados durante este trabalho. Esta ferramenta mostrou-se de grande valia para estudos de pré-formulação e formulação, permitindo a análise simultânea de variáveis tanto para *screening* como para otimização de formulações farmacêuticas.

Objetivos

Objetivo geral

Desenvolver um sistema microestruturado para a administração oral de extrato padronizado de *Cecropia glaziovii* Sneth.

Objetivos específicos

- Caracterização da planta *Cecropia glaziovii* Sneth;
- Otimização da extração, avaliando diferentes solventes e métodos de extração;
- Caracterização físico-química e tecnológica das soluções extrativas;
- Validação da metodologia de análise das soluções extrativas;
- Estudo de estabilidade das soluções extrativas;
- Realização de estudo de formulação para obtenção das microesferas contendo o extrato padronizado de embaúba;
- Caracterização morfológica, físico-química e tecnológica dos sistemas microestruturados desenvolvidos, bem como avaliação da eficiência de encapsulação do marcador químico.

Capítulo 1
Caracterização da *Cecropia glaziovii*
Sneth

1. APRESENTAÇÃO

A qualidade do material vegetal depende em grande parte do estado da planta fresca. A qualidade e a quantidade de princípios ativos dependem em parte do metabolismo, fixado geneticamente, assim como grandemente influenciado pelas características ambientais. A localização, o estado do solo, a exposição a luz, a altitude, o clima, a estação do ano do momento da colheita são alguns fatores que condicionam o valor do material vegetal (VOIGT, 1982). Uma característica bastante relevante do metabolismo secundário dos vegetais é a elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade numa mesma espécie, sendo determinado por uma necessidade ecológica de sobrevivência (SIMÕES, 2003).

Nesse sentido, no desenvolvimento de fitoterápicos faz-se necessário o desenvolvimento de produtos com características físicas, químicas, físico-químicas e tecnológicas bem definidas. O desenvolvimento de extratos padronizados requer o conhecimento prévio de aspectos ligados ao vegetal, tais como identificação do vegetal, conhecimento de sua composição química, disponibilidade de métodos analíticos para a matéria-prima, conhecimento das substâncias responsáveis ou envolvidas nas atividades terapêuticas relatadas. Em suma, para garantir a qualidade de um produto fitoterápico é necessário o conhecimento e a padronização das características da matéria-prima vegetal, de modo a garantir a obtenção de um produto final que atenda aos itens de segurança, eficácia, qualidade e de reprodutibilidade, característicos de um medicamento.

Esta parte do trabalho descreve a avaliação da matéria-prima vegetal, folhas secas e moídas de *Cecropia glaziovii*, caracterizando-a e avaliando sua qualidade, como uma etapa prévia ao desenvolvimento de um extrato padronizado desta planta.

2. MATERIAIS e MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Matérias-primas

Folhas de *Cecropia glaziovii* Sneth

2.1.2. Solventes, soluções e reagentes

Agar nutriente (OXOID)

Agar sabouraud (MicroMed – Isofar)

Água purificada
Etanol
Fosfato de potássio monobásico (VETEC)

2.1.3. Equipamentos

Aparelho de hidrodestilação FABBE
Auto-clave Phoenix AY50
Balança Ohaus Analytical Standard
Balança semi-analítica Gehaka BG 4000
Banho termostatisado B. Braun Biotech International 18 BU
Banho termostatisado Marte
Chapa de aquecimento Fisatom
Dessecador
Estufa Binder 30 °C
Estufa Biomatic 20 – 25 °C
Estufa Nova Ética 402 3G
Fluxo laminar de fluxo horizontal LABCONCO
Tamises (Mesh 12, 18, 25, 35, 45 e 80, conforme ASTM)
Manta de aquecimento Quimis Q321A24
Moinho de facas Macmont
Mufla Fornitec UL 1400
Tamisador Bertel 1400

2.2. Metodologia

2.2.1. Aquisição do material vegetal de estudo

O material vegetal, folhas secas e grosseiramente rasuradas de *Cecropia glaziovii* foi adquirido do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CPQBA, da Universidade de Campinas – UNICAMP, em junho de 2007, sendo este constituído por folhas secas. O laudo de identificação fornecido pelo Instituto de Botânica de São Paulo encontra-se no anexo 1.

2.2.2. Moagem do material vegetal

As folhas de *Cecropia glaziovii* foram cominuídas em moinho de facas em malha de 3,0 mm. O material resultante foi utilizado para a realização dos ensaios de caracterização, bem como matéria-prima para as preparações extrativas.

2.2.3. Perda por dessecação (Farmacopéia Brasileira, 1988)

A perda por dessecação da matéria-prima vegetal foi avaliada por gravimetria, utilizando balança e estufa. Em pesa-filtros previamente tarados, foram pesados exatamente cerca de 2,0 g de folhas secas moídas. Estes foram colocados em estufa a 105 °C pelo tempo inicial de 2 horas e posteriormente na mesma temperatura por períodos de 30 minutos, até peso constante (variação máxima de 5,0 mg, conforme Farmacopéia Brasileira). Os resultados expressos em percentual ponderal representam a média de três determinações.

2.2.4. Teor de extrativos (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)

Cerca de 1,0 g do material vegetal moído, exatamente pesado, foi aquecido à fervura com 100,0 g de água purificada, durante 10 minutos. Após o resfriamento, a massa de 100,0 g foi reconstituída com adição de água purificada, filtrada em papel filtro e os 20,0 mL iniciais foram desprezados. Do restante do filtrado, alíquota de cerca de 20,0 g foi exatamente pesada em pesa-filtro, previamente tarado, evaporando-se a mesma até seca em banho-maria, sob eventual agitação. Após evaporação completa do solvente, o pesa-filtro foi colocado em estufa a 105 °C por 2 horas, resfriado em dessecador e então pesado.

Esse procedimento foi repetido duas vezes, dando origem a duas soluções de extrativos (A1 e A2). Cada solução foi colocada em 3 pesa-filtros ($n = 3$).

O teor de extrativos (TE) foi calculado em percentual ponderal, utilizando-se a média de três determinações da massa de resíduo seco, segundo a equação:

$$TE = (RS \times fd \times 100)/m - (m \times PD/100)$$

onde:

TE = teor percentual de extrativos (% , m/m)

PD = perda por dessecação (%)

RS = massa do resíduo seco (g)

m = massa do material vegetal (g)

fd = Fator de diluição (5)

2.2.5. Granulometria (PASQUALOTO, 2005; VILA – JATO, 1997)

Cerca de 30,0 g do material vegetal moído homogeneizado foi exatamente pesado e submetido à passagem por um conjunto de tamises de abertura de malha de 0,18 a 1,70 mm. O sistema foi fechado e a ope-

ração realizada em tamisador vibratório, a 3,5 vibrações por segundo. Após 10 minutos, a quantidade de material vegetal moído retido nos tamises bem como o do coletor foi pesada.

Para a análise granulométrica foram considerados os seguintes parâmetros: classe granulométrica (CG, mm); intervalo de abertura de malha (Δ , mm); diâmetro granulométrico médio (DG, mm); fração retida (FR, %); fração retida acumulada (FRA, %); e fração de passagem (FP, %).

O cálculo para o diâmetro médio utilizou o modelo dos probitos (VILA-JATO, 1997; PASQUALOTO, 2005) para linearização da curva sigmóide da distribuição granulométrica. Na representação gráfica, os valores de diâmetro (DG) foram dispostos nas abscissas (x) e os valores transformados em probitos foram indicados nas ordenadas (y). O diâmetro médio das partículas foi calculado através da equação da reta obtida por regressão linear: DG (mm) versus probitos, tratando-se de uma distribuição normal, com desvio-padrão aritmético.

2.2.6. Cinzas totais (Farmacopéia Brasileira, 1988)

A determinação de cinzas totais destina-se a estabelecer a quantidade de substância residual não-volátil no processo de incineração especificado.

Cerca de 3,0 g do material vegetal pulverizado foram exatamente pesados e transferidos para cadinho de porcelana previamente calcinado, resfriado e pesado. Após distribuição uniforme da amostra no cadinho, este foi levado a uma manta de aquecimento para queima inicial do material. Em seguida colocado em mufla e incinerado pelo aumento gradual da temperatura, não ultrapassando 600 °C, pelo tempo inicial de 2 horas e posteriormente na mesma temperatura por períodos de 30 minutos, até peso constante. Ao final de cada período, o cadinho foi resfriado em dessecador e pesado. Os resultados expressos em percentual ponderal representam a média de três determinações.

2.2.7. Avaliação da qualidade microbiológica da matéria-prima vegetal

2.2.7.1. Pré-tratamento do material a ser examinado

Cerca de 10,0 g de planta moída e seca foram suspensos em 90,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2. A amostra tratada correspondeu à diluição 10^{-1} (WHO, 2005).

2.2.7.2. Determinação numérica de formas viáveis

Contagem de bactérias aeróbias

A amostra previamente tratada foi diluída em séries decimais, empregando a mesma solução utilizada no pré-tratamento, até a diluição 10^{-9} . Cada diluição foi plaqueada em duplicata, empregando-se a técnica oficial da sementeira em profundidade no agar nutriente. A incubação foi feita a 30 – 35 °C, por 7 dias (WHO, 2005). Após este período as colônias formadas foram contadas nas placas de Petri e os resultados expressos como unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

Contagem de bolores e leveduras

Da mesma forma que para contagem de bactérias aeróbicas, foram preparadas diluições decimais da amostra previamente tratada, até a diluição 10^{-9} . A técnica empregada foi a da sementeira em profundidade no agar sabouraud. Cada diluição foi plaqueada em duplicata e incubada a 20 – 25 °C, por 7 dias (WHO, 2005). Após este período as colônias formadas foram contadas nas placas de Petri e os resultados expressos como unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

No desenvolvimento de um fitoterápico, a primeira etapa a ser controlada é referente à obtenção da planta. Buscando diminuir os impactos ambientais causados pela coleta do material vegetal, ter controle sobre o mesmo, assim como manter o mais constante possível a composição da matéria-prima vegetal no sentido de facilitar a transposição de escala, optou-se por utilizar o vegetal cultivado em centro especializado: (CPQBA da UNICAMP). Desta forma tem-se a sua correta classificação botânica, certificada através do laudo de identificação emitido pelo Instituto de Botânica de São Paulo. O material vegetal utilizado deve manter uma constância para que se possa prever a qualidade do fitoterápico que será obtido.

A adequada transformação da droga vegetal é um dos fatores fundamentais para garantir que o material possua o grau de qualidade necessário para a formulação (grau farmacêutico). Neste ponto é imprescindível conhecer a droga vegetal em questão e sua caracterização pos-

sibilita conhecer a matéria-prima e estabelecer limites para os ensaios de qualidade, que posteriormente garantirão uma matéria-prima com as mesmas características quali e quantitativas das inicialmente utilizadas.

3.1. Perda por dessecação

A secagem do material vegetal implica em alterações importantes no estado físico e físico-químico no interior das células do vegetal. O estado gelatinoso do plasma é alterado pela desidratação, e essa modificação estrutural propicia o contato entre substâncias ativas, originalmente dissolvidas nos fluidos celulares, com enzimas presentes em outros compartimentos (LIST, 1989). Dependendo da enzima e do substrato, podem ocorrer diferentes reações, tais como oxidação, hidrólise, fermentação e complexação (VOIGT, 1982). A umidade, além de influenciar as reações intra e extracelulares do vegetal, pode ainda promover a proliferação de microorganismos, principalmente fungos. Esta contaminação pode comprometer a integridade das substâncias farmacologicamente ativas.

Estes fatores determinam a importância do conhecimento do teor de umidade no material vegetal, que é definido através do ensaio de perda por dessecação. A umidade em excesso permite a ação de enzimas, levando à degradação de constituintes químicos e desenvolvimento de fungos e bactérias (GIL, 2007). Em geral a faixa do teor de umidade preconizado pela Farmacopéia Brasileira (1988) é de 8 – 14 %.

O resultado encontrado para a perda por dessecação da matéria-prima vegetal foi de 13,10 % ($\pm 0,06$) com desvio padrão relativo de 0,44 % ($n = 3$), verificando-se que estes se encontram dentro do preconizado.

3.2. Teor de extrativos

O teor de extrativos é um método auxiliar no controle da matéria-prima, assumindo grande importância quando não estão estabelecidos métodos químicos e biológicos para determinação dos constituintes ativos, ou quando a identidade destes não é conhecida em sua totalidade. Avalia o rendimento de extração de substâncias sob condições específicas, servindo como um parâmetro de avaliação das características da matéria-prima vegetal, permitindo sua comparação com outros lotes da mesma. Uma vez que o ensaio utilizou água como solvente, este permite indicar a presença de compostos hidrossolúveis presentes na matéria-prima vegetal, como aminoácidos, açúcares, heterosídeos flavonoídicos e mucilagens (BARNI, 2009).

O teor de extrativos em água obtido para a matéria-prima vegetal seca e moída é 21,93 % ± 0,82 , com DPR igual a 3,75%.

3.3. Granulometria

A determinação da granulometria visa estabelecer e padronizar a faixa de tamanho das partículas do vegetal cominuído, uma vez que este tamanho e a superfície de contato apresentam relação direta no acesso do solvente ao material vegetal, conferindo homogeneidade e reprodutibilidade do processo extrativo. Comparativamente ao material inteiro, o material rasurado ou moído apresenta uma maior superfície de contato com o líquido extrator, e a presença de maiores proporções de células cujas paredes encontram-se rompidas, expondo imediatamente os conteúdos celulares à ação do solvente. No entanto, partículas excessivamente pequenas podem apresentar inconvenientes tais como difícil separação do marco da solução extrativa ao final da extração (VOIGT, 1982).

A granulometria foi determinada considerando os seguintes fatores: classe granulométrica (CG, mm), intervalo de abertura de malha (Δ m, mm), diâmetro granulométrico médio (DG, mm), fração retida (FR, %), fração retida acumulada (FRA, %) e fração de passagem (FP, %). A tabela 1 apresenta os resultados obtidos.

TABELA 1. Análise granulométrica por tamisação da matéria-prima vegetal moída

| CG (mm) | Mesh (mm) | Intervalo (Δ ; mm) | DG (mm) | Planta (g) | FR (%) | FRA (%) | FP (%) |
|--------------|-----------|----------------------------|---------|------------|--------|---------|--------|
| > 1,70 | 1,70 | - | - | 0,08 | 0,27 | 0,27 | 99,73 |
| 1,70 - 1,00 | 1,00 | 0,70 | 1,35 | 3,35 | 11,20 | 11,47 | 88,53 |
| 1,00 - 0,71 | 0,71 | 0,29 | 0,86 | 7,31 | 24,45 | 35,92 | 64,08 |
| 0,71 - 0,50 | 0,50 | 0,21 | 0,61 | 8,85 | 29,60 | 65,52 | 34,48 |
| 0,50 - 0,355 | 0,355 | 0,15 | 0,43 | 4,31 | 14,41 | 79,93 | 20,07 |
| 0,355 - 0,18 | 0,180 | 0,175 | 0,27 | 3,45 | 11,54 | 91,47 | 8,53 |
| Coletor | 0,00 | < 0,18 | 0,09 | 2,55 | 8,53 | 100,00 | 0,00 |
| Total | | | | 29,90 | | | |

CG: classe granulométrica; DG: diâmetro granulométrico médio; FR: fração retida; FRA: fração retida acumulada; FP: fração de passagem

A figura 7 representa a distribuição granulométrica do material vegetal, enquanto a figura 8 representa as curvas características de retenção e passagem acumuladas do material através da análise granulométrica por tamisação.

Uma vez que os resultados mostraram uma distribuição normal, o diâmetro médio das partículas foi calculado utilizando o modelo de probitos para a linearização da curva de distribuição granulométrica. A análise de probitos permite a transformação estatística da distribuição normal dos cumulativos % em uma linha reta. O ponto 50 % (probito = 5) foi utilizado para a determinação do diâmetro médio das partículas (DG50) e os pontos 16 % (probito = 4, DG16, diâmetro menor) e 84 % (probito = 6, DG84, diâmetro maior) como os limites do intervalo, por corresponderem a um desvio-padrão à direita e à esquerda da média, na curva de distribuição normal. Deste modo, se o tamanho das partículas seguir uma distribuição normal, o desvio-padrão aritmético será calculado ou subtraindo-se do valor correspondente ao diâmetro médio das partículas (50 %, probito = 5, DG50) o valor correspondente a um desvio-padrão à direita (16 %), ou subtraindo-se do valor correspondente a um desvio-padrão à esquerda (84 %) o valor correspondente ao diâmetro médio (DG50); DG50 - DG16, ou DG84 - DG50.

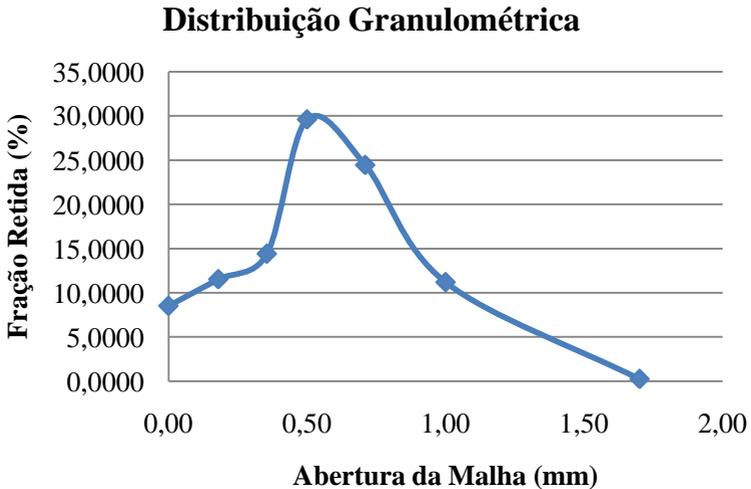


Figura 7. Distribuição granulométrica referente à fração retida obtida através da análise granulométrica

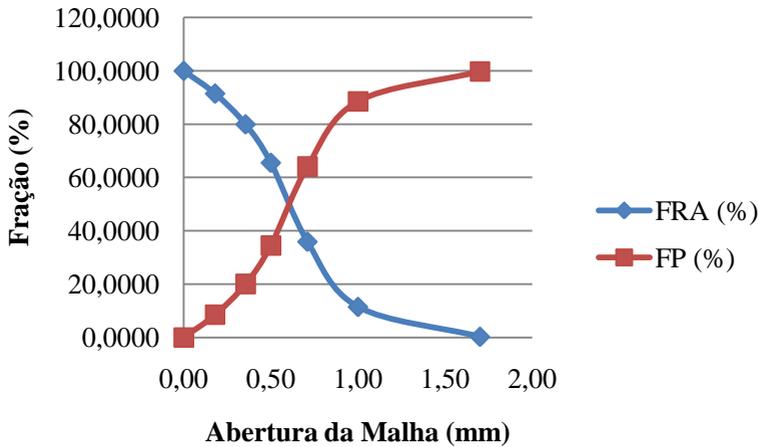


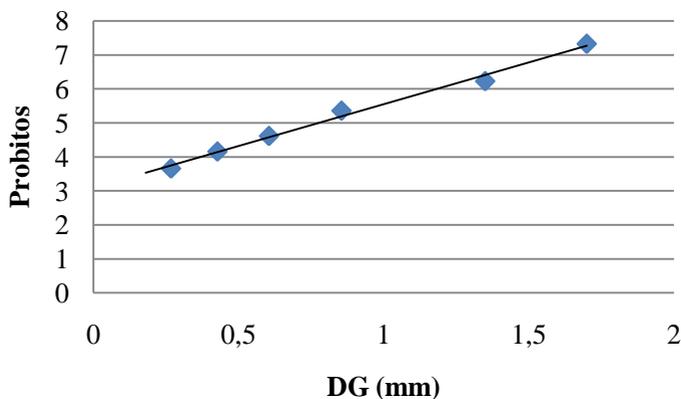
Figura 8. Curvas cumulativas de retenção e passagem após tamização da matéria-prima vegetal moída. FRA: fração retida acumulada; FP: fração de passagem

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos pela avaliação dos probitos e a figura 9 a representação gráfica dos mesmos. A equação da reta obtida e coeficiente de correlação são: $y = 2,454x + 3,095$ e $r = 0,9961$, respectivamente.

TABELA 2. Linearização do diâmetro granulométrico médio obtido através do modelo de probitos

| <i>DG (mm)</i> | <i>FP (%)</i> | <i>Probitos</i> |
|----------------|---------------|-----------------|
| 1,7000 | 99,73 | 7,326 |
| 1,3500 | 88,53 | 6,227 |
| 0,8550 | 64,08 | 5,358 |
| 0,6050 | 34,48 | 4,615 |
| 0,4275 | 20,07 | 4,158 |
| 0,2675 | 8,53 | 3,659 |
| 0,1800 | 0,00 | 0,000 |

DG: diâmetro granulométrico médio; FP: fração de passagem



DG: diâmetro granulométrico médio

Figura 9. Representação gráfica da linearização do diâmetro granulométrico médio obtido através do modelo de probitos

Desta forma determinou-se que o diâmetro médio do material cominuído, com base nos gráficos acima apresentados, é de 0,78 mm ($\pm 0,41$ mm).

3.4. Cinzas Totais

As cinzas totais incluem as derivadas de tecido vegetal (cinzas fisiológicas) e de materiais estranhos, especialmente areia e terra aderente à superfície da droga (cinzas não-fisiológicas) (Farmacopéia Brasileira, 1988). Desta forma, o ensaio de cinzas totais pode ser usado inclusive como um indicador da idoneidade do fornecedor do material (GIL, 2007). Os valores preconizados pelas monografias da Farmacopéia Brasileira variam entre 3 e 9,5 %.

O teor de cinzas totais obtido para a matéria-prima vegetal seca e moída ($n = 3$) foi de 7,92 % ($\pm 0,03$) com um desvio padrão relativo de 0,33 %, estando dentro da faixa determinada pela farmacopéia (FARMACOPÉIA, 1988).

3.5. Qualidade microbiológica do material

O ensaio microbiológico nos permite tecer importante consideração quanto à qualidade do material vegetal. A presença de microorganismos influencia diretamente na qualidade geral deste, principalmente no que diz respeito à garantia de estabilidade dos princípios ativos, refletindo,

por conseguinte, nos resultados das análises quali e quantitativas realizadas no âmbito do controle de qualidade físico-químico (GIL, 2007).

As matérias-primas vegetais possuem, naturalmente, uma carga microbiana elevada, geralmente, proveniente do solo. Além da microflora natural, a manipulação durante a coleta e processamento pode levar à contaminação adicional (GIL, 2007).

Não há hoje ainda uma uniformidade nas especificações estabelecidas dos limites de contaminação permitidos. Nos últimos anos tem-se verificado uma tentativa de harmonização entre algumas farmacopéias: Européia, Americana, embora não haja a adoção de uma diretriz universalmente aceita. A Farmacopéia Brasileira IV (1998) não apresenta orientação de padrão específico para os produtos fitoterápicos, e limites para a contagem de microorganismos viáveis totais constam, somente, de algumas monografias (GIL, 2007).

A tabela 3 apresenta os limites microbiológicos preconizados pela OMS (Organização Mundial de Saúde) (WHO, 2005).

TABELA 3. Limites microbiológicos preconizados pela OMS (WHO, 2005) para as diferentes categorias relacionadas ao material vegetal de acordo com a sua utilização e características.

| Categoria | Bactérias aeróbias (UFC/mL) | Fungos e leveduras (UFC/mL) | <i>E. coli</i> (UFC/mL) | Outras enterobactérias (UFC/mL) | <i>Salmonella</i> (UFC/mL) | <i>Shigella</i> (UFC/mL) | <i>Clostridia</i> (UFC/mL) |
|-----------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 1 | -- | $\leq 10^5$ | $\leq 10^4$ | -- | -- | Ausente | -- |
| 2 | $\leq 10^7$ | $\leq 10^4$ | $\leq 10^2$ | $\leq 10^4$ | Ausente | Ausente | Ausente |
| 3 | $\leq 10^5$ | $\leq 10^3$ | ≤ 10 | $\leq 10^3$ | Ausente | Ausente | Ausente |
| 4 | $\leq 10^7$ | $\leq 10^4$ | ≤ 10 | $\leq 10^3$ | Ausente | Ausente | Ausente |
| 5 | $\leq 10^5$ | $\leq 10^3$ | Ausente | $\leq 10^3$ | Ausente | Ausente | Ausente |

- 1: Matéria-prima vegetal medicinal, material vegetal medicinal a ser processado posteriormente, incluindo procedimentos de descontaminação química ou física;
- 2: Material vegetal medicinal que foi pré-tratado (por exemplo com água fervente, de acordo com o preparo de chás e infusões) ou que será usado em formas farmacêuticas tópicas;
- 3: Outros materiais vegetais medicinais para uso interno;
- 4: Fitoterápicos aos quais água fervente é adicionada antes do uso;
- 5: Outros fitoterápicos.

Uma vez que o material vegetal em estudo será posteriormente processado utilizando alta temperatura ou etanol para a extração das substâncias de interesse, pode ser enquadrado na descrição nº 1 da tabela 3. Na contagem de bactérias aeróbias o valor encontrado foi de $1,04 \times 10^3$ UFC/mL e na contagem de bolores e leveduras, $8,25 \times 10^4$ UFC/mL. Desta forma, a matéria-prima vegetal utilizada neste trabalho encontra-se abaixo do limite preconizado pela OMS.

Com base no conjunto de resultados obtidos, a droga vegetal objeto deste trabalho foi caracterizada e considerada adequada para a continuidade dos estudos.

Capítulo 2

Padronização das soluções extrativas

1. APRESENTAÇÃO

A qualidade exigida e a disponibilidade de matérias-primas para a fabricação de fitoterápicos são fatores limitantes para a indústria farmacêutica, uma vez que é necessária a padronização da mesma forma que para os produtos sintéticos, embora respeitando suas especificidades. Desta forma, a definição dos parâmetros necessários da padronização de métodos para a avaliação da qualidade da matéria-prima vegetal e de insumos vegetais para medicamentos fitoterápicos é de extrema relevância. Muitas espécies possuem poucos dados científicos que permitam a validação de sua utilização, tanto do ponto de vista farmacológico quanto químico. Estes conhecimentos estão na base para o desenvolvimento de fitoterápicos que agreguem qualidade com o desenvolvimento de produtos.

Este capítulo trata da padronização da extração de folhas de *C. glaziovii* no sentido de maximizar sua potencial atividade anti-diabética e anti-hipertensiva, utilizando para isto métodos de fácil passagem de escala e economicamente viáveis para processos industriais que devem obter o máximo de rendimento. Os métodos de maceração e decocção atendem a estes requisitos, tendo sido avaliados por delineamentos experimentais que permitiram o conhecimento da interferência dos fatores de extração. Um método analítico de doseamento por CLAE dos marcadores químicos foi desenvolvido e validado. Os extratos foram ainda avaliados farmacologicamente tanto para a atividade anti-diabética quanto anti-hipertensiva.

2. MATERIAIS e MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Matérias-primas

Ácido cafeico (Sigma – Aldrich)

Ácido clorogênico (Sigma – Aldrich)

Ácido gálico (Fluka, Sigma – Aldrich)

Folhas de *Cecropia glaziovii* Sneth

2.1.2. Solventes, soluções e reagentes

Acetonitrila grau CLAE (J. T. Baker)

Ácido acético (Qhemis)

Água mili-Q (Millipore)

Água purificada
Carbonato de sódio (Riedel de Hæn)
Etanol
Metanol (J. T. Baker)
Reagente de Fenol de Folin-Ciocalteu (Fluka, Sigma – Aldrich)
Solução tampão pH 4,0 (Nuclear)
Solução tampão pH 7,0 (Nuclear)

2.1.3. Aparelhos, equipamentos e materiais especiais

Aparelho de hidrodestilação FABBE
Balança Ohaus Analytical Standard
Balança semi-analítica Gehaka BG 4000
Banho de Ultrassom – UltraSonic Cleaner USC 700 Unique
Banho termostatisado Marte
Bomba de vácuo EMC Platinum acoplada ao liofilizador
Bomba de vácuo Fisatom Mod. 830
Coluna Zorbax ODS (5 µm, 150 x 4,6 mm) Agilent
Cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer, equipado com:
Autosampler Perkin Elmer Series 200
Bomba binária Series 200
Degasser à vácuo Perkin Elmer Series 200
Detector DAD Series 200 EP
Detector UV/Vis Series 200
Interface 600 Series LINK

Dessecador
Espectrofotômetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 10
Estufa Nova Ética 402 3G
Evaporador rotativo Marconi MA-120
Freezer Consul 180
Liofilizador Terroni LD 1500
Membranas HVLP 0,45 µm, com 47 e 13 mm de diâmetro Millipore
pHmetro Oakton, pH 5 Acorn series
Pré-coluna Phenomenex ODS (4,0 x 3,0 mm)

2.2. Metodologia

2.2.1. Validação da metodologia analítica por CLAE

O método desenvolvido para a análise das soluções extrativas preparadas consistiu na utilização da cromatografia líquida de alta efici-

ência (CLAE), técnica esta muito utilizada para a detecção e quantificação de compostos fenólicos (ANDRADE-CETTO, 2007; ASTHER, 2005; AZUMA, 1999; CHANG, 2006; DE SOUZA, 2002). A análise foi desenvolvida em fase reversa com coluna C18 (Octadecilsilano - ODS) baseada em estudos anteriores (COSTA, 2009). Os parâmetros de validação foram desenvolvidos conforme ICH (2005) e BRASIL (2003). Os parâmetros avaliados e validados do método foram: linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de quantificação e limite de detecção.

Sistema Cromatográfico

- Coluna: Zorbax ODS (5 µm, 150 x 4,6 mm)
- Pré-coluna: ODS (4,0 x 3,0 mm)
- Fluxo: 1,0 mL/min
- Detecção: 330 nm. Conforme determinado em espectrofotômetro UV/Vis e confirmado pela literatura (CELLI, 2007)
- Volume de injeção: 20 µL
- Fase móvel: A: Acetonitrila
B: Ácido acético 1,0%

A fase móvel foi preparada diariamente e desgaseificada em banho de ultrassom por 10 minutos, antes do uso. A tabela 4 apresenta a programação da fase móvel utilizada no equipamento de CLAE.

TABELA 4. Programação da fase móvel para CLAE

| Programação (min) | Modo | Solvente A (%) | Solvente B (%) |
|-------------------|------------|----------------|----------------|
| 0-15 | Isocrático | 13 | 87 |
| 15-25 | Gradiente | 40 | 60 |
| 25-34 | Isocrático | 40 | 60 |

Solvente A: Acetonitrila; solvente B: Ácido Acético 1,0%

Curva analítica, linearidade e intervalo

Para a obtenção das curvas analíticas foram preparadas soluções de ácido clorogênico (ACG) e ácido cafeico (ACF), utilizando como solvente metanol:água purificada (1:1, v/v), nas concentrações: 2,5; 5; 10; 12,5; 15; 20; 25; 50; 75; 100; 125; 150 e 200 µg/mL e 2,5; 5; 10; 12,5; 15; 20; 25; 50 e 100 µg/mL respectivamente. As soluções foram

filtradas através de membrana de PVDF (Fluoreto de Polivinilideno) de diâmetro de poro de 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo por um injetor automático.

As áreas foram representadas frente às concentrações para a construção das curvas de ácido clorogênico e ácido cafeico. A equação da reta foi obtida por regressão linear e o coeficiente de correlação calculado. Para determinar a linearidade da curva analítica, espera-se que o coeficiente de correlação (r) seja $r \geq 0,99$ (BRASIL, 2003).

O intervalo consiste na faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico, sendo derivado do estudo de linearidade.

Precisão e exatidão (E)

A precisão e a exatidão do método analítico foram testadas por análises inter e intra-dia.

A precisão consiste na habilidade do método reproduzir o mesmo resultado. Para isso foram realizados os seguintes testes:

Repetibilidade: expressa a precisão sob as mesmas condições de operação num curto período de tempo. Na validação do método acima descrito, 3 concentrações (mínima, média e máxima) de ácido clorogênico (2,5; 50 e 200 µg/mL) e de ácido cafeico (2,5; 25 e 100 µg/mL) foram injetadas três vezes no mesmo dia. Desta forma foi possível calcular o desvio padrão relativo, não devendo este ser maior do que 5,0 % (BRASIL, 2003).

Precisão intermediária: expressa a precisão em diferentes dias, analistas, equipamentos entre outros. Na validação do método em questão, a concentração de 50 µg/mL de ácido clorogênico e 25 µg/mL de ácido cafeico foram injetadas três vezes em três dias diferentes. O desvio padrão relativo foi calculado, não devendo ser maior do que 5,0 % (BRASIL, 2003).

A exatidão consiste na concordância entre o valor encontrado pelo método e o valor aceito como verdadeiro (% de recuperação) (BRASIL, 2003). A porcentagem de recuperação deve ficar entre 95 – 105 %. Neste trabalho foram utilizados os extratos obtidos por maceração (8 dias 20 % etanol, 8d20; 6 dias 50 % etanol, 6d50; 8 dias 80 % etanol, 8d80) e aos mesmos foram adicionados 25,0 µg/mL de ácido clorogênico e 25,0 µg/mL de ácido cafeico. O cálculo utilizado para a obtenção da % de recuperação foi:

$$E = (\text{concentração obtida} - \text{concentração real}) \times 100 / \text{concentração real}$$

Limite de quantificação (LQ)

Consiste na menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. A equação utilizada para o cálculo é apresentada a seguir:

$$LQ = dp \times 10/IC$$

onde: dp é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de várias curvas analíticas construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação; IC é a inclinação da curva analítica; 10 é utilizado com base na relação de dez vezes o ruído da linha de base.

Limite de detecção (LD)

Consiste na menor concentração do analito que produz resposta considerada detectável. Normalmente é avaliada pela relação sinal:ruído, em uma proporção 3,3:1. A equação utilizada para o cálculo é apresentado a seguir:

$$LD = dp \times 3,3/IC$$

onde: dp é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de várias curvas analíticas construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação; IC é a inclinação da curva analítica; 3,3 é utilizado com base na relação de 3,3 vezes o ruído da linha de base.

2.2.2. Delineamento experimental

Para avaliação da interferência dos fatores no preparo das soluções extrativas foram elaborados dois delineamentos fatoriais com o auxílio do programa Design Expert®, versão 6.0.6. Cada delineamento consiste num desenho com 2 fatores e 2 níveis (máximo e mínimo) para cada fator (2^2). Um delineamento foi elaborado para os extratos obtidos por maceração (EM), considerando como fator A o teor etanólico (%) e como fator B o tempo (dias). Todos os sistemas foram mantidos a temperatura ambiente durante o tempo de extração. Para os extratos obtidos

por decocção (ED) considerou-se como fator A a temperatura (°C) e fator B o tempo (minutos), utilizando como líquido extrator água purificada. Um ponto central foi proposto e cada ponto foi realizado em duplicata. No total foram preparados 20 extratos, 10 por maceração e 10 por decocção. Os delineamentos encontram-se descritos nas tabelas 5 e 6. Como parâmetro fixo foi adotada a proporção planta:solvente de 5,0 %.

TABELA 5. Delineamento fatorial 2^2 para obtenção das soluções extrativas por maceração a temperatura ambiente. Fatores avaliados: concentração de etanol (A) e tempo (B)

| EXP | Etanol (%) | Tempo (dias) | Representação |
|-----|------------|--------------|---------------|
| 1 | 20 | 4 | 4d20 |
| 2 | 20 | 4 | 4d20 |
| 3 | 80 | 4 | 4d80 |
| 4 | 80 | 4 | 4d80 |
| 5 | 20 | 8 | 8d20 |
| 6 | 20 | 8 | 8d20 |
| 7 | 80 | 8 | 8d80 |
| 8 | 80 | 8 | 8d80 |
| 9 | 50 | 6 | 6d50 |
| 10 | 50 | 6 | 6d50 |

TABELA 6. Delineamento fatorial 2² para obtenção das soluções extrativas por decocção utilizando água purificada como líquido extrator. Fatores avaliados: temperatura (A) e tempo (B)

| EXP | Temperatura (°C) | Tempo (minutos) | Representação |
|-----|------------------|-----------------|---------------|
| 1 | 70 | 10 | 7010 |
| 2 | 70 | 10 | 7010 |
| 3 | 90 | 10 | 9010 |
| 4 | 90 | 10 | 9010 |
| 5 | 70 | 30 | 7030 |
| 6 | 70 | 30 | 7030 |
| 7 | 90 | 30 | 9030 |
| 8 | 90 | 30 | 9030 |
| 9 | 80 | 20 | 8020 |
| 10 | 80 | 20 | 8020 |

2.2.3. Preparo das soluções extrativas

Os parâmetros de preparação das soluções extrativas foram estabelecidos conforme o planejamento fatorial previamente descrito (item 2.2.2.). Os frascos para maceração foram mantidos a temperatura ambiente protegidos da luz e, após o período determinado pelos delineamentos, o material vegetal foi separado do solvente através de filtração a vácuo. Já os extratos obtidos por decocção foram filtrados após resfriamento e reconstituição do volume.

2.2.4. Análise das soluções extrativas

Todos os ensaios descritos a seguir foram realizados para caracterização das soluções extrativas obtidas por maceração (EM) e por decocção (ED).

2.2.4.1. Resíduo seco (HARTKE e MUTSCHLER, 1987)

Para a avaliação do teor de resíduo seco (RS) pesou-se, exatamente, cerca de 20,0 g de cada solução extrativa em pesa-filtros previamente tarados. O conteúdo de cada pesa-filtro foi levado à secura em banho de água quente sob agitação ocasional e, a seguir os pesa-filtros foram colocados em estufa a 105 °C por duas horas, resfriados em des-

secador e então pesados. O resultado foi calculado em relação a 100,0 g de solução extrativa (% , m/m) pela média de três determinações.

2.2.4.2. pH

O pH das soluções extrativas foi determinado utilizando-se um pHmetro digital, calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. A leitura foi realizada em 20 mL da solução extrativa, aguardando a estabilização da leitura. O resultado foi expresso pela média de três determinações.

2.2.4.3. Fenólicos totais (YU, 2002)

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada com a utilização do reagente de fenol Folin-Ciocalteu. 20 µL de solução extrativa, 500,0 µL do reagente de fenol Folin-Ciocalteu e 2,0 mL de água purificada foram colocados em tubo de ensaio. Esta mistura foi agitada e, num tempo não inferior a 30 segundos nem superior a 8 minutos, foram adicionados a cada tubo 1,5 mL de solução de carbonato de sódio 20 %. O volume final foi completado a 10,0 mL com água purificada. Após 2 h de reação numa temperatura de 24 °C, as amostras foram lidas em espectrofotômetro de UV/Visível a 765 nm em cubeta de 10 mm. O branco continha todas as substâncias da mistura de reação com exceção da solução extrativa que foi substituída por água purificada. As leituras foram realizadas em triplicata.

A solução-mãe de ácido gálico foi preparada em balão volumétrico de 100,0 mL, onde aproximadamente 0,5 g de ácido foram exatamente pesados e dissolvidos em 10,0 mL de metanol com auxílio de ultrassom por 10 minutos. Em seguida o volume foi completado com água purificada. Desta solução-mãe foram obtidas as seguintes diluições: 50, 100, 150, 250 e 500 µg/mL em água purificada, para construção da curva analítica. A mistura de reação continha 100,0 µL de cada uma das concentrações, 500,0 µL do reagente de fenol Folin-Ciocalteu e 2,0 mL de água purificada. Em seguida, foi adotado o mesmo procedimento acima descrito para as amostras das soluções extrativas. A absorvância foi representada frente à concentração para a construção da curva analítica do ácido gálico.

Os resultados foram calculados em termos de ácido gálico.

2.2.5. Doseamento por CLAE dos marcadores químicos

Os teores de ACG e ACF foram avaliados por CLAE, conforme condições anteriormente validadas, descritas neste capítulo, item 2.2.1., páginas 47 e 48.

Antes da injeção no cromatógrafo, as amostras foram preparadas da maneira descrita a seguir. Alíquotas de 3,0 mL de cada uma das soluções extrativas foram colocadas em balões volumétricos de 10,0 mL e o volume completado com metanol:água purificada (1:1, v/v). O volume de 3,0 mL foi escolhido com base em estudo de linearidade dos marcadores nas soluções extrativas que será discutido no capítulo 3 desta dissertação, por ser esta uma concentração onde os resultados apresentam-se de maneira linear.

Os picos obtidos foram caracterizados por comparação com o tempo de retenção dos padrões de referência. A quantificação individual dos compostos foi realizada usando a curva-padrão obtida por regressão linear.

Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

2.2.6. Liofilização das soluções extrativas

Como etapa prévia à liofilização, foi necessária a eliminação do etanol dos EM, realizada com auxílio de evaporador rotativo a 60 °C. Para evitar a precipitação de substâncias devido à menor relação soluto:solvente, foi previamente adicionado a cada solução extrativa uma quantidade de água purificada equivalente à quantidade de etanol a ser evaporada.

Para a realização da liofilização, dois procedimentos distintos foram adotados, em função da utilização posterior do extrato liofilizado. Os extratos destinados à caracterização e ensaios biológicos foram transferidos para frascos de vidro em alíquotas de volume aproximado de 20 mL; os extratos que seriam utilizados para o preparo das micropartículas foram transferidos para frascos âmbar em volumes de 0,5, 1,0 e 2,0 mL. Posteriormente, as amostras foram congeladas em freezer a -20 °C por no mínimo 48 horas e então liofilizados por 48 horas a -50 °C sob pressão de 133,3 mBar. Após finalização desta operação, os liofilizados foram mantidos em dessecador até a sua utilização.

2.2.7. Avaliação *in vivo* da atividade anti-diabética

Este estudo foi realizado em colaboração com a equipe da Profa. Dra. Fatima Regina Mena Barreto Silva no Laboratório de Hormônios e

Transdução de Sinais do Departamento de Bioquímica da UFSC com os extratos liofilizados e os marcadores químicos isolados: ACG e ACF. O procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da UFSC em 19 de março de 2007 (anexo 2).

Dois estudos foram realizados: tolerância à glicose em ratos hiperglicêmicos e avaliação da atividade anti-diabética em ratos diabéticos induzidos por aloxano. As amostras avaliadas foram os extratos 4d20, 8d20 e 6d50 (maceração) e 8020 e 9030 (decoção), na concentração de 400 mg/kg de rato. Para os marcadores químicos estas atividades foram avaliadas utilizando as concentrações de 15,0 mg/kg para ACG, 2,0 mg/kg de ACG e ACF isolados ou a mistura de ambos nesta última concentração.

No anexo 3, ao final desta dissertação, é apresentada uma descrição dos métodos utilizados neste estudo.

2.2.8. Avaliação *ex vivo* da atividade anti-hipertensiva

Este estudo foi realizado em colaboração com a equipe da Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau, no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais do Departamento de Farmacologia da UFSC. Para a atividade anti-hipertensiva foram testados os extratos liofilizados 4d20 e 8d20 (maceração) e 8020 e 9030 (decoção).

No anexo 4 é descrita a metodologia utilizada para avaliação desta atividade.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

No início deste trabalho, o marcador químico selecionado foi o ACG, segundo a literatura o composto de maior concentração na espécie *Cecropia* (ANDRADE-CETTO, 2001 e 2007; HERRERA-ARELLANO, 2004; NICASIO, 2005; REVILLA-MONSALVE, 2007; TANAE, 2007). Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa confirmaram a sua presença também na *Cecropia glaziovii* Sneth. Uma vez que suas características físico-químicas são amplamente relatadas na literatura e por sua disponibilidade comercial como padrão analítico, optou-se por utilizá-lo como marcador analítico.

Nas análises por CLAE dos extratos preparados para quantificação do marcador químico, o pico do ácido clorogênico (ACG) estava resolvido, apresentando um tempo de retenção de 3,5 minutos, da mes-

ma forma que o pico obtido pela injeção do padrão deste ácido. O extrato enriquecido com padrão de ACG foi injetado no cromatógrafo e a área resultante teve um aumento proporcional à quantidade de padrão adicionada ao extrato. Além disso, o espectro obtido por meio de detector DAD (detecção ultravioleta por arranjo de diodos) demonstrou um grau de pureza de 1,04.

No entanto, observou-se nos extratos obtidos por maceração a presença de um segundo pico, com tempo de retenção aproximado a 6,0 minutos. Este pico apresentava uma área bastante variável em função da porcentagem de etanol no líquido extrator, com uma área inversamente proporcional à concentração de etanol figura 10.

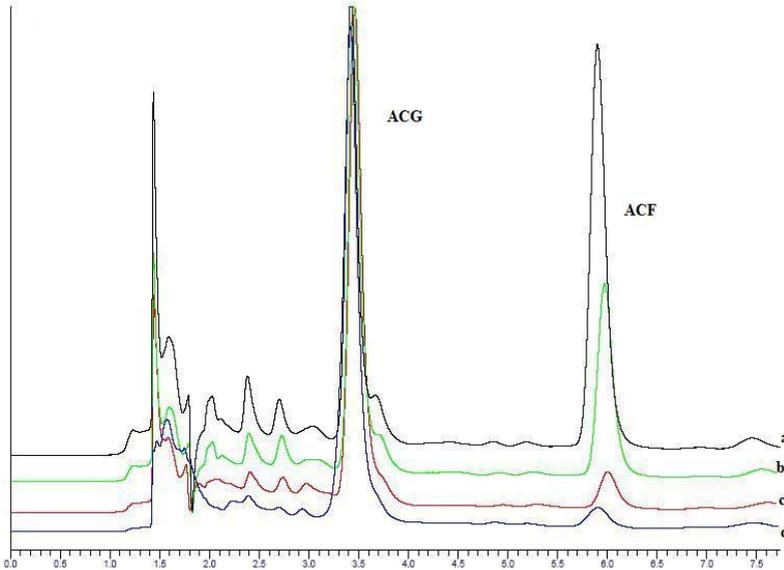


Figura 10. Sobreposição de cromatogramas dos primeiros 8 minutos das soluções extrativas obtidas por maceração (4d20, 8d20, 6d50 e 8d80). (a) Linha preta referente ao extrato 8d20, (b) linha verde referente ao extrato 4d20, (c) linha vermelha referente ao extrato 6d50 e (d) linha azul referente ao extrato 8d80

O ACG é um éster conjugado dos ácidos cafeico e quínico. Desta forma investigou-se a possibilidade desta substância ser o ACF. Com o intuito de verificar esta possibilidade, um padrão de ACF foi injetado no cromatógrafo mantendo as mesmas condições cromatográficas, sendo

verificado o mesmo tempo de retenção entre o padrão e a substância em questão. Além disso, uma alíquota do extrato foi enriquecida com o ACF padrão e observou-se um aumento da área proporcional à quantidade de padrão adicionada. Para confirmar esta hipótese, padrão e extratos foram injetados em cromatógrafo acoplado a um detector DAD.

As figuras 11 e 12 apresentam os cromatogramas obtidos para os picos do padrão de ACF e do extrato 4d20, respectivamente. A similaridade dos dois espectros UV/Vis acoplados aos cromatogramas indica que se trata da mesma substância, o ACF.

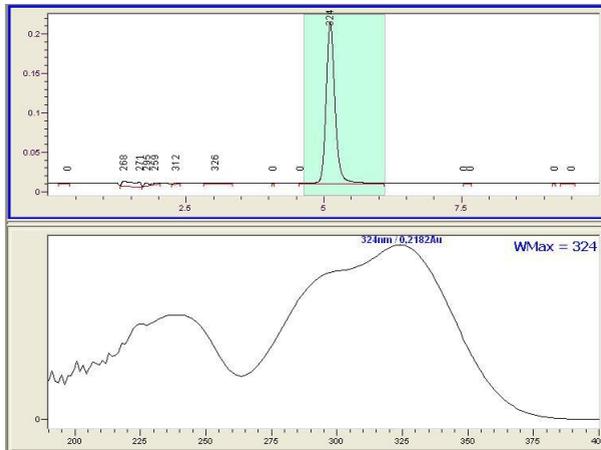


Figura 11. Cromatograma típico obtido por CLAE do ACF e respectivo espectro obtido com detector DAD na região de 180 a 400 nm

é realizada através da elaboração de uma curva analítica e da análise estatística da linearidade através de regressão linear (BRASIL, 2003).

A linearidade do método foi investigada para o ácido clorogênico no intervalo de 2,5 – 200 µg/ml e para o ácido cafeico no intervalo de 2,5 – 100 µg/ml, tendo sido elaboradas três curvas analíticas para cada marcador. A tabela 7 apresenta as equações de reta utilizadas na conversão entre as áreas dos picos dos cromatogramas obtidas e a concentração de cada um dos analitos, bem como o fator de correlação que deve ser $r \geq 0,99$ (BRASIL, 2003). As figuras 13 e 14 apresentam as curvas analíticas obtidas para o ACG e o ACF, respectivamente. O intervalo médio das áreas obtidas para o ACG foi de 124.124,50 – 10.825.077,00 uV.s e para o ACF foi de 220.669,78 – 9.158.942,30 uV.s.

TABELA 7. Dados de linearidade dos marcadores químicos obtidos para a validação do método de CLAE

| Composto | Intervalo de Linearidade (µg/mL) | Equação da reta | Coefficiente de Correlação (r) |
|----------|----------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| ACG | 2,5 - 200 | $y = 54291x - 16595$ | 0,999995 |
| ACF | 2,5 - 100 | $y = 91599x - 6746,9$ | 0,999987 |

As curvas analíticas para os ácidos clorogênico e cafeico apresentaram excelente coeficiente de correlação (r), sendo, portanto linear nos respectivos intervalos. Cada ponto da curva representa a média dos valores obtidos para cada concentração com seu respectivo desvio padrão. A avaliação dos resíduos não indica uma tendência em nenhuma das curvas obtidas (ACG ou ACF).

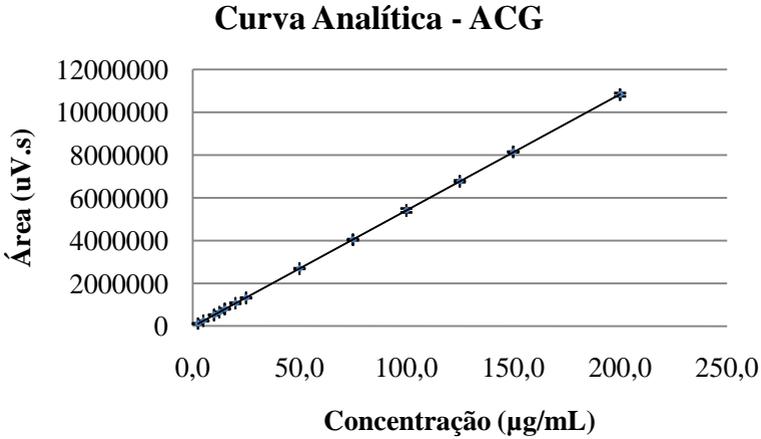


Figura 13. Curva analítica média do ácido clorogênico obtida por CLAE. Coeficiente de correlação, 0,999995; equação da reta: $y = 54291x - 16595$

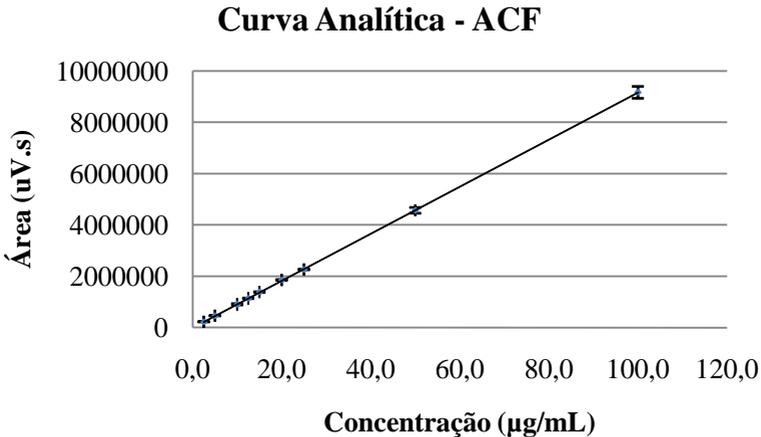


Figura 14. Curva analítica média do ácido cafeico obtida por CLAE. Coeficiente de correlação, 0,999987; equação da reta: $y = 91599x - 6746,9$

3.1.2. Precisão

A repetibilidade foi caracterizada para ambos os marcadores por desvios padrões relativos inferiores a 0,4 %. Já a precisão intermediária apresentou desvios inferiores a 0,7 %, demonstrando que o método proposto é preciso. A tabela 8 apresenta os resultados obtidos para precisão.

TABELA 8. Dados de precisão: repetibilidade e precisão intermediária dos marcadores químicos obtidos para a validação do método de CLAE

| Composto | Repetibilidade | | Precisão Intermediária | |
|----------|-------------------------|------------|-------------------------|------------|
| | Concentração (µg/mL) | DPR (%) | Concentração (µg/mL) | DPR (%) |
| ACG | 2,5 | 0,2 | 50,0 | 0,6 |
| | 50 | 0,4 | | |
| | 200 | 0,2 | | |
| ACF | 2,5 | 0,4 | 25,0 | 0,7 |
| | 25 | 0,3 | | |
| | 100 | 0,2 | | |

DPR: desvio padrão relativo

3.1.3. Exatidão

A exatidão de um método analítico corresponde à proximidade entre os resultados obtidos por um determinado método e o valor verdadeiro. A exatidão pode ser avaliada através de amostras às quais são adicionadas quantidades conhecidas da substância referência, sendo expressa como porcentagem de recuperação (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Quando todos os valores experimentais obtidos encontrarem-se dentro dos limites aceitáveis de recuperação (95-105 %), o método será considerado exato.

Como pode ser observado na tabela 9, a recuperação média de todas as amostras avaliadas encontra-se dentro dos limites preconizados, demonstrando então a exatidão do método.

TABELA 9. Dados de exatidão do doseamento dos marcadores químicos nos extratos utilizados para a validação do método de CLAE

| Extratos | Composto | Concentração do Extrato ($\mu\text{g/mL}$) | Recuperação | |
|----------|----------------------------|---|-------------|---------|
| | | | Média (%) | DPR (%) |
| 8d20 | ACG (25 $\mu\text{g/mL}$) | 65,9 | 100,6 | 0,4 |
| | ACF (25 $\mu\text{g/mL}$) | 41,7 | 100,8 | 0,5 |
| 6d50 | ACG (25 $\mu\text{g/mL}$) | 155,9 | 98,0 | 0,2 |
| | ACF (25 $\mu\text{g/mL}$) | 9,4 | 101,9 | 0,5 |
| 8d80 | ACG (25 $\mu\text{g/mL}$) | 138,7 | 100,1 | 0,5 |
| | ACF (25 $\mu\text{g/mL}$) | 5,3 | 102,3 | 0,1 |

DPR: desvio padrão relativo

3.1.4. Limite de quantificação e limite de detecção

A sensibilidade da metodologia de quantificação dos ACG e ACF foi avaliada através da determinação dos limites de detecção e quantificação. O limite de detecção é tido como a menor concentração absoluta do analito numa amostra capaz de ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as mesmas condições do experimento. O limite de quantificação é tido como a menor concentração do analito numa amostra capaz de ser quantificado com precisão aceitável e exatidão (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Neste contexto, a determinação do limite de detecção e quantificação foi calculada com base no desvio padrão da resposta, inclinação da curva analítica e ruído obtido durante análise. A tabela 10 apresenta esses resultados.

TABELA 10. Limites de quantificação e detecção dos marcadores químicos obtidos para a validação do método de CLAE

| Composto | LQ ($\mu\text{g/mL}$) | LD ($\mu\text{g/mL}$) |
|----------|----------------------------|----------------------------|
| ACG | 1,05 | 0,3460 |
| ACF | 0,22 | 0,0732 |

LQ: limite de quantificação; LD: limite de detecção

A determinação dos LD e LQ em função da área foi calculada através da área do ruído obtido durante a análise da amostra e dos marcadores isolados. Considerando que o ICH (2005) determina que a área do

LD deva ser 3 vezes a área do ruído e que a área do LQ deva ser 10 vezes a área deste mesmo ruído, obteve-se para o método os limites de detecção e de quantificação de 136,41 uV.s e 454,70 uV.s, respectivamente.

O conjunto dos resultados obtidos no estudo de validação permite concluir que o método proposto é adequado e seguro para a quantificação dos marcadores químicos nos extratos obtidos. Desta forma, o ACG e o ACF foram quantificados nos extratos utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência devidamente validado. Os teores destes ácidos nos extratos obtidos por maceração e decocção estão descritos nas tabelas 11 e 13, respectivamente. As tabelas 12 e 14 apresentam a análise da variância (ANOVA) para todos os resultados obtidos para os diferentes extratos.

3.2. Análise das soluções extrativas: Maceração e Decocção

As tabelas 11 e 12 apresentam, respectivamente, os resultados de todos os ensaios realizados para a caracterização das soluções extrativas obtidas por maceração e a análise estatística destes, dando uma visão geral dos mesmos.

TABELA 11. Resultados da caracterização dos extratos obtidos por maceração usando o delineamento fatorial 2²

| EXP | Extrato | Resíduo seco (%) | pH | Fenólicos totais (mg/mL) | ACG (µg/mL) | ACF (µg/mL) |
|-----|---------|------------------|------|--------------------------|-------------|-------------|
| 1 | 4d20 | 1,06 | 5,78 | 3,64 | 131,09 | 36,93 |
| 2 | 4d20 | 1,05 | 5,81 | 3,96 | 128,81 | 36,67 |
| 3 | 4d80 | 1,02 | 5,88 | 3,48 | 150,99 | 3,25 |
| 4 | 4d80 | 1,01 | 5,88 | 3,37 | 150,69 | 3,27 |
| 5 | 8d20 | 1,14 | 5,79 | 3,95 | 73,36 | 58,35 |
| 6 | 8d20 | 1,10 | 5,83 | 3,69 | 75,62 | 57,61 |
| 7 | 8d80 | 1,06 | 5,90 | 3,47 | 154,80 | 3,78 |
| 8 | 8d80 | 1,05 | 5,93 | 3,43 | 153,99 | 3,67 |
| 9 | 6d50 | 1,08 | 5,92 | 3,88 | 167,11 | 11,94 |
| 10 | 6d50 | 1,07 | 5,96 | 3,89 | 167,65 | 12,18 |

TABELA 12. Análise de variância dos resultados da caracterização dos extratos obtidos por maceração usando o delineamento fatorial 2^2 ($p \leq 0,05$)

| ANOVA | Resíduo seco (%) | pH | Fenólicos totais (mg/mL) | ACG ($\mu\text{g/mL}$) | ACF ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------------------|------------------|--------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Modelo | 0,0005 | 0,0008 | 0,0027 | < 0,0001 | < 0,0001 |
| A | 0,0010 | 0,0008 | 0,0027 | < 0,0001 | < 0,0001 |
| B | 0,0012 | -- | -- | < 0,0001 | < 0,0001 |
| AB | -- | -- | -- | < 0,0001 | < 0,0001 |
| Curvatura | 0,3380 | 0,0020 | 0,0242 | < 0,0001 | < 0,0001 |
| <i>Lack of Fit</i> | 0,2571 | 0,3187 | 0,9680 | -- | -- |

ACF: Transformação recomendada: Square root (Lambda = 0,5)

Fator A: Concentração de etanol (%)

Fator B: Tempo (dias)

Da mesma forma, as tabelas 13 e 14 apresentam os resultados dos estudos realizados com as soluções extrativas obtidas por decocção, assim como a análise estatística dos mesmos.

TABELA 13. Resultados da caracterização dos extratos obtidos por decocção usando o delineamento fatorial 2^2

| EXP | Extrato | Resíduo seco (%) | pH | Fenólicos totais (mg/mL) | ACG ($\mu\text{g/mL}$) | ACF ($\mu\text{g/mL}$) |
|-----|---------|------------------|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 7010 | 0,82 | 5,88 | 2,09 | 179,09 | 7,75 |
| 2 | 7010 | 0,76 | 5,94 | 1,65 | 177,67 | 7,72 |
| 3 | 9010 | 0,91 | 5,72 | 2,19 | 190,17 | 7,59 |
| 4 | 9010 | 0,93 | 5,72 | 2,15 | 192,99 | 8,02 |
| 5 | 7030 | 0,87 | 5,85 | 2,21 | 185,41 | 8,06 |
| 6 | 7030 | 0,83 | 5,84 | 2,13 | 186,65 | 8,18 |
| 7 | 9030 | 0,91 | 5,70 | 2,19 | 191,55 | 8,70 |
| 8 | 9030 | 0,95 | 5,71 | 2,35 | 193,04 | 8,63 |
| 9 | 8020 | 0,77 | 5,65 | 2,15 | 220,87 | 4,86 |
| 10 | 8020 | 0,76 | 5,66 | 2,06 | 221,30 | 4,86 |

TABELA 14. Análise de variância dos resultados da caracterização dos extratos obtidos por decocção usando o delineamento fatorial 2^2 ($p \leq 0,05$)

| ANOVA | Resíduo seco (%) | pH | Fenólicos totais (mg/mL) | ACG ($\mu\text{g/mL}$) | ACF ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------------------|------------------|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Modelo | 0,0035 | 0,0001 | 0,0983 | 0,0002 | 0,0045 |
| A | 0,0016 | < 0,0001 | 0,1109 | < 0,0001 | 0,0304 |
| B | 0,0977 | 0,0498 | 0,1103 | 0,0041 | 0,0017 |
| AB | -- | -- | -- | 0,0089 | 0,0679 |
| Curvatura | 0,0021 | 0,0003 | 0,9400 | < 0,0001 | < 0,0001 |
| <i>Lack of Fit</i> | 0,1979 | 0,1334 | 0,3950 | -- | -- |

Fator A: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

Fator B: Tempo (minutos)

Resíduo Seco

O resíduo seco e o pH são parâmetros do controle de qualidade de produtos fitoterápicos que auxiliam no estabelecimento de suas características e na sua padronização.

O resíduo seco avalia a quantidade total de substâncias extraídas em condições específicas, desta forma podendo dar informações sobre a influência das diferentes condições de extração (método de extração, líquido extrator, tempo de extração, entre outros) sobre a qualidade do processo extrativo.

Considerando os extratos obtidos por maceração pode-se observar a influência tanto da concentração de etanol (fator A) quanto do tempo de extração (fator B) (tabela 12) sobre o resíduo seco, sendo que os dois fatores são significativos. O aumento da porcentagem de etanol do líquido extrator provoca a diminuição do resíduo seco. Por outro lado, o aumento do tempo resulta em uma maior quantidade de resíduo. Esta relação pode ser observada na figura 15.

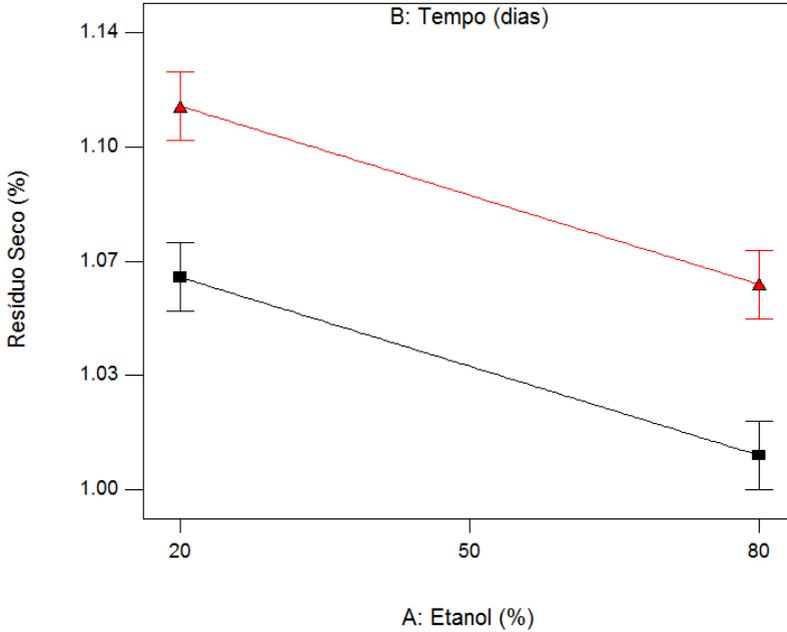


Figura 15. Representação gráfica dos fatores concentração de etanol (A) e tempo (B) dos extratos obtidos por maceração para resíduo seco. (▲): 8 dias; (■): 4 dias

Para a decocção, os dois fatores considerados também são significativos. No entanto, no caso dos decoctos, tanto a temperatura como o tempo, quando aumentados, provocam um aumento do resíduo seco (figura 16).

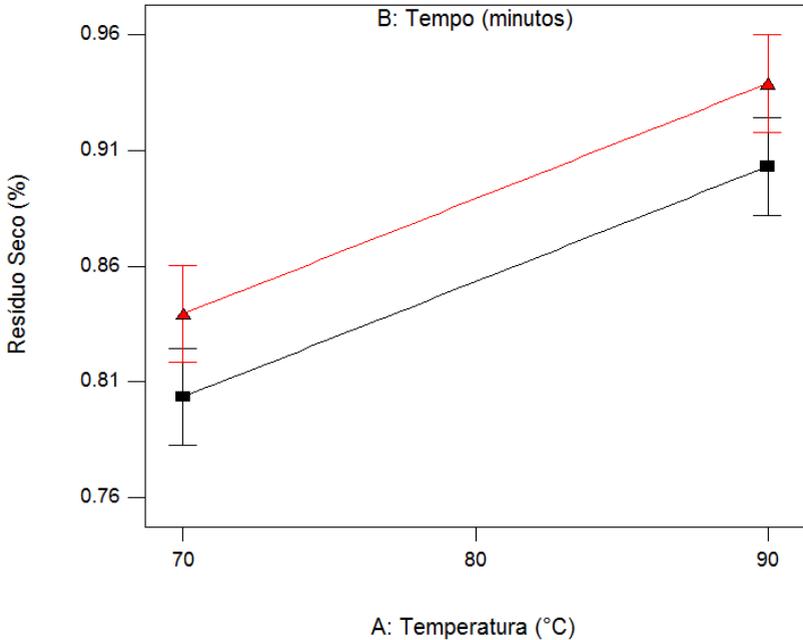


Figura 16. Representação gráfica dos fatores temperatura (A) e tempo (B) dos extratos obtidos por decocção para resíduo seco. (▲): 30 minutos; (■): 10 minutos

Não foi encontrada correlação entre o resíduo seco e o teor dos marcadores químicos indicando que este método não pode ser utilizado como indicativo da concentração dos mesmos.

pH

Com relação ao pH, quando se observam os valores para os diferentes extratos obtidos por maceração, verifica-se que apenas a concentração de etanol é significativa, sendo que um aumento da concentração de etanol acarreta um aumento no valor de pH (figura 17). No entanto, este aumento não é linear, como indica o valor de significância da curvatura expressa na tabela 12.

A diferença entre os valores de pH dos extratos mostrou-se estatisticamente significativa após a aplicação do teste t de Student ($\alpha \leq 0,05$). Contudo, esta diferença estatística pode ser considerada de pouco

significado tecnológico, uma vez que os valores encontrados são muito próximos.

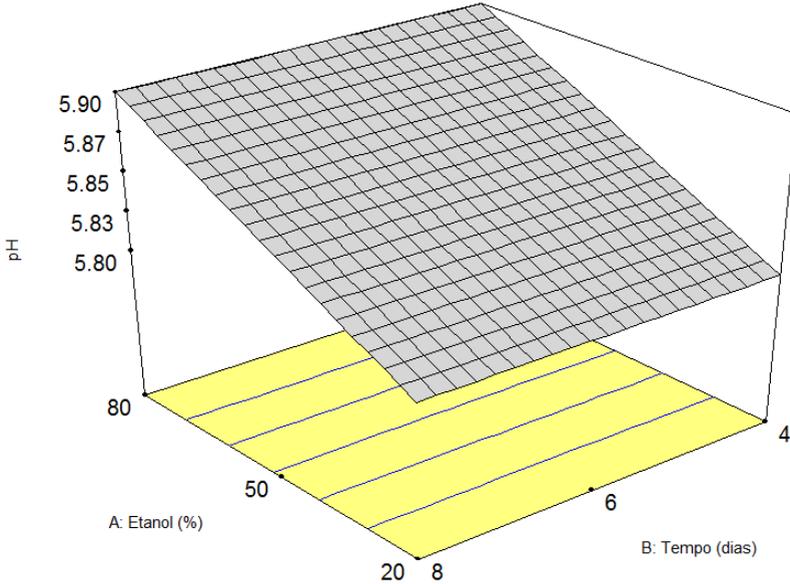


Figura 17. Gráfico tridimensional dos resultados obtidos para o ensaio de pH relacionando os fatores concentração de etanol (A) e tempo (B) dos extratos obtidos por maceração

Na decocção, tanto a temperatura como o tempo sugerem ter influência sobre o pH. Como pode ser visualizado na figura 18, o aumento da temperatura e do tempo resulta na diminuição do pH. No entanto, ao contrário do observado para a maceração, não foram encontradas diferenças significativas entre os valores após a aplicação do teste t de Student, mesmo considerando que a curvatura é significativa (tabela 14).

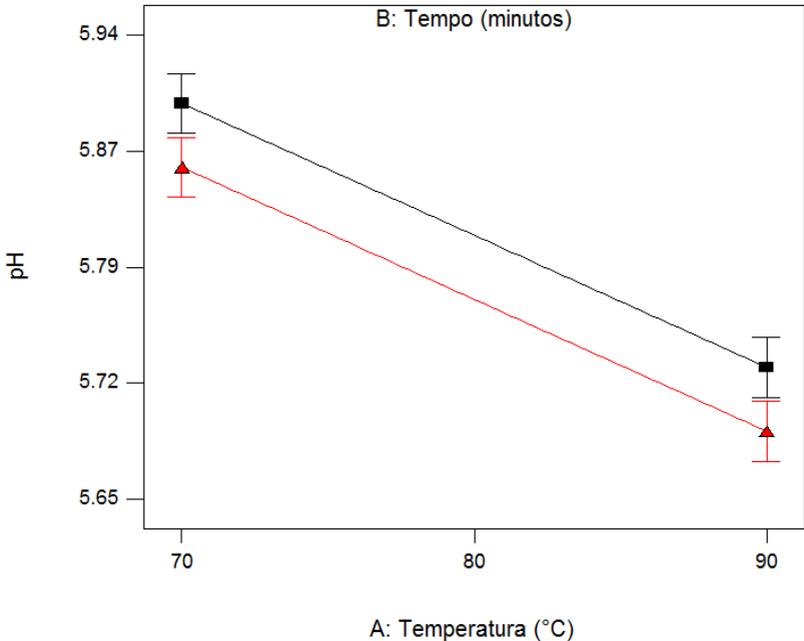


Figura 18. Representação gráfica dos fatores temperatura (A) e tempo (B) dos extratos obtidos por decocção para o ensaio de pH. (▲): 30 minutos; (■): 10 minutos

Fenólicos totais

Os polifenóis são substâncias redutoras e, portanto, oxidam-se com facilidade, resultando em substâncias coradas (SIMÕES, 2003).

O conteúdo total de compostos fenólicos foi determinado usando-se a técnica de Folin-Ciocalteu. Este método colorimétrico consiste na extração de compostos fenólicos (solução ácida) e sua quantificação por espectrofotometria, após reação de oxi-redução em presença de álcali (solução de carbonato de sódio). Esta reação resulta na formação de um complexo de coloração azulada (SIMÕES, 2003; VERZA, 2007). O agente de oxi-redução utilizado foi o reagente de fenol Folin-Ciocalteu, composto por fosfomolibdato e fosfotungstato, que atua medindo a quantidade de substâncias necessárias para inibir a oxidação do reagente, de forma que a capacidade redutora da amostra é mensurada como

um todo. O complexo colorido que se forma, no entanto, é extremamente instável, constituindo-se esta a principal limitação do método, além da interferência de outros constituintes. Este inconveniente pode ser minimizado pela realização da medida de valores de absorvância no tempo estabelecido de 120 minutos.

Este ensaio, bem como os demais que avaliam uma determinada classe de substâncias, não é específico para um dado composto, podendo, com isto, incorrer em erro devido à presença de interferentes ou por diferenças entre os máximos de absorção das substâncias envolvidas. No entanto, apesar dos problemas inerentes a estes ensaios, no caso de extratos vegetais os mesmos podem dar informações importantes sobre a qualidade da amostra avaliada. Ao tratar-se de uma matriz complexa, que pode apresentar variações quali e quantitativa em sua composição, a quantificação total pode ser considerada vantajosa. Além disso, as propriedades biológicas dos extratos vegetais estão mais comumente relacionadas a efeitos sinérgicos de vários compostos do que a substâncias isoladas.

Os resultados de fenólicos totais foram expressos em termos de ácido gálico (YU, 2002). Esta metodologia foi desenvolvida por Folin e Ciocalteu em 1927 e utilizada por outros autores (SADLER, 1995; TEPE, 2007; VERZA, 2007), com pequenas modificações. A figura 19 apresenta a curva do ácido gálico utilizada para o doseamento. A curva apresenta como equação da reta, $y = 0,0008x + 0,0164$ e coeficiente de correlação, $r = 0,9999$.

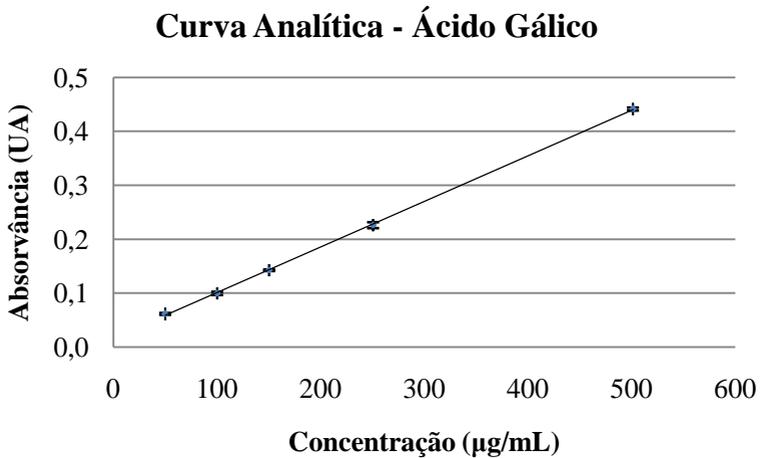


Figura 19. Curva analítica média do ácido gálico obtida por espectrofotometria UV/Vis. Detecção: 765 nm. Coeficiente de correlação, 0,9999; equação da reta: $y = 0,0008x + 0,0164$

Como pode ser observado nas tabelas 11 e 13, os EM apresentam um maior teor fenólicos totais do que os ED. Várias podem ser as causas desta diferença, entre as quais podem ser destacados dois fatores. Inicialmente, devido aos solventes empregados. Na maceração o líquido extrator é uma mistura de etanol/água, na decocção é utilizada somente água, portanto, os solventes utilizados para os dois métodos apresentam diferenças de polaridade. De acordo com a literatura, os polifenóis são melhor extraídos em sistemas alcoólicos de concentração entre 40 e 80 % do que quando utilizados solventes puros (água, etanol, metanol) (KATSUBE, 2009). Além disso, a influência da temperatura também é marcante: seu aumento resulta num incremento da solubilidade dos ácidos clorogênico e cafeico (MOTA, 2008) e, conseqüentemente, facilita a sua extração; entretanto, pode potencializar a degradação e/ou reações de polimerização dos compostos fenólicos (MA, 2009).

Com relação aos EM, podemos observar que os resultados para fenólicos totais são influenciados pela concentração de etanol no extrato. À medida que a concentração de etanol aumenta, a concentração de fenólicos totais diminui (figura 20). Já na decocção os dois fatores são significativos, conforme se aumenta a temperatura e o tempo, ocorre o aumento da concentração de fenólicos totais (figura 21).

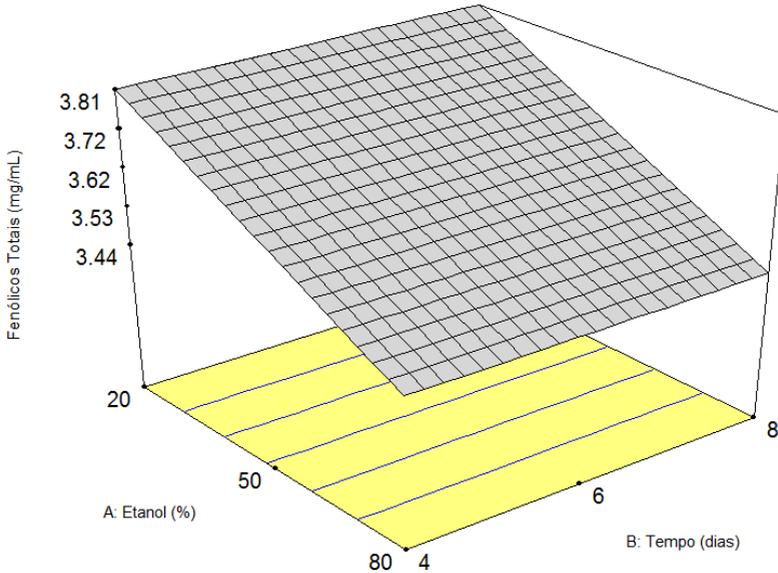


Figura 20. Gráfico tridimensional dos resultados obtidos para o ensaio de fenólicos totais relacionando os fatores concentração de etanol (A) e tempo (B) dos extratos obtidos por maceração

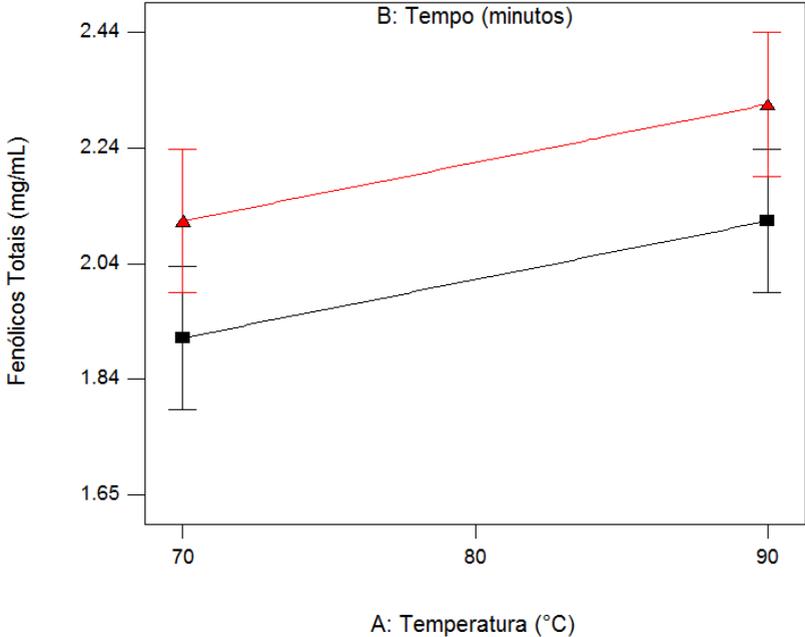


Figura 21. Representação gráfica dos fatores temperatura (A) e tempo (B) dos extratos obtidos por decocção para o ensaio de fenólicos totais. (▲): 30 minutos; (■): 10 minutos

Teor de ácido clorogênico e ácido cafeico

No desenvolvimento de fitoterápicos, é desejável a recuperação dos compostos químicos do material vegetal em sua totalidade, ou valores muito próximos, em cada etapa de seu processamento. Em se tratando dos compostos químicos responsáveis, ou parcialmente responsáveis pela atividade biológica, como é o caso dos ácidos fenólicos na *Cecropia glaziovii*, este requisito assume papel fundamental, por isto a importância do conhecimento de todos os fatores que possam interferir em cada etapa deste processo.

Neste trabalho foi realizado um estudo de formulação utilizando um delineamento fatorial que permitiu, com o auxílio do software Design-Expert®, a análise da influência de diversos parâmetros simultaneamente sobre respostas pré-estabelecidas. No caso dos teores dos marcadores químicos, ACG e ACF, determinados através do método de CLAE validado e apresentados na tabela 11, pode-se observar a influên-

cia de todos os fatores estudados sobre esta resposta, bem como algumas interações entre elas.

Para o ACG nos EM pode-se observar claramente uma interação entre a porcentagem de etanol e o tempo (figura 22).

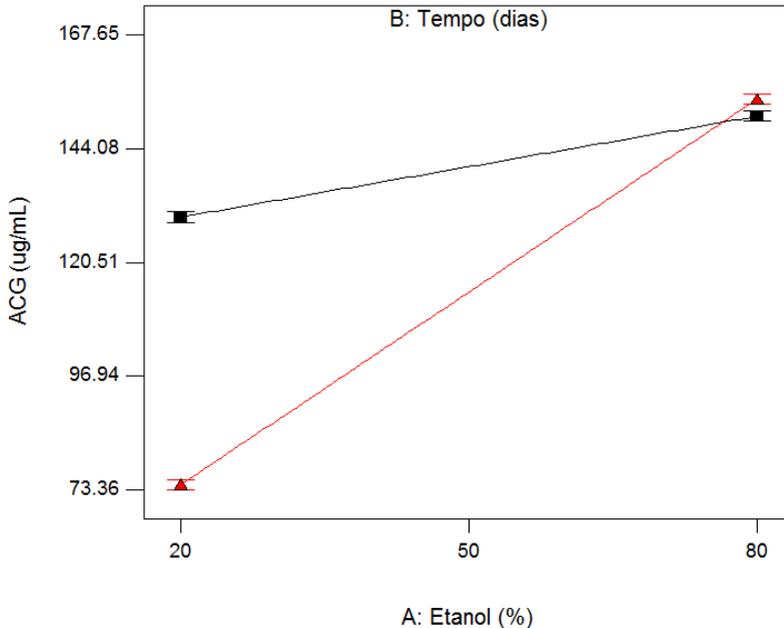


Figura 22. Gráfico de interação entre os fatores concentração de etanol (A) e tempo (B) dos extratos obtidos por maceração para o doseamento de ácido clorogênico. (▲): 8 dias; (■): 4 dias

Na concentração de etanol de 80 % é possível observar-se uma constância nos teores do ACG nos tempos estudados, indicando que no menor tempo estudado, 4 dias, a quantidade total passível de ser extraída nestas condições já foi transferida ao líquido extrator, ou seja, o equilíbrio de extração já foi alcançado a 4 dias. Por outro lado, quando o líquido extrator utilizado foi o etanol 20 %, observou-se uma queda importante no teor deste ácido com o aumento do tempo (tabela 11). Este último resultado foi considerado bastante surpreendente, indicando algum tipo de alteração na composição do extrato durante o processo extrativo, o que motivou um estudo para elucidação deste fato. Este estudo será apresentado no capítulo 3.

Ainda observando a tabela 11, pode-se verificar que o extrato que apresenta maior concentração de ACG é o extrato com 60 % de etanol, seguido dos extratos com 80 % de etanol (independente do tempo empregado), o extrato obtido após 4 dias com 20 % de etanol e após 8 dias de extração com 20 % de etanol.

A análise dos teores de ACF encontrados nos extratos apresentou valores acima de 10 entre o resultado máximo e o mínimo, que neste tipo de análise indicam que uma transformação é necessária para melhor interpretação dos resultados. No caso do ACF esta razão foi de 17,97 e, por este motivo, os dados foram transformados utilizando a raiz quadrada. A figura 23 mostra o comportamento dos resultados, num gráfico de interação.

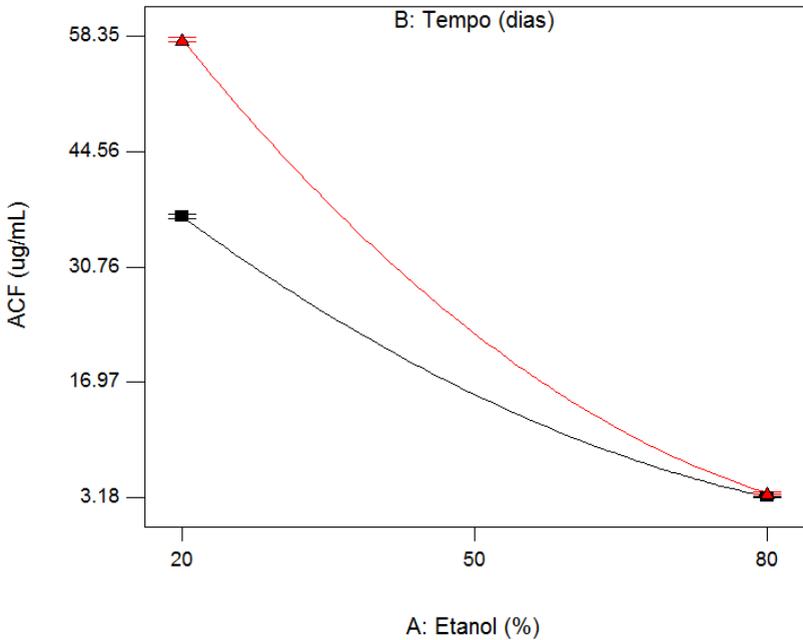


Figura 23. Gráfico de interação após aplicação de raiz quadrada, entre os fatores concentração de etanol (A) e tempo (B) dos extratos obtidos por maceração para o doseamento de ácido cafeico. (▲): 8 dias; (■): 4 dias

A concentração de ACF em 20 % de etanol teve um aumento significativo quando o tempo aumentou de 4 para 8 dias, passando de cerca de 36 para 58 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Neste mesmo período, a concentração de ACG diminuiu de aproximadamente 130 para 75 $\mu\text{g/mL}$. Bus-

cando justificar este resultado inusitado, foi levantada a hipótese de que o ACG poderia ter sido convertido em ACF, uma vez que o ácido clorogênico é um éster do ácido cafeico (OLTHOF, 2001). Esta conversão poderia ter ocorrido devido à ação de enzimas extraídas da própria planta ou dos microorganismos que pudessem estar presentes nas soluções extrativas, além de uma maior extração do composto. Estas hipóteses foram avaliadas e os resultados deste estudo constituem o capítulo 3 desta dissertação.

A análise dos teores encontrados para o ACG nos extratos obtidos por decocção também evidenciou uma interação entre os fatores temperatura e tempo, como pode ser observado na tabela 14 e na figura 24.

Com o aumento do tempo e da temperatura obteve-se uma maior concentração de ACG. No entanto, a 90 °C a diferença entre 10 e 30 minutos foi pouco expressiva.

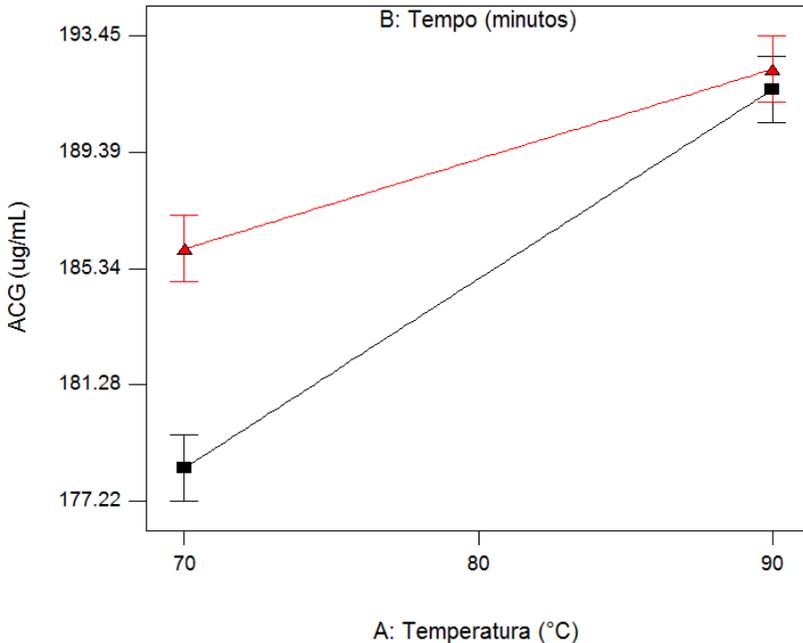


Figura 24. Gráfico de interação entre os fatores temperatura (A) e tempo (B) dos extratos obtidos por decocção para o doseamento de ácido clorogênico. (▲): 30 minutos; (■): 10 minutos

A análise dos teores de ácido cafeico nos extratos obtidos por decocção indica que em 10 minutos tem-se pouca influência da temperatura, já em 30 minutos a variação na concentração de ácido cafeico é mais significativa (figura 25). No entanto, os valores de ACF nos decoctos são pouco expressivos, principalmente se comparados aos elevados teores de ácido clorogênico encontrados nos mesmos.

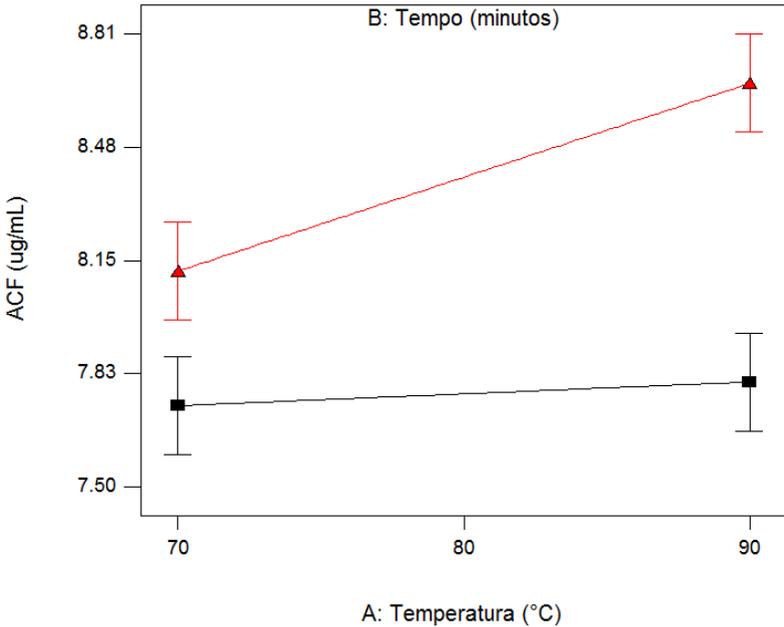


Figura 25. Gráfico de interação entre os fatores temperatura (A) e tempo (B) dos extratos obtidos por decocção para o doseamento de ácido cafeico. (▲): 30 minutos; (■): 10 minutos

3.3. Avaliação *in vivo* da atividade anti-diabética

Um estudo realizado por Revilla-Monsalve e colaboradores (2007) avaliou a atividade da *C. obtusifolia* em pacientes diabéticos por 32 semanas. Efeitos positivos foram obtidos após 18 semanas de tratamento, porém, este estudo não mostrou mudança significativa nos níveis de insulina, levando a conclusão de que o efeito hipoglicemiante da

Cecropia não poderia ser atribuído a indução de secreção de insulina, mas poder-se-ia então sugerir uma atividade insulino-mimética. Esses resultados interessantes nos levaram a investigar uma possível atividade anti-diabética na *C. glaziovii*, uma vez que não foram encontrados relatos na literatura de utilização desta planta com esta finalidade.

A possível atividade anti-diabética dos extratos foi avaliada utilizando dois modelos, administração oral em ratos hiperglicêmicos e em ratos diabéticos porque, desta forma, é possível evidenciar a forma como esta atividade ocorre.

O pâncreas de ratos normais hiperglicêmicos possui células β capazes de secretar insulina, portanto este estudo permite a avaliação da função secretagoga de insulina. Já nos ratos diabéticos o pâncreas não é funcional; uma queda na glicemia nestes animais após a administração do extrato evidencia uma atividade insulino-mimética (CAZAROLLI, 2009).

Os extratos selecionados para a realização destes estudos foram os EM 4d20, 8d20 e 6d50 e os ED 8020 e 9030.

Os EM 4d20 e 8d20 foram escolhidos por apresentarem a maior concentração de ACF (substância já relatada como possuindo atividade anti-diabética), mas uma relação ACG:ACF diferente: para 4d20 a relação é de 3,6:1, enquanto que para 8d20 a relação é de 1,3:1. As diferentes proporções entre os marcadores químicos podem permitir a observação de possível efeito sinérgico na atividade. O extrato 6d50 foi selecionado por apresentar a maior concentração de ACG, dentre todos os EM preparados. Já os ED foram escolhidos por apresentarem a maior concentração de ACG (8020) e a maior concentração de ACF (9030) do delineamento realizado. Todos os extratos foram testados na concentração de 400 mg/kg.

Os marcadores isolados também foram testados. O ACG foi avaliado na concentração usual para este tipo de ensaio, 15,0 mg/kg (referência), e posteriormente em concentração próxima à encontrada nos extratos, 2,0 mg/kg. O ACF foi testado na concentração de 2,0 mg/kg. A mistura de ambos foi avaliada a 2,0 mg/kg de cada um dos ácidos.

3.3.1. Avaliação dos EM em animais hiperglicêmicos

O primeiro marcador químico a ser testado foi o ACG isolado, na concentração de 15 mg/kg de animal. Em seguida foram testados os extratos brutos obtidos por maceração na concentração de 400 mg/kg.

O ACG nesta concentração não foi capaz de reduzir a glicemia dos animais no tempo do estudo, conforme observado na figura 26

quando comparado ao controle hiperglicêmico tendo promovido inclusive o aumento da glicemia. Por outro lado, os EM 4d20 e 8d20 apresentaram resultados bastante expressivos na redução da glicemia, em especial o extrato 8d20. O mesmo apresentou diferença significativa ($p \leq 0,001$) nos tempos de 15, 30 e 60 minutos e $p \leq 0,05$ em 180 minutos. O extrato 4d20 apresentou diferença significativa ($p \leq 0,001$) nos primeiros 15 minutos.

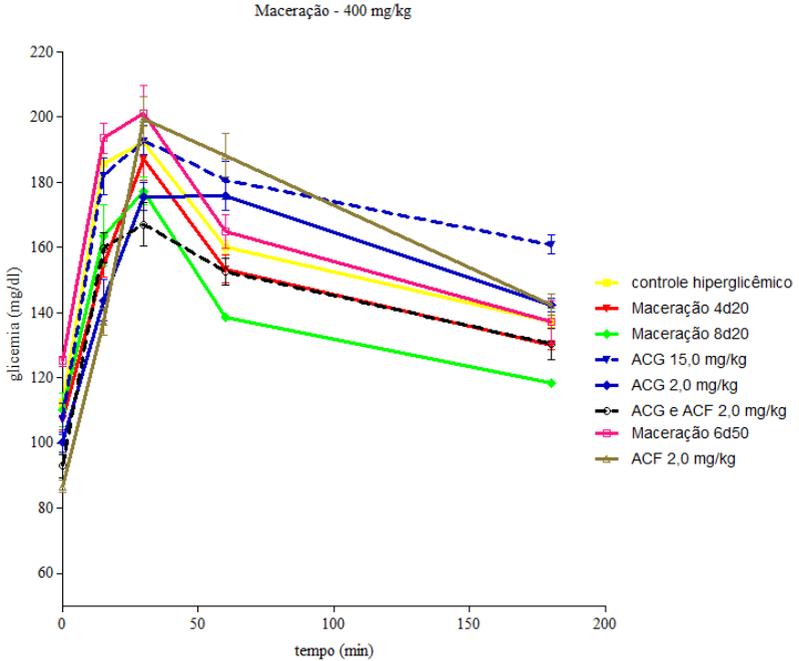


Figura 26. Gráfico comparativo do efeito agudo entre os marcadores químicos (isolados e em associação) e os extratos obtidos por maceração na curva de tolerância à glicose oral. Administração dos extratos liofilizados por gavagem: 400 mg/kg. Os resultados são a média \pm EPM (n = 6 – 10)

Com base nas concentrações do ACG e do ACF nos extratos (expressos na tabela 11, página 63), é possível calcular a quantidade desses ácidos administrada em média aos animais. Os ratos tratados com o extrato 4d20, receberam em média 4,30 mg/kg de ACG e 1,54 mg/kg de ACF. Os ratos tratados com o extrato 8d20, receberam em média 2,61 mg/kg de ACG e 2,39 mg/kg de ACF. Sendo assim verifica-se que no

extrato 4d20 a concentração do ACG era aproximadamente 3 vezes maior do que a concentração do ACF. Já no extrato 8d20 os marcadores apresentavam uma relação praticamente de 1:1. Com essas constatações foi decidido testar os marcadores de forma isolada e associados nesta mesma proporção e numa concentração próxima ao encontrado nos extratos. A concentração utilizada foi de 2,0 mg/kg de animal.

O ACG na concentração de 2,0 mg/kg apresentou diferença significativa ($p \leq 0,01$) com o controle hiperglicêmico nos tempos de 15 e 30 minutos e após esse tempo apresentou aumento na glicemia. O ACF nesta mesma concentração apresentou diferença significativa ($p \leq 0,01$) do controle apenas em 15 minutos. Mas a associação de ambos foi significativamente diferente ($p \leq 0,01$) do controle em 15, 30 e 60 minutos, indicando um possível sinergismo na atividade hipoglicemiante destas duas substâncias.

Ao serem comparados os resultados obtidos para os extratos brutos 4d20 e 8d20 (EM) com os marcadores pode-se ainda sugerir que outras substâncias, não estudadas neste trabalho, estejam atuando de forma sinérgica na diminuição da glicemia em ratos.

O extrato 6d50 não apresentou resultados significativamente diferentes do controle hiperglicêmico. Os ratos tratados com o extrato 6d50, receberam em média 5,95 mg/kg de ACG e 0,42 mg/kg de ACF.

3.3.2. Avaliação dos ED em animais hiperglicêmicos

Na avaliação dos ED na curva de tolerância à glicose nenhum dos extratos apresentou efeito hipoglicemiante, apesar da concentração de ACG ser maior do que nos EM (figura 27). Ao serem retomados os resultados obtidos para o ACG testado isoladamente nas concentrações de 15 e 2,0 mg/kg, pode-se inferir que a resposta hipoglicemiante desse ácido parece ser dose-dependente. Desta forma, era de se esperar que os ED não apresentassem atividade hipoglicemiante.

Assim como para os EM, foi calculada a quantidade de ácidos administrada aos animais, também para a decocção. Os ratos tratados com o extrato 8020 receberam em média 7,36 mg/kg de ACG e 0,28 mg/kg de ACF. Os ratos tratados com o extrato 9030 receberam em média 6,77 mg/kg de ACG e 0,46 mg/kg de ACF.

Confirmando o que foi anteriormente discutido, nenhum dos extratos que apresentaram alta concentração de ACG (acima de 5,0 mg/kg; 6d50, 8020 e 9030) apresentou atividade hipoglicemiante, mais uma vez sugerindo uma atividade dose-dependente. Nicasio e colaboradores (2005) avaliaram a atividade hipoglicemiante de extratos metanólicos de

duas espécies de *Cecropia* (*obtusifolia* e *peltata*) e também concluíram que a atividade do ACG seria dose-dependente. Além disso, pode-se verificar um efeito sinérgico entre os dois ácidos (ACG e ACF) na proporção 1:1, uma vez que mantida esta relação o efeito hipoglicemiante foi potencializado.

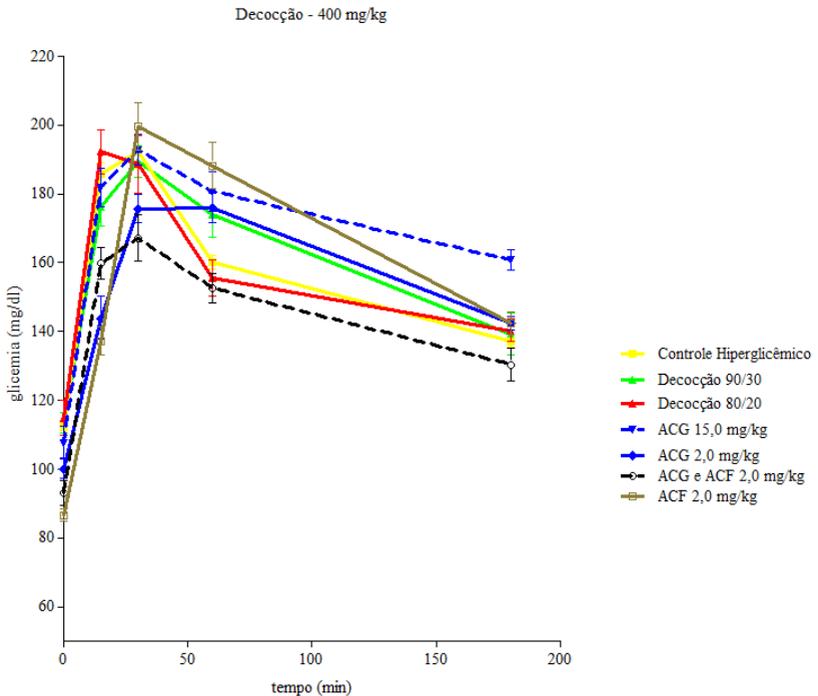


Figura 27. Gráfico comparativo do efeito agudo entre os marcadores químicos (isolados e em associação) e os extratos obtidos por decocção na curva de tolerância à glicose oral. Administração dos extratos liofilizados por gavagem: 400 mg/kg. Os resultados são a média \pm EPM (n = 6 – 10)

3.3.3. Avaliação dos extratos obtidos em animais diabéticos

Neste tipo de experimento, em que é necessária a indução do diabetes, a taxa da glicemia dos animais que apresentam a patologia é bastante variável, sendo considerados diabéticos animais com glicemia acima de 300 mg/dL (CAZAROLLI, 2009). Desta forma, para possibilitar a comparação entre os grupos, todos os animais tem determinada sua

taxa glicêmica no tempo zero, ou seja, antes da administração das amostras. Neste trabalho, o valor médio de glicemia inicial de cada grupo foi considerado como valor referência e a alteração em cada um dos tempos estudados foi definida como a variação percentual em relação a este valor inicial.

Como comparativos para os dois tipos de extratos foi avaliada inicialmente a atividade dos marcadores químicos isolados e em associação. O ACG, na concentração de 15 mg/kg, como pode ser observado nas figuras 28 e 29, acarreta uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) da glicemia dos animais diabéticos em 2 e 3 horas (em torno de 30 % da glicemia, quando comparado ao tempo zero do mesmo grupo). Estudos similares demonstram a utilização de uma concentração bem próxima de ACG ou de outras substâncias em que se espera encontrar atividade anti-diabética (ANDRADE-CETTO, 2001; HSU, 2003). Em outros casos a dose testada neste trabalho esteve abaixo do que se tem observado (CAZAROLLI, 2009).

O ACG também foi testado na concentração equivalente a dos extratos, 2,0 mg/kg, não sendo observada alteração na glicemia dos animais, indicando que a resposta para o ACG em animais diabéticos é dose-dependente. Ao contrário do que é observado nos ratos hiperglicêmicos, a redução da glicemia só ocorre em concentrações mais elevadas do ácido.

O ACF e a associação deste com o ACG também foram testados na concentração de 2,0 mg/kg e em nenhuma destas situações foi observada a redução na glicemia.

Todos os extratos, tanto os obtidos por maceração quanto os por decocção, foram testados na concentração de 400 mg/kg, mas independente do método de extração utilizado, nenhum deles apresentou resultados satisfatórios para a atividade anti-diabética. Cabe salientar que neste estudo somente os marcadores isolados foram capazes de reduzir a glicemia quando comparados ao controle.

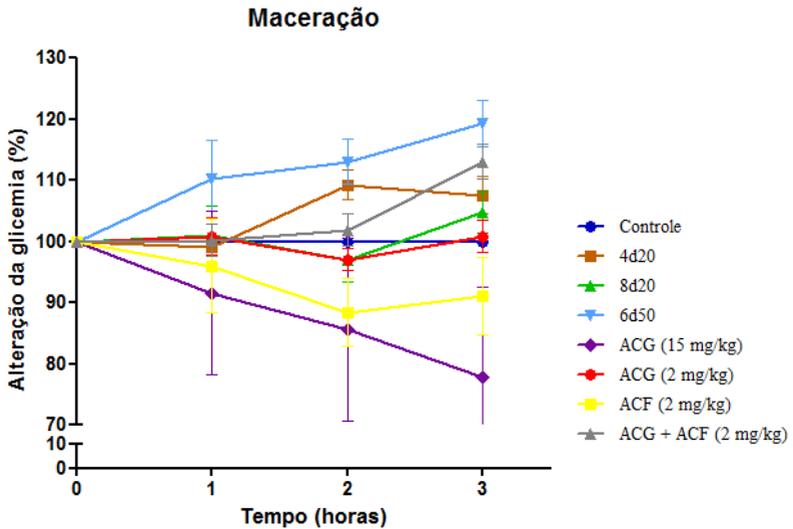


Figura 28. Alteração percentual da glicemia em ratos diabéticos após administração dos extratos obtidos por maceração (400 mg/kg) e dos marcadores químicos isolados e em associação

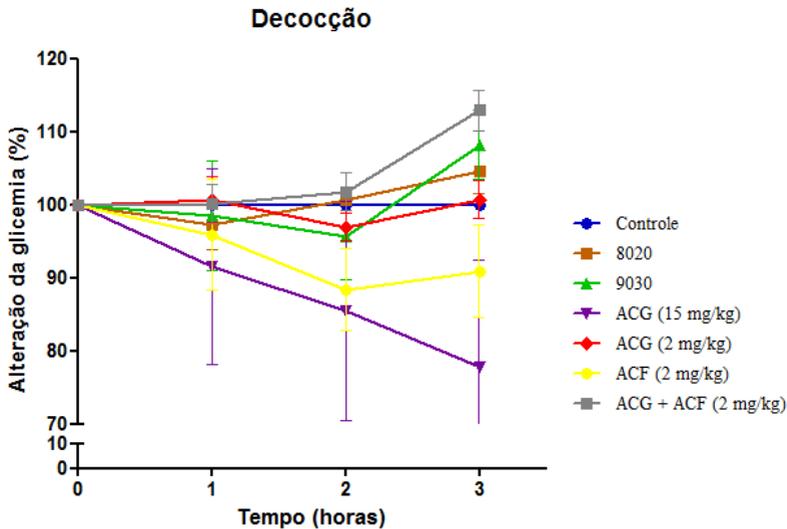


Figura 29. Alteração percentual da glicemia em ratos diabéticos após administração dos extratos obtidos por decocção (400 mg/kg) e dos marcadores químicos isolados e em associação

Os resultados obtidos neste estudo revelam uma capacidade de diminuição da glicemia em ratos hiperglicêmicos, atividade esta ainda não relatada para a *C. glaziovii*, o que pode ser considerado um resultado bastante interessante. No entanto, diferente do que é relatado pelo trabalho de Revilla-Monsalve e colaboradores (2007) com a *C. obtusifolia*, foi evidenciada uma atividade secretagoga de insulina, uma vez que em animais com a hiperglicemia induzida as células β pancreáticas encontram-se intactas e em bom funcionamento, capazes de produzir insulina. Por outro lado, os resultados obtidos em animais diabéticos sugerem a ausência de ação insulino-mimética.

3.4. Avaliação *ex vivo* da atividade anti-hipertensiva

A *C. glaziovii* vem sendo utilizada na medicina tradicional na forma de infusão (chá) como anti-hipertensiva, cardiotônica e antiasmática (ROCHA, 2002). Lima-Landman e colaboradores (2007) analisaram o extrato aquoso de *C. glaziovii* e a fração butanólica deste quanto à atividade anti-hipertensiva, obtendo resultados satisfatórios. Com base nesses resultados, este trabalho pretendeu avaliar a atividade anti-

hipertensiva do extrato bruto aquoso, assim como de extratos obtidos por maceração com etanol, buscando evidenciar a ação sinérgica dos diferentes compostos.

A possível atividade anti-hipertensiva dos extratos brutos liofilizados 4d20, 8d20, 9030 e 8020 foi investigada através da avaliação do efeito sobre a reatividade vascular em anéis de aorta torácica isolada de ratos. A aorta é seccionada na forma de anéis de 3 a 4 mm de comprimento e mantida em condições ideais. Duas hastes metálicas são inseridas na luz do vaso, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica acoplado a um sistema de aquisição de dados. Após o período de equilíbrio (60 minutos) as preparações são contraídas com fenilefrina (1 μM) e a presença do endotélio funcional é avaliada pela capacidade da acetilcolina (ACh, 1 μM) induzir ao relaxamento das preparações. Somente as preparações que apresentarem relaxamento igual ou superior a 75 % serão consideradas com endotélio íntegro. Em seguida as amostras (extratos) são testadas após nova contração dos anéis com fenilefrina, construindo-se curvas relacionando dose-resposta.

Neste estudo foram construídas curvas concentração resposta (CCR) cumulativas na presença de endotélio funcional, demonstradas na figura 30. Todos os extratos apresentaram capacidade de induzir o relaxamento dos anéis de aorta, mas as CCR cumulativas demonstraram um efeito vasodilatador mais pronunciado nos EM quando comparados aos ED, significando que uma resposta semelhante pode ser conseguida com menores concentrações de extrato. Comparando estes resultados a estudos realizados com *Cyathea phalerata* Mart. (HORT, 2006), observa-se uma diminuição da contração da aorta bastante surpreendente. No trabalho citado, a concentração de início de relaxamento de uma fração solúvel em acetato de etila está em torno de 30 $\mu\text{g/mL}$. Os extratos brutos liofilizados estudados de *C. glaziovii* apresentam uma concentração de início de relaxamento dos anéis de aorta em torno de 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Outros estudos relatam concentrações ainda maiores de extratos ou frações enriquecidas para obtenção da atividade vasodilatadora (CAMPANA, 2009; DALBÓ, 2008).

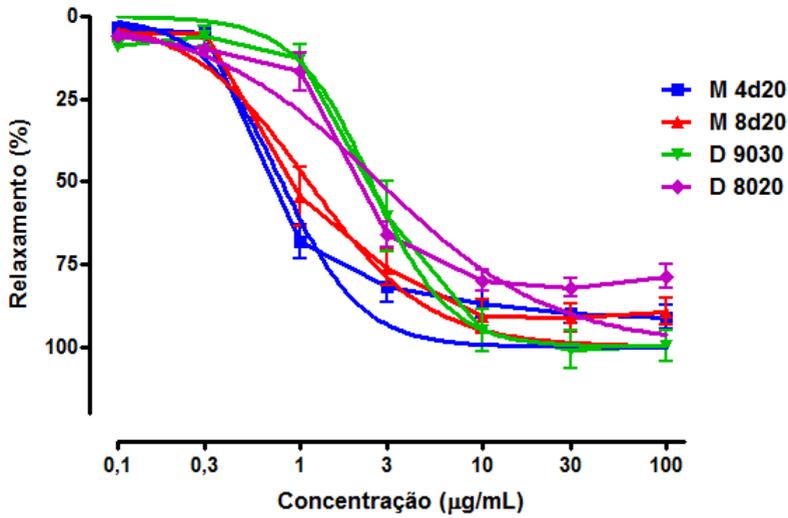


Figura 30. Curvas concentração resposta cumulativas aos extratos liofilizados obtidos por maceração e por decocção (0,1 – 1000 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato, contraídos previamente com fenilefrina (1 µM). Cada ponto representa média ± EPM de 6 experimentos

Capítulo 3
Monitoramento dos teores dos marcadores
químicos nas soluções extrativas

1. APRESENTAÇÃO

Durante a avaliação dos extratos padronizados de *Cecropia glaziovii* foram observados alguns resultados inesperados. Inicialmente, o aparecimento de uma nova substância nos extratos obtidos por maceração que revelou ser o ácido cafeico, ainda não relatado para esta espécie e que passou a ser considerado como um segundo marcador químico. O teor deste ácido aumentou com a diminuição do teor alcoólico, sendo quase inexpressivo quando se utilizou a máxima concentração de etanol, 80 %, como líquido extrator. No extrato no qual o ácido cafeico apareceu em maior teor, maceração com 20 % de etanol, sua concentração aumentou com o aumento do tempo de extração, de 4 para 8 dias. No entanto, neste mesmo extrato, foi observada uma diminuição bastante expressiva do teor de ácido clorogênico, cujo teor foi reduzido praticamente à metade no mesmo período de tempo. Esta observação conduziu à busca de uma explicação plausível para este resultado surpreendente. Neste sentido, foram levantadas hipóteses sobre possível degradação microbiológica ou enzimática do ácido clorogênico. Com o intuito de avaliar estas hipóteses, foi delineado um estudo no qual foram inseridos novos fatores que poderiam evitar a ação de microorganismos e de enzimas, através da adição de conservante anti-microbiano ou da diminuição da temperatura durante o processo extrativo. Este capítulo descreve os resultados obtidos neste estudo.

2. MATERIAIS e MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Matérias-primas

Ácido cafeico (Sigma – Aldrich)
Ácido clorogênico (Sigma – Aldrich)
Folhas de *Cecropia glaziovii* Sneth

2.1.2. Solventes, soluções e reagentes

Acetonitrila grau CLAE (J. T. Baker)
Ácido acético (Qhemis)
Água mili-Q (Millipore)
Água purificada
Etanol
Metanol (J. T. Baker)

2.1.3. Aparelhos, equipamentos e materiais especiais

Aparelho de hidrodestilação FABBE

Balança Ohaus Analytical Standard

Balança semi-analítica Gehaka BG 4000

Banho de Ultrassom – UltraSonic Cleaner USC 700 Unique

Banho termostatisado Marte

Bomba de vácuo Fisatom Mod. 830

Coluna Zorbax ODS (5 μ m, 150 x 4,6 mm) Agilent

Cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer, equipado com:

Autosampler Perkin Elmer Series 200

Bomba binária Series 200

Degasser à vácuo Perkin Elmer Series 200

Detector UV/Vis Series 200

Interface 600 Series LINK

Dessecador

Estufa Nova Ética 402 3G

Membranas HVLP 0,45 μ m, com 47 e 13 mm de diâmetro Millipore

Pré-coluna Phenomenex ODS (4,0 x 3,0 mm)

Refrigerador Eletrolux R310

2.2. Metodologia

2.2.1. Linearidade das respostas por CLAE das soluções extrativas

As soluções extrativas foram preparadas conforme descrito no capítulo 2, itens 2.2.2., p. 50 e 2.2.3., p. 52.

Os extratos utilizados para este estudo foram: 8d20, 6d50 e 8d80, por representarem todas as polaridades possíveis das amostras estudadas.

As diferentes diluições foram preparadas adicionando-se o extrato em balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com metanol:água (1:1, v/v) quando necessário.

A linearidade das respostas foi determinada tanto para as concentrações de ácido clorogênico quanto para as concentrações de ácido cafeico através de regressão linear. As áreas encontradas na validação do método de doseamento de ácido clorogênico e ácido cafeico por CLAE foram utilizadas como base para a determinação do intervalo de estudo da linearidade dos extratos.

Os resultados de linearidade foram avaliados através da curva que relaciona área com concentração (mg/mL), portanto houve a necessida-

de de determinar a densidade dos extratos. As áreas obtidas que não se encontravam dentro do intervalo da curva analítica dos ácidos (clorogênico ou cafeico) não foram utilizadas para a construção da respectiva curva.

Densidade

A densidade foi determinada através do resíduo seco, onde 25,0 mL de cada uma das soluções extrativas foram colocados em pesa-filtros previamente tarados. Os pesa-filtros foram pesados, para que se pudesse determinar a relação volume / massa. A solução extrativa foi evaporada em banho de água quente, sob agitação ocasional. Após a evaporação, os pesa-filtros foram colocados em estufa a 105 °C por duas horas, resfriados em dessecador e então pesados. O resultado foi calculado em relação a 100,0 g de solução extrativa (% , m/m) pela média de três determinações do resíduo seco.

2.2.2. Estabilidade das soluções extrativas

As soluções extrativas foram preparadas segundo as condições descritas no capítulo 2, itens 2.2.2., p. 50 e 2.2.3., p. 52. Resumidamente, frascos de boca larga foram adicionados a matéria-prima vegetal moída e os diferentes líquidos extratores mantendo uma proporção planta:solvente de 5,0 %. Para cada uma das soluções extrativas (4d20, 4d80, 6d50, 8d20 e 8d80) foram também preparados extratos que foram mantidos em geladeira durante a extração (4 °C) ou tiveram o acréscimo de metilparabeno (Nipagin[®], conservante antimicrobiano ativo na faixa de 3,0 – 8,0 de pH) a 0,1 % no tempo zero (antes do início da extração). A partir de então, os frascos contendo os diferentes sistemas foram mantidos nas condições descritas por períodos de tempo pré-determinados. Decorrido este tempo, o marco foi separado das soluções extrativas por filtração à vácuo.

Delineamento Fatorial

O preparo das soluções extrativas foi baseado em dois delineamentos fatoriais desenhados obtidos com o auxílio do programa Design-Expert[®], versão 6.0.6. Cada delineamento consiste num desenho com 3 fatores e 2 níveis (máximo e mínimo) para cada fator (2^3), sendo dois fatores numéricos e um categórico. Um delineamento foi elaborado para a avaliação da influência da temperatura durante o processo extrativo dos EM, considerando como fatores numéricos o teor etanólico (% , fator

A) e o tempo (dias, fator B) e como fator categórico a temperatura (geladeira ou ambiente, fator C). Para a avaliação da influência da presença de conservante nas soluções extrativas durante o processo foram considerados os mesmos fatores A e B alterando apenas o fator C (categórico) para presença ou ausência de conservante. Dois pontos centrais foram propostos, devido o uso de fator categórico. Cada ponto foi realizado em duplicata. No total foram preparados 36 extratos, 18 para avaliação da temperatura e 18 para avaliação da influência do conservante. Os delineamentos estão detalhados nas tabelas 15 e 16. Baseado na densidade de cada extrato, os resultados foram expressos em µg de ACG ou ACF por g de extrato.

TABELA 15. Delineamento fatorial 2^3 para obtenção das soluções extrativas e respectivas condições extrativas, destinadas à avaliação da influência da temperatura no processo extrativo dos marcadores químicos

| EXP | EtOH (%) | Tempo (dias) | T |
|-----|----------|--------------|-----------|
| 1 | 20 | 4 | geladeira |
| 2 | 20 | 4 | geladeira |
| 3 | 80 | 4 | geladeira |
| 4 | 80 | 4 | geladeira |
| 5 | 20 | 8 | geladeira |
| 6 | 20 | 8 | geladeira |
| 7 | 80 | 8 | geladeira |
| 8 | 80 | 8 | geladeira |
| 9 | 20 | 4 | ambiente |
| 10 | 20 | 4 | ambiente |
| 11 | 80 | 4 | ambiente |
| 12 | 80 | 4 | ambiente |
| 13 | 20 | 8 | ambiente |
| 14 | 20 | 8 | ambiente |
| 15 | 80 | 8 | ambiente |
| 16 | 80 | 8 | ambiente |
| 17 | 50 | 6 | geladeira |
| 18 | 50 | 6 | ambiente |

EtOH (%): concentração etanólica; T: temperatura

TABELA 16. Delineamento fatorial 2^3 para obtenção das soluções extrativas destinadas à avaliação da influência do conservante no processo extrativo dos marcadores químicos

| EXP | EtOH (%) | Tempo (dias) | Conservante |
|-----|----------|--------------|-------------|
| 1 | 20 | 4 | ausência |
| 2 | 20 | 4 | ausência |
| 3 | 80 | 4 | ausência |
| 4 | 80 | 4 | ausência |
| 5 | 20 | 8 | ausência |
| 6 | 20 | 8 | ausência |
| 7 | 80 | 8 | ausência |
| 8 | 80 | 8 | ausência |
| 9 | 20 | 4 | presença |
| 10 | 20 | 4 | presença |
| 11 | 80 | 4 | presença |
| 12 | 80 | 4 | presença |
| 13 | 20 | 8 | presença |
| 14 | 20 | 8 | presença |
| 15 | 80 | 8 | presença |
| 16 | 80 | 8 | presença |
| 17 | 50 | 6 | ausência |
| 18 | 50 | 6 | presença |

EtOH (%): concentração etanólica

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Soluções extrativas obtidas de plantas são amostras biológicas e consequentemente matrizes complexas, com a presença de inúmeras substâncias não identificadas e que podem tornar-se interferentes em análises como a CLAE, modificando a linearidade dos resultados. O teor etanólico é um fator importante na determinação da polaridade das substâncias extraídas, quanto maior o teor de etanol, menor a polaridade da solução extrativa.

O princípio de separação e quantificação de substâncias por CLAE fundamenta-se na utilização de uma fase móvel que se move sobre uma fase estacionária arrastando consigo os compostos a serem

distribuídos entre essas duas fases. Para que esta distribuição aconteça, é preciso que as polaridades entre as fases sejam diferentes, de tal modo que permita a permanência de alguns compostos ligados à fase estacionária, enquanto outros são arrastados pela fase móvel. Uma vez que ocorre a mudança de polaridade da fase móvel e/ou da amostra injetada, tem-se a modificação ou deformação da linearidade das respostas (COLLINS, 1993).

Considerando que um volume fixo de 3 mL de extrato é adicionado em um balão volumétrico de 10 mL e seu volume completado com metanol:água (1:1, v/v), quando uma solução extrativa com 20 % de etanol for adicionada, uma determinada polaridade será obtida para esta amostra a ser analisada. Mas ao adicionarmos um extrato com 80 % de etanol a esse mesmo balão volumétrico teremos conseqüentemente uma amostra com menor polaridade. Desta forma verifica-se o potencial da solução extrativa em alterar a polaridade da amostra e com isso possivelmente a linearidade das respostas.

3.1. Linearidade das respostas por CLAE das soluções extrativas

Uma vez que a relação entre área e concentração dos marcadores químicos pode ser influenciada por fatores como polaridade do líquido extrator e composição dos diferentes extratos, é necessário assegurar-se que o intervalo de concentração considerado para a construção da curva-padrão seja linear, ou seja, que seja garantida uma relação direta entre área do pico e concentração do analito. Neste sentido, um estudo de linearidade foi conduzido para os extratos 8d20, 6d50 e 8d80 utilizando CLAE com as mesmas condições cromatográficas anteriormente validadas. Concentrações crescentes de cada extrato foram injetadas no cromatógrafo e a concentração de cada um dos marcadores foi medida. Desta forma, foram obtidas seis curvas analíticas, uma para cada marcador em cada extrato.

Para que as áreas encontradas tanto dos extratos quanto dos padrões pudessem ser comparadas em termos de massa, foi determinada a densidade de cada um dos extratos, podendo-se assim correlacionar o volume pipetado para as diluições dos extratos com a sua massa. As densidades dos extratos estudados podem ser visualizadas na tabela 17.

TABELA 17. Densidade dos extratos obtidos por maceração 8d20, 6d50 e 8d80, calculada em função do resíduo seco obtido a partir de 25 mL de solução extrativa

| Extrato | Densidade (g/cm ³) |
|---------|--------------------------------|
| 8d20 | 0,9751 |
| 6d50 | 0,9381 |
| 8d80 | 0,8678 |

Extrato 8d20

Na construção das curvas analíticas dos ACG e ACF isolados, os intervalos de área encontrados foram 124.124,50 – 10.825.077,00 uV.s e 220.669,78 – 9.158.942,30 uV.s, respectivamente (capítulo 2, página 59), o que significa que, dentro destes limites, existe uma relação linear entre área do pico e a sua concentração. Portanto, a área encontrada para cada um dos marcadores deve necessariamente encontrar-se dentro destes limites. Conforme é possível observar na tabela 18, as diluições 27,17 mg/mL para ambos os ácidos e a diluição 38,32 mg/mL para o ACF encontram-se abaixo do limite inferior. Desta forma, estas concentrações foram desconsideradas no momento de serem traçadas as curvas de linearidade do extrato 8d20. As figuras 31 e 32 apresentam as curvas obtidas para o ACG e ACF, respectivamente, onde é possível verificar a linearidade para os dois ácidos fenólicos neste extrato dentro do intervalo de concentração considerado.

TABELA 18. Áreas médias dos picos de ACG e ACF obtidas de diferentes diluições do extrato 8d20 para determinação da linearidade das respostas por CLAE

| Concentração extrato (mg/mL) | Área – ACG (uV.s) | Área – ACF (uV.s) |
|------------------------------|-------------------|-------------------|
| 27,17 | 120823,08 | 137908,32 |
| 38,82 | 171.576,43 | 195816,67 |
| 85,39 | 400.615,68 | 441.030,54 |
| 178,55 | 834.154,84 | 921.659,43 |
| 232,89 | 1.065.710,89 | 1.154.351,24 |
| 357,10 | 1.654.292,98 | 1.846.993,42 |
| 543,41 | 2.571.613,09 | 2.832.159,26 |
| 714,20 | 3.377.151,99 | 3.645.350,37 |
| 776,30 | 3.510.501,01 | 3.976.519,37 |

Linearidade 8d20 - ACG

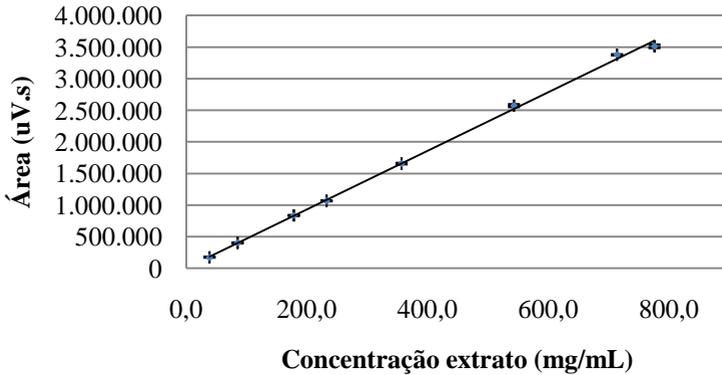


Figura 31. Curva média de linearidade do extrato 8d20 para análise do marcador químico ácido clorogênico obtida por CLAE. Intervalo de linearidade 38,32 – 776,30 mg/mL. Coeficiente de correlação, 0,9993; equação da reta: $y = 4632,6x + 3435,5$

Linearidade 8d20 - ACF

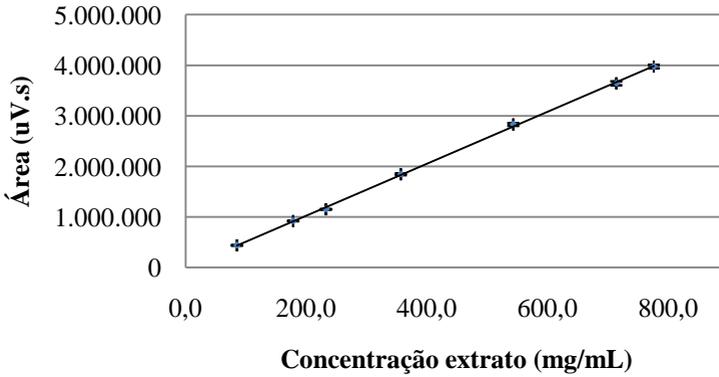


Figura 32. Curva média de linearidade do extrato 8d20 para análise do marcador químico ácido cafeico obtida por CLAE. Intervalo de linearidade 85,39 – 776,30 mg/mL. Coeficiente de correlação, 0,9998; equação da reta: $y = 5135,1x + 1591,4$

Com base nestes resultados pode-se inferir que o extrato 8d20 deve ser analisado numa concentração acima de 85,39 mg/mL, pois somente a partir desta concentração é possível obter respostas lineares para os dois marcadores químicos.

Extrato 6d50

A tabela 19 apresenta as áreas dos picos dos ácidos clorogênico e cafeico nas diluições das soluções extrativas. Nesta tabela é possível observar que, da mesma forma que para o extrato 8d20, existem áreas que se encontram abaixo do intervalo determinado pelas curvas analíticas (124.124,50 – 10.825.077,00 uV.s para o ACG e 220.669,78 – 9.158.942,30 uV.s para o ACF, ver capítulo 2, página 59). Portanto esses pontos devem ser retirados das curvas analíticas, reduzindo a faixa de concentração de linearidade das respostas.

TABELA 19. Áreas médias dos picos de ACG e ACF obtidas de diferentes diluições do extrato 6d50 para determinação da linearidade das respostas por CLAE

| Concentração extrato (mg/mL) | Área – ACG (uV.s) | Área – ACF (uV.s) |
|------------------------------|-------------------|-------------------|
| 11,65 | 109.842,31 | 7.238,97 |
| 23,30 | 257.119,47 | 16.640,20 |
| 46,60 | 519.887,05 | 37.421,13 |
| 93,20 | 989.102,90 | 73.351,94 |
| 186,40 | 1.840.600,78 | 155.756,67 |
| 279,60 | 2.522.003,79 | 238.732,96 |
| 354,16 | 3.016.827,62 | 295.318,15 |
| 419,40 | 3.357.912,63 | 349.689,09 |
| 559,20 | 4.029.543,08 | 466.214,31 |
| 699,00 | 4.622.032,17 | 592.477,86 |
| 932,00 | 5.503.401,58 | 767.357,73 |

Na análise por regressão linear da curva demonstrada na figura 33, que representa as áreas dos picos do ACG *versus* concentração da solução extrativa, pode-se observar que a mesma apresenta um valor não satisfatório ($r = 0,9819$). Desta forma, foi necessária a redução do intervalo da curva com a retirada dos pontos de maior diluição dos extratos. Portanto o intervalo de concentração do extrato 6d50 no qual a área do pico de ACG apresenta uma relação linear e pode ser co-relacionada com seu teor é de 279,60 a 932,00 mg/mL (figura 34).

Por outro lado, a curva ACF apresentou excelente linearidade, demonstrada pelo coeficiente de correlação igual a 0,9996 (figura 35).

Linearidade 6d50 - ACG

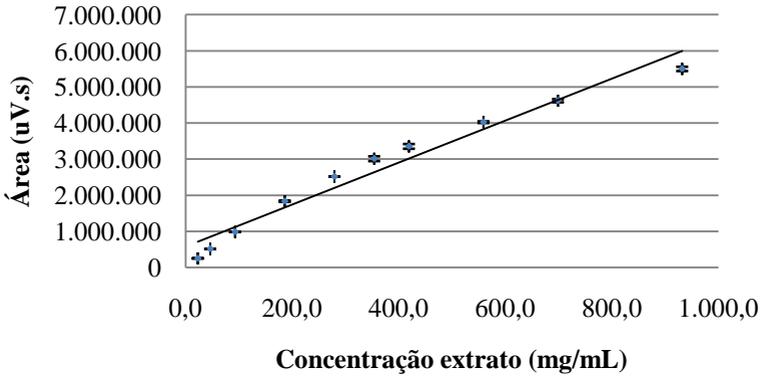


Figura 33. Curva média de linearidade do extrato 6d50 para análise do marcador químico ácido clorogênico obtida por CLAE. Intervalo de linearidade 23,30 – 932,00 mg/mL. Coeficiente de correlação, 0,9819; equação da reta: $y = 5819,1x + 575133$

Linearidade 6d50 - ACG

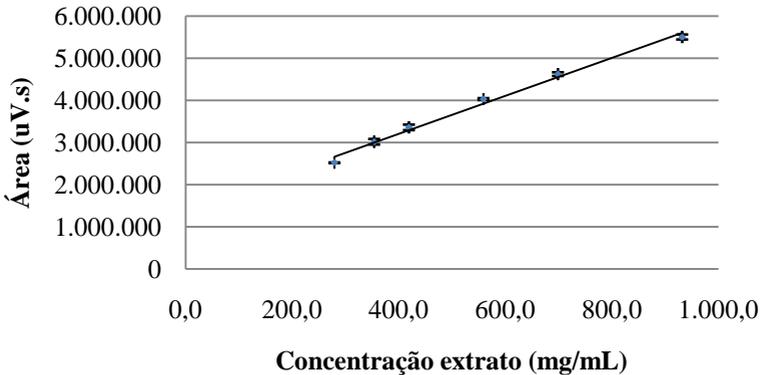


Figura 34. Curva média corrigida de linearidade do extrato 6d50 para análise do marcador químico ácido clorogênico obtida por CLAE. Intervalo de linearidade 279,60 – 932,00 mg/mL. Coeficiente de correlação, 0,9958; equação da reta : $y = 4504,9x + 1406787,3$

Linearidade 6d50 - ACF

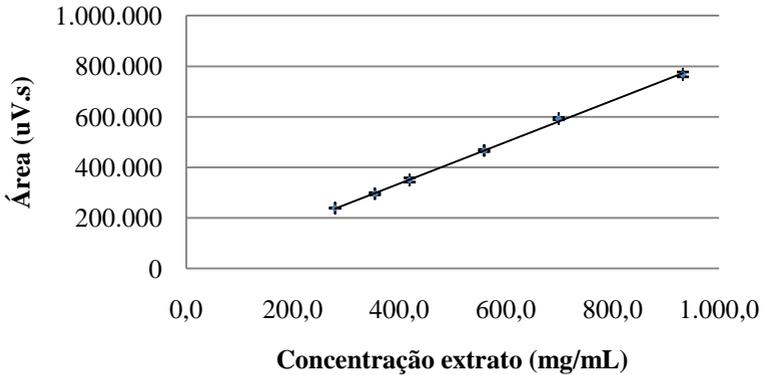


Figura 35. Curva média de linearidade do extrato 6d50 para análise do marcador químico ácido cafeico obtida por CLAE. Intervalo de linearidade 279,60 – 932,00 mg/mL. Coeficiente de correlação, 0,9996; equação da reta: $y = 821,14x + 7757,6$

Com base nestes resultados pode-se inferir que o extrato 6d50 deve ser analisado numa concentração acima de 279,60 mg/mL, pois somente a partir desta concentração é possível obter respostas lineares para os dois marcadores químicos.

Extrato 8d80

A tabela 20 apresenta as áreas dos picos dos ácidos clorogênico e cafeico nas diluições das soluções extrativas. Nesta tabela é possível observar que todas as áreas encontram-se abaixo do limite inferior de linearidade da curva analítica do ACF (220.669,78 – 9.158.942,30 uV.s), ver capítulo 2, página 59). Portanto, não foi possível traçar a curva analítica do extrato 8d80 para o ACF.

A figura 36 apresenta a curva obtida para o ACG, onde é possível verificar a linearidade para este ácido fenólico neste extrato nas diluições estudadas.

TABELA 20. Áreas médias dos picos de ACG e ACF obtidas de diferentes diluições do extrato 8d80 para determinação da linearidade das respostas por CLAE

| Concentração extrato (mg/mL) | Área – ACG (uV.s) | Área – ACF (uV.s) |
|------------------------------|-------------------|-------------------|
| 13,27 | 174.694,59 | 6.511,37 |
| 22,75 | 297.650,97 | 8.426,98 |
| 41,70 | 560.347,95 | 19.299,99 |
| 83,40 | 1.076.881,48 | 42.484,99 |
| 166,80 | 1.899.433,83 | 92.037,18 |
| 227,50 | 2.242.411,72 | 123.178,06 |
| 333,61 | 2.634.238,01 | 169.260,98 |
| 454,92 | 3.049.574,38 | |
| 568,65 | 3.434.325,37 | |
| 758,20 | 3.976.159,07 | |

Linearidade 8d80 - ACG

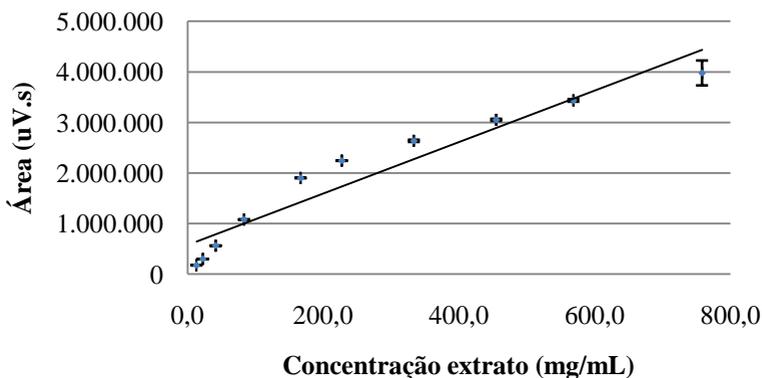


Figura 36. Curva média de linearidade do extrato 8d80 para análise do marcador químico ácido clorogênico obtida por CLAE. Intervalo de linearidade 13,27 – 758,20 mg/mL. Coeficiente de correlação, 0,9607; equação da reta: $y = 5093,8x + 574127$

Na análise por regressão linear da curva demonstrada na figura 36, que representa as áreas dos picos do ACG *versus* concentração da solução extrativa, pode-se observar que a mesma apresenta um valor não satisfatório ($r = 0,9607$). Desta forma, foi necessária a redução do intervalo da curva com a retirada dos pontos de maior diluição dos extratos. Portanto o intervalo de concentração do extrato 8d80 no qual a área do pico de ACG apresenta uma relação linear e pode ser co-relacionada com seu teor é de 166,80 a 758,20 mg/mL (figura 37).

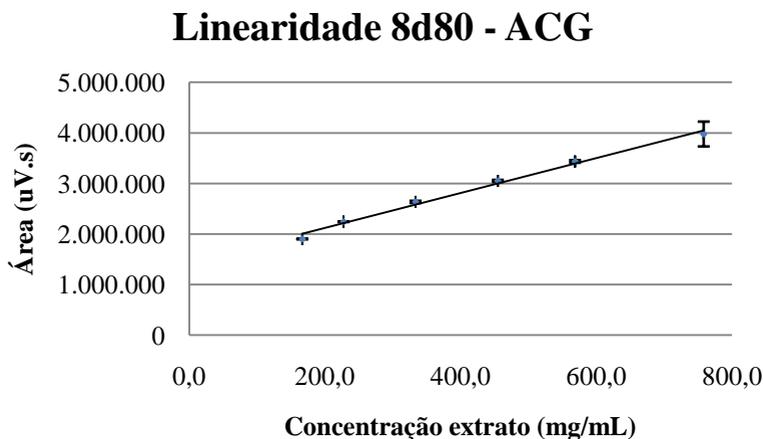


Figura 37. Curva média corrigida de linearidade do extrato 8d80 para análise do marcador químico ácido clorogênico obtida por CLAE. Intervalo de linearidade 166,80 – 758,20 mg/mL. Coeficiente de correlação, 0,9959; equação da reta: $y = 3455,9x + 1427156,27$

A figura 38 apresenta um cromatograma do extrato 8d80 injetado na concentração de 758,20 mg/mL, que corresponde à injeção direta do extrato no cromatógrafo, sem diluição prévia. Neste cromatograma pode ser observada a indefinição e a pouca relevância da área do pico do ACF

(tempo de retenção de 6,0 minutos) nestas condições. De fato, concentrações de extrato acima de 333,61 mg/mL resultam na diminuição da resolução do pico, não permitindo que a área seja determinada. Por outro lado, em concentrações inferiores a este valor, mesmo com melhor resolução, o pico apresenta área inferior à área de menor concentração obtida na curva analítica do padrão do ácido, apesar de manter-se dentro do limite de quantificação do método.

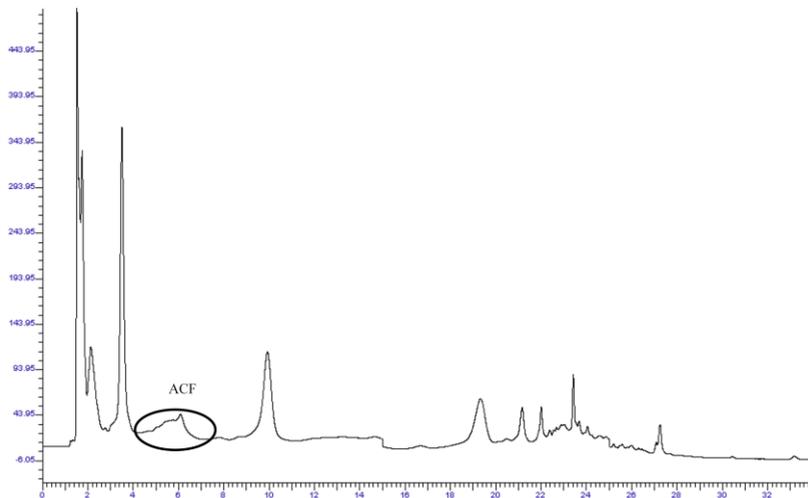


Figura 38. Perfil cromatográfico do extrato 8d80 a 758,20 mg/mL obtido por CLAE. Fase móvel em sistema de gradiente, fluxo 1,0 mL/min., detecção a 330nm

Com base nos resultados obtidos, para obter respostas lineares e, assim, garantir a confiabilidade do doseamento do ACG no extrato 8d80, a concentração mínima do extrato em diluições deverá ser de 166,80 mg/mL.

De maneira geral, os extratos etanólicos de *Cecropia glaziovii* deverão ser analisados por CLAE na faixa de 280,0 a 775,0 mg/mL.

3.2. Estabilidade das soluções extrativas

A análise dos teores encontrados para os marcadores químicos nos diferentes extratos obtidos por maceração mostrou alguns resultados inesperados e surpreendentes, já comentados anteriormente, principalmente com relação aos extratos preparados com 20 % de etanol. Nestes extratos, encontrou-se uma concentração de 130 $\mu\text{g/mL}$ para o ACG após 4 dias de processo extrativo (solução 4d20); no entanto, após 8 dias a concentração deste marcador caiu para cerca de 75 $\mu\text{g/mL}$ (solução 8d20). Por outro lado, a concentração de ACF no mesmo período aumentou de 36 para 58 $\mu\text{g/mL}$. Considerando que, por tratar-se de um dímero, a degradação do ACG pode levar a um aumento da concentração de ACF e que os teores de ACF são consideravelmente mais baixos nas outras EM, com concentrações alcoólicas mais elevadas a busca por uma possível explicação para este fato tornou-se necessária, levando ao estudo da estabilidade dos EM durante o processo extrativo e não como costumeiramente é encontrado, após o período de extração (HEBERLÉ, 2000; WEI, 2007; VATAI, 2009).

Os compostos fenólicos são substâncias sensíveis à luz, aquecimento e à presença de oxigênio (MA, 2009). Portanto, a suposta degradação do ACG poderia ser consequência de uma reação química e/ou enzimática ou ainda microbiológica.

Desta forma, foram elaborados dois novos planejamentos fatoriais, onde foram incluídos como fatores categóricos a temperatura e a presença de conservante. Os resultados deste estudo são apresentados nas tabelas 21 e 23.

TABELA 21. Resultados de quantificação dos marcadores químicos ACG e ACF nos extratos obtidos por delineamento fatorial 2^3 em diferentes condições extrativas, destinadas à avaliação da influência da temperatura no processo extrativo dos marcadores

| EXP | Extrato | T | ACG ($\mu\text{g/g}$) | ACF ($\mu\text{g/g}$) |
|-----|---------|-----------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | 4d20 | geladeira | 112,24 | 21,38 |
| 2 | 4d20 | geladeira | 116,12 | 18,95 |
| 3 | 4d80 | geladeira | 152,89 | 5,60 |
| 4 | 4d80 | geladeira | 139,65 | 4,94 |
| 5 | 8d20 | geladeira | 84,81 | 31,32 |
| 6 | 8d20 | geladeira | 90,32 | 30,95 |
| 7 | 8d80 | geladeira | 145,86 | 5,45 |
| 8 | 8d80 | geladeira | 145,56 | 5,59 |
| 9 | 4d20 | ambiente | 97,01 | 32,65 |
| 10 | 4d20 | ambiente | 119,15 | 34,64 |
| 11 | 4d80 | ambiente | 173,59 | 6,17 |
| 12 | 4d80 | ambiente | 140,35 | 4,90 |
| 13 | 8d20 | ambiente | 62,76 | 46,21 |
| 14 | 8d20 | ambiente | 67,62 | 42,79 |
| 15 | 8d80 | ambiente | 155,19 | 5,90 |
| 16 | 8d80 | ambiente | 159,86 | 6,12 |
| 17 | 6d50 | geladeira | 160,75 | 7,85 |
| 18 | 6d50 | ambiente | 165,09 | 10,07 |

T: temperatura

Para avaliar o nível de significância dos fatores e as possíveis interações entre eles em um delineamento fatorial, é necessário que a variação entre os valores das respostas seja estabelecida. Quando a relação entre o maior e o menor valor de uma determinada resposta é superior a 10, uma transformação é requerida, podendo esta ser do tipo raiz quadrada, base log, base \log_{10} .

No caso do ACF foi requerida uma transformação para melhor avaliação destes resultados, uma vez que a razão entre as concentrações máxima e mínima de ACF encontrada nos extratos foi de 9,44, sendo recomendada pelo programa Design-Expert a transformação dos resultados em raiz quadrada (*square root*, $\lambda = 0,5$).

A adequação do modelo foi avaliada pelo teste-F e determinada pelo coeficiente R^2 . O valor-F do modelo para ACG é de 33,58 e para o ACF é de 552,06, indicando que existe apenas 0,01% de chance do valor-F ser consequência do ruído, sendo o modelo considerado adequado. A análise de variância (ANOVA) também mostrou serem os fatores do modelo adequados para a avaliação a que se destina, comprovado pelo valor de $p < 0,0001$ tanto para o ACG quanto o ACF (tabela 22). Os valores dos R^2 preditos estão de acordo com os R^2 ajustados para os dois ácidos e não há falta de ajuste ao modelo, uma vez que os valores de *lack of fit* (falta de ajuste) não são significativos ($p > 0,05$). A curvatura é significativa para ambos, sugerindo que o traçado tridimensional dessas respostas é mais curvilíneo do que linear no espaço de desenho estudado.

Os resultados apresentam fortes evidências de interação entre os fatores concentração de etanol e tempo, assim como entre a concentração de etanol e a temperatura tanto para a concentração do ACG quanto do ACF durante a extração ($p < 0,05$) (tabela 22). Entretanto os efeitos dessas interações são diferentes. No caso do ACG isso implica dizer que num menor tempo de extração (4 dias) um aumento na concentração de etanol e da temperatura leva a um considerável aumento da concentração do ácido (figura 39a e 39b), enquanto num maior tempo de extração (8 dias), em baixa concentração de etanol (20%), ocorre um decréscimo nessa concentração, independente da temperatura (figura 39a e 39b).

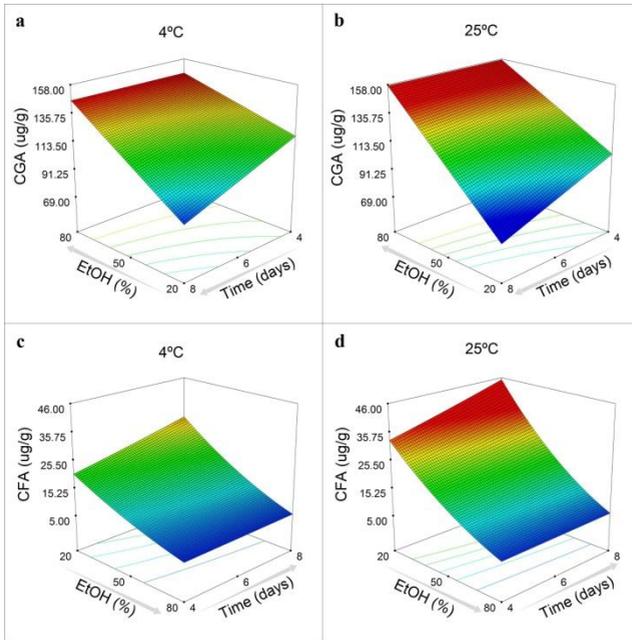


Figura 39. Gráficos tridimensionais dos resultados obtidos na quantificação dos marcadores químicos ACG e ACF no estudo de estabilidade relacionando os fatores concentração de etanol (A), tempo (B) e avaliação da influência da temperatura (C) dos extratos obtidos por maceração. (a) influência no teor de ACG a 4 °C; (b) influência no teor de ACG a 25 °C; (c) influência no teor de ACF a 4 °C e (d) influência no teor de ACF a 25 °C

Ao contrário, quando falamos em termos de ACF, observa-se um aumento da sua concentração conforme aumenta o tempo (8 dias) e a temperatura (ambiente), numa menor concentração de etanol (20 %) (figura 39c e 39d).

TABELA 22. Análise de variância dos resultados de quantificação dos marcadores químicos ACG e ACF nos extratos obtidos por maceração utilizando delineamento fatorial 2^3 em diferentes condições extrativas, destinadas à avaliação da influência da temperatura e da presença de conservante no processo extrativo dos marcadores ($p \leq 0,05$)

| ANOVA | Valor - p | | | |
|-----------------------|-------------|----------|-------------|----------|
| | Temperatura | | Conservante | |
| | ACG | ACF | ACG | ACF |
| Modelo | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |
| A | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |
| B | 0,0049 | < 0,0001 | 0,0072 | 0,0001 |
| C | 0,8598 | < 0,0001 | -- | 0,0025 |
| AB | 0,0049 | < 0,0001 | 0,0009 | 0,0255 |
| AC | 0,0258 | < 0,0001 | -- | 0,0059 |
| Curvatura | 0,0002 | < 0,0001 | < 0,0001 | 0,0001 |
| <i>Lack of Fit</i> | 0,741 | 0,3872 | 0,7574 | 0,4334 |
| R^2 | 0,9385 | 0,996 | 0,9452 | 0,9958 |
| Adj R^2 | 0,9106 | 0,9942 | 0,9326 | 0,9939 |
| Pred R^2 | 0,8661 | 0,989 | 0,9171 | 0,9874 |
| <i>Adeq Precision</i> | 15,184 | 53,808 | 19,359 | 48,172 |

ACF, delineamento temperatura: Transformação recomendada: *Square root* ($\Lambda = 0,5$)

ACF, delineamento conservante: Transformação recomendada: Base 10 log ($\Lambda = 0,0$)

Fator A: Concentração de etanol (%)

Fator B: Tempo (dias)

Fator C: Temperatura ou conservante

Lack of Fit: Falta de ajuste

Adj R^2 : R^2 ajustado

Pred R^2 : R^2 predito

Da mesma forma que no caso da temperatura, o modelo escolhido para avaliação da influência do conservante também foi a interação entre 2 fatores (2FI) para as duas respostas. No caso do ACF, uma vez que a razão entre as concentrações máxima e mínima de ACF encontradas nos extratos foi de 9,44, os resultados foram transformados para melhor avaliação, nesse caso, sendo recomendada pelo programa a transformação dos resultados em base \log_{10} (Base 10 log, $\lambda = 0,0$).

A adequação do modelo foi avaliada pelo teste-F e determinada pelo coeficiente R^2 . O valor-F do modelo para ACG é de 74,79 e para o ACF é de 526,29, indicando que existe apenas 0,01 % de chance do valor-F ser consequência do ruído, indicando a adequação do modelo. A análise de variância (ANOVA) mostrou que os fatores do modelo são adequados para a avaliação a que se destina, comprovado pelo valor de $p < 0,0001$ tanto para o ACG quanto o ACF (tabela 22). Os valores dos R^2 preditos estão de acordo com os R^2 ajustados para os dois ácidos e não há falta de ajuste ao modelo, uma vez que os valores de *lack of fit* (falta de ajuste) não são significativos ($p > 0,05$). A curvatura é significativa para ambos, sugerindo que o traçado tridimensional dessas respostas é mais curvilíneo do que linear no espaço de desenho estudado.

TABELA 23. Resultados de quantificação dos marcadores químicos ACG e ACF nos extratos obtidos por delineamento fatorial 2^3 em presença ou ausência de conservante, destinados à avaliação da influência deste no processo extrativo dos marcadores

| EXP | Extrato | Conservante | ACG ($\mu\text{g/g}$) | ACF ($\mu\text{g/g}$) |
|-----|---------|-------------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | 4d20 | ausência | 119,15 | 34,64 |
| 2 | 4d20 | ausência | 97,01 | 32,65 |
| 3 | 4d80 | ausência | 173,59 | 6,17 |
| 4 | 4d80 | ausência | 139,86 | 4,90 |
| 5 | 8d20 | ausência | 62,76 | 46,21 |
| 6 | 8d20 | ausência | 67,62 | 42,79 |
| 7 | 8d80 | ausência | 155,19 | 5,90 |
| 8 | 8d80 | ausência | 159,86 | 6,12 |
| 9 | 4d20 | presença | 100,18 | 25,82 |
| 10 | 4d20 | presença | 101,45 | 24,81 |
| 11 | 4d80 | presença | 140,15 | 4,92 |
| 12 | 4d80 | presença | 148,64 | 5,53 |
| 13 | 8d20 | presença | 72,04 | 34,53 |
| 14 | 8d20 | presença | 74,45 | 34,49 |
| 15 | 8d80 | presença | 155,14 | 6,02 |
| 16 | 8d80 | presença | 152,43 | 5,93 |
| 17 | 6d50 | ausência | 165,09 | 10,07 |
| 18 | 6d50 | presença | 166,51 | 10,34 |

A interação entre os fatores concentração de etanol e tempo é significativa para as respostas do ACG. O comportamento desta interação é o mesmo do anteriormente descrito para a temperatura. Com o aumento da concentração de etanol há um incremento na concentração do ACG (figura 40a e 40b). Por outro lado com 20 % de etanol num período de 8 dias, a concentração do ACG diminui, como previamente discutido. O fator presença de conservante não é significativo, indicando que a presença ou não deste não altera a concentração do ácido (figura 40a e 40b). Este fato sugere que a diminuição do ACG no extrato 8d20 quando comparado ao 4d20 não ocorre devido à ação microbiana durante o processo de extração. Para o ACF, observa-se a influência das interações entre a concentração de etanol e o tempo, assim como entre a

concentração de etanol e a presença de conservante. Com a diminuição do teor etanólico e aumento do tempo, ocorre o aumento do ACF (figura 40c e 40d). Para a interação entre a concentração de etanol e a presença de conservante, a maior extração de ACF acontece com 20 % etanol na ausência de conservante (figura 40c).

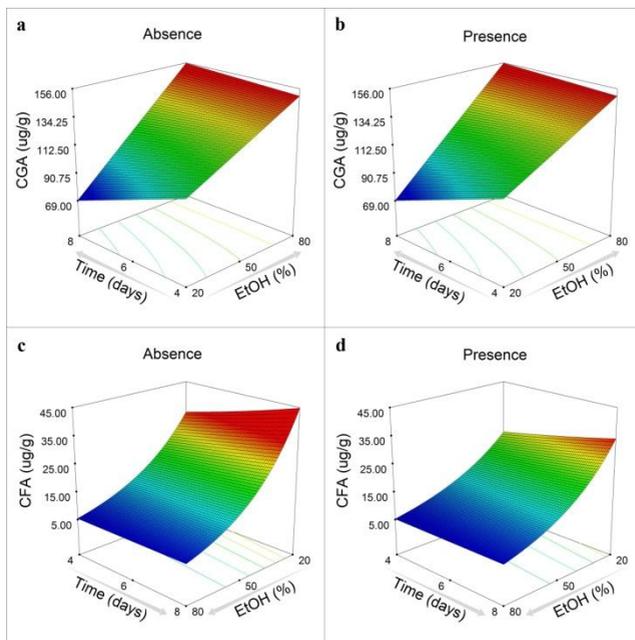


Figura 40. Gráficos tridimensionais dos resultados obtidos na quantificação dos marcadores químicos ACG e ACF no estudo de estabilidade relacionando os fatores concentração de etanol (A), tempo (B) e avaliação da presença de conservante (C) dos extratos obtidos por maceração. (a) influência da ausência de conservante no teor de ACG; (b) influência da presença de conservante no teor de ACG; (c) influência da ausência de conservante no teor de ACF e (d) influência da presença de conservante no teor de ACF

Após avaliação detalhada dos resultados obtidos, verifica-se que estes não permitem afirmar que a diminuição do ACG em função do tempo ocorre devido a uma possível degradação microbiológica. Isto porque o perfil de diminuição do ACG em 8 dias se manteve em todas

as condições estudadas, não sendo alterado na presença ou ausência do conservante.

Além disso, valores mais baixos de temperatura interferem no processo extrativo, diminuindo a possibilidade de reações químicas, a ação enzimática, assim como o poder extrativo do solvente nestas condições. Desta forma, os resultados obtidos não nos permitem uma afirmação conclusiva quanto ao fator responsável pela diminuição da concentração do ACG ao longo do tempo quando da utilização do etanol a 20 %. Sendo necessários estudos adicionais para tentarmos responder a este questionamento.

Capítulo 4
Desenvolvimento do sistema
microestruturado

1. APRESENTAÇÃO

O desafio no desenvolvimento de novos sistemas de liberação modificada de fármacos tem estimulado inúmeros investimentos na investigação científica na área de Tecnologia Farmacêutica nas últimas décadas. Diferentes tecnologias têm obtido pleno sucesso científico e comercial, sendo que os sistemas particulados têm-se destacado em relação a sistemas monolíticos tradicionalmente utilizados, tais como comprimidos e cápsulas. Assim, o desenvolvimento de novos sistemas multiparticulados de liberação modificada destinados à administração pela via oral, especialmente os sistemas microestruturados, por sua excepcional capacidade de controle da liberação das substâncias encapsuladas, redução dos efeitos colaterais e diminuição na frequência de administração do medicamento, ocupam posição relevante no tratamento de patologias que necessitam de esquemas terapêuticos para administração contínua de fármacos, como é o caso do Diabetes melito e da hipertensão arterial.

Neste capítulo foi realizado um estudo preliminar de formulação com vistas a desenvolver um sistema microestruturado para a encapsulação dos extratos padronizados de *Cecropia glaziovii* que apresentaram um melhor desempenho na avaliação das atividades hipoglicemiante e anti-hipertensiva.

2. MATERIAIS e MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Matérias-primas

Diclorometano P.A. (Cromoline)

Eudragit® RS100 (Röhm Pharma)

Extrato de *C. glaziovii* Sneth ED 9030 liofilizado

Extrato de *C. glaziovii* Sneth EM 8d20 liofilizado

2.1.2. Solventes, soluções e reagentes

Água purificada

Etanol

PVA (Mowiol 40-88 – Sigma-Aldrich)

2.1.3. Aparelhos e equipamentos

Agitador magnético ARE Heating Magnetic Stirrer VELP Scientifica
Aparelho de hidrodestilação FABBE
Balança Ohaus Analytical Standard
Balança semi-analítica Gehaka BG 4000
Banho de Ultrassom – UltraSonic Cleaner USC 700 Unique
Banho termostaticado Marte
Bomba de vácuo Fisatom Mod. 830
Centrífuga Sigma 4K15
Cronômetro Casio
Dessecador
Espectrofotômetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 10
Estufa Nova Ética 402 3G
Freezer Consul 180
Haste S25N-8G IKA - WERKE
Microscópio Eletrônico de Varredura Philips XL30
Microscópio ótico Leica DC300, software IRFANVIEW
Membrana HVLP 0,45 µm Millipore

2.2. Metodologia

2.2.1. Preparo dos extratos

Os extratos ED 9030 e EM 8d20 foram preparados conforme descrito no capítulo 2, itens 2.2.2., p. 50 e 2.2.3., p. 52. Posteriormente estes extratos foram liofilizados em alíquotas de 1,0, 2,0 e 4,0 mL, como descrito no cap. 2, item 2.2.6., página 54. Imediatamente antes da preparação das formulações de micropartículas, os liofilizados foram dispersos com a adição de 1,0 mL de água purificada, sendo assim obtidos extratos nas concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mL de extrato liofilizado/mL de água purificada.

TABELA 24. Nomenclatura estabelecida para identificação da concentração e do tipo de extrato incorporado em cada uma das formulações

| Nomenclatura | Preparação prévia dos extratos padronizados | Formulações |
|---------------------|--|--------------------|
| EM1 | 1,0 mL de extrato obtido por maceração liofilizado, posteriormente ressuspensionado em 1,0 mL de água purificada | 1, 2, 9, 10 |
| EM2 | 2,0 mL de extrato obtido por maceração liofilizados, posteriormente ressuspensionados em 1,0 mL de água purificada | 17, 19, 21, 23 |
| EM4 | 4,0 mL de extrato obtido por maceração liofilizados, posteriormente ressuspensionados em 1,0 mL de água purificada | 5, 6, 13, 14 |
| ED1 | 1,0 mL de extrato obtido por decocção liofilizado, posteriormente ressuspensionado em 1,0 mL de água purificada | 3, 4, 11, 12 |
| ED2 | 2,0 mL de extrato obtido por decocção liofilizados, posteriormente ressuspensionados em 1,0 mL de água purificada | 18, 20, 22, 24 |
| ED4 | 4,0 mL de extrato obtido por decocção liofilizados, posteriormente ressuspensionados em 1,0 mL de água purificada | 7, 8, 15, 16 |

2.2.2. Preparo das micropartículas

As micropartículas foram preparadas pela técnica da dupla emulsão A/O/A, com extração/evaporação do solvente, conforme descrito por Lamprecht e colaboradores (2004). Brevemente, 0,5 mL de extrato liofilizado ressuspensionado foi adicionado a uma solução do polímero (Eudragit® RS100) em diclorometano e a mistura foi submetida à agitação do equipamento Ultraturrax por 1 minuto. Desta forma, obteve-se a

emulsão primária A/O, que foi vertida sobre 75,0 mL de solução de PVA 0,5% e mantida sob agitação magnética por 5 minutos, formando a dupla emulsão A/O/A. Esta dupla emulsão foi vertida sobre 425,0 mL de solução de PVA 0,1% e mantida sob agitação magnética por 3 horas a temperatura ambiente, para completa evaporação do solvente orgânico. Após este período as micropartículas foram mantidas em repouso por aproximadamente 18 horas para decantação. A seguir, o sobrenadante foi descartado e as micropartículas foram transferidas para tubos de ensaio com a ajuda de 40,0 mL de água purificada, centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi repetido três vezes.

Após esse procedimento as micropartículas foram filtradas utilizando filtro HVLP sob vácuo com 50,0 mL de água purificada e colocadas em dessecador contendo sílica gel por 4 dias para secagem. Após esse período as micropartículas foram colocadas em frascos e mantidas em dessecador.

Para realização de ensaios comparativos foram preparadas também micropartículas brancas, onde a solução extrativa foi substituída por água purificada.

Estudo de formulação: planejamento fatorial

Para o preparo das micropartículas foi elaborado um delineamento fatorial com o auxílio do programa Design Expert[®], versão 6.0.6. Este consiste num desenho com 4 fatores e 2 níveis (máximo e mínimo) para cada fator (2^4). Os fatores avaliados foram: fator A (numérico), quantidade de polímero (Eudragit[®] RS100) (mg); fator B (categórico), tipo de extrato (macerado ou decocto); fator C (numérico), concentração do extrato em relação ao extrato inicial (mL de extrato submetidos à liofilização com posterior reconstituição do volume a 1 mL com água purificada); fator D (numérico) velocidade de agitação na formação da primeira emulsão (rpm). Dois pontos centrais foram propostos, sendo cada um repetido quatro vezes. Os fatores e os níveis de cada fator podem ser visualizados na tabela 25.

TABELA 25. Fatores e níveis utilizados no estudo de formulação: delineamento fatorial 2⁴

| Níveis/Fatores | Polímero (mg) | Extrato | Concentração extra- to (mL ext. liof./mL água purif.) | Velocidade (rpm) |
|----------------|---------------|---------|---|------------------|
| | A | B | C | D |
| Inferior | 100 | M | 1,0 | 9500 |
| Ponto médio | 200 | | 2,0 | 13500 |
| Superior | 300 | D | 4,0 | 17500 |

Extrato M: macerado; extrato D: decocto

No total foram preparadas 24 formulações, 12 com os EM e 12 com os ED.

As formulações resultantes do delineamento estão detalhadas na tabela 26.

TABELA 26. Delineamento fatorial 2^4 para obtenção das micropartículas poliméricas destinado a avaliação dos fatores concentração do polímero (A), tipo de extrato (B), concentração do extrato (C) e velocidade de agitação da primeira emulsão (D)

| EXP | Polímero (mg) | Extrato | Concentração extrato (mL ext. liof./mL água purif.) | Velocidade (rpm) |
|--------|---------------|---------|---|------------------|
| 1 | 100 | M | 1,0 | 9500 |
| 2 | 300 | M | 1,0 | 9500 |
| 3 | 100 | D | 1,0 | 9500 |
| 4 | 300 | D | 1,0 | 9500 |
| 5 | 100 | M | 4,0 | 9500 |
| 6 | 300 | M | 4,0 | 9500 |
| 7 | 100 | D | 4,0 | 9500 |
| 8 | 300 | D | 4,0 | 9500 |
| 9 | 100 | M | 1,0 | 17500 |
| 10 | 300 | M | 1,0 | 17500 |
| 11 | 100 | D | 1,0 | 17500 |
| 12 | 300 | D | 1,0 | 17500 |
| 13 | 100 | M | 4,0 | 17500 |
| 14 | 300 | M | 4,0 | 17500 |
| 15 | 100 | D | 4,0 | 17500 |
| 16 | 300 | D | 4,0 | 17500 |
| 17 | 200 | M | 2,0 | 13500 |
| 18 | 200 | D | 2,0 | 13500 |
| 19 | 200 | M | 2,0 | 13500 |
| 20 | 200 | D | 2,0 | 13500 |
| 21 | 200 | M | 2,0 | 13500 |
| 22 | 200 | D | 2,0 | 13500 |
| 23 | 200 | M | 2,0 | 13500 |
| 24 | 200 | D | 2,0 | 13500 |
| Branca | 300 | Água | 1,0 | 17500 |

Extrato M: macerado; extrato D: decocto

2.2.3. Rendimento

O rendimento foi calculado em relação à quantidade de polímero e de extrato utilizadas no preparo das MCP, e o resultado é apresentado em porcentagem.

$$\text{Rendimento} = \frac{(\text{massa polímero} + \text{massa extrato}) - \text{massa MCP}}{100/(\text{massa polímero} + \text{massa extrato})} \times$$

2.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As formulações de micropartículas foram analisadas quanto à formação, aparência e tamanho por MEV no Laboratório de Materiais (LabMat) da UFSC. As amostras foram metalizadas com ouro e analisadas em aumentos de 25 a 400 vezes, em microscópio eletrônico de varredura Philips XL30.

2.2.4.1. Formação e aparência das micropartículas

Para a determinação da formação das partículas foi utilizada uma escala na qual o grau 1 corresponde à quase inexistência de partículas formadas e o grau 5 para formulações com grande número de partículas e onde não se observam restos de polímero.

Da mesma forma, para a avaliação da aparência das micropartículas foi definida uma escala de 1 a 5. O grau 1 foi atribuído para as formulações cujas partículas apresentaram superfície extremamente porosa e o grau 5 para as formulações nas quais a quase totalidade das partículas apresentou superfície lisa.

2.2.4.2. Tamanho de partícula

As micropartículas foram medidas a partir das fotomicrografias, utilizando-se o programa Size Meter desenvolvido por Luiz H. C. Carlson do Laboratório de Controle de Processos da UFSC (UFSC/CTC/EQA).

2.2.5. Eficiência de encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação foi determinada utilizando-se a técnica de espectroscopia no UV/Vis.

Curva analítica

Para a obtenção da curva analítica foi preparada uma solução-mãe inicial de ácido cafeico pesando-se 50,0 mg em balão volumétrico

de 10,0 mL. Em seguida 3,0 mL de metanol foram adicionados e colocados em banho de ultrassom para completa dissolução do ácido cafeico, sendo o volume completado com acetonitrila. Desta solução-mãe foram preparadas soluções com as seguintes concentrações: 2,5; 5; 7,5; 10; 15 e 20 µg/mL utilizando-se acetonitrila como solvente. As soluções foram lidas em espectrofotômetro UV/Vis a 328nm. Três soluções-mãe foram preparadas, desta forma obtiveram-se 3 curvas padrão. Cada concentração de cada curva foi lida em triplicata.

As áreas foram representadas frente às concentrações para a construção das curvas de ácido cafeico. A equação da reta foi obtida por regressão linear e o coeficiente de correlação calculado.

Preparo das amostras e determinação da EE

Cerca de 10,0 mg de micropartículas foram pesadas em duplicata e dissolvidas em acetonitrila. O volume de acetonitrila adicionado foi definido em função da quantidade de extrato contida na formulação. Assim, as formulações que continham EM1 e ED1 receberam 1,0 mL; as formulações contendo EM2 e ED2 ou EM4 e ED4 foram dissolvidas em 2,0 mL ou 4,0 mL de acetonitrila, respectivamente. Procedeu-se, então a medida da absorção das soluções em espectroscopia de UV/Vis em 328 nm. Para o cálculo da eficiência de encapsulação procedeu-se a correção em função da diluição. Para o branco utilizou-se micropartículas brancas, dissolvidas em acetonitrila numa proporção 10:1 (mg:mL).

Os resultados foram expressos em termos de percentual de ácido cafeico contido nas micropartículas em relação à quantidade de ácido cafeico contida no extrato adicionado em cada formulação. Para determinar a quantidade teórica de ácido cafeico, 100,0 µL de cada um dos extratos (ED 9030 ou EM 8d20) foi dissolvido em 8,0 mL de acetonitrila e, a seguir, procedeu-se a medida da absorvância das soluções em 328 nm.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

O método da dupla emulsão A/O/A consiste no método mais utilizado para encapsulação de fármacos hidrofílicos (ERDEN, 1996; JAIN, 2000).

Para a encapsulação de fármacos com alta solubilidade em água, a emulsificação em fase aquosa geralmente não obtém sucesso, levando

a baixas eficiências de encapsulação. Isso ocorre devido à rápida partição do fármaco hidrofílico da solução hidrofóbica que contém o polímero, em direção à fase aquosa que circunda esta solução (ERDEN, 1996; FREITAS, 2005; HASAN, 2007; ROSCA, 2004).

Vários são os fatores que afetam a formação das micropartículas, sendo os mais conhecidos: natureza e solubilidade do fármaco a ser encapsulado; concentração, composição e massa molecular do polímero; razão fármaco/polímero; solvente orgânico utilizado; concentração e natureza do emulsionante; temperatura e velocidade de agitação do processo de emulsificação; as viscosidades e razão entre os volumes das fases dispersa e contínua (JAIN, 2000).

Devido à influência de todos esses fatores, além do conhecimento do problema de eficiência de encapsulação, se faz necessário um estudo detalhado de formulação. Neste caso, o planejamento fatorial apresenta-se como uma ferramenta bastante adequada, garantindo a formação das micropartículas bem como o máximo de encapsulação do fármaco.

Os resultados obtidos para as micropartículas preparadas pela técnica de dupla emulsão, com posterior extração/evaporação do solvente, são apresentados na tabela 27.

TABELA 27. Resultados da caracterização das micropartículas obtidas usando o delineamento fatorial 2⁴

| EXP | Rendimento (%) | Aparência | Formação | Tamanho partícula (µm) ± DPR | EE (%) |
|--------|----------------|-----------|----------|------------------------------|--------|
| 1 | 33,62 | 1 | 2 | 77,03 ± 21,43 | 70,17 |
| 2 | 59,87 | 4 | 2 | 97,04 ± 31,54 | 69,89 |
| 3 | 60,05 | 1 | 1 | 63,34 ± 26,54 | 56,00 |
| 4 | 72,95 | 3 | 1 | 79,15 ± 14,46 | 62,59 |
| 5 | 65,59 | 2 | 2 | 72,05 ± 23,14 | 36,65 |
| 6 | 64,83 | 4 | 4 | 105,16 ± 20,62 | 45,61 |
| 7 | 79,32 | 1 | 1 | 68,93 ± 19,62 | 37,83 |
| 8 | 83,84 | 5 | 4 | 117,02 ± 23,15 | 50,11 |
| 9 | 44,23 | 2 | 4 | 78,24 ± 19,36 | 72,16 |
| 10 | 54,96 | 4 | 3 | 93,84 ± 28,52 | 65,67 |
| 11 | 40,93 | 1 | 2 | 78,44 ± 21,15 | 57,81 |
| 12 | 74,99 | 4 | 3 | 109,04 ± 23,47 | 53,59 |
| 13 | 66,14 | 3 | 2 | 89,35 ± 12,23 | 48,81 |
| 14 | 58,97 | 4 | 3 | 136,98 ± 14,77 | 44,85 |
| 15 | 80,81 | 4 | 3 | 103,13 ± 27,01 | 44,76 |
| 16 | 83,28 | 4 | 3 | 98,97 ± 25,89 | 50,75 |
| 17 | 55,09 | 3 | 4 | 111,07 ± 17,56 | 49,72 |
| 18 | 83,00 | 3 | 2 | 83,78 ± 18,34 | 53,31 |
| 19 | 60,18 | 3 | 3 | 110,52 ± 17,99 | 49,29 |
| 20 | 81,25 | 3 | 3 | 90,01 ± 16,13 | 54,96 |
| 21 | 50,89 | 3 | 4 | 94,05 ± 17,03 | 37,60 |
| 22 | 81,46 | 3 | 3 | 105,23 ± 16,65 | 54,12 |
| 23 | 46,16 | 3 | 4 | 91,96 ± 18,91 | 52,50 |
| 24 | 84,02 | 3 | 3 | 88,60 ± 17,06 | 56,92 |
| Branca | 74,29 | 4 | 3 | 76,86 ± 22,90 | 0,00 |

EE: Eficiência de encapsulação; DPR: Desvio padrão relativo

A tabela 28 apresenta os valores da análise de variância para todos os fatores estudados, suas interações e outros parâmetros do modelo. Como podem ser observados, todos os modelos são significativos para os ensaios realizados. A curvatura é significativa ($p < 0,05$) para a for-

mação das MCP, sugerindo que o traçado tridimensional dessas respostas é mais curvilíneo do que linear no espaço de desenho estudado. Além disso, é possível observar que não há falta de ajuste ($p > 0,05$) de nenhum dos modelos para as análises em questão.

TABELA 28. Análise de variância dos resultados da caracterização das micropartículas obtidas usando o delineamento fatorial 2^4 ($p \leq 0,05$)

| ANOVA | <i>Valor – p</i> | | | | |
|--------------------|------------------|-----------|---------------|--------------|----------|
| | Rendimento | Aparência | Forma- ção | Tama- nho | EE |
| Modelo | < 0,0001 | < 0,0001 | 0,0049 | 0,0002 | < 0,0001 |
| A | 0,0033 | < 0,0001 | 0,0356 | 0,0002 | -- |
| B | < 0,0001 | -- | 0,0237 | -- | 0,7167 |
| C | < 0,0001 | 0,0030 | 0,1455 | 0,0183 | < 0,0001 |
| D | -- | 0,0248 | 0,0356 | 0,0257 | -- |
| AC | 0,0028 | -- | 0,0356 | -- | -- |
| AD | -- | 0,0248 | -- | -- | -- |
| BC | -- | -- | -- | -- | 0,0237 |
| CD | -- | -- | 0,0356 | -- | -- |
| Curvatura | 0,1770 | 0,7805 | 0,0175 | 0,2991 | 0,2123 |
| <i>Lack of Fit</i> | 0,1333 | -- | 0,1832 | 0,3418 | 0,3048 |

EE: Eficiência de encapsulação

Fator A: Quantidade de polímero (mg)

Fator B: Tipo de extrato

Fator C: Concentração do extrato

Fator D: Velocidade de agitação, 1° emulsão (rpm)

Lack of Fit: Falta de ajuste

3.1. Rendimento

O rendimento corresponde à relação entre massa total de polímero e de extrato utilizadas para o preparo de cada uma das formulações e a massa obtida de MCP, podendo assim sinalizar perdas durante o processo de preparo.

Como podem ser observados na tabela 27, os valores de rendimento obtidos para as formulações foram bastante heterogêneos, variando entre 33 a 84 %. A análise da variância (tabela 28) demonstra que estes resultados são influenciados principalmente pelas diferentes características dos extratos obtidos pelos dois métodos de preparação (fator

B), pela interação entre a quantidade de polímero (fator A) e a concentração do extrato (fator C). A figura 41 permite melhor visualização da interação AC, onde as MCP que utilizaram a menor concentração de EM (EM1) apresentam aumento do rendimento quando se aumenta a concentração do polímero. Por outro lado, com concentrações de extrato mais elevadas (EM4), não se observa alteração do rendimento, podendo-se inferir que este depende exclusivamente da quantidade de polímero.

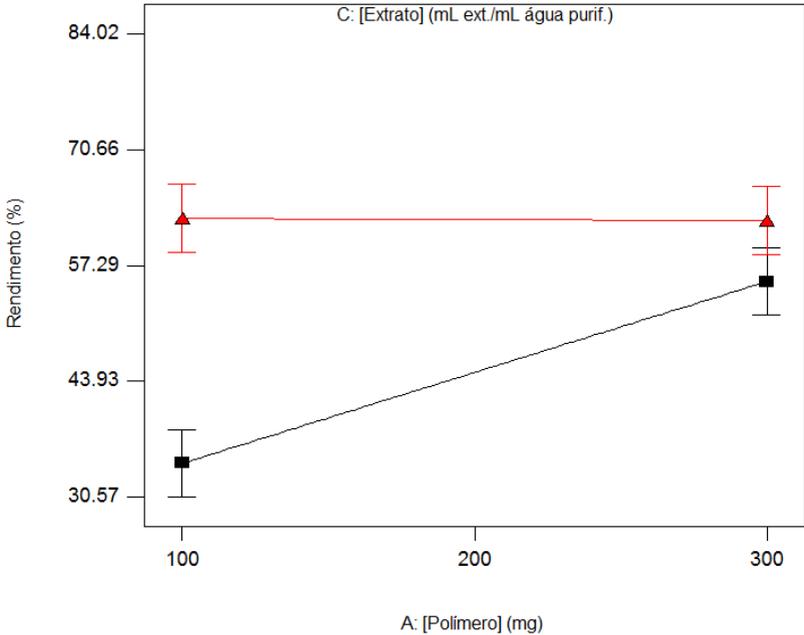


Figura 41. Gráfico de interação entre os fatores concentração de polímero (A) e concentração de extrato (C) das MCP obtidas para a determinação do rendimento, utilizando os EM. (■): EM1; (▲): EM4

Este mesmo perfil é observado para as MCP que contém os extratos obtidos por decocção (fator B), apesar de o rendimento obtido ser de maneira geral mais elevado para estas formulações.

A figura 42 apresenta os resultados de rendimento relacionando todos os fatores envolvidos. Esses resultados são obtidos independentes da velocidade de agitação durante a formação da primeira emulsão (fator

D) utilizada, conforme pode ser observado na tabela 28, onde o valor da ANOVA para este fator não é significativo.

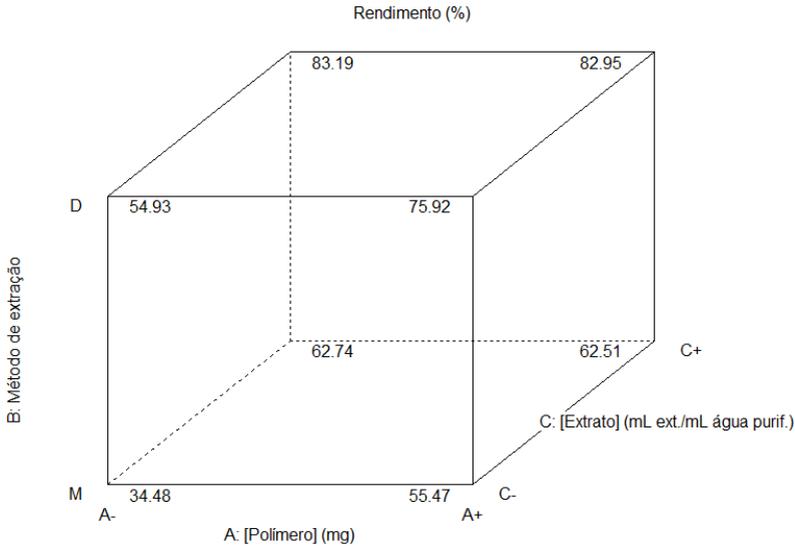


Figura 42. Representação em cubo da influência dos fatores concentração do polímero (A), tipo de extrato (B) e concentração do extrato (C) sobre os resultados de rendimento das MCP

3.2. Formação

Para a avaliação da formação das partículas foi definida uma escala, na qual o valor 1 indica um número baixo de partículas formadas, aumentado gradativamente até atingir grau 5, onde todas as partículas estariam formadas e íntegras, sem restos de polímero perceptíveis. A figura 43 apresenta fotomicrografias de formulações classificadas como grau 1 e grau 4. Como pode ser visualizado na tabela 27, a nenhuma das formulações foi atribuído grau 5, uma vez que todas as formulações apresentaram partículas rompidas, em maior ou menor grau. No entanto, a primeira vista já é possível observar a influência das características de cada extrato, diferentes em decorrência dos diferentes métodos utilizados em sua preparação, sobre a microencapsulação dos mesmos. Todas as formulações que foram classificadas como de grau 4, com um grande número de partículas formadas, contém o extrato EM 8d20, enquanto

que todas que receberam grau 1 contém o extrato ED 9030. Esse resultado pode ser comprovado pela significância do fator B na tabela 28.

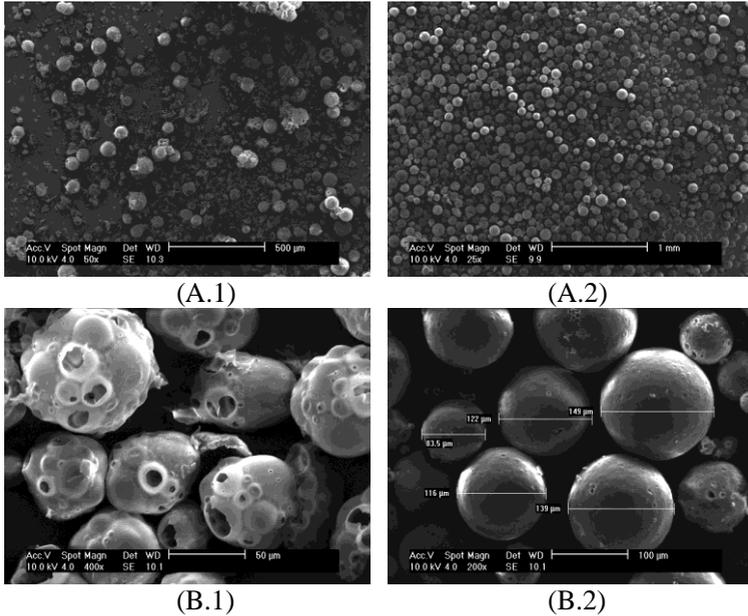


Figura 43. Microfotografias obtidas por MEV das micropartículas para avaliação da (A) formação e da (B) aparência. (A.1) Formulação 7, grau 1; (A.2) Formulação 22, grau 4; (B.1) Formulação 1, grau 1; (B.2) Formulação 8, grau 5

A formação das partículas é influenciada ainda por duas interações importantes entre os fatores AC e CD. Na figura 44 pode-se observar que, na medida em que se aumenta a velocidade de agitação, o aumento da concentração do polímero permite a melhor formação das MCP com uma concentração mais baixa do extrato, não sendo importante para a concentração mais alta do extrato, que já apresenta boa formação com a maior concentração de polímero.

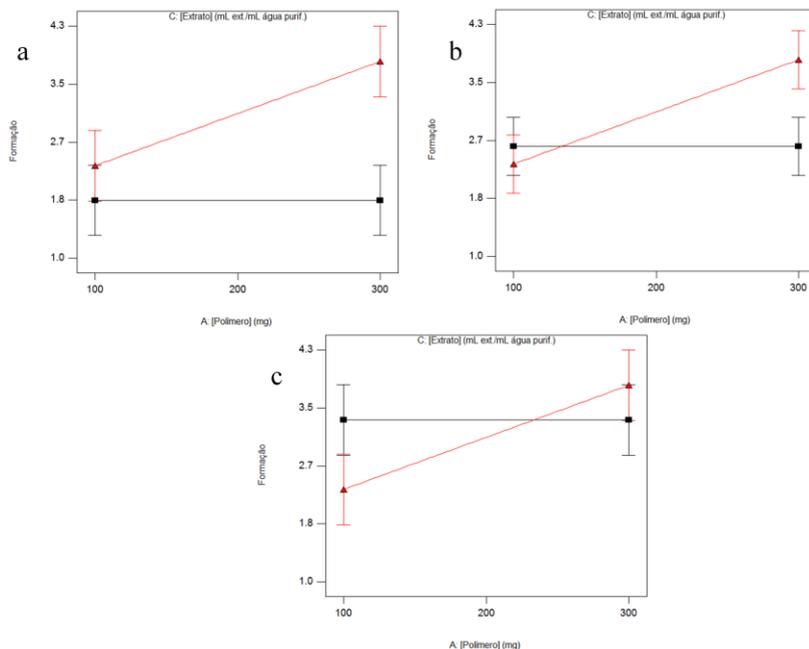


Figura 44. Gráficos de interação entre os fatores concentração de polímero (A), concentração de extrato (C) e velocidade de agitação da 1^o emulsão (D) para avaliação da formação das MCP, utilizando os EM. (■): EM1; (▲): EM4. (a) influência dos fatores A e C quando o fator D for igual a 9.500 rpm; (b) influência dos fatores A e C quando o fator D for igual a 13.500 rpm e (c) influência dos fatores A e C quando o fator D for igual a 17.500 rpm

3.3. Aparência

A aparência corresponde à avaliação visual da superfície das partículas através das fotos obtidas por MEV. Da mesma forma que para a formação das micropartículas, foi estabelecida uma escala de 1 a 5 para classificação das formulações. A figura 43 mostra fotomicrografias de formulações classificadas como grau 1 e como grau 5 no critério aparência.

Na tabela 28 é possível verificar que a interação entre os fatores A e D é significativa, assim como a influência do fator C. Conforme é aumentada a concentração do polímero (fator A), melhora-se a aparência das MCP obtidas, sendo esta influência mais significativa em velocidades mais elevadas (fator D). O aumento da concentração do extrato tam-

bém permite a melhora da aparência das mesmas, independente do tipo de extrato utilizado (EM ou ED, fator B). A figura 45 permite a visualização da interação AD, sendo que o mesmo perfil foi observado para os diferentes extratos.

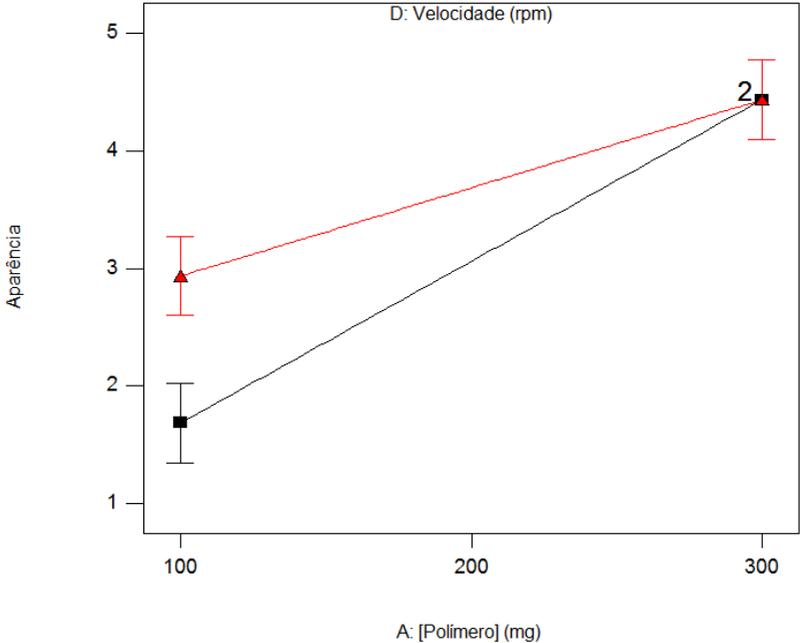


Figura 45. Gráfico de interação entre os fatores concentração de polímero (A) e velocidade de agitação da 1ª emulsão (D) para avaliação da aparência das MCP, utilizando os EM4. (■): velocidade de agitação 9.500 rpm; (▲): velocidade de agitação 17.500 rpm

3.4. Tamanho de partícula

Todas as formulações apresentaram diâmetro médio de partícula entre 66 e 135 μm . Considerando que estas formulações destinam-se à administração oral, o intervalo de tamanhos pode ser considerado adequado.

Na análise de variância dos resultados do tamanho de partícula, de acordo com a tabela 28 não há nenhuma interação entre os fatores. A quantidade de polímero, a quantidade de extrato e a velocidade de agitação (fatores A, C e D, respectivamente) atuam de forma isolada, sem

influência do tipo de extrato (fator B), indicando que este não interfere nos resultados de tamanho de partícula.

A figura 46 apresenta os resultados de tamanho de partícula. Os fatores A, C e D, à medida que aumentam promovem o aumento do tamanho das MCP. Desta forma obtém-se o maior tamanho de partículas com a maior concentração do polímero, a maior concentração do extrato e maior velocidade de agitação da 1º emulsão.

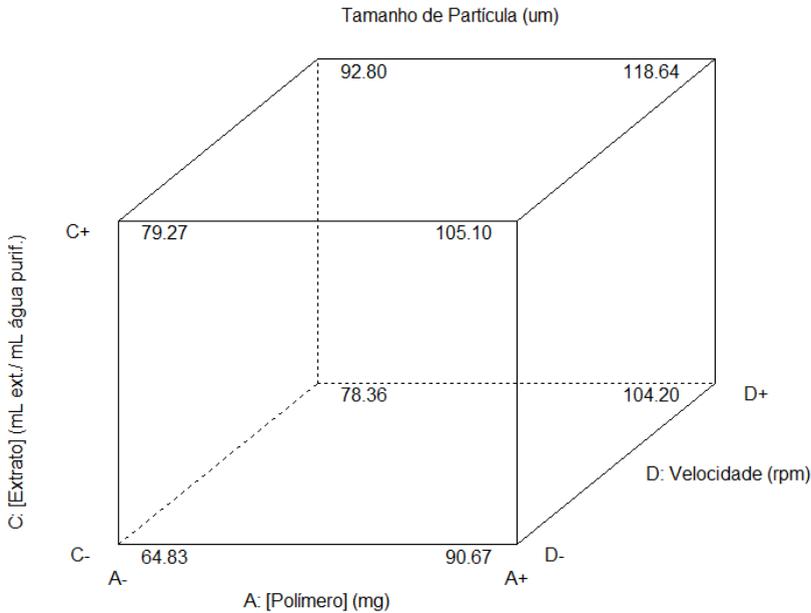


Figura 46. Representação em cubo da influência dos fatores concentração do polímero (A), concentração do extrato (C) e velocidade de agitação da 1º emulsão (D) sobre os resultados de tamanho de MCP.

3.5. Eficiência de encapsulação

Várias metodologias têm sido descritas na literatura para a determinação da eficiência de encapsulação em micropartículas. A mais utilizada tem sido baseada na CLAE. Considerando que o polímero Eudragit® RS100 é um polímero catiônico e da dificuldade em separá-lo do meio onde foi dissolvido, neste trabalho foi feita a opção por utilizar a técnica de espectrofotometria para esta determinação. O ACF foi utilizado como padrão por apresentar o máximo de absorção no comprimen-

to de onda da grande maioria dos compostos fenólicos, objetos desse estudo. A figura 47 apresenta a curva analítica do ácido cafeico utilizada para o cálculo da eficiência de encapsulação. A curva apresenta como equação da reta, $y = 0,0748x + 0,0024$ e coeficiente de correlação, $r = 0,9992$.

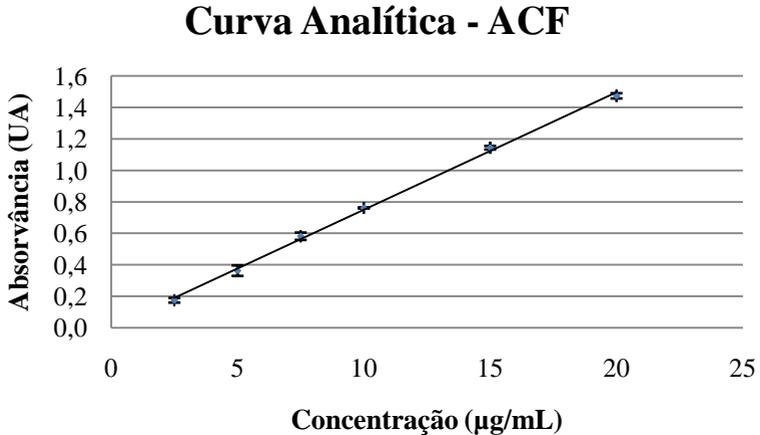


Figura 47. Curva analítica média do ácido cafeico obtida por espectrofotometria UV/Vis. Detecção: 328 nm. Coeficiente de correlação, 0,9992; equação da reta: $y = 0,0748x + 0,0024$

O branco utilizado consistiu nas MCP brancas dissolvidas em acetoneitrila. O cálculo baseou-se, por conseguinte na diferença entre as absorções obtidas da solução de MCP e o branco. Os resultados são apresentados na tabela 27.

Através da análise de variância é possível observar a interação dos fatores B e C nos resultados de eficiência de encapsulação. A figura 48 apresenta de que maneira ocorre esta interação. Para os EM quanto maior a concentração do extrato, menor a eficiência de encapsulação. O mesmo ocorre para os ED, com a diferença de que as MCP preparadas com ED apresentam eficiências de encapsulação mais próximas. Ainda é possível verificar que a concentração do polímero e a velocidade de agitação da 1ª emulsão não interferem nos resultados de EE.

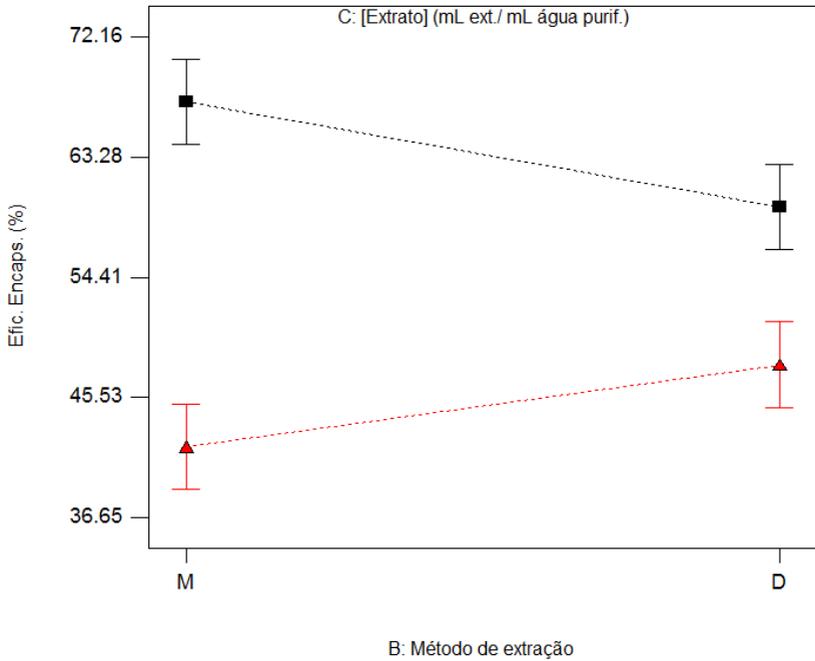


Figura 48. Gráfico de interação entre os fatores tipo de extrato (B) e concentração do extrato (C) para avaliação da eficiência de encapsulação das MCP, utilizando os EM. (■): EM1; (▲): EM4

Conclusões

- ✓ Os delineamentos elaborados para preparação e avaliação da influência dos fatores de formulação sobre as características das soluções extrativas obtidas por maceração e decocção foram adequados para todas as análises realizadas;
- ✓ Um maior teor de fenólicos totais é obtido com a utilização da maceração como método extrativo, sendo influenciado pelo teor de etanol do líquido extrator. Nos ED, o aumento da temperatura e do tempo promovem aumento deste teor;
- ✓ Durante a avaliação do teor do marcador químico por CLAE foi identificada nos extratos obtidos por maceração a presença de ácido cafeico, um ácido fenólico ainda não relatado para esta espécie na literatura, passando a ser considerado como um segundo marcador químico;
- ✓ A metodologia por CLAE desenvolvida para o doseamento dos marcadores químicos (ácido clorogênico e ácido cafeico) nas soluções extrativas obtidas por maceração e por decocção foi validada de acordo com ICH (2005) e BRASIL (2003), sendo capaz de separar e quantificar simultaneamente os dois marcadores químicos;
- ✓ Os extratos obtidos por decocção a 80 °C por 20 minutos apresentam os maiores teores de ACG. Nos EM a maior concentração foi obtida no extrato 6d50;
- ✓ Os extratos obtidos por maceração com 20 % de etanol apresentam os maiores teores de ACF, sendo estes inexpressivos nos ED;
- ✓ A ação do ACG na redução da glicemia mostrou-se dose-dependente tanto em animais hiperglicêmicos quanto diabéticos, sugerindo-se uma ação secretagoga;
- ✓ Os extratos obtidos por maceração com 20 % de etanol apresentaram ação na redução da glicemia em ratos hiperglicêmicos, não sendo observada esta atividade em animais diabéticos. Este resultado indica uma atividade anti-diabética nos extratos obtidos ainda não relatada para a espécie. A associação do ácido clorogênico e do ácido cafeico apresentou uma atividade semelhante aos EM obtidos com 20 % de etanol;
- ✓ Todos os extratos apresentaram uma atividade vasorrelaxante no ensaio de reatividade vascular em aorta torácica isolada em ratos, sendo

os EM efetivos em uma concentração inferior aos ED. Porém todos os extratos foram efetivos em concentrações inferiores às encontradas na literatura para outras plantas, evidenciando uma atividade anti-hipertensiva bastante interessante nos extratos brutos, em consonância com resultados anteriores publicados para frações obtidas com solventes orgânicos;

- ✓ Os delineamentos elaborados para avaliação da interferência da temperatura e da presença de conservante no processo extrativo apresentam modelos significativos para o doseamento de ACG e ACF;
- ✓ No delineamento que contempla a interferência da temperatura, ocorre interação entre os fatores concentração de etanol e tempo e entre concentração de etanol e temperatura, tanto no doseamento do ACG quanto do ACF;
- ✓ No delineamento que contempla a interferência da presença de conservante ocorre interação entre os fatores concentração de etanol e tempo, tanto no doseamento do ACG como do ACF;
- ✓ No delineamento que contempla o estudo de formulação das micropartículas, o modelo é significativo para todos os ensaios realizados. As MCP contendo ED apresentam melhor rendimento. As formulações contendo EM resultam em micropartículas mais bem formadas. A melhor aparência é conseguida com o aumento da concentração do polímero e do extrato;
- ✓ O diâmetro médio das micropartículas variou entre 66 e 135 μm ;
- ✓ A eficiência de encapsulação nas micropartículas variou de 35 – 72 %, sendo inversamente proporcional à concentração do extrato. A eficiência de encapsulação pode ser considerada satisfatória considerando tratar-se de uma substância hidrofílica.

Referências

ABREU, F. O. M. S.; BIANCHINI, C.; FORTE, M. M. C.; KIST, T. B. L. "Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling behavior of alginate-chitosan hydrogels." Carbohydrate Polymers, v. 74(2), p. 283-289, 2008.

ALCÂNTARA, C.; RAMALHINHO, V. "Endotélio e Hipertensão Arterial." Medicina Interna, v. 10, n. 4, p. 217 – 220, 2003.

AMORATI, R.; PEDULLI, G. F.; CABRINI, L.; ZAMBONIN, L.; LANDI, L. "Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids." Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54(8), p. 2932-2937, 2006.

ANDRADE-CETTO, A.; WIEDENFELD, H. "Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats." Journal of Ethnopharmacology, v. 78(2-3), p. 145-149, 2001.

ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; MARTÍNEZ-ZURITA, E.; ORTEGA-LARROCEA, P.; HEINRICH, M. "Disease-Consensus Index as a tool of selecting potential hypoglycemic plants in Chikindzonot, Yucatán, México." Journal of Ethnopharmacology, v. 107(2), p. 199-204, 2006.

ANDRADE-CETTO, A.; CÁRDENAS, R.; RAMÍREZ-REYES, B. "Hypoglycemic Effect of *Cecropia peltata* L. on N5-STZ Type 2 Diabetic Rats." Pharmacologyonline, v. 3, p. 203-210, 2007.

ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R. "Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes." Journal of Ethnopharmacology, v. 116(1), p. 27-32, 2008a.

ANDRADE-CETTO, A.; MARTÍNEZ-ZURITA, E.; SOTO-CONSTANTINO, A.; REVILLA-MONSALVE, C.; WIEDENFELD, H. "Chronic hypoglycemic effect of *Malmea depressa* root on n5-streptozotocin diabetic rats." Journal of Ethnopharmacology, v. 116 (2), p. 358-362, 2008b.

ANDREASEN, M. F.; KROON, P. A.; WILLIAMSON, G.; GARCIA-CONESA, M. T. "Esterase Activity Able To Hydrolyze Dietary Antioxidant Hydroxycinnamates Is Distributed along the Intestine of Mammals." Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 49(11), p. 5679-5684, 2001.

ANDRIAMBELOSON, E.; KLESCHYOV, A. L.; MULLER, B.; BERETZ, A.; STOCLET, J.C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. "Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta." British Journal of Pharmacology, v. 120, p. 1053-1058, 1997.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN J.R., L.V. (Tradução: Senna, E.M.L. et al.) "Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos." 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ASTHER, M.; ESTRADA ALVARADO, M. I.; HAON, M.; NAVARRO, D.; ASTHER, M.; LESAGE-MEESSEN, L.; RECORD, E. "Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger* catalysing the hydrolysis of chlorogenic acid." Journal of Biotechnology, v. 115(1), p. 47-56, 2005.

AULTON, M.E. (Tradução: ORTEGA, G.G. et al.) "Delineamento de formas farmacêuticas. (Pharmaceutics: The science of dosage forms design)." 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005 (Elsevier Health Sciences, 2001).

AZUMA, K.; NAKAYAMA, M.; KOSHIOKA, M.; IPPOUSHI, K.; YAMAGUCHI, Y.; KOHATA, K.; YAMAUCHI, Y.; ITO, H.; HIGASHIO, H. "Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L." Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 47(10), p. 3963-3966, 1999.

BARCELÓ, A.; AEDO, C.; RAJPATHAK, S.; ROBLES, S. "The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean." Bulletin of the World Health Organization, v. 81, p. 19-27, 2003.

BARNI, S. T.; CECHINEL FILHO, V.; COUTO, A. G. "Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica." Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 19 (4), p. 865-870, 2009.

BASTOS DE MARIA, C. A.; MOREIRA, R. F. A. "Analytical methods for chlorogenic acid - Métodos para análise de Ácido clorogênico." Química Nova, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

BATYCKY, R. P.; HANES, J.; LANGER, R.; EDWARDS, D. A. "A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres." Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 86, n. 2, p. 1464-1477, 1997.

BECKERT, T. E.; LEHMANN, K.; SCHMIDT, P. C. "Compression of enteric-coated pellets to disintegrating tablets." International Journal of Pharmaceutics, v. 143(1), p. 13-23, 1996.

BELTRÁN, J. L.; SANLI, N.; FONRODONA, G.; BARRÓN, D.; ÖZKAN, G.; BARBOSA, J. "Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pKa values of polyphenolic acids in water and acetonitrile-water media." Analytica Chimica Acta, v. 484(2), p. 253-264, 2003.

BENEKE, C. E.; VILJOEN, A. M.; HAMMAN, J. H. "Polymeric plant-derived excipients in drug delivery." Molecules, v. 14(7), p. 2602-2620, 2009.

BORODINA, T. N.; RUMSH, L. D.; KUNIZHEV, S. M.; SUKHORUKOV, G. B.; VOROZHTSOV, G. N.; FELDMAN, B. M.; RUSANOVA, A. V.; VASIL'EVA, T. V.; STRUKOVA, S. M.; MARKVICHEVA, E. A. "Entrapment of herbal extracts into biodegradable microcapsules." Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, v. 2(2), p. 176-182, 2008.

BOTSARIS, A. S. "Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: The archives of Flora Medicinal." Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, v. 3, p. 18, 2007.

BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C. F. F.; SANTOS, A. C. P.; MONTE-MÓR, R. L. M. "Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia." Journal of Ethnopharmacology, v. 120(2), p. 141-148, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos; fica revogada a Resolução RE nº475, de 19 de março de 2002". Diário Oficial da União. 02.06.2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. "A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos". Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf>

BUNDESVEREINIGUNG Deutscher Apothekerverbaende (Hrgs.)
Deutsche Arzneimittel - Codex. Frankfurt: Govi, Stuttgart: Deutscher
Apotheker, 1986. v.1: Codex-Probe 4, p. 9.

CAMPANA, P. R. V.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. "Endothelium-
dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta by *Mansoa hirsuta* D.C."
Phytomedicine, v. 16(5), p. 456-461, 2009.

CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; JORGE, A. P.; DE SOUSA, E.;
HORST, H.; WOEHLE, V. M.; PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ,
B.; SILVA, F. R. M. B. "Follow-up studies on glycosylated flavonoids
and their complexes with vanadium: Their anti-hyperglycemic potential
role in diabetes." Chemico-Biological Interactions, v. 163(3), p. 177-
191, 2006.

CAZAROLLI, L. H.; FOLADOR, P.; MORESCO, H. H.; BRIG-
HENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. "Mechan-
ism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2''-O- α -L-
rhamnopyranosyl)- β -L-fucopyranoside on 14 C-glucose uptake." Che-
mico-Biological Interactions, v. 179(2-3), p. 407-412, 2009.

CELIK, S.; ERDOGAN, S.; TUZCU, M. "Caffeic acid phenethyl ester
(CAPE) exhibits significant potential as an antidiabetic and liver-
protective agent in streptozotocin-induced diabetic rats." Pharmacologi-
cal Research, v. 60(4), p. 270-276, 2009.

CELLI, N.; DRAGANI, L. K.; MURZILLI, S.; PAGLIANI, T.; POGGI,
A. "In vitro and in vivo stability of caffeic acid phenethyl ester, a bioac-
tive compound of propolis." Journal of Agricultural and Food Chemi-
stry, v. 55, p. 3398-3407, 2007.

CERCATO, C.; MANCINI, M. C.; ARGUELLO, A. M.; PASSOS, V.
Q.; VILLARES, S. M.; HALPERN, A. "Systemic hypertension, di-
abetes mellitus, and dyslipidemia in relation to body mass index: evalua-
tion of a Brazilian population." Revista do Hospital das Clinicas, v.
59(3), p. 113-118, 2004.

CHAN, E. S.; YIM, Z. H.; PHAN, S. H.; MANSA, R. F.; RAVINDRA,
P. "Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with cal-
ginate hydrogel beads." Food and Bioproducts Processing, (article in
press). Available online 22 November 2009.
[http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B8JGD-
4XS0D9X-
1&_user=687353&_coverDate=11%2F22%2F2009&_rdoc=1&_fmt=hi](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B8JGD-4XS0D9X-1&_user=687353&_coverDate=11%2F22%2F2009&_rdoc=1&_fmt=hi)

gh&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000037882&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687353&md5=f0067b35f741cdf22d9999d83694bf7d. Acesso em 25/02/2010.

CHANG, Q.; ZUO, Z.; CHOW, M. S. S.; HO, W. K. K. "Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. major) fruits and a hawthorn drink." Food Chemistry, v. 98(3), p. 426-430, 2006.

CHEN, H.; LANGER, R. "Oral particulate delivery: status and future trends." Advanced Drug Delivery Reviews, v. 34(2-3), p. 339-350, 1998.

CLIFFORD, M. N. "Chlorogenic acids and other cinnamates - Nature, occurrence and dietary burden." Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 79(3), p. 362-372, 1999.

CLIFFORD, M. N. "Chlorogenic acids and other cinnamates - Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism." Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 80(7), p. 1033-1043, 2000.

CLIFFORD, M. N.; WU, W.; KUHNERT, N. "The chlorogenic acids of *Hemerocallis*." Food Chemistry, v. 95(4), p. 574-578, 2006.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. e colaboradores "Introdução a Métodos Cromatográficos" Campinas Editora da UNICAMP, 5° edição. 1993.

CORRÊA, D. S.; RABETTI, A. C.; RAE, G. A. "ATP-sensitive potassium channels do not mediate vasorelaxation by acetylcholine or iloprost." Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 24, p. 729-734, 1991.

COSTA, G.M. "Estudo Fitoquímico Comparativo entre *Cecropia glaziovii* Sneth. e *Cecropia pachystachya* Trécul." 2009. 116 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

COUTEAU, D.; McCARTNEY, A. L.; GIBSON, G. R.; WILLIAMSON, G.; FAULDS, C. B. "Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid." Journal of Applied Microbiology, v. 90(6), p. 873-881, 2001.

DALBÓ, S.; MOREIRA, E. G.; BRANDÃO, F. C.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; MICKE, G. A.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. "Mechanisms underlying the vasorelaxant effect induced by proanthocyani-

- din-rich fraction from *Croton celtidifolius* in rat small resistance arteries." Journal of Pharmacological Sciences, v. 106(2), p. 234-241, 2008.
- DEGUSSA, 1999. CD fornecido pelo fabricante com literatura a respeito da matéria-prima (polímero).
- DELARCINA JÚNIOR, S.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R. M.; TANAE, M. M.; LAPA, A. J. "Inhibition of histamine-induced bronchospasm in guinea pigs treated with *Cecropia glaziovii* Sneth and correlation with the *in vitro* activity in tracheal muscles." Phytomedicine, v. 14, p. 328-332, 2007.
- DE SOUSA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B.; BARRETO SILVA, F. R. M. "Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(α -D-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves." Journal of Natural Products, v. 67(5), p. 829-832, 2004.
- DE SOUZA, K. C. B.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V.L. "LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 28, p. 771-777, 2002.
- DINIZ, A.; ESCUDER-GILABERT, L.; LOPES, N. P.; GOBBONETO, L.; VILLANUEVA-CAMAÑAS, R. M.; SAGRADO, S.; MEDINA-HERNÁNDEZ, M. J. "Permeability profile estimation of flavonoids and other phenolic compounds by biopartitioning micellar capillary chromatography." Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 55(21), p. 8372-8379, 2007.
- DI STASI, L. C.; SEITO, L. N.; HURUMA-LIMA, C. "A. Urticales medicinais." In: DI STASI, L.C.; HURUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo: UNESP, p. 230-233, 2002.
- ERDEN, N.; CELEBI, N. "Factors influencing release of salbutamol sulphate from poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by water-in-oil-in-water emulsion technique." International Journal of Pharmaceutics, v. 137(1), p. 57-66, 1996.
- FARMACOPÉIA Brasileira, 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. (1927). "On tyrosine and tryptophane determinations in proteins." Journal of Biological Chemistry, v. 73, n. 2, 1927.

- FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. "Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: Reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology." Journal of Controlled Release, v. 102(2), p. 313-332, 2005.
- FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H. S. "Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds." Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48(6), p. 2101-2110, 2000.
- GABBAY, M.; CESARINI, P.R.; DIB, S.A. "Diabetes melito do tipo 2 na infância e adolescência: revisão da literatura." Jornal de Pediatria, v. 79, n. 3, p. 201-208, 2003.
- GABRIELSSON, J.; LINDBERG, N. O.; LUNDSTEDT, T. "Multivariate methods in pharmaceutical applications." Journal of Chemometrics, v. 16(3), p. 141-160, 2002.
- GAYATHRI, M.; KANNABIRAN, K. "Antidiabetic and ameliorative potential of Ficus bengalensis bark extract in streptozotocin induced diabetic rats." Indian Journal of Clinical Biochemistry, v. 23(4), p. 394-400, 2008.
- GERWIN, N.; HOPS, C.; LUCKE, A. "Intraarticular drug delivery in osteoarthritis." Advanced Drug Delivery Reviews, v. 58(2), p. 226-242, 2006.
- GIL, E.S. et al. "Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos". In: FISCHER, D.C.H. Controle de Qualidade de Fitoterápicos. São Paulo – SP: Editora Pharmabooks, 2007. p. 289–327.
- GONTHIER, M. P.; REMESY, C.; SCALBERT, A.; CHEYNIER, V.; SOUQUET, J. M.; POUTANEN, K.; AURA, A. M. "Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota in vitro." Biomedecine & Pharmacotherapy, v. 60(9), p. 536-540, 2006.
- GRIENDLING, K. K.; FITZGERALD, G. A. "Oxidative Stress and Cardiovascular Injury Part I: Basic Mechanisms and In Vivo Monitoring of ROS." Circulation, v. 108(16), p. 1912-1916, 2003.
- HADIAH, J. T.; CONN, B. J.; QUINN, C. J. "Infra-familial phylogeny of Urticaceae, using chloroplast sequence data." Australian Systematic Botany, v. 21(5), p. 375-385, 2008.
- HARTKE, K. & MUTSCHLER, E. Deutsches Arzneibuch - 9. Ausgabe 1986 Kommentar. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1987. p.305-306.

- HASAN, A. S.; SOCHA, M.; LAMPRECHT, A.; GHAZOUANI, F. E.; SAPIN, A.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P.; UBRICH, N. "Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release." International Journal of Pharmaceutics, v. 344(1-2), p. 53-61, 2007.
- HEBERLÉ, G.; WEHRMANN, L.; PETROVICK, P. R. "Characterization of *Cecropia glazioui* Sneth. (Cecropiaceae) spray-dried extract - Caracterização do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* Sneth. (Cecropiaceae)." Acta Farmaceutica Bonaerense, v. 19(3), p. 203-210, 2000.
- HERRERA-ARELLANO, A.; AGUILAR-SANTAMARÍA, L.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, B.; NICASIO-TORRES, P.; TORTORIELLO, J. "Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics." Phytomedicine, v. 11(7-8), p. 561-566, 2004.
- HERRERO-MARTINEZ, J. M.; REPOLLES, C.; BOSCH, E.; ROSES, M.; RAFOLS, C. "Potentiometric determination of aqueous dissociation constants of flavonols sparingly soluble in water." Talanta, v. 74(4), p. 1008-1013, 2008.
- HNATYSZYN, O.; MIÑO, J.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C. "The hypoglycemic effect of *Phyllanthus sellowianus* fractions in streptozotocin-induced diabetic mice." Phytomedicine, v. 9(6), p. 556-559, 2002.
- HORT, M. A. "Estudo das Atividades Vasodilatadora e Antioxidante de *Cyathia phalerata* Mart. (CYATHEACEAE)." 2006. 114 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- HORZIC, D.; KOMES, D.; BELSCAK, A.; GANIC, K. K.; IVEKOVIC, D.; KARLOVIC, D. "The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions." Food Chemistry, v. 115(2), p. 441-448, 2009.
- ICH. International Conference on Harmonisation. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2(R1)*. London, 2005.
- IDF. International Diabetes Federation. Diabetes Voice. December 2009, Volume 54, Issue 3.
http://www.diabetesvoice.org/files/attachments/2009_3_Final.pdf. Acesso em 01/02/2010.

JAIN, R. A. "The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices." Biomaterials, v. 21(23), p. 2475-2490, 2000.

JALIL, R.; NIXON, J. R. "Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: Problems associated with preparative techniques and release properties." Journal of Microencapsulation, v. 7(3), p. 297-325, 1990.

JIAO, Y.; UBRICH, N.; HOFFART, V.; MARCHAND-ARVIER, M.; VIGNERON, C.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. "Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits." Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 91(3), p. 760-768, 2002.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. "Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine." The American Journal of Clinical Nutrition, v. 78(4), p. 728-733, 2003.

JORGE, A. P.; HORST, H.; DE SOUSA, E.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. "Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle." Chemico-Biological Interactions, v. 149, p. 89-96, 2004.

KAMALAKKANNAN, N.; MAINZEN PRINCE, P. S. "Restoration of carbohydrate metabolic enzyme activity in serum, liver, and kidney by Aegle marmelos fruit in streptozotocin-induced diabetic rats." Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, v. 12(1-2), p. 87-95, 2006.

KATSUBE, T.; TSURUNAGA, Y.; SUGIYAMA, M.; FURUNO, T.; YAMASAKI, Y. "Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves." Food Chemistry, v. 113(4), p. 964-969, 2009.

KENDALL, R. A.; ALHNAN, M. A.; NILKUMHANG, S.; MURDAN, S.; BASIT, A. W. "Fabrication and *in vivo* evaluation of highly pH-responsive acrylic microparticles for targeted gastrointestinal delivery." European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 37(3-4), p. 284-290, 2009.

KILIÇARSLAN, M.; BAYKARA, T. "The effect of the drug/polymer ratio on the properties of the verapamil HCl loaded microspheres." International Journal of Pharmaceutics, v. 252(1-2), p. 99-109, 2003.

- KIM, B.-Y.; JEONG, J. H.; PARK, K.; KIM, J.-D. "Bioadhesive interaction and hypoglycemic effect of insulin-loaded lectin-microparticle conjugates in oral insulin delivery system." Journal of Controlled Release, v. 102(3), p. 525-538, 2005.
- KOSARAJU, S. L.; D'ATH, L.; LAWRENCE, A. "Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery." Carbohydrate Polymers, v. 64(2), p. 163-167, 2006.
- KOSARAJU, S. L.; LABBETT, D.; EMIN, M.; KONCZAK, I.; LUNDIN, L. "Delivering polyphenols for healthy ageing." Nutrition and Dietetics, v. 65(SUPPL. 3), p. S48-S52, 2008.
- KRISHNAMACHARI, Y.; MADAN, P.; LIN, S. "Development of pH- and time-dependent oral microparticles to optimize budesonide delivery to ileum and colon." International Journal of Pharmaceutics, v. 338(1-2), p. 238-247, 2007.
- LACATUSU, I.; BADEA, N.; BOJIN, D.; IOSUB, S.; MEGHEA, A. "Novel fluorescence nanostructured materials obtained by entrapment of an ornamental bush extract in hybrid silica glass." Journal of Sol-Gel Science and Technology, v. 51(1), p. 84-91, 2009.
- LAMPRECHT, A.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. "Microsphere design for the colonic delivery of 5-fluorouracil." Journal of Controlled Release, v. 90(3), p. 313-322, 2003.
- LAMPRECHT, A.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. "pH-sensitive microsphere delivery increases oral bioavailability of calcitonin." Journal of Controlled Release, v. 98(1), p. 1-9, 2004.
- LAMPRECHT, A.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. "Observations in simultaneous microencapsulation of 5-fluorouracil and leucovorin for combined pH-dependent release." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 59(2), p. 367-371, 2005.
- LANDRAULT, N.; POUCHERET, P.; AZAY, J.; KROSNIAK, M.; GASC, F.; JENIN, C.; CROS, G.; TEISSEGRE, P. L. "Effect of a polyphenols-enriched chardonnay white wine in diabetic rats." Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51(1), p. 311-318, 2003.
- LANGER, R. S., PEPPAS, N. A. "Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems." Biomaterials, v. 2(4), p. 201-214, 1981.

LI, W. L.; ZHENG, H. C.; BUKURU, J.; DE KIMPE, N. "Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus." Journal of Ethnopharmacology, v. 92(1), p. 1-21, 2004.

LIMA-LANDMAN, M. T. R.; BORGES, A. C. R.; CYSNEIROS, R. M.; DE LIMA, T. C. M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. "Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An *in vivo* approach to the hypotensive mechanism." Phytomedicine, v. 14(5), p. 314-320, 2007.

LINHARD, R. "Biodegradable polymers for controlled release of drugs." In: ROSOFF, M. *Controlled Release of Drugs: Polymers and aggregate systems*. New York: VCH Publisher Inc. 1988. p.53-85.

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. "Phytopharmaceutical Technology." Boca Raton. CRC Press. 1989.

LOPEDOTA, A.; TRAPANI, A.; CUTRIGNELLI, A.; LAQUINTANA, V.; DENORA, N.; FRANCO, M.; TRAPANI, G.; LISO, G. "Effect of cyclodextrins on physico-chemical and release properties of Eudragit RS 100 microparticles containing glutathione." Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v. 57(1-4), p. 425-432, 2007.

LOPEDOTA, A.; TRAPANI, A.; CUTRIGNELLI, A.; CHIARANTINI, L.; PANTUCCI, E.; CURCI, R.; MANUALI, E.; TRAPANI, G. "The use of Eudragit[®] RS 100/cyclodextrin nanoparticles for the transmucosal administration of glutathione." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 72(3), p. 509-520, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. "Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas." Nova Odessa: Instituto Plantarium de Estudos da Flora Ltda, p.520-521, 2008.

LUENGAS-CAICEDO, P. E. "Variação sazonal da composição química das folhas de *Cecropia glaziovii* Sneth." Anais da III Semana da Pós-Graduação da UFMG, Belo Horizonte, 2002.

LUENGAS-CAICEDO, P. E.; BRAGA, F. C.; BRANDÃO, G. C.; DE OLIVEIRA, A. B. "Seasonal and intraspecific variation of flavonoids and proanthocyanidins in *Cecropia glaziovii* Sneth. leaves from native and cultivated specimens." Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences, v. 62(9-10), p. 701-709, 2007.

- MA, Y. Q.; CHEN, J. C.; LIU, D. H.; YE, X. Q. "Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound." Ultrasonics Sonochemistry, v. 16(1), p. 57-62, 2009.
- MAURICIO, A.Q. "Estudo da Atividade Antioxidante do Ácido Cafeico e da PIH: um polifenol natural e um quelante sintético". Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília – Instituto de Química, 2006.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. "The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology." British Journal of Pharmacology, v. 147(SUPPL. 1), p. S193-S201, 2006.
- MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. "Medicinal Plants of Brazil." Algonac: Reference Publications, p. 247, 2000.
- MOTA, F. L.; QUEIMADA, A. J.; PINHO, S. P.; MACEDO, E. A. "Aqueous solubility of some natural phenolic compounds." Industrial and Engineering Chemistry Research, v. 47(15), p. 5182-5189, 2008.
- NARDINI, M.; CIRILLO, E.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. "Absorption of Phenolic Acids in Humans after Coffee Consumption." Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50(20), p. 5735-5741, 2002.
- NICASIO, P.; AGUILAR-SANTAMARÍA, L.; ARANDA, E.; ORTIZ, S.; GONZÁLEZ, M. "Hypoglycemic Effect and Chlorogenic Acid Content in Two *Cecropia* species." Phytotherapy Research, v. 19, p. 661-664, 2005.
- NICOLAU, M.; ANTONIOLLI, A.; de LIMA, T. C. M.; ERA, G. A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. "Efeito do Extrato bruto (EB) e frações semipurificadas de *Cecropia glaziovii* sobre a musculatura lisa cardíaca *in vitro* e o sistema cardiovascular." In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 10, Escola Paulista de Medicina, São Paulo. Resumos (Res. 3). 1988.
- NINAHUAMAN, M. F. M. L.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J.; LIMALANDMAN, M. T. R. "ACE activity during the hypotension produced by standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth: A comparative study to captopril effects in rats." Phytomedicine, v. 14, p. 321-327, 2007.
- OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. "Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans." Journal of Nutrition, v. 131(1), p. 66-71, 2001.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Avaliação do Plano de Reorganização da Atenção à Hipertensão Arterial e ao Diabetes Mellitus no Brasil 2004.

http://new.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&task=doc_details&gid=323&Itemid=423. Acesso em 10/12/2009.

OZKORUCUKLU, S. P.; BELTRÁN, J. L.; FONRODONA, G.; BARRÓN, D.; ALSANCAK, G.; BARBOSA, J. "Determination of dissociation constants of some hydroxylated benzoic and cinnamic acids in water from mobility and spectroscopic data obtained by CE-DAD." Journal of Chemical and Engineering Data, v. 54(3), p. 807-811, 2009.

PASQUALOTO, K. F. M.; FUNCK, J. A. B.; SILVA, F. E. B.; KRATZ, C. P. "Utilização de probitos como instrumento estatístico simples à avaliação da distribuição de tamanho de partículas de dois tipos de celulose microcristalina." Revista Brasileira de Farmácia, Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 31-34, 2005.

PHARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 1ª edição. Transcrição: Da SILVA, R.A.D. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926.

PICOS, D. R.; CARRIL, M. G.; MENA, D. F.; FUENTE, L. N. "Microesferas Biodegradables de Liberación Controlada para Administración Parenteral" Revista Cubana de Farmacia, v. 34 (1), p. 70-77, 2000.

PIGNATELLO, R.; FERRO, M.; DE GUIDI, G.; SALEMI, G.; VANDELLI, M. A.; GUCCIONE, S.; GEPPI, M.; FORTE, C.; PUGLISI, G. "Preparation, characterisation and photosensitivity studies of solid dispersions of diflunisal and Eudragit RS100[®] and RL100[®]." International Journal of Pharmaceutics, v. 218(1-2), p. 27-42, 2001.

PIGNATELLO, R.; BUCOLO, C.; FERRARA, P.; MALTESE, A.; PULEO, A.; PUGLISI, G. "Eudragit RS100[®] nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen." European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 16(1-2), p. 53-61, 2002a.

PIGNATELLO, R.; BUCOLO, C.; SPEDALIERI, G.; MALTESE, A.; PUGLISI, G. "Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application." Biomaterials, v. 23(15), p. 3247-3255, 2002b.

PIGNATELLO, R.; RICUPERO, N.; BUCOLO, C.; MAUGERI, F.; MALTESE, A.; PUGLISI, G. "Preparation and characterization of eu-

- dragit retard nanosuspensions for the ocular delivery of cloricromene." AAPS PharmSciTech (<http://www.aapspharmscitech.org>), v. 7(1), 2006.
- PIO-CORRÊA, M. "Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas." Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 200-212, 1978.
- PLUMB, G. W.; GARCIA-CONESA, M. T.; KROON, P. A.; RHODES, M.; RIDLEY, S.; WILLIAMSON, G. "Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora." Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 79(3), p. 390-392, 1999.
- PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M. "Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey." Trends in Analytical Chemistry, v. 28(7), p. 893-902, 2009.
- RAFFIN, R. P.; COLOMBO, P.; SONVICO, F.; ROSSI, A.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. "Agglomerates containing pantoprazole microparticles: Modulating the drug release." American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech, v. 10(2), p. 335-345, 2009.
- RAVI KUMAR, M. N. "Nano and microparticles as controlled drug delivery devices." Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences [electronic resource] : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques, v. 3(2), p. 234-258, 2000.
- REVILLA-MONSALVE, M. C.; ANDRADE-CETTO, A.; PALOMINO-GARIBAY, M. A.; WIEDENFELD, H.; ISLAS-ANDRADE, S. "Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients." Journal of Ethnopharmacology, v. 111(3), p. 636-640, 2007.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." Free Radical Biology and Medicine, v. 20(7), p. 933-956, 1996.
- RIEDEL, A.; LEOPOLD, C. S. "Degradation of omeprazole induced by enteric polymer solutions and aqueous dispersions: HPLC investigations." Drug Development and Industrial Pharmacy, v. 31(2), p. 151-160, 2005.
- ROCHA, F. F.; LAPA, A. J.; DE LIMA, T. C. M. "Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glazioui* Sneth in mice." Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 71(1-2), p. 183-190, 2002.

ROCHA, F. F.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; SOUCCAR, C.; TANAE, M. M.; DE LIMA, T. C. M.; LAPA, A. J. "Antidepressant-like effect of *Cecropia glazioui* Sneth and its constituents – *In vivo* and *in vitro* characterization of the underlying mechanism." Phytomedicine, v. 14, p. 396-402, 2007.

ROSCA, I. D.; WATARI, F.; UO, M. "Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation." Journal of Controlled Release, v. 99(2), p. 271-280, 2004.

RUBIO, A. R.; MORALES-SEGURA, M. A. "Nitric oxide, an iceberg in cardiovascular physiology: Far beyond vessel tone control." Archives of Medical Research, v. 35(1), p. 1-11, 2004.

SADLER, N. P.; JACOBS, H. "Application of the Folin-Ciocalteu reagent to the determination of salbutamol in pharmaceutical preparations." Talanta, v. 42(10), p. 1385-1388, 1995.

SAID, O.; FULDER, S.; KHALIL, K.; AZAIZEH, H.; KASSIS, E.; SAAD, B. "Maintaining a physiological blood glucose level with 'glucoselevel', a combination of four anti-diabetes plants used in the traditional Arab herbal medicine." Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, v. 5(4), p. 421-428, 2008.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. "Incorporation of quercetin in lipid microparticles: Effect on photo- and chemical-stability." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 49(1), p. 90-94, 2009.

SHI, G.; RAO, L.; YU, H.; XIANG, H.; PEN, G.; LONG, S.; YANG, C. "Yeast-cell-based microencapsulation of chlorogenic acid as a water-soluble antioxidant." Journal of Food Engineering, v. 80(4), p. 1060-1067, 2007.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. "Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação." Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 39 (1), p. 1-20, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. "Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul." Porto Alegre: UFRGS, p.97, 1998.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. "Farmacognosia – da Planta

ao Medicamento” Porto Alegre / Florianópolis Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 5 edição. 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes 2007.

http://www.diabetes.org.br/educacao/docs/Diretrizes_SBD_2007.pdf

Acesso em 09/05/2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. IV Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão, v. 5, n. 4, 2002. Disponível em www.sbh.org.br

SPENLEHAUER, G.; VEILLARD, M.; BENOIT, J. P. "Formation and characterization of cisplatin loaded poly(d,l-lactide) microspheres for chemoembolization." Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 75(8), p. 750-755, 1986.

SRINIVASAN, K.; VISWANAD, B.; ASRAT, L.; KAUL, C. L.; RAMARAO, P. "Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening." Pharmacological Research, v. 52(4), p. 313-320, 2005.

STANGE, V. S.; GOMES, T. D. U. H.; de ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. C. P. "Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcolólico bruto, por meio de bioensaios *in vivo* e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), Cecropiaceae." Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 19 (2B), p. 637-642, 2009.

SYTSMA, K. J.; MORAWETZ, J.; PIRES, J. C.; NEPOKROEFF, M.; CONTI, E.; ZJHRA, M.; HALL, J. C.; CHASE, M. W. "Urticalean rosids: circumscription, rosid ancestry, and phylogenetics based on *rbcL*, *trnL-F*, and *ndhF* sequences." American Journal of Botany, v. 89, p. 1531–1546, 2002.

TAKADA, S.; UDA, Y.; TOGUCHI, H.; OGAWA, Y. "Application of a spray drying technique in the production of TRH- containing injectable sustained-release microparticles of biodegradable polymers." PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, v. 49(4), p. 180-184, 1995.

TANAE, M. M.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; DE LIMA, T. C. M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. "Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antacid secretion and antidepressant-like activities". Phytomedicine, v. 14, p. 309-313, 2007.

TEPE, B.; SOKMEN, A. "Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic *Tanacetum* subspecies from Turkish flora." Bioresource Technology, v. 98(16), p. 3076-3079, 2007.

TONG, P.; ZHANG, L.; HE, Y.; CHI, Y.; CHEN, G. "A simple capillary electrophoresis with electrochemical detection method for determination of the hydrolysis rate constant of chlorogenic acid." Talanta, v. 77(5), p. 1790-1794, 2009.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. "Reactive oxygen species in vascular biology: Implications in hypertension." Histochemistry and Cell Biology, v. 122(4), p. 339-352, 2004a.

TOUYZ, R. M. "Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: What is the clinical significance?" Hypertension, v. 44(3), p. 248-252, 2004b.

TRAPANI, A.; LAQUINTANA, V.; DENORA, N.; LOPEDOTA, A.; CUTRIGNELLI, A.; FRANCO, M.; TRAPANI, G.; LISO, G. "Eudragit RS 100 microparticles containing 2-hydroxypropyl-[beta]-cyclodextrin and glutathione: Physicochemical characterization, drug release and transport studies." European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 30(1), p. 64-74, 2007.

UN, J. J.; LEE, M. K.; YONG, B. P.; JEON, S. M.; CHOI, M. S. "Anti-hyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 318(2), p. 476-483, 2006.

US PHARMACOPEIA 30 (USP 30). Validation of Compendial Methods. United States Pharmacopeia Convention, Rockville, 2007.

VACHON, M. G.; NAIRN, J. G. "The use of ¹³C solid state NMR to elucidate physico-chemical association in Eudragit[®] RS100 microencapsulated acyl esters of salicylic acid." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 45(1), p. 9-21, 1998.

VAN DAM, R. M. "Coffee consumption and risk of type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer." Applied Physiology, Nutrition and Metabolism, v. 33(6), p. 1269-1283, 2008.

VATAI, T.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. "Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide." Journal of Food Engineering, v. 90(2), p. 246-254, 2009.

- VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. "Plantas Medicinais: Cura Segura?" Química Nova, v. 28 (3), p. 519-528, 2005.
- VERVOORT, L.; KINGET, R. "In vitro degradation by colonic bacteria of inulinHP incorporated in eudragit RS films." International Journal of Pharmaceutics, v. 129(1-2), p. 185-190, 1996.
- VERZA, S. G.; KREINECKER, M. T.; REIS, V.; HENRIQUES, A. T.; ORTEGA, G. G. "Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L." Quím. Nova [online], v.30, n.4, p. 815-820, 2007. ISSN 0100-4042. doi: 10.1590/S0100-40422007000400011. Acesso em 04/11/2009.
- VILA-JATO, J. L. (Ed.) "Tecnología Farmacéutica. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas." Madrid: Editorial Sintesis S. A., 1997. v I. p. 79 – 90.
- VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M. "Tratado de Tecnología Farmacéutica." 3 ed. Zaragoza - España. Editorial Acribia, 1982.
- WANG, Z.; CLIFFORD, M. N.; SHARP, P. "Analysis of chlorogenic acids in beverages prepared from Chinese health foods and investigation, in vitro, of effects on glucose absorption in cultured Caco-2 cells." Food Chemistry, v. 108(1), p. 369-373, 2008.
- WEI, Y.-J.; QI, L.-W.; LI, P.; LUO, H.-W.; YI, L.; SHENG, L.-H. "Improved quality control method for Fufang Danshen preparations through simultaneous determination of phenolic acids, saponins and diterpenoid quinones by HPLC coupled with diode array and evaporative light scattering detectors." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 45(5), p. 775-784, 2007.
- WELSCH, C. A.; LACHANCE, P. A.; WASSERMAN, B. P. "Dietary Phenolic Compounds: Inhibition of Na⁺-Dependent D-Glucose Uptake in Rat Intestinal Brush Border Membrane Vesicles." Journal of Nutrition, v. 119(11), p. 1698-1704, 1989.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004.
http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index.html
 Acesso em 09/10/2009.
- WHO. *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva: WHO, 2005.

XIANG, Z.; NING, Z. "Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in South-China honeysuckle." LWT - Food Science and Technology, v. 41(7), p. 1189-1203, 2008.

YU, L.; HALEY, S.; PERRET, J.; HARRIS, M.; WILSON, J.; QIAN, M. "Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts." Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50(6), p. 1619-1624, 2002.

ZANATTA, L.; DE SOUSA, E.; CAZAROLLI, L. H. ; CUNHA JUNIOR, A.; PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F. R. M. B. "Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats." Journal of Ethnopharmacology, v. 109, p. 151-155, 2007.

ZANATTA, L.; ROSSO, A.; FOLADOR, P.; FIGUEIREDO, M. S. R. B.; PIZZOLATTI, M. G.; LEITE, L. D., SILVA, F. R. M. B. "Insulinomimetic effect of kaempferol 3-neohesperidoside on the rat soleus muscle." Journal of Natural Products, v. 71, n. 4, p. 532-535, 2008.

ZHANG, L.; KOSARAJU, S. L. "Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants." European Polymer Journal, v. 43(7), p. 2956-2966, 2007.

Anexos / Apêndices

ANEXO 1. Laudo de identificação da matéria-prima vegetal *Cecropia glaziovii* Sneth.

Instituto de Botânica de São Paulo

Curadoria do Herbário

C. P. 4005

01061-970 São Paulo SP Brasil Fax: (011) 5073-6300 R. 302

Tel: (011) 5073-6300 R. 281

LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO

A planta que nos foi submetida à identificação, pelo CPQBA trata-se de:

Cecropia glaziovi Snethl. (Família Urticaceae)



Dra. Inês Cordeiro
Pesquisador Científico

São Paulo, 22 de janeiro de 2008.

Obs. Este laudo de identificação é exclusivo de CPQBA, não podendo ser repassado para nenhuma outra empresa, pois trata do resultado da análise de uma única amostra. Fica também vedada a menção ou utilização do nome ou sigla do Instituto de Botânica, em qualquer tipo de publicidade comercial, seja qual for o veículo publicitário, principalmente se o nome do Instituto for utilizado para qualificar produção industrial sobre a qual o mesmo não exerça qualquer meio de controle.

ANEXO 2. Protocolo PP 00085/CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Pró-Reitoria de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais

Fone: (048) 3721-9206 - Fax: (048) 3721-9599

e-mail: ceua@reitoria.ufsc.br

Ofício nº 021/03/CEUA/PRPe

Florianópolis, 19 de março de 2007.

Da: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

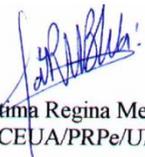
Ao(à): **Prof(a) Dr(a) Ângela Machado de Campos**

Departamento de Ciências Farmacêuticas - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, cadastrado sob o número PP00085/CEUA e intitulado "Desenvolvimento de sistemas poliméricos microestruturados de administração oral contendo extrato otimizado de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba) visando o tratamento do diabetes mellitus e da hipertensão arterial", a Presidente da CEUA deliberou o seguinte:

Em reunião ordinária da CEUA realizada em 14/03/2007, APROVOU o *ad referendum* do Protocolo PP00085, envolvendo o uso de 152 ratos Wistar para o período de dois anos. Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.


Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva
Presidente da CEUA/PRPe/UFSC

Atenciosamente,

ANEXO 3. Avaliação *in vivo* da atividade anti-diabética

Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos entre 50–54 dias de idade (180-250g), mantidos em gaiolas plásticas com alimento e água à vontade até o início dos tratamentos. A temperatura da sala foi mantida entre 21 ± 2 °C e com ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro. Animais, descritos como “jejum” foram privados de comida por 16 horas, mas com acesso livre à água. Os animais foram mantidos em concordância com as recomendações do Conselho Brasileiro de Medicina Veterinária e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, Protocolo PP 00085/CEUA.

Animais diabéticos induzidos com aloxana

O diabetes foi induzido através de uma única injeção intravenosa de monohidrato de aloxana (Sigma) 5% em soro fisiológico, na dose de 50 mg/kg de peso corporal, em animais sob anestesia etérea. Esta solução foi sempre preparada imediatamente antes do uso. Três dias depois, foram coletadas amostras de sangue e os níveis de glicose foram determinados para confirmar o desenvolvimento do diabetes. Foram considerados diabéticos apenas ratos que apresentavam glicemia entre 350-450 mg/dL (DE SOUSA, 2004; CAZAROLLI, 2006). As coletas de sangue foram realizadas nos tempos zero, 1, 2 e 3 horas, após o tratamento para a determinação da glicemia.

Teste oral de tolerância à glicose

Ratos em jejum foram divididos em três grupos de cinco animais cada. Grupo I, controle não tratado; Grupo II, hiperglicêmico, recebeu somente glicose (4 g/kg de peso corporal); Grupo III, tratado, recebeu glicose (4g/kg de peso corporal) juntamente com o extrato ou marcador (es) químico (s). A sobrecarga de glicose e o tratamento foram administrados por gavage. As coletas de sangue foram realizadas nos tempos 0, 15, 30, 60 e 180 min. após o tratamento.

Coleta de sangue e determinação da glicemia

Todos os animais estavam em jejum de 16 h antes da coleta de sangue. O sangue foi coletado por capilaridade pelo plexo retro-orbital em tubos de eppendorf. As amostras foram centrifugadas e imediatamente o soro foi separado. Alíquotas de 10 µl do soro (em duplicata) foram utilizados para dosar a glicose pelo método enzimático da glicose oxidase (GLI-COSE PP da Gold Analisa Diagnóstica). As amostras foram incubadas

por 10 minutos à temperatura ambiente (25 °C) e as absorvâncias foram lidas em um espectrofotômetro da marca GBC Scientific Equipment Pty LTDA, em 500 nm. Os resultados foram expressos em mg/dL de glicose. Todos os animais foram previamente anestesiados em câmara de éter antes da coleta de sangue. Após o término do experimento, os mesmos foram eutanasiados por decapitação em guilhotina e as carcaças foram mantidas em refrigerador até o momento do descarte no lixo hospitalar.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni pelo programa INSTAT versão 3.0. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05. Para a análise comparativa entre dois grupos foi utilizado o teste “t” de Student.

ANEXO 4. Avaliação *ex vivo* da atividade anti-hipertensiva

Montagem das preparações isoladas de anel de aorta torácica de rato

Os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia com quetamina e cloridrato de xilazina, seguido de exsanguinação feita pela secção da artéria carótida. Após a abertura da cavidade torácica, a aorta foi delicadamente removida e transferida para uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição (mM): NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 0,9; NaHCO₃ 25; glicose 11, e retirou-se os tecidos adiposos e conectivos adjacentes (ANDRIAMBELOSON, 1997).

O vaso foi seccionado na forma de anéis de 3 a 4 mm de comprimento, os quais foram transferidos para cubas de vidro com volume total de 5 mL contendo solução de Krebs-Henseleit, mantida à 37°C, pH 7,4 e aerada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂. Duas hastes metálicas foram inseridas na luz dos mesmos, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica acoplado a um sistema de aquisição de dados SOFT & SOLUTIONS (KitCad 8). A tensão de repouso das preparações correspondeu a 1,0 g e a solução nutriente foi substituída a cada 15 minutos.

Após o período de equilíbrio (60 minutos) as preparações foram contraídas com fenilefrina (1 μM) e a presença do endotélio funcional foi avaliada pela capacidade da acetilcolina (ACh, 1 μM) induzir ao relaxamento das preparações. Somente as preparações que apresentaram relaxamento igual ou superior a 75% foram consideradas com endotélio íntegro. Após a realização do teste da integridade do endotélio, as preparações foram lavadas com solução fisiológica e mantidas em repouso por 30 minutos.

Caracterização do efeito vasorrelaxante dos extratos de *Cecropia glaziovii* (2 de maceração e 2 de decocção)

Após os 30 minutos de repouso, foram realizadas Curvas Concentração Resposta (CCR) cumulativas (0,1 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aos extratos, na presença do endotélio, em anéis previamente contraídos com fenilefrina (1 μM).

APÊNDICE 1. Artigo submetido à revista Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis – Elsevier e cópia da confirmação de submissão do mesmo por parte da revista

TITLE: EXPERIMENTAL DESIGN AS A TOOL TO EVALUATE CHLOROGENIC AND CAFFEIC ACIDS EXTRACTED FROM *CECROPIA GLAZIOVII* SNETH.

¹Daniela P. Arend

^{1,3}Diva Sonaglio

^{1,3}Ana Lúcia Gomes Dos Santos

^{2,3}Flávio H. Reginatto

^{1,3}Angela M. de Campos*

¹Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

²Laboratório de Farmacognosia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if) do CNPq, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Moraes Rego N° 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901. Recife - PE

*Address to correspondence: Angela Machado de Campos, Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, Brazil, Postal Code: 88040-900.

Phone: +55 (48) 3721 5067; e-mail: angelacampos@ccs.ufsc.br

Fax: +55 (48) 3721 9350

ABSTRACT:

The effects of different parameters, including ethanol concentration, time of drug:solvent contact, temperature and the presence of a preservative, on chlorogenic acid (CGA) and caffeic acid (CFA) yields in *Cecropia glaziovii* Sneth extracts were investigated using an experimental design. In order to quantify the phenolic acids in these extracts a high-performance liquid chromatography–diode array detection (HPLC–DAD) method was developed and validated. Extracts with 80% ethanol presented a higher CGA content, but low amounts of CFA. Extracts with 20% ethanol showed a higher CFA concentration, but a sharp reduction in CGA extraction yield. The presence of a preservative, under the same extraction conditions, resulted in a slight difference or no difference in the CGA and CFA extraction yields. When the temperature was controlled at 4°C or 25°C, a slight alteration in the concentrations of the phenolics studied was observed. The present approach can be applied in order to determine the optimum conditions for the preparation of *Cecropia glaziovii* Sneth extracts based on CGA or CFA extraction yield as a chemical marker.

KEYWORDS: *Cecropia glaziovii*; Chlorogenic acid; Caffeic acid; Validation; Stability; Factorial design.

1. INTRODUCTION

The analysis of plants and herbal formulations presents several problems arising from their complex nature and the inherent variability of their constituents. Plants are complex mixtures of a variety chemicals, which poses a problem in terms of standardization and quality control. However, this very fact is responsible for their feature of being therapeutically effective. Consequently, the herbal drug preparation itself, as a whole, is regarded as the active substance. Hence, the extraction procedure and the stability of the extract are important since they determine the quality and the yield of the individual constituents. Also, the economical feasibility of an industrial process requires that it works in such a way that high efficiency values are attained. Some factors can contribute to achieving this aim: (1) correctly choosing the raw materials to extract; (2) subjecting these materials to appropriate pretreatment; and (3) optimizing the values of the variables which have a direct influence on the process [1]. *Cecropia* species are extensively used in traditional medicine in Latin America as cardiotonic, diuretic, hypotensive, and anti-inflammatory agents. Moreover chlorogenic acid (CGA), also found as a major compound in other plants, has been related to the pharmacological properties of *Cecropia* sp. [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11]. Although *Cecropia glaziovii* is widely used in Brazilian folk medicine, there are no reports concerning the influence of its extraction conditions on the phenolic acids content. In addition, little information is available on the quality evaluation and standardization methods for both qualitative and quantitative determination of this component [12, 13, 14]. In addition, studies related to the intermediate pharmaceutical products have been reported [15, 16, 17], and the results are not associated with the stability during the extraction process. Extraction efficiency is commonly a function of the process conditions. Temperature, time of contact, and plant:solvent ratio are some of the most important factors that influence the extraction efficacy in terms of quality and yield [1, 17, 18, 19, 20]. On the other hand, the role of each factor in the mass transfer of the process is not predictable since the chemical characteristics of the solvent and the diverse structure and composition of the natural products lead to each material-solvent system showing different behavior [1].

In the present study, a specific extraction condition allowed us to obtain caffeic acid (CFA), a substance not yet reported for this species. Thus, we evaluated the extraction and stability of CGA and CFA during the extraction process using a 2³ factorial design. Ethanolic solvent concentration, extraction time and the use of temperature or a preservative were chosen as variables. All data were obtained using a validated high performance liquid chromatography/diode array detection (HPLC/DAD) method for analysis of the crude extract of *Cecropia glaziovii* Sneth leaves.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Materials

2.1.1. Chemical reagents

Chemicals and reagents were obtained from the following commercial sources: chlorogenic acid and caffeic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), methanol and acetonitrile (HPLC grade) (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), acetic acid (Qhemis, São Paulo, Brazil), LC-grade water obtained with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA), and Methylparaben (DEG, São Paulo, Brazil). All samples and solutions were prepared from purified water. All other reagents and solvents were analytical grade.

2.1.2. Raw Material Characterization. Plant material

Dried leaves of *Cecropia glaziovii* were obtained from the Pluridisciplinary Center of Chemical, Biological and Agronomic Studies of the University of Campinas, SP, Brazil. The dry leaves were ground in a knife mill (Macmont) with a mesh of 3 mm. The ground material was submitted to a particle size distribution test, as described below.

2.2. Methods

2.2.1. Particle Size Distribution Test

Particle size distribution was evaluated by a standard sieving method, for a period of 15 minutes (Sieve shaker Bertel 1400), with 30 g of the dried milled plant material, using a series of sieves with screen sizes corresponding to 180, 355, 500, 710, 1000 and 1700 μm . The average particle size was calculated by means of Probito's evaluation [21, 22].

2.2.2. Preparation of Extracts

The extraction solutions (ES) were prepared by maceration at 5.0% (plant:solvent ratio; w/v) of crushed leaves (average diameter $780 \pm 410 \mu\text{m}$). Three ethanol concentrations (20, 50, and 80%; v/v) and three extraction times (4, 6, and 8 days) were evaluated. The extraction process was carried out at two different temperatures ($4^\circ\text{C} \pm 1$ and $25^\circ\text{C} \pm 2$) and in the presence or absence of the preservative (methylparaben, MP, 1.0 mg/mL). The design that evaluated the presence of the preservative was carried out at $25^\circ\text{C} \pm 2$. All extractions were prepared in duplicate in the dark.

2.2.3. Analytical procedures. Sample preparation

Three milliliters of the ES were diluted to ten milliliters with methanol:water solution (50:50; v/v). The samples were filtered through a 0.45 μm HVLP membrane (Millipore).

2.3. Chromatography Conditions (HPLC)

The chromatographic analysis was performed on a Perkin-Elmer chromatograph equipped with a Series 200 auto sampler, Series 200 binary pump, Series 200 UV-Vis detector or Series 200 EP Diode Array Detector and Series 200 vacuum degasser. A Zorbax C HP C18 column (5 μm , 150 x 4.6 mm, Agilent Technologies) was used. The gradient elution consisted of acetonitrile (A) – 1.0% acetic acid (B) with a flow rate of 1 mL/min and was programmed as follows: 0 – 15 min, 87% B; 15 – 25 min, 87 – 60% B; 25 – 34 min, 60% B. Detection was at 330 nm. The mobile phase was prepared daily and degassed by sonication before use. The injection volume was 20 μL . The data were gathered using TotalChrom® Workstation software. All chromatographic analyses were performed in triplicate.

2.4. Quantitative analysis

The quantification of chemical markers, CGA and CFA, was carried out by comparison of their retention times and by co-injection of standard solutions. Standard curves were plotted for chlorogenic (2.5 to 200 $\mu\text{g/mL}$) and caffeic (2.5 to 100 $\mu\text{g/mL}$) acids. The quantification of the individual compounds was performed using a validated regression curve ($r^2 > 0.9999$). All standard solutions were analyzed in triplicate and the ES were analyzed in duplicate. The average areas of the peaks were calculated.

2.5. Validation of analytical procedures

The parameters were validated according to International Conference on Harmonization (ICH) guidelines [23]. The linearity was determined for the calibration curves obtained by HPLC determination of CGA and CFA and for the extraction solution curves [8 days 20% ethanol (8d20), 6 days 50% ethanol (6d50) and 8 days 80% ethanol (8d80)]. The slope and the other statistics of the calibration curves were calculated by linear regression. The detection limit (DL) and quantification limit (QL) were based on the standard deviation (SD) and the slope (S) of the calibration curves [23]. The precision of the method was determined as repeatability and intermediate precision. To evaluate repeatability, the percent relative standard deviation (%RSD) of three concentrations of the curve (maximum, average and minimum), with each injection carried out three times, was considered. The intermediate precision was evaluated in triplicate over 3 days. Accuracy was determined by recovery, adding measured amounts of CGA and CFA to the extraction solutions. The recovery experiment was performed for one concentration of each phenolic acid level (25.0 $\mu\text{g/mL}$) in three different extraction solutions (8d20, 6d50 and 8d80) injected in triplicate. The recovery was determined by subtracting the values obtained for the control matrix preparation from those obtained for the samples that were prepared with the standards added, divided by the amount added and then multiplied by 100 [23].

2.6. Experimental design

Two 18-run 2^3 full factorial designs were used to evaluate 2 numerical variables at 2 levels and a central point (levels -1, 0 and +1): ethanol concentration (A) (20, 50 and 80 %) and extraction time (B) (4, 6 and 8 days). To each design a categorical variable (C) related to the stability was introduced. One design evaluated the effect of temperature (4 and 25°C) and the other of preservative (absence and presence), using -1 as a coded value for 4°C or absence of preservative and +1 for 25°C or presence of preservative. Two replicates of all experiments and the center point (level 0, i.e. 50% and 6 days) were run for both stability conditions. The different factor settings of the trials are shown in Table 1. All factor level combinations were carried

out in a randomized order. The results were evaluated with the program Design-Expert[®], Version 7.1.6. (StatEase, Minneapolis, MN, USA).

The effects were calculated presuming a linear model with interaction among the factors. The equation model was defined as:

$$Y = M + aA + bB + cC + abAB + acAC + bcBC + abcABC \quad (1)$$

where Y is the model response, M is the mean value, A, B, C are the main factors (A = ethanol concentration; B = extraction time; C = temperature or presence of a preservative), AB, AC, BC, and ABC are the binary and ternary interactions between the factors, and a, b, c or ab, ac, bc, and abc are the coefficients of the main factors and interaction factors, respectively, employing a probability error of $p < 0.05$. The equation terms were determined by reverse hierarchical regression analysis. Analysis of variance (ANOVA) was performed to support the polynomial equations and to identify the significance of single factors and their interactions.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Analytical method validation

Reversed-phase high performance liquid chromatographic (HPLC) was proposed as a suitable method for the simultaneous determination of CGA and CFA in ES. The method developed was then validated in terms of accuracy, precision, linearity, quantification limit and detection limit, in accordance with the ICH guidelines [23]. The nature of the sample determines which parameters should be evaluated, especially when the samples are complex biologic matrices, as in the case of plant extraction solutions [24]. Figure 1 shows a typical chromatogram for the ES. The retention times investigated (3.5 min for CGA and 6.0 min for CFA) showed a sharp and symmetrical peak, with good baseline resolution and minimal tailing, thus facilitating the accurate measurement of peak area ratios.

3.1.1. Precision and accuracy

The precision and accuracy were determined by spiking the sample with a known quantity of the standard. The mean recovery was calculated on one assay for each standard. Good accuracy was observed with satisfactory recovery in the range of 98.00 – 102.30% (Table 2). Measurement of intra- and inter-day variability was used to determine the precision of the newly developed method. The intra-day variation (repeatability) was determined by analyzing in triplicate the mixed standard solution three times within 1 day. While, for the inter-day variability test (intermediate precision), the solution was examined in triplicate on 3 separate days. The percentage relative standard deviation (% RSD) was taken as a measure of precision. The results for the precision showed low values (less than 5.0%) for intra and inter-day % RSD as shown in Table 3.

3.1.2. Calibration curves, linearity and detection and quantification limits

The calibration curves were found to be linear over the range of 2.5 – 200 µg/mL for CGA and 2.5 – 100 µg/mL for CFA. The ranges and correlation coefficients are given in Table 4. All calibration curves showed good linear regression in the range of $r^2 = 0.999974 - 0.999990$. The DL and QL values for CGA were found to be 0.3460 and 1.05 µg/mL, and for CFA were 0.0732 and 0.22 µg/mL, respectively (Table 4). In order to observe the presence of interference, extraction solution curves were used to determine the amount of samples (8d20, 6d50 and 8d80) where linearity was found. The regression equations and the correlation coefficients of the extraction solutions are shown in Table 5. Excellent linearity was obtained for both phenolic acids in the extraction solution 8d20 and CFA in 6d50, demonstrated by the correlation coefficients of the curves. However, in the case of 6d50 and 8d80, there was linearity deviation for the CGA curves with correlation coefficients of 0.9642 and 0.9229, respectively (Table 5). On the other hand, for ES concentrations higher than 30% (6d50) and 22% (8d80), the correlation coefficients were, respectively, 0.9917 and 0.9919 for CGA as shown in Table 6. In the case of CFA in 8d80 we could not determine linearity. The reason for this result might be a combination of a low concentration of caffeic acid and a high percentage of EtOH, changing the polarity of the sample.

3.2. Statistical analysis for stability study

Initially, CGA was chosen as the chemical marker because phenolic acid has been reported as the major compound in aqueous and/or butanolic extracts of *Cecropia* species [6, 25, 26, 27, 28, 29]. However, in this study, mixtures of ethanol and water were chosen as nontoxic and environmentally friendly solvents, which have been shown to be effective in the extraction of polyphenolic compounds. Since the type and magnitude of the extraction variables can affect analyte recovery, a suitable design (2³ full factorial) design was used. The experimental parameters analyzed initially were ethanol concentration and time. Surprisingly, in the 20% ethanolic extracts we observed a considerable amount of some other compound that was not detected in the extracts with higher ethanolic concentrations. Later, we identified it from the DAD spectrum as being caffeic acid (Fig. 2), and confirmed this finding through it having the same retention time as the CFA standard solution. In addition, when comparing CGA concentrations at 4d20 and 8d20 ES, a significant reduction in its yield from 4 to 8 days was observed. This effect might be related to a chemical and/or enzymatic and microbiological degradation, considering that chlorogenic acid is an ester of caffeic acid and quinic acid [30]. However, there are no reports of the degradation of CGA during the extraction process. In order to investigate this possible degradation, the influence of temperature and the presence of a preservative on CGA content in the extraction solutions were evaluated. For this, these two variables, each with two levels, were introduced into the experimental design.

The experimental design allows the maximum amount of information to be obtained from the data collected in the smallest number of experimental runs. The basic idea is to change all relevant factors simultaneously over a set of planned experiments and then connect and interpret the results using mathematical models [31]. To provide a statistical verification of the response curvatures, two center points were added to each design. Also, each experiment was repeated twice. This type of design was used to provide additional degrees of freedom and to measure the experimental error [31]. The CGA and CFA content of the 18 runs of each experimental design are presented in Table 7. The experiments resulted in concentrations of CGA ranging from 62.76 to 173.59 µg/g and of CFA from 4.90 to 46.21 µg/g.

3.2.1. Influence of Extraction Temperature

The model chosen to analyze the factorial design was one with two-factor interactions (2FI), for both responses. In the case of CFA, due to the considerable variation between the contents of the ES, a square-root transformation was required. The adequacy of the model was verified by an F-test and the determination coefficient R^2 . The analysis of variance for the extraction temperature showed that this regression model was highly significant ($p < 0.0001$) for CGA and CFA responses (Table 8), with values of 30.96 and 601.35, respectively. The R^2 values of 0.94 (CGA) and 0.997 (CFA) are in reasonable agreement with the adjusted values $\text{Adj } R^2 > 0.91$ (CGA) and $\text{Adj } R^2 > 0.99$ (CFA). The lack-of-fit for two responses was not significant ($p > 0.05$) (Table 8), which implies adequacy of the model. Curvature was statistically significant for both CGA and CFA, suggesting that three-dimensional plots for these responses are more curvilinear than linear in the design space. Our results provide strong evidence of interaction between factors AB and AC for both CGA and CFA extraction yields (Table 8). This implies that, for a short extraction time (4 days) an increase in both the EtOH % and the temperature leads to an increase in the CGA extraction yield (Figs. 3a and 3b), while with a long extraction time (8 days) with low EtOH % the CGA extraction yield drops regardless of the temperature. On the other hand, we observed an increase in the CFA content with lower EtOH % and at 8 days (Fig. 3c). Under these conditions, a higher CFA extraction is obtained at 25°C (Fig. 3d).

3.2.2. Influence of Extraction Preservative

In the same way as for the temperature design, the model chosen to analyze the factorial design had two-factor interactions (2FI) for both responses. For CFA, also with a considerable variation in content, a transformation (Base 10 log) was required. The ANOVA for the extraction preservative design indicates that the models for CGA and CFA responses are significant ($p < 0.0001$) (Table 8), with Model F-values of 74.79 and 636.56, respectively. The values of $R^2 > 0.95$ (CGA) and $R^2 > 0.996$ (CFA) were in reasonable agreement with $\text{Adj } R^2 > 0.93$ (CGA) and $\text{Adj } R^2 > 0.99$ (CFA). The lack-of-fit for two responses was not statistically significant ($p > 0.05$), as observed in Table 8. Curvature was statistically significant for both CGA and CFA.

The interaction between the factors A (EtOH %) and B (extraction time) are significant in terms of the CGA responses. The behavior for CGA content for the AB interaction was the same as that in the previous temperature design. With an increase in the EtOH % there was an increase in CGA concentration (fig. 4a). On the other hand with 20% ethanol after 8 days we observed a decrease in the CGA content (Fig. 4a) as previously discussed. The C factor is not significant (Table 8), indicating that the presence of a preservative does not modify the CGA concentration when compared to the ES without preservative (Figs. 4a and 4b). This suggests that the decrease in CGA content in 8d20 when compared to 4d20 is not due to microbiological degradation during the extraction period. For CFA content, the influence of both interactions AB and AC was observed. Decreasing the EtOH % and increasing the extraction time, leads to an increase in the CFA concentration (Fig. 4c). For the AC interaction a higher CFA extraction takes place at 20% EtOH in the absence of the preservative (Fig. 4c and 4d).

3.3. Optimization of extraction conditions

The final equations in terms of coded factors for CGA and CFA contents in the two experimental designs are:

$$\text{Temperature CGA} = 122.69 + 28.93 A - 8.69 B - 0.75 C + 8.69 AB + 6.37 AC \quad (2)$$

$$\text{Temperature Sqrt(CFA)} = 4.00 - 1.64 A + 0.26 B + 0.32 C - 0.23 AB - 0.28 AC \quad (3)$$

$$\text{Preservative CGA} = 119.97 + 33.14 A - 7.53 B + 10.08 AB \quad (4)$$

$$\text{Preservative Log}_{10}(\text{CFA}) = 1.14 - 0.39 A + 0.044 B - 0.032 C - 0.02 AB + 0.026 AC \quad (5)$$

These equations allow us to establish excellent conditions of extraction for each one of the acids, or both. The mathematically obtained conditions of extraction were applied and showed agreement with the theoretical data.

At this point the desired result must be clearly defined. Are we interested in obtaining an ES with a higher concentration of CGA or of CFA? Alternatively, should both be maximized?

The optimization of the extraction conditions for the contents of CGA and CFA were determined as follows: on analyzing Table 9 it can be noted that it would be impossible to obtain a maximum concentration of both phenolics in the same extract, even if we give more importance to one than the other. If both are maximized having the same importance, the desirability is 0.541, but if CFA becomes the more important compound, even if both are maximized, we have an increased desirability of 0.696.

It is important to remember that the design space limits were the only ones used. In this way the extract that permits maximization of only one phenolic acid has greater desirability but is also prepared under very different conditions. To obtain the maximum of CGA, it will be necessary to use 80% ethanol for 4 days, with a desirability of 0.853. To obtain a maximum concentration of CFA it will be necessary to use 20% ethanol for 8 days, with a desirability of 0.984 (table 9).

Table 10 shows predicted and experimental results for CGA and CFA for both conditions described above. We observed an excellent reproducibility of the results ranging between 0.18 and 5.88%, suggesting good predictability of the established model.

4. CONCLUSIONS

The extraction and HPLC-DAD methods described herein were applied to the determination of two phenolic acids extracted from *Cecropia glaziovii*. An important result was the detection of CFA, considering that this compound has not yet been reported for this species. The validated method is simple, selective, accurate, precise, specific and has the ability to separate and quantify CGA and CFA from *C. glaziovii* hydroethanolic extraction solutions. These results are of great interest since these phenolic acids show a broad spectrum of pharmacological activities and are widely distributed in nature. Therefore, the developed method can give rational support to evaluating the extraction procedures of this and other medicinal plants, and could also be used as a marker in studies for establishing dose-response relationships.

A statistical regression model allowed the determination of an optimized set of extraction conditions, in the design space studied, in order to obtain a high quantity of CGA or CFA. The statistical model was experimentally validated, with the variation observed between predicted and measured properties being below 6%. In conclusion, it was verified that it is possible to obtain ES with high concentrations of CGA or CFA using specific extraction conditions. Thus, it is necessary to clarify the intended use of the extracts obtained and the desired activity. In this regard, other simultaneous biological and analytical assays are necessary in order to obtain better results.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC – Grant number 05798, edict 008/2006) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors also thank Felipe Augusto Tasca for collaboration with the graphical illustrations.

REFERENCES

- [1] M. Pinelo, M. Rubilar, et al. (2005). "Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(6): 2111-2117.
- [2] R.V. Howell, G.U. Montero. (1996). "Diuretic effect of *Cecropia obtusifolia* (Moraceae) on albino rats". Rev. Biol. Trop. **44**, 93–96.
- [3] W.J. Arion, W. K. Canfield, et al. (1997). "Chlorogenic Acid and Hydroxynitrobenzaldehyde: New Inhibitors of Hepatic Glucose 6-Phosphatase." Archives of Biochemistry and Biophysics **339**(2): 315-322.
- [4] F.F. Rocha, A. J. Lapa, et al. (2002). "Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glaziovii* Sneth in mice." Pharmacology Biochemistry and Behavior **71**(1-2): 183-190.
- [5] N. Landrault, P. Poucheret, et al. (2003). "Effect of a polyphenols-enriched chardonnay white wine in diabetic rats." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(1): 311-318.
- [6] A. Herrera-Arellano, L. Aguilar-Santamaría, et al. (2004). "Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics." Phytomedicine **11**(7-8): 561-566.
- [7] R.R. Almeida, J.M. Raimundo, R.R. Oliveira, M.A.C. Kaplan, C.R. Gattass, R.T. Sudo, G. Zapata-Sudo. (2006). "Activity of *Cecropia lyratiloba* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in Wistar rats". Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. **33**: 109–113.
- [8] A.E. Consolini, M.I. Ragone, G.N. Migliori, P. Conforti, M.G. Volonte. (2006). "Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice". J. Ethnopharmacol. **106**, 90-96.
- [9] C. Souccar, R. M. Cysneiros, et al. (2008). "Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism." Phytomedicine **15**(6-7): 462-469.
- [10] A. Andrade-Cetto, J. Becerra-Jiménez, et al. (2008). "Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes." Journal of Ethnopharmacology **116**(1): 27-32.
- [11] A. J. Alonso-Castro, A. C. Miranda-Torres, et al. (2008). "*Cecropia obtusifolia* Bertol and its active compound, chlorogenic acid, stimulate 2-NBDglucose uptake in both insulin-sensitive and insulin-resistant 3T3 adipocytes." Journal of Ethnopharmacology **120**(3): 458-464.
- [12] M. Friedman and H. S. Jürgens. (2000). "Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(6): 2101-2110.
- [13] A.A. Van Der Sluis, M. Dekker, et al. (2005). "Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 3. Stability during storage." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(4): 1073-1080.
- [14] Q. Chang, Z. Zuo, et al. (2006). "Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. major) fruits and a hawthorn drink." Food Chemistry **98**(3): 426-430.
- [15] G. Heberlé, L. Wehrmann, et al. (2000). "Characterization of *cecropia glaziovii* Syneth. (Cecropiaceae) spray-dried extract." Acta Farm. Bonaerense **19**(3): 203-210.
- [16] Y.-J. Wei, L.-W. Qi, et al. (2007). "Improved quality control method for Fufang Danshen preparations through simultaneous determination of phenolic acids, saponins and diterpenoid quinones by HPLC coupled with diode array and evaporative light scattering detectors." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **45**(5): 775-784.
- [17] T. Vatai, M. Skerget, et al. (2009). "Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide." Journal of Food Engineering **90**(2): 246-254.
- [18] B. Isacchi, M. C. Bergonzi, et al. (2007). "Analysis and stability of the constituents of St. John's wort oils prepared with different methods." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **45**(5): 756-761.

- [19] G. Spigno and D. M. De Faveri (2007). "Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts." *Journal of Food Engineering* **78**(3): 793-801.
- [20] Y.Q. Ma, J. C. Chen, et al. (2009). "Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound." *Ultrasonics Sonochemistry* **16**(1): 57-62.
- [21] J.L. Vila-Jato. (1997). *Tecnología Farmacéutica. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*. Madrid: Editorial Síntesis S. A. v I, 79 – 90.
- [22] K.F.M. Pasqualoto, J.A.B. Funck, F.E.B. Silva, C.P. Kratz. (2005). "Utilização de probitos como instrumento estatístico simples à avaliação da distribuição de tamanho de partículas de dois tipos de celulose microcristalina". *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 31-34, 2005.
- [23] ICH - International Conference on Harmonization. (2005). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2(R1)*. London.
- [24] K.C.B. De Souza, E.E.S. Schapoval, V.L. Bassani. (2002). "LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **28**: 771-777.
- [25] A. Andrade-Cetto and H. Wiedenfeld (2001). "Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats." *Journal of Ethnopharmacology* **78**(2-3): 145-149.
- [26] A. Andrade-Cetto, R. Cárdenas, B. Ramírez-Reyes. (2007). "Hypoglycemic effect of *Cecropia peltata* L. on N5-STZ type 2 diabetic rats". *Pharmacologyonline* **3**: 203-210.
- [27] P. Nicasio, L. Aguilar-Santamaría, E. Aranda, S. Ortiz & M. González. (2005). "Hypoglycemic Effect and Chlorogenic Acid Content in Two *Cecropia* species". *Phytother. Res.* **19**: 661-664.
- [28] M.C. Revilla-Monsalve, A. Andrade-Cetto, et al. (2007). "Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients." *Journal of Ethnopharmacology* **111**(3): 636-640.
- [29] M.M. Tanae, M.T.R. Lima-Landman, T.C.M. De Lima, C. Souccar, A.J. Lapa. (2007). "Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antacid secretion and antidepressant-like activities". *Phytomedicine*, v. 14, p. 309-313.
- [30] M.R. Olthof, P. C. H. Hollman, et al. (2001). "Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans." *J. Nutr.* **131**(1): 66-71.
- [31] J. Gabriëlsson, N. O. Lindberg, et al. (2002). "Multivariate methods in pharmaceutical applications." *Journal of Chemometrics* **16**(3): 141-160.

Table 1. Statistical experimental design for extraction temperature and preservative system

| Temperature | | | | |
|---------------------|----------|-------------------|----------------------|--------------------|
| Factor | Units | Low level (-1) | Central level (0) | High level (+1) |
| EtOH (A) | % (v/v) | 20 | 50 | 80 |
| Time (B) | (t) days | 4 | 6 | 8 |
| Temperature (C) | (T) °C | 4.0 ± 1.0 | — | 25.0 ± 2.0 |
| Preservative | | | | |
| Factor | Units | Low level (-1) | Central level (0) | High level (+1) |
| EtOH (A) | % (v/v) | 20 | 50 | 80 |
| Time (B) | (t) days | 4 | 6 | 8 |
| Preservative (C) | — | absence | — | presence |

Table 2. Accuracy data for phenolic compounds

| Extracts ^a | Compound | Extract Concentration (µg/mL) | Recovery ^b | |
|-----------------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------|---------|
| | | | Mean (%) | RSD (%) |
| 8d20 | Chlorogenic Acid (25 µg/mL) | 65.9 | 100.6 | 0.4 |
| | Caffeic Acid (25 µg/mL) | 41.7 | 100.8 | 0.5 |
| 6d50 | Chlorogenic Acid (25 µg/mL) | 155.9 | 98.0 | 0.2 |
| | Caffeic Acid (25 µg/mL) | 9.4 | 101.9 | 0.5 |
| 8d80 | Chlorogenic Acid (25 µg/mL) | 138.7 | 100.1 | 0.5 |
| | Caffeic Acid (25 µg/mL) | 5.3 | 102.3 | 0.1 |

^a 8d20 = extraction for 8 days with 20% ethanol; 6d50 = 6 days with 50% ethanol; 8d80 = 8 days with 80% ethanol

^b Recovery was determined by injection of spiked samples, in triplicate, with standard solutions

Table 3. Repeatability and intermediate precision data for phenolic standards

| Compound | Repeatability ^a | | Intermediate precision ^a | |
|------------------|----------------------------|------------|-------------------------------------|------------|
| | Concentration (µg/mL) | RSD (%) | Concentration (µg/mL) | RSD (%) |
| Chlorogenic Acid | 2.5 | 0.2 | 50.0 | 0.6 |
| | 50 | 0.4 | | |
| | 200 | 0.2 | | |
| Caffeic Acid | 2.5 | 0.4 | 25.0 | 0.7 |
| | 25 | 0.3 | | |
| | 100 | 0.2 | | |

^a Limits: RSD < 5%

Table 4. Calibration data of phenolic standards

| Compound | Linearity Range (µg/mL) | Calibration equation ^a | Correlation coefficient (r ²) | QL ^b (µg/mL) | DL ^b (µg/mL) |
|------------------|-------------------------|-----------------------------------|---|-------------------------|-------------------------|
| Chlorogenic Acid | 2.5 - 200 | y = 54291x - 16595 | 0.999990 | 1.05 | 0.3460 |
| Caffeic Acid | 2.5 - 100 | y = 91599x - 6746,9 | 0.999974 | 0.22 | 0.0732 |

^a Chlorogenic Acid and Caffeic Acid (n = 3)

^b QL: quantification limit; DL: detection limit

Table 5. Linearity of extraction solutions

| ES | Range (%) | | Regression equation | | Correlation coefficient | |
|------|------------|-----------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------|
| | CGA | CFA | CGA | CFA | CGA | CFA |
| 8d20 | 5 - 100 | 11 - 100 | $y = 463264x + 3435.5$ | $y = 513506x + 1591.4$ | 0.9987 | 0.9996 |
| 6d50 | 2.5 - 100 | 30 - 100 | $y = 581907x + 575133$ | $y = 82114x + 7757.6$ | 0.9642 | 0.9992 |
| 8d80 | 1.75 - 100 | NP ^a | $y = 509377x + 574127$ | NP ^a | 0.9229 | NP ^a |

^a NP: not possible to determine

Table 6. Linearity of extraction solutions with higher lowest concentration

| ES | Range (%) | | Regression equation | | Correlation coefficient | |
|------|-----------|-----|---------------------------|-----|-------------------------|-----|
| | CGA | CFA | CGA | CFA | CGA | CFA |
| 6d50 | 30 - 100 | | $y = 450489x + 1406787.3$ | | 0.9917 | |
| 8d80 | 22 - 100 | | $y = 345590x + 1427156.3$ | | 0.9919 | |

Table 7. CGA and CFA content in *Cecropia glaziovii* extraction solutions using two full factorial designs

| STD | EtOH (%) | t (days) | Stability conditions ^a | CGA (µg/g) | CFA (µg/g) |
|------|----------|----------|-----------------------------------|------------|------------|
| T1 | 20 | 4 | 4 | 112.24 | 21.38 |
| T2 | 20 | 4 | 4 | 116.12 | 18.95 |
| T3 | 80 | 4 | 4 | 152.89 | 5.60 |
| T4 | 80 | 4 | 4 | 139.65 | 4.94 |
| T5 | 20 | 8 | 4 | 84.81 | 31.32 |
| T6 | 20 | 8 | 4 | 90.32 | 30.95 |
| T7 | 80 | 8 | 4 | 145.86 | 5.45 |
| T8 | 80 | 8 | 4 | 145.56 | 5.59 |
| T9 | 20 | 4 | 25 | 97.01 | 32.65 |
| T10 | 20 | 4 | 25 | 119.15 | 34.64 |
| T11 | 80 | 4 | 25 | 173.59 | 6.17 |
| T12 | 80 | 4 | 25 | 140.35 | 4.90 |
| T13 | 20 | 8 | 25 | 62.76 | 46.21 |
| T14 | 20 | 8 | 25 | 67.62 | 42.79 |
| T15 | 80 | 8 | 25 | 155.19 | 5.90 |
| T16 | 80 | 8 | 25 | 159.86 | 6.12 |
| T17 | 50 | 6 | 4 | 160.75 | 7.85 |
| T18 | 50 | 6 | 25 | 165.09 | 10.07 |
| MP1 | 20 | 4 | absence | 119.15 | 34.64 |
| MP2 | 20 | 4 | absence | 97.01 | 32.65 |
| MP3 | 80 | 4 | absence | 173.59 | 6.17 |
| MP4 | 80 | 4 | absence | 139.86 | 4.90 |
| MP5 | 20 | 8 | absence | 62.76 | 46.21 |
| MP6 | 20 | 8 | absence | 67.62 | 42.79 |
| MP7 | 80 | 8 | absence | 155.19 | 5.90 |
| MP8 | 80 | 8 | absence | 159.86 | 6.12 |
| MP9 | 20 | 4 | presence | 100.18 | 25.82 |
| MP10 | 20 | 4 | presence | 101.45 | 24.81 |
| MP11 | 80 | 4 | presence | 140.15 | 4.92 |
| MP12 | 80 | 4 | presence | 148.64 | 5.53 |
| MP13 | 20 | 8 | presence | 72.04 | 34.53 |
| MP14 | 20 | 8 | presence | 74.45 | 34.49 |
| MP15 | 80 | 8 | presence | 155.14 | 6.02 |
| MP16 | 80 | 8 | presence | 152.43 | 5.93 |
| MP17 | 50 | 6 | absence | 165.09 | 10.07 |
| MP18 | 50 | 6 | presence | 166.51 | 10.34 |

^aT1 – T18: Temperature (°C); MP1 - MP18: Preservative

Table 8. Analysis of variance: Temperature and Preservative

| Source | <i>p - Value</i> | | | |
|---------------------------|------------------|----------|--------------|----------|
| | Temperature | | Preservative | |
| | CGA | CFA | CGA | CFA |
| Model | < 0.0001 | < 0.0001 | < 0.0001 | < 0.0001 |
| A | < 0.0001 | < 0.0001 | < 0.0001 | < 0.0001 |
| B | 0.0071 | < 0.0001 | 0.0072 | < 0.0001 |
| C | 0.7782 | < 0.0001 | --- | 0.0009 |
| AB | 0.0071 | < 0.0001 | 0.0009 | 0.0176 |
| AC | 0.0330 | < 0.0001 | --- | 0.0038 |
| Curvature | 0.0014 | < 0.0001 | < 0.0001 | 0.0002 |
| Lack of Fit | 0.5863 | 0.4923 | 0.7574 | 0.8580 |
| R² | 0.9393 | 0.9967 | 0.9452 | 0.9969 |
| Adj R² | 0.9090 | 0.9950 | 0.9326 | 0.9953 |
| Pred R² | N/A | N/A | 0.9025 | N/A |
| Adeq Precision | 13.939 | 52.884 | 19.359 | 50.012 |

Table 9. Process optimization

| | Goal | Importance | Solution | | | | | Desirability |
|-----|--------------|------------|----------|-------------|--------------|------------|------------|--------------|
| | | | EtOH (%) | Time (days) | Storage (°C) | CGA (µg/g) | CFA (µg/g) | |
| CGA | maximize | 3 | 28 | 4 | 25 | 111.15 | | 0.541 |
| CFA | maximize | 3 | | | | 27.99 | | |
| CGA | maximize | 1 | 20 | 6 | 25 | 90.53 | | 0.696 |
| CFA | maximize | 5 | | | | 37.52 | | |
| CGA | maximize | 3 | 80 | 4 | 25 | 157.25 | | 0.853 |
| CFA | within range | 3 | | | | 5.58 | | |
| CGA | within range | 3 | 20 | 8 | 25 | 69.26 | | 0.984 |
| CFA | maximize | 3 | | | | 45.22 | | |

Table 10. Extraction process optimization and statistical model validation

| Maximum CFA (µg/mL) | Predicted properties | Experimental properties | Deviation (%) |
|-------------------------|----------------------|-------------------------|---------------|
| CGA (µg/g) within range | 69.26 | 65.19 | 5.88 |
| CFA (µg/g) maximum | 45.22 | 44.50 | 1.18 |
| Maximum CGA (µg/mL) | | | |
| CGA (µg/g) maximum | 157.25 | 156.97 | 0.18 |
| CFA (µg/g) within range | 5.58 | 5.54 | 0.72 |

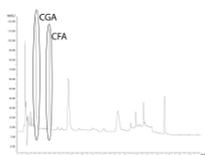


Figure 1. Typical UV chromatogram of *Cecropia glaziovii* Sneth extraction solution. Recorded at 330 nm

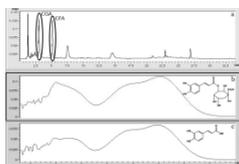


Figure 2. (a) DAD chromatogram of *Cecropia glaziovii* Sneth extraction solution. (b) DAD spectrum and chemical structure of Chlorogenic acid (CGA). (c) DAD spectrum and chemical structure of Caffeic acid (CFA).

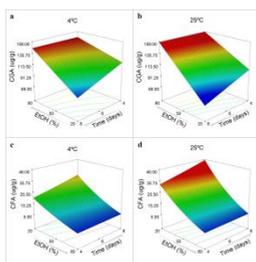


Figure 3. Influence of extraction Temperature. (a) 4°C influence in CGA extraction. (b) 25°C influence in CGA extraction. (c) 4°C influence in CFA extraction. (d) 25°C influence in CFA extraction.

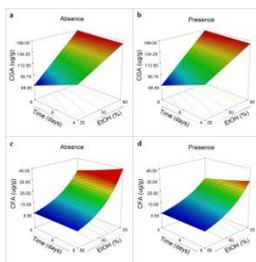


Figure 4. Influence of extraction Preservative. (a) Absence of preservative influence in CGA extraction. (b) Presence of preservative influence in CGA extraction. (c) Absence of preservative influence in CFA extraction. (d) Presence of preservative influence in CFA extraction.

Dear Angela,

Your submission entitled "EXPERIMENTAL DESIGN AS A TOOL TO EVALUATE CHLOROGENIC AND CAFFEIC ACIDS FROM CECROPIA GLAZIOVII SNETH" has been received by the Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jpba/>.

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/jpba/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned by the journal staff.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis