



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

ISABELLE CRISTINNE FERRAZ BEZERRA

**PLANEJAMENTO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS  
FARMACÊUTICAS PARA VEICULAÇÃO DE EXTRATIVOS DERIVADOS DAS  
FOLHAS DE *Eugenia uniflora* Linn (PITANGA)**

Recife

2021

ISABELLE CRISTINNE FERRAZ BEZERRA

**PLANEJAMENTO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS  
FARMACÊUTICAS PARA VEICULAÇÃO DE EXTRATIVOS DERIVADOS DAS  
FOLHAS DE *Eugenia uniflora* Linn (PITANGA)**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutorado em Inovação Terapêutica na área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Recife

2021

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Bezerra, Isabelle Cristinne Ferraz

Planejamento, produção e caracterização de formas farmacêuticas para veiculação de extrativos derivados das folhas de *Eugenia uniflora* Linn (pitanga) / Isabelle Cristinne Ferraz Bezerra - 2021.

199 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Luiz Alberto Lira Soares

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2021.

Inclui referências e apêndice.

1. *Eugenia uniflora* 2. Fitoterápicos 3. Extrato seco por aspersão  
I. Soares, Luiz Alberto Lira (Orientador) II. Título

615.1 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022-023

ISABELLE CRISTINNE FERRAZ BEZERRA

**PLANEJAMENTO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS  
FARMACÊUTICAS PARA VEICULAÇÃO DE EXTRATIVOS DERIVADOS DAS  
FOLHAS DE *Eugenia uniflora* Linn (PITANGA)**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutorado em Inovação Terapêutica na área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para Saúde.

**Aprovado em: 25/02/2021.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luíz Alberto Lira Soares (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Karina Perreli Randau (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida (Examinador Externo)  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

---

Dra. Zênia Maria Maciel Lavra (Examinador Externo)  
Instituto Ageu Magalhães/ Fundação Osvaldo Cruz

---

Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno (Examinador Externo)  
Universidade Estadual da Paraíba

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, em especial à minha mãe, por todo o suporte e apoio durante toda minha vida. Ao meu pai por todo carinho, dedicação e amor durante toda essa jornada.

Ao meu orientador Luiz Soares (Lula), pela oportunidade e todos os ensinamentos passados durante todos estes anos desde a iniciação científica. O professor Lula, para mim, sempre será um grande exemplo de pessoa e profissional a ser seguido.

À Magda, Rhayanne e Kassia por serem papéis importantes para o desenvolvimento deste trabalho, agradeço por todas as contribuições e todo o suporte.

A todos os integrantes do Laboratório de Farmacognosia (NUDATEF) pelos bons momentos compartilhados em todos esses anos de trabalho.

Às minhas amigas e companheiras de curso Layanne e Laís, que mesmo distantes sempre estiveram presentes em minha vida, me oferecendo toda a amizade e afeto que precisei.

Ao meu amigo Dan, que foi uma figura que eu admirei desde que cheguei no curso de Farmácia, obrigada por todos os incentivos e momentos de compreensão.

Ao meu grupo “7”. Ana, Ágatha, Jéssica, Kayla, Kelly e Mayara, vocês têm sido meu alicerce e um ponto de acolhimento e amor nesses últimos tempos. Obrigada por estarem na minha vida. “Que alívio sermos 7, que alívio termos umas às outras”.

Agradeço por fim, à Lucas, por estar comigo todos esses anos, por não desistir de mim e me acolher mesmo não compreendendo todos os meus estigmas. Por mim, eu não estaria aqui hoje. Mas por você, eu estou. Obrigada.

## RESUMO

A busca por medicamentos fitoterápicos apresenta destaque no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos devido à biodiversidade e grande número de espécies medicinais. Dentre as espécies promissoras, destaca-se *Eugenia uniflora* Linn (pitangueira), que apresenta propriedades biológicas, como antimicrobiana, anti-hipertensiva e antidiabética, sendo de interesse para o desenvolvimento de produtos derivados da espécie. Assim, o objetivo deste trabalho engloba desenvolver, produzir e avaliar formas farmacêuticas (produtos secos(pós) e emulsões) derivadas de extratos das folhas de *Eugenia uniflora*. A abordagem iniciou com uma otimização de extração através de planejamento de misturas, empregando água, metanol, etanol e acetona. Variáveis como método extrativo e quantidade de droga foram avaliadas em ensaio fatorial 3<sup>2</sup>. O extrato otimizado foi seco por aspersão utilizando adjuvantes, e os produtos secos foram caracterizados segundo o rendimento/propriedades físico-químicas. Também foram executados ensaio fatorial e planejamento de misturas dos adjuvantes para avaliar as condições de secagem. Para os sistemas dispersos, foram realizados estudos de pré-formulação, avaliando sistemas convencionais (tween20/span80-TS; cera autoemulsionante (LanetteN-LN)), pickering (hidroxipropilmetilcelulose-HPMC e goma xantana-GX) e co-estabilizados. No planejamento de misturas, foram obtidos 15 extratos para a construção de modelos, usados para simular outras 7 misturas. A mistura quaternária (46:13:18:23;v/v/v/v) apresentou o melhor desempenho. A análise das condições extrativas em ensaio fatorial revelou que a melhor condição para preparação do extrato é obtida utilizando turbólise e 5g de droga vegetal. Na secagem por aspersão, os dados mostraram a viabilidade de secagem de extratos com e sem adjuvantes, resultando em rendimentos médios de cerca de 45% (m/m). Quanto à caracterização dos produtos secos, a umidade residual se apresentou na faixa de 4,8–8,2%. O produto sem adjuvante apresentou o menor tamanho médio, e o produto contendo celulose foi responsável por partículas maiores. No ângulo de repouso, os produtos revelaram propriedades favoráveis ao fluxo. Os dados de Fator de Hausner e Índice de compressibilidade indicaram que a adição de adjuvantes melhorou as propriedades tecnológicas; e, que o dióxido de silício coloidal-DSC foi responsável pelos melhores resultados. Na otimização da secagem, a apenas o rendimento foi significativo, e as melhores condições de secagem foram obtidas a 140°C, com vazão de 0,4 L/h e 1,55 m<sup>3</sup>/min de velocidade de fluxo de ar. Quanto à mistura de adjuvantes, foram obtidos 7 produtos, e o produto contendo a mistura ternária dos adjuvantes obteve as melhores respostas, possibilitando o incremento das propriedades físicas do pó em relação aos produtos testados. Foram testadas 6 formulações de sistemas dispersos, das quais as estabilizadas por HPMC apresentaram separação

de fases, enquanto que as convencionais e estabilizadas por GX apresentaram estabilidade. Nos ensaios sob estresse, a emulsão convencional apresentou sedimentação, indicando que os sistemas co-estabilizados, pickering (GX) e convencional (LN) apresentaram maior estabilidade. Os resultados encontrados revelam dados tecnológicos promissores para aplicação dos produtos secos como forma final e como insumo para a produção de cápsulas e comprimidos. Além disso, a etapa de pré-formulação de sistemas emulsionados apontou que os sistemas co-estabilizados e pickering apresentaram resultados vantajosos para a futura aplicação na fabricação de formas dispersas contendo extrativos de *E. uniflora*.

**Palavras Chave:** *Eugenia uniflora*; desenho experimental; tecnologia de fitoterápicos; extrato seco por aspersão; sistemas dispersos.

## ABSTRACT

The search for herbal medicines is highlighted in the development of new therapeutic agents due to the biodiversity and large number of medicinal species. Among the promising species, *Eugenia uniflora* Linn (pitangueira), which has biological properties, such as antimicrobial, antihypertensive and antidiabetic, being of interest for the development of pharmaceutical products derived from the species. Thus, the aim of this work includes developing, producing and evaluating pharmaceutical forms (dry products (powders) and emulsions) derived from extracts of *Eugenia uniflora* leaves. The approach started with an extraction optimization through mix planning, employing water, methanol, ethanol and acetone. Variables such as extractive method and quantity of drugs were evaluated in a factorial assay <sup>32</sup>. The optimized extract was spray dried using adjuvants, and the dry products were characterized according to the yield/physical-chemical properties. Factorial assay and mixture planning of adjuvants were also performed to evaluate drying conditions. For the dispersed systems, pre-formulation studies were conducted, evaluating conventional systems (tween20/span80-TS; auto-emulsifying wax (LanetteN-LN)), pickering (hydroxypropylmethylcellulose-HPMC and xanthan gum-XG) and co-stabilized. In the planning of mixtures, 15 extracts were obtained for the construction of models, used to simulate 7 other mixtures. The quaternary mixture (46:13:18:23;v/v/v/v) showed the best performance. The analysis of extractive conditions in factorial assay revealed that the best condition for extract preparation is obtained using turbo extraction and 5g of plant drug. In spray drying, the data showed the drying viability of extracts with and without adjuvants, resulting in average yields of about 45% (w/w). Regarding the characterization of dry products, residual moisture was in the range of 4.8–8.2%. The product without adjuvant presented the smallest average size, and the product containing cellulose was responsible for larger particles. At the angle of rest, the products revealed properties favorable to the flow. Hausner Factor and Compressibility Index data indicated that the addition of adjuvants improved technological properties; and that colloidal silicon dioxide-CSD was responsible for the best results. In the drying optimization, only the yield was significant, and the best drying conditions were obtained at 140°C, with flow of 0.4 L/h and 1.55 m<sup>3</sup>/min of airflow velocity. Regarding the mixture of adjuvants, 7 products were obtained, and the product containing the ternary mixture of adjuvants obtained the best responses, allowing the increase of the physical properties of the powder in relation to the tested products. Six formulations of dispersed systems were tested, of which those stabilized by HPMC presented phase separation, while conventional ones and XG stabilized presented stability. In the stress tests, the conventional emulsion showed sedimentation,

indicating that the co-stabilized, pickering (GX) and conventional (LN) systems showed greater stability. The results found reveal promising technological data for the application of dry products as a final form and as an input for the production of capsules and pills. In addition, the preformulation stage of emulsified systems indicated that the co-stabilized and pickering systems showed advantageous results for the future application in the manufacture of dispersed forms containing *E. uniflora* extracts.

**Keywords:** *Eugenia uniflora*; experimental design; phytotherapeutic technology; spray-dried extract; dispersed systems.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - <i>Eugenia uniflora</i> L. (A), pitangas (B), e distribuição geográfica da pitangueira no território brasileiro (C)..... | 25 |
| Figura 2 - Flavonoides miricetina e miricitrina (miricetina-O-ramnosídeo) (A); Taninos macrocíclicos eugeniflorin D1 e D2.(B).....  | 30 |
| Figura 3 - Planejamento centroide simplex para o estudo de misturas de três componentes (a) e de quatro componentes (b). ....       | 35 |
| Figura 4 - Representação esquemática de emulsões e seus processos de instabilidade. ....                                            | 49 |
| Figura 5 - Histograma de distribuição granulométrica (A) e curva de retenção e passagem (B). ....                                   | 74 |
| Figura 6 - Gráficos de Probabilidade Normal (A) e de Efeitos Padronizados (Paretos) (B) para a variável Resíduo Seco.....           | 80 |
| Figura 7 - Gráficos de contorno obtidos para o teor de resíduo seco nas diferentes composições do simplex centroide.....            | 81 |
| Figura 8 - Gráficos de Probabilidade Normal (A) e de Efeitos Padronizados (Paretos) (B) para a variável de Flavonoides Totais. .... | 84 |
| Figura 9 - Gráficos de contorno obtidos para os teores de Flavonoides nas diferentes composições do simplex centroide. ....         | 85 |
| Figura 10 - Gráficos de Probabilidade Normal (A) e de Efeitos Padronizados (Paretos) (B) para a variável de Taninos Totais.....     | 87 |
| Figura 11 - Gráficos de contorno obtidos para o teor de Taninos Totais nas diferentes composições do simplex centroide. ....        | 88 |
| Figura 12 - <i>Fingerprints</i> obtidos para os extratos produzidos pelo simplex centroide. ....                                    | 91 |
| Figura 13 - Gráficos de Probabilidade Normal (A) e de Efeitos Padronizados (Paretos) (B) para a variável Miricitrina. ....          | 93 |
| Figura 14 - Gráficos de contorno obtidos para os teores de Miricitrina (MYR) nas diferentes composições do simplex centroide. ....  | 94 |
| Figura 15 - Gráficos de Probabilidade Normal (A) e de Efeitos Padronizados (Paretos) (B) para a variável flavonoide 2. ....         | 95 |
| Figura 16 - Gráficos de contorno obtidos para os teores de F2 nas diferentes composições do simplex centroide.....                  | 96 |
| Figura 17 - Estrutura da molécula de Miricitrina. ....                                                                              | 97 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 18 - Gráficos de Probabilidade Normal (A) e de Efeitos Padronizados (Paretos) (B) para a variável de Ácido Gálico. ....                                                                                                                                                                                                                              | 101 |
| Figura 19 - Gráficos de Probabilidade Normal (A) e de Efeitos Padronizados (Paretos) (B) para a variável Ácido Elágico.....                                                                                                                                                                                                                                 | 101 |
| Figura 20 - Gráficos de contorno obtidos para os teores de Ácido Gálico (AG) nas diferentes composições do simplex centroide. ....                                                                                                                                                                                                                          | 102 |
| Figura 21 - Gráficos de contorno obtidos para os teores de Ácido Elágico (AE) nas diferentes composições do simplex centroide. ....                                                                                                                                                                                                                         | 102 |
| Figura 22 - Estrutura das moléculas de ácido gálico (A) e ácido elágico (B). ....                                                                                                                                                                                                                                                                           | 103 |
| Figura 23 - Fingerprint para polifenóis dos extratos produzidos por simplex centroide através de cromatografia de camada delgada de alta eficiência. ....                                                                                                                                                                                                   | 104 |
| Figura 24 - Gráficos de <i>desirability</i> para a composição da mistura quaternária de água:metanol:etanol:acetona (46:13:18:23, v/v/v/v) e previsão de teores de resíduos, flavonoides, eficiência de extração de flavonoides totais, taninos totais, eficiência de extração de taninos (A) e para ácido gálico, ácido elágico, miricitrina e F2 (B)..... | 109 |
| Figura 25 - <i>Fingerprint</i> por CCDAE para polifenóis obtido dos extratos modelados por planejamento simplex centroide. ....                                                                                                                                                                                                                             | 110 |
| Figura 26 - <i>Fingerprint</i> por CLAE para polifenóis de extratos modelados por planejamento simplex centroide.....                                                                                                                                                                                                                                       | 110 |
| Figura 27 - Gráficos de superfície de resposta e de efeitos padronizados para as respostas: Resíduo Seco, Flavonoides Totais, Eficiência de Extração de Flavonoides (EEF). ....                                                                                                                                                                             | 114 |
| Figura 28 - Gráficos de superfície de resposta e de efeitos padronizados para as respostas: Taninos Totais e Eficiência de Extração de Taninos (EET).....                                                                                                                                                                                                   | 115 |
| Figura 29 - Gráficos de superfície de resposta e de efeitos padronizados para as respostas: Ácido Gálico, Ácido Elágico.....                                                                                                                                                                                                                                | 116 |
| Figura 30 - Gráficos de superfície de resposta e de efeitos padronizados (Paretos) para as respostas: Miricitrina e F2. ....                                                                                                                                                                                                                                | 117 |
| Figura 31 - Gráfico de paretos (A) e superfície de resposta (B) para o rendimento no planejamento fatorial. ....                                                                                                                                                                                                                                            | 136 |
| Figura 32 - Gráficos de superfície de resposta (A), contorno (B), probabilidade normal (C) e Paretos (D) obtidos para a variável rendimento no planejamento de misturas de adjuvantes. ....                                                                                                                                                                 | 144 |
| Figura 33 - Gráficos de superfície de resposta (A), contorno (B), probabilidade normal (C) e Paretos (D) obtidos para a variável umidade no planejamento de misturas de adjuvantes....                                                                                                                                                                      | 146 |

|                                                                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 34 - Gráficos de superfície de resposta (A), contorno (B), probabilidade normal (C) e Paretos (D) obtidos para a variável ângulo de repouso no planejamento de misturas de adjuvantes. .... | 148 |
| Figura 35 - Gráficos de superfície de resposta (A), contorno (B), probabilidade normal (C) e paretos (D) obtidos para a variável índice de Carr no planejamento de misturas de adjuvantes. ....    | 152 |
| Figura 36 - Gráficos de superfície de resposta (A), contorno (B), probabilidade normal (C) e paretos (D) obtidos para a variável fator de Hausner no planejamento de misturas de adjuvantes. ....  | 154 |
| Figura 37 - Curvas de <i>desirability</i> geradas no planejamento de misturas de adjuvantes na obtenção de produtos secos das folhas de <i>E. uniflora</i> . ....                                  | 155 |
| Figura 38 - Curvas de <i>desirability</i> (modificadas manualmente) obtidas no planejamento de misturas de adjuvantes na obtenção de produtos secos das folhas de <i>E. uniflora</i> . ....        | 156 |
| Figura 39 - Análise fitoquímica de produto seco por aspersão e frações de <i>Eugenia uniflora</i> . ....                                                                                           | 158 |
| Figura 40 - Fingerprint para polifenóis de produto seco por aspersão e frações de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> . ....                                                                         | 159 |
| Figura 41 - Diagramas de fases pseudo-ternários obtidos através de agitação por ultra-turrax (A) e sonda ultrassônica (B). ....                                                                    | 161 |
| Figura 42 - Variação do pH das diferentes formulações na etapa de otimização do método de obtenção. ....                                                                                           | 163 |
| Figura 43 - Gráfico de Paretos – A; Superfície de Resposta – B, para a resposta pH. ....                                                                                                           | 165 |
| Figura 44 - Gráfico de efeitos padronizados (Paretos) – A; Gráfico de Superfície de Resposta – B, para a resposta turbidimetria. ....                                                              | 167 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1 - Proporção de solventes utilizados para cada sistema de extração obtido.....                                                                                                                                                                                                                        | 56  |
| Tabela 2. Parâmetros, fatores e variáveis modificadas em ensaio fatorial 2 <sup>3</sup> .....                                                                                                                                                                                                                 | 64  |
| Tabela 3 - Tabela de planejamento de misturas de adjuvantes para planejamento simplex centroide de misturas. ....                                                                                                                                                                                             | 65  |
| Tabela 4 - Composição dos sistemas emulsionados convencionais, pickering e co-estabilizados produzidos. ....                                                                                                                                                                                                  | 71  |
| Tabela 5 - Composição da emulsão convencional à base de cera emulsionante (Lanette N). .                                                                                                                                                                                                                      | 71  |
| Tabela 6 - Resultados obtidos para o planejamento simplex centroide.....                                                                                                                                                                                                                                      | 76  |
| Tabela 7 - Modelos matemáticos e dados de ANOVA para as variáveis analisadas no planejamento de mistura por simplex centroide. ....                                                                                                                                                                           | 77  |
| Tabela 8 - Teor de resíduo seco obtido no simplex centroide. ....                                                                                                                                                                                                                                             | 79  |
| Tabela 9 - Teor de Flavonoides Totais obtidos no simplex centroide.....                                                                                                                                                                                                                                       | 83  |
| Tabela 10 - Teor de taninos totais obtidos no simplex centroide. ....                                                                                                                                                                                                                                         | 86  |
| Tabela 11 - Valores de eficiência de extração para os extratos obtidos no simplex centroide.                                                                                                                                                                                                                  | 89  |
| Tabela 12 - Teores de miricitrina e flavonoide 2 (F2) obtidos no simplex centroide. ....                                                                                                                                                                                                                      | 92  |
| Tabela 13 - Valores de constantes dielétricas para os solventes/sistemas de solventes calculadas a partir das proporções dos componentes da mistura. ....                                                                                                                                                     | 98  |
| Tabela 14 - Teores de ácido gálico (AG) e ácido elágico (AE) obtidos no simplex centroide. ....                                                                                                                                                                                                               | 100 |
| Tabela 15 - Respostas de teores de resíduo sólido, flavonoides e taninos totais por espectrofotometria UV-Vis, Eficiência de extração para flavonoides e taninos, e os marcadores ácido gálico e elágico e os flavonoides miricitrina e flavonoide 2 expresso em miricitrina, para os extratos modelados..... | 107 |
| Tabela 16 - Matriz do planejamento fatorial para avaliar a influência da quantidade de droga e método extrativo sobre as respostas dos teores de resíduos, flavonoides, taninos e eficiência de extração.....                                                                                                 | 111 |
| Tabela 17 - Valores de coeficiente de determinação e equações matemáticas obtidas no planejamento fatorial. ....                                                                                                                                                                                              | 112 |
| Tabela 18 - Rendimentos dos extratos secos produzidos através de secagem por aspersão. .                                                                                                                                                                                                                      | 121 |
| Tabela 19 - Dados de umidade residual dos produtos secos por aspersão. ....                                                                                                                                                                                                                                   | 124 |
| Tabela 20 - Dados de tamanho e distribuição de partículas dos produtos secos por aspersão. ....                                                                                                                                                                                                               | 126 |

|                                                                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 21 - Dados de ângulo de repouso obtidos para os pós de extratos secos por aspersão. ....                                                                | 127 |
| Tabela 22 - Valores de referência para Fator de Hausner e Índice de Carr.....                                                                                  | 129 |
| Tabela 23 - Dados de Índices de Carr e Fatores de Hausner para os pós obtidos após secagem por aspersão. ....                                                  | 130 |
| Tabela 24 - Teor dos marcadores presentes nos extratos secos por aspersão. ....                                                                                | 132 |
| Tabela 25 - Dados obtidos no planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para avaliação das condições de secagem por aspersão. ....                                   | 134 |
| Tabela 26 - Valores de efeitos estimados obtidos para a variável rendimento no planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> . ....                                     | 135 |
| Tabela 27 – Tabela de ANOVA para a variável rendimento no planejamento fatorial. ....                                                                          | 136 |
| Tabela 28 - Dados de rendimento, umidade e propriedades físicas obtidos para avaliação de concentração de adjuvante.....                                       | 137 |
| Tabela 29 - Dados de variáveis de respostas utilizadas para avaliação de planejamento de misturas.....                                                         | 139 |
| Tabela 30 - Modelos matemáticos e valores de R <sup>2</sup> para as variáveis analisadas no planejamento de mistura de adjuvantes por Simplex Centroides. .... | 140 |
| Tabela 31 - Dados de ANOVA para a variável rendimento no planejamento de misturas de adjuvantes. ....                                                          | 141 |
| Tabela 32 - Dados de ANOVA para a variável umidade no planejamento de misturas de adjuvantes. ....                                                             | 141 |
| Tabela 33 - Dados de ANOVA para a variável ângulo de repouso no planejamento de misturas de adjuvantes. ....                                                   | 141 |
| Tabela 34 - Dados de ANOVA para a variável densidade inicial no planejamento de misturas de adjuvantes. ....                                                   | 142 |
| Tabela 35 - Dados de ANOVA para a variável densidade compactada no planejamento de misturas de adjuvantes.....                                                 | 142 |
| Tabela 36 - Dados de ANOVA para a variável índice de Carr no planejamento de misturas de adjuvantes. ....                                                      | 142 |
| Tabela 37 - Dados de ANOVA para a variável fator de Hausner no planejamento de misturas de adjuvantes. ....                                                    | 142 |
| Tabela 38 - Dados de rendimento obtidos no planejamento de misturas de adjuvantes. ....                                                                        | 143 |
| Tabela 39 - Dados de umidade obtidos para planejamento de misturas de adjuvantes.....                                                                          | 145 |

|                                                                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 40 - Dados de ângulo de repouso obtidos para planejamento de misturas de adjuvantes .....                                                                                      | 147 |
| Tabela 41 - Dados de densidade aparente obtidos para planejamento de misturas de adjuvantes .....                                                                                     | 149 |
| Tabela 42 - Dados de densidade compactada obtidos para planejamento de misturas de adjuvantes .....                                                                                   | 150 |
| Tabela 43 - Dados de índice de Carr obtidos para planejamento de misturas de adjuvantes.                                                                                              | 150 |
| Tabela 44 - Dados de Fator de Hausner obtidos para planejamento de misturas de adjuvantes .....                                                                                       | 153 |
| Tabela 45 - Proporção dos constituintes das formulações selecionadas a partir do diagrama de fases obtido por sonda ultrassônica. ....                                                | 162 |
| Tabela 46 - Análise turbidimétrica das diferentes preparações obtidas através da variação de tempo e potência.....                                                                    | 164 |
| Tabela 47 - Matriz de planejamento fatorial $3^2$ para avaliar a influência do tempo e potência sobre as características de pH e turbidimetria na obtenção de sistemas dispersos..... | 164 |
| Tabela 48 - Dados de ANOVA para a variável pH no ensaio fatorial $3^2$ . ....                                                                                                         | 165 |
| Tabela 49 - Dados de ANOVA para a variável Turbidimetria no ensaio fatorial $3^2$ .....                                                                                               | 166 |
| Tabela 50 - Características físico-químicas das emulsões brancas. ....                                                                                                                | 167 |
| Tabela 51 - Características físico-químicas das durante o ensaio de estabilidade de acompanhamento. ....                                                                              | 169 |
| Tabela 52 - Dados de caracterização dos novos sistemas emulsionados. ....                                                                                                             | 172 |
| Tabela 53 - Avaliação das características macroscópicas frente a ensaio de gelo-degelo. ....                                                                                          | 174 |
| Tabela 54 - Respostas de estabilidade das emulsões frente a força centrífuga. ....                                                                                                    | 176 |
| Tabela 55 - Dados de Caracterização das emulsões após 30 dias de preparação.....                                                                                                      | 177 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |                                                                                       |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ANOVA</b>    | Análise de Variância                                                                  |
| <b>ANVISA</b>   | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                                              |
| <b>CCD</b>      | Cromatografia em Camada Delgada                                                       |
| <b>CCD-AE</b>   | Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência                                    |
| <b>CLAE-DAD</b> | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Fotodiodos |
| <b>CMC</b>      | Celulose Microcristalina                                                              |
| <b>CV</b>       | Coeficiente de Variação                                                               |
| <b>DPR</b>      | Desvio Padrão Relativo                                                                |
| <b>DSC</b>      | Dióxido de Silício Coloidal                                                           |
| <b>EB</b>       | Extrato Bruto                                                                         |
| <b>FAc</b>      | Fração Acetato de Etila                                                               |
| <b>FAq</b>      | Fração Aquosa                                                                         |
| <b>FC</b>       | Folin Ciocalteu                                                                       |
| <b>FNT</b>      | Fração Não Tanante                                                                    |
| <b>GX</b>       | Goma Xantana                                                                          |
| <b>HPLC</b>     | <i>High Performance Liquid Chromatography</i>                                         |
| <b>PFT</b>      | Polifenóis Totais                                                                     |
| <b>PNA</b>      | Polifenóis Não Adsorvidos                                                             |
| <b>AS</b>       | Solução Amostra                                                                       |
| <b>SB</b>       | Solução Branco                                                                        |
| <b>SEFT</b>     | Solução Estoque Flavonoides Totais                                                    |
| <b>SETT</b>     | Solução Estoque Taninos Totais                                                        |
| <b>SC</b>       | Simplex Centróide                                                                     |
| <b>TT</b>       | Taninos Totais                                                                        |

## SUMÁRIO

|          |                                                                |           |
|----------|----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                        | <b>20</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>                                         | <b>23</b> |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL .....                                           | 23        |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                    | 23        |
| <b>3</b> | <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>                             | <b>24</b> |
| 3.1      | <i>Eugenia uniflora</i> Linn. ....                             | 24        |
| 3.1.1    | Aspectos gerais e botânicos .....                              | 24        |
| 3.1.2    | Aspectos Farmacológicos .....                                  | 26        |
| 3.1.3    | Aspectos químicos .....                                        | 29        |
| 3.2      | OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS .....                               | 31        |
| 3.2.1    | Planejamentos Fatoriais .....                                  | 32        |
| 3.2.2    | Planejamentos de Misturas .....                                | 33        |
| 3.3      | EXTRATOS SECOS POR ASPERSÃO .....                              | 35        |
| 3.3.1    | Caracterização de pós e extratos secos .....                   | 36        |
| 3.4      | ADJUVANTES FARMACÊUTICOS NA OBTENÇÃO DE EXTRATOS SECOS .....   | 40        |
| 3.4.1    | Dióxido de silício coloidal (Aerosil®) .....                   | 41        |
| 3.4.2    | Lactose .....                                                  | 42        |
| 3.4.3    | Celulose microcristalina .....                                 | 43        |
| 3.4.4    | Maltodextrina .....                                            | 44        |
| 3.4.5    | Goma Xantana .....                                             | 44        |
| 3.5      | SISTEMAS DISPERSOS .....                                       | 45        |
| 3.5.1    | Emulsões - generalidades .....                                 | 45        |
| 3.5.2    | Estabilidade das emulsões e métodos de avaliação .....         | 48        |
| 3.5.3    | Métodos para a obtenção de emulsões .....                      | 51        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                | <b>53</b> |
| 4.1      | MATERIAIS .....                                                | 53        |
| 4.1.1    | Reagentes, solventes, padrões e excipientes .....              | 53        |
| 4.1.2    | Vidrarias e materiais complementares .....                     | 53        |
| 4.2      | MÉTODOS .....                                                  | 54        |
| 4.2.1    | Obtenção, Identificação e Tratamento do Material Vegetal ..... | 54        |
| 4.2.1.1  | Caracterização do material vegetal .....                       | 54        |
| 4.2.2    | Otimização do Processo Extrativo .....                         | 55        |

|              |                                                                                                                                                    |           |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.2.1      | <i>Preparação dos extratos e aplicação simplex centroide para planejamento de misturas .....</i>                                                   | 55        |
| 4.2.2.2      | <i>Caracterização dos Extratos .....</i>                                                                                                           | 56        |
| 4.2.2.3      | <i>Otimização de Método Extrativo através de Planejamento Fatorial .....</i>                                                                       | 60        |
| 4.2.2.4      | <i>Análise dos Dados.....</i>                                                                                                                      | 61        |
| <b>4.2.3</b> | <b>Produção, otimização e caracterização de Extratos Secos .....</b>                                                                               | <b>61</b> |
| 4.2.3.1      | <i>Secagem por aspersão (Spray Drying) .....</i>                                                                                                   | 61        |
| 4.2.3.2      | <i>Caracterização de extratos secos .....</i>                                                                                                      | 62        |
| 4.2.3.3      | <i>Otimização do processo de obtenção dos produtos secos .....</i>                                                                                 | 64        |
| 4.2.3.3.1    | <i>Avaliação das condições de secagem por aspersão .....</i>                                                                                       | 64        |
| 4.2.3.4      | <i>Fracionamento e Análise fitoquímica do extrato seco .....</i>                                                                                   | 66        |
| <b>4.2.4</b> | <b>Estudos de pré-formulação e caracterização de Sistemas Dispersos para a Veiculação de Extratos das Folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L.....</b> | <b>67</b> |
| 4.2.4.1      | <i>Construção de diagrama de fases pseudo-ternários .....</i>                                                                                      | 67        |
| 4.2.4.2      | <i>Obtenção dos sistemas emulsionados .....</i>                                                                                                    | 67        |
| 4.2.4.2.1    | <i>Avaliação do método de obtenção das emulsões através de planejamento fatorial .....</i>                                                         | 68        |
| 4.2.4.3      | <i>Caracterização dos sistemas emulsionados .....</i>                                                                                              | 68        |
| 4.2.4.3.1    | <i>Análise macroscópica e índice de cremagem.....</i>                                                                                              | 68        |
| 4.2.4.3.2    | <i>Determinação de tamanho e distribuição de gotículas .....</i>                                                                                   | 68        |
| 4.2.4.3.3    | <i>Análise de pH.....</i>                                                                                                                          | 69        |
| 4.2.4.3.4    | <i>Potencial zeta .....</i>                                                                                                                        | 69        |
| 4.2.4.3.5    | <i>Análise turbidimétrica e densidade.....</i>                                                                                                     | 69        |
| 4.2.4.4      | <i>Análises de estabilidade .....</i>                                                                                                              | 69        |
| 4.2.4.4.1    | <i>Ciclo gelo-degelo .....</i>                                                                                                                     | 69        |
| 4.2.4.4.2    | <i>Estabilidade sob centrifugação .....</i>                                                                                                        | 70        |
| 4.2.4.4.3    | <i>Estabilidade de acompanhamento preliminar .....</i>                                                                                             | 70        |
| 4.2.4.5      | <i>Obtenção de formulações convencionais, pickering e co-estabilizadas .....</i>                                                                   | 70        |
| 4.2.4.5.1    | <i>Emulsões Pickering.....</i>                                                                                                                     | 70        |
| 4.2.4.5.2    | <i>Emulsões Co-estabilizadas (Tensoativos + polímero estabilizante) .....</i>                                                                      | 70        |
| 4.2.4.5.3    | <i>Emulsão convencional à base de cera auto-emulsionante (Cera Lanette N) ..</i>                                                                   | 71        |
| <b>5</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                | <b>73</b> |
| 5.1          | <b>MATÉRIA-PRIMA VEGETAL .....</b>                                                                                                                 | <b>73</b> |
| 5.1.1        | <b>Caracterização físico-química .....</b>                                                                                                         | <b>73</b> |

|           |                                                                                                                                    |            |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2       | OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO.....                                                                                              | 75         |
| 5.2.1     | <b>Planejamento Simplex Centroeide .....</b>                                                                                       | <b>75</b>  |
| 5.2.1.1   | <i>Variáveis de resposta .....</i>                                                                                                 | <i>78</i>  |
| 5.2.1.1.1 | Resíduo Seco.....                                                                                                                  | 78         |
| 5.2.1.1.2 | Teor de flavonoides totais .....                                                                                                   | 82         |
| 5.2.1.1.3 | Teor de taninos totais (TT).....                                                                                                   | 86         |
| 5.2.1.1.4 | Eficiência de Extração.....                                                                                                        | 89         |
| 5.2.1.1.5 | Quantificação de ácido gálico, elágico e flavonoides por CLAE .....                                                                | 90         |
| 5.2.1.1.6 | Fingerprint por Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência .....                                                           | 103        |
| 5.2.1.1.7 | Avaliação das respostas significativas e modelagem de novas misturas .....                                                         | 105        |
| 5.2.3     | <b>Planejamento fatorial: otimização de método extrativo .....</b>                                                                 | <b>110</b> |
| 5.3       | EXTRATOS SECOS POR ASPERSÃO.....                                                                                                   | 120        |
| 5.3.1     | <b>Umidade residual .....</b>                                                                                                      | <b>123</b> |
| 5.3.2     | <b>Diâmetro e distribuição de Partículas .....</b>                                                                                 | <b>125</b> |
| 5.3.3     | <b>Ângulo de repouso .....</b>                                                                                                     | <b>127</b> |
| 5.3.4     | <b>Densidade bruta inicial e de compactação, Fator de Hausner e Índice de Carr.....</b>                                            | <b>128</b> |
| 5.3.5     | <b>Teores de marcadores por UV-Vis e CLAE .....</b>                                                                                | <b>131</b> |
| 5.3.6     | <b>Otimização do processo de obtenção dos produtos secos .....</b>                                                                 | <b>133</b> |
| 5.3.7     | <b>Fracionamento e análise fitoquímica do extrato seco através de cromatografia de camada delgada.....</b>                         | <b>156</b> |
| 5.4       | ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO - AVALIAÇÃO DE SISTEMAS DISPERSOS PARA INCORPORAÇÃO DE EXTRATOS SECOS DE <i>Eugenia uniflora</i> L. .... | 160        |
| 5.4.1     | <b>Construção de Diagrama de Fases Pseudo-Ternários .....</b>                                                                      | <b>160</b> |
| 5.4.2     | <b>Obtenção preliminar dos sistemas emulsionados .....</b>                                                                         | <b>161</b> |
| 5.4.3     | <b>Avaliação do método de obtenção das emulsões através de planejamento fatorial .....</b>                                         | <b>162</b> |
| 5.4.5     | <b>Incorporação de derivados das folhas <i>E. uniflora</i> .....</b>                                                               | <b>169</b> |
| 5.4.5.1   | <i>Produção de emulsões clássicas.....</i>                                                                                         | <i>169</i> |
| 5.4.5.2   | <i>Produção de novas formulações.....</i>                                                                                          | <i>170</i> |
| 5.4.5.3   | <i>Estabilidade preliminar dos sistemas .....</i>                                                                                  | <i>173</i> |
| 5.4.5.3.1 | Estabilidade no ciclo gelo-degelo.....                                                                                             | 173        |
| 5.4.5.3.2 | Estabilidade frente à aceleração centrífuga.....                                                                                   | 175        |

|           |                                   |            |
|-----------|-----------------------------------|------------|
| 5.4.5.3.3 | Análises de acompanhamento.....   | 177        |
| <b>6</b>  | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b> | <b>179</b> |
|           | <b>REFERÊNCIAS .....</b>          | <b>181</b> |
|           | <b>APÊNDICE A.....</b>            | <b>199</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Espécies vegetais figuram como uma alternativa terapêutica difundida em todo o mundo. Tal fato pode ser atribuído à medicina popular, visto que a terapia empírica possui um arcabouço de informações relacionadas a diversas espécies medicinais. Este conhecimento empírico facilita o uso de espécies medicinais pela população, colocando a fitoterapia e a pesquisa por novos fitoterápicos em posição de destaque na medicina alopática (KLEIN *et al.*, 2009). Este destaque também pode ser correlacionado com a viabilidade de obtenção de produtos oriundos de vegetais, bem como aos efeitos adversos e riscos associados ao uso prolongado de medicamentos sintéticos, além da busca de produtos de origem natural e sustentável (BRASIL, 2006; 2016; KLEIN *et al.*, 2009; HASENCLEVER *et al.*, 2017). Outro fator é que as fontes naturais possuem uma enorme diversidade de substâncias potenciais para a terapêutica, principalmente quando consideramos que mais de 1/3 das drogas aprovadas pelo Food and Drug Administration, e quase 50% das drogas anticâncer registradas, são substâncias naturais ou derivadas de origem natural (BOY *et al.*, 2018)

O uso de espécies nativas “novas” ou “promissoras” que possuam atividades biológicas viáveis e uso difundido pela população, é outro fator que corrobora para o interesse em produtos de origem vegetal, principalmente diante da biodiversidade brasileira e do número reduzido de estudos acerca das espécies nativas. Partindo desta premissa, a Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) que completa 12 anos, foi lançada para incentivar ensaios biológicos, estudos sobre a constituição química, controle da qualidade e desenvolvimento tecnológico das espécies de interesse (BRASIL, 2009). Assim, o estímulo a estudos sobre as espécies medicinais serve de força motriz para a realização de pesquisas neste campo, fortalecendo o papel dos fitoterápicos (KLEIN *et al.*, 2009; HASENCLEVER *et al.*, 2017; BOY *et al.*, 2018).

Entretanto, ainda é um desafio obter formas farmacêuticas para a veiculação de extrativos vegetais devido à diversidade química presente na composição dessas matrizes e da influência de fatores associados à obtenção dos insumos vegetais. De forma geral as dificuldades para a obtenção de medicamentos fitoterápicos passam por diversas etapas, desde a identificação e cultivo, obtenção de perfil químico e processo de extração das substâncias ativas, obtenção de extratos/produtos secos (como insumo intermediário ou produto final) até a sua aplicação em uma forma farmacêutica (KLEIN *et al.*, 2009; ZORZI *et al.*, 2015; SIMÕES *et al.*, 2017; FREITAS; TEIXEIRA; ZAMARIOLI, 2017).

Quanto ao processamento tecnológico, outro desafio é a preparação de formulações estáveis que tenham capacidade de suportar as condições físico-químicas adversas e incompatibilidades que podem ser causadas pela natureza complexa da matriz oriunda de espécies medicinais (ZORZI *et al.*, 2015; FREITAS; TEIXEIRA; ZAMARIOLI, 2017).

Partindo desta premissa, para o desenvolvimento de formulações contendo ativos vegetais que atendam a todos os requisitos necessários para a sua aplicação na terapêutica, devem ser avaliados os fatores que podem influenciar na qualidade. Todas as etapas envolvidas na obtenção do produto devem ser investigadas e padronizadas para que a variabilidade química e biológica não apresente variações nas etapas analíticas e tecnológicas que possam impactar na qualidade do produto final. Esta padronização deve ser realizada desde as etapas de manuseio da matéria prima, preparação de extratos e de incorporação em formas farmacêuticas (ZORZI *et al.*, 2015), sendo de grande importância a manutenção da integridade do fitocomplexo para a preservação da atividade terapêutica e segurança do uso (KLEIN *et al.*, 2009; SIMÕES *et al.*, 2010; 2017).

Dentre as espécies promissoras e que integram a lista de plantas medicinais de interesse ao SUS, encontra-se *Eugenia uniflora* L. (BRASIL, 2009), que se destaca por ser uma espécie frutífera usada na indústria alimentícia e cosmética, possuindo também potencial farmacêutico (MALAMAN *et al.*, 2011). Pertencente à família Myrtaceae, a pitangueira ou pitanga, é uma espécie de ampla utilização na medicina popular, principalmente para tratamento de distúrbios gástricos, diabetes, febre e hipertensão. Algumas destas atividades possuem evidências científicas para a sua aplicação na terapêutica, como: diurética, anti-hipertensiva (CONSOLINI *et al.*, 2002), antirreumática (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 1987), hipocolesterolemizante, hipoglicêmica (ARAI *et al.*, 1999), antifúngica (FERREIRA *et al.*, 2013), antimicrobiana (OGUNWANDE *et al.*, 2005), antinociceptiva, antipirética (AMORIM *et al.*, 2009), antidepressiva, hepatoprotetora (VICTORIA *et al.*, 2012; 2013), antiproliferativa e citotóxica (DENARDIM *et al.*, 2014), antioxidante (GARMUS *et al.*, 2014; DENARDIM *et al.*, 2015), além da atividade anti-inflamatória e antibacteriana (RATTMANN *et al.*, 2012; FALCÃO *et al.*, 2018). Grande parte destas atividades são frequentemente correlacionadas à presença de polifenóis e óleos voláteis relatados para a espécie com frequência em ensaios fitoquímicos e análises quantitativas (FIÚZA *et al.*, 2008; AMORIM *et al.*, 2009; RATTMANN *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2017; ASSUNÇÃO *et al.*, 2017; BEZERRA *et al.*, 2018; 2020).

Diante do exposto, o desenvolvimento tecnológico de formas farmacêuticas que contenham elevado teor de extratos de *E. uniflora* compreende um passo fundamental para

assegurar a viabilidade terapêutica da espécie. Considerando as propriedades biológicas relatadas para *E. uniflora*, o desenvolvimento e avaliação de formas sólidas e semissólidas aliado à escassez de abordagens tecnológicas para a espécie, figuram como promissores para a consolidação da espécie como alternativa terapêutica.

Nesse contexto, o propósito deste trabalho é o planejamento, produção e avaliação de formas farmacêuticas sólidas e semissólidas para veiculação de extrativos das folhas de *Eugenia uniflora* Linn.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, fabricar e caracterizar produtos secos por *spray-drying* a partir de soluções extrativas otimizadas das folhas de *Eugenia uniflora* L. para obtenção de formas farmacêuticas sólidas (pós), para aplicação em estudos de pré-formulação de produtos semissólidos (emulsões).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar, identificar e caracterizar o material vegetal;
- Preparar, otimizar e caracterizar soluções extrativas das folhas de *E. uniflora*, com o auxílio de métodos estatísticos de design experimental;
- Desenvolver, fabricar e caracterizar extratos secos a partir das folhas de *E. uniflora* empregando secagem por aspersão (*spray-drying*);
- Avaliar e otimizar as condições de secagem por aspersão para obtenção de extratos secos das folhas de *E. uniflora* com maior rendimento;
- Realizar estudos de pré-formulação de sistemas dispersos para veiculação dos extratos otimizados das folhas de *E. uniflora*.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

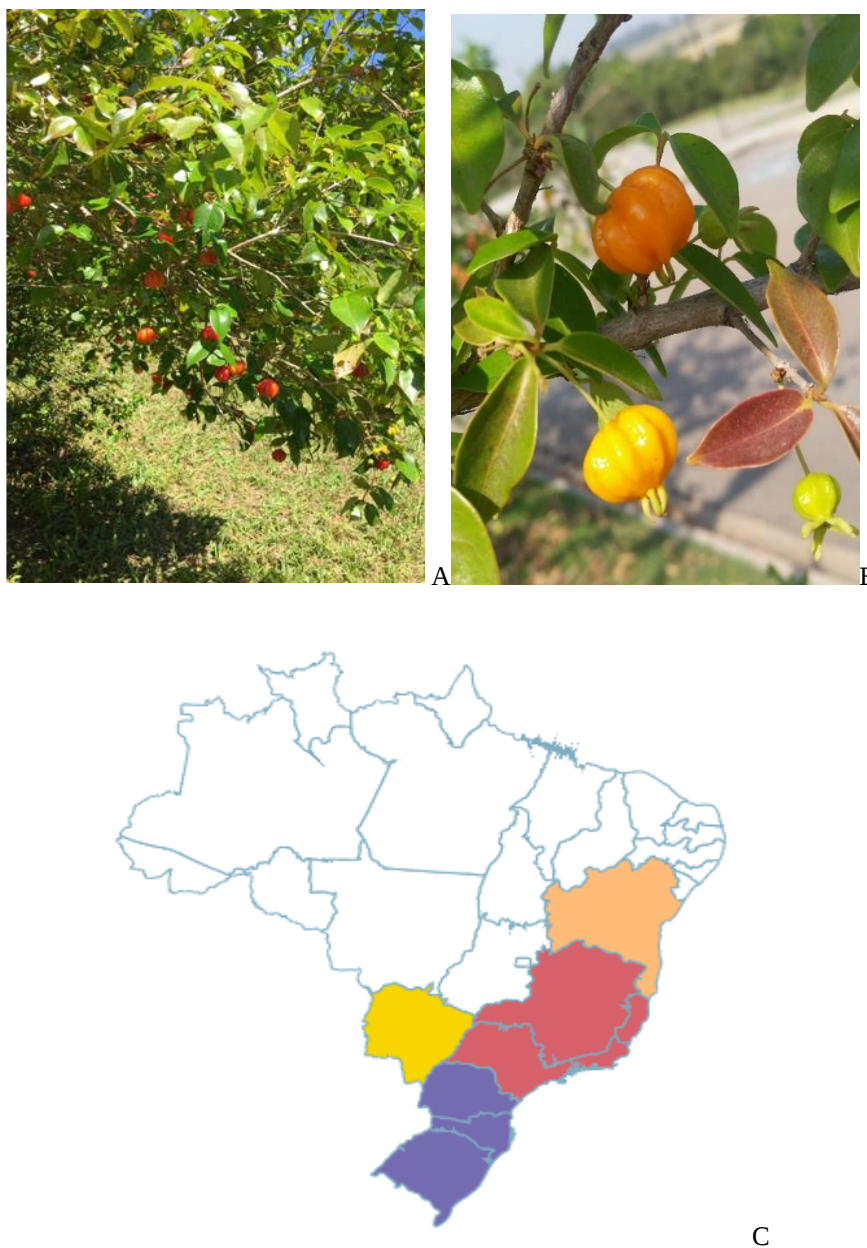
#### 3.1 *Eugenia uniflora* L.

##### 3.1.1 Aspectos gerais e botânicos

*Eugenia uniflora* L., conhecida popularmente no Brasil como pitangueira ou pitanga, é uma espécie nativa da região central do país até o norte da Argentina. É uma espécie facilmente adaptável, encontrando-se distribuída em todo o território brasileiro, especialmente nas regiões de Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, e nos demais territórios da América do Sul (LORENZI; MATOS, 2006; RODRIGUES; OLIVEIRA SILVA; BRITO, 2018). Com classificação taxonômica: Reino Plantae, Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Ordem Myrtales, a espécie pertence à Família Myrtaceae e Gênero *Eugenia*. Possui algumas sinônimas científicas, entre elas: *Eugenia michelii*, *Myrtus brasiliiana*, *Stenocalyx affinis*, *Stenocalyx micheli*, *Stenocalix lucidus* (SOBRAL, 2015; FLORA DO BRASIL, 2018).

A pitangueira (Figura 1) apresenta-se, sob o ponto de vista botânico, como um arbusto ou árvore semidecídua, que geralmente atinge de 3-5 metros de altura, e em alguns casos chegam a alcançar até 12 metros de altura. Possui copa estreita, e tronco liso de cor pardo clara. Apresenta folhas simples, alternadas, de formas elípticas, ovaladas, ovaladas-lanceoladas medindo de 3-6 cm de comprimento, e 2-3 cm de largura, glabras, membranáceas a levemente coriáceas, possuindo coloração verde escuro na face adaxial e verde mais claro na abaxial. A lâmina possui ápice agudo a acuminado, com margem inteira penínérvea, com nervura central mais proeminente na face abaxial. Possuem aroma característico devido à presença de óleos voláteis. Suas flores são típicas da família Myrtaceae, de cor branca, solitárias ou em grupos de 2-3 nas axilas e nas extremidades dos ramos. Os frutos são do tipo drupa, globosos e sulcados, brilhantes e de cor vermelha, amarela, roxa ou preta, com polpa carnosa e agridoce, contendo 1 a 2 sementes (FIÚZA *et al.*, 2009; LORENZI, 2014; RODRIGUES; OLIVEIRA SILVA; BRITO, 2018, BRASIL, 2010; 2019).

**Figura 1** - *Eugenia uniflora* L. (A), pitangas (B), e distribuição geográfica da pitangueira no território brasileiro (C).



Fonte: A: Foto por Magda Ferreira; B: Foto por Fiorella Mazine (Flora do Brasil); C: Flora do Brasil, 2021.

Nos aspectos microscópicos, como elementos mais importantes encontram-se as seguintes características: folhas com lâmina foliar de simetria dorsiventral e hipostomáticas (estômatos paracíticos, com células-guarda com espessamento da face interna em formato de halteres). Em secção transversal é possível identificar: epiderme uniestratificada recoberta por espessa cutícula; parênquima paliádico uniestratificado acompanhado de células coletoras; parênquima espongoso contendo de 7 a 9 estratos, contendo células com projeções braciiformes; no mesofilo, são encontrados com facilidade estruturas de idioblastos cristalíferos contendo drusas e cristais rômnicos de oxalato de cálcio; além de cavidades secretoras esquisolisígenas,

que comumente contém gotas de óleo essencial e estão presentes nas duas faces, mas com maior concentração na face adaxial. A nervura principal apresenta principalmente contorno plano-convexo (raramente côncavo-convexo ou biconvexo), e subjacentes à epiderme podem haver de 1 a 3 camadas de colênquima anelar; o feixe vascular é do tipo bicolateral em arco aberto, envolvido por 2 a 3 camadas de células parenquimáticas de paredes espessadas; o floema apresenta abundância de cristais rômbicos de pequenas dimensões. Cavidades secretoras também estão presentes subepidermicamente; além disso, grãos de amido, drusas e cristais estão presentes abundantemente por todo o parênquima (BRASIL, 2019).

### 3.1.2 Aspectos Farmacológicos

Em relação à terapêutica, a pitangueira possui extenso uso na medicina tradicional. As folhas possuem uso em manifestações clínicas no sistema gastrointestinal, além das atividades diurética, anti-hipertensiva, antipirética, anti-inflamatória, antirreumática, antifúngica, hipocolesterolemia e hipoglicêmica, onde diversas destas atividades possuem evidências científicas apresentadas na literatura (CONSOLINI *et al.*, 2002; AMORIM *et al.*, 2009; RATTMANN *et al.*, 2012; FALCÃO *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2013; SCHUMACHER *et al.*, 2015; MEIRA *et al.*, 2020).

Diversos relatos da literatura demonstraram o potencial antimicrobiano dos óleos voláteis presentes em *E. uniflora*. Adebajo e colaboradores (1989) reportaram a ação antimicrobiana promissora do óleo essencial das folhas e frutos para cepas *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Trichophyton menthagrophytes*. Ogunwande e colaboradores (2005) demonstraram efeitos dos óleos voláteis da espécie contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, que, além deste efeito ainda exibiu uma excelente ação citotóxica para células tumorais das linhagens PC-3 e Hep G2, e demonstrou completa inibição do crescimento de linhas celulares Hs 578T.

Pereira e colaboradores (2017) investigaram o potencial antibiótico da associação de extratos de *E. uniflora* e luzes led com antimicrobianos utilizados na terapêutica, reportando uma mudança na atividade biológica. Falcão e colaboradores (2018) evidenciaram que extratos brutos e frações das folhas apresentaram moderado potencial antimicrobiano para as cepas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, em que os extratos apresentaram atividade mais expressiva que as frações semipurificadas, evidenciando a importância da manutenção do fitocomplexo presente no extrato bruto.

Com relação à atividade antifúngica, Lima e colaboradores (2006) avaliaram a atividade do óleo essencial das folhas contra diversas cepas encontrando atividade promissora para *Candida krusei*. Biasi-Garbin e colaboradores (2016), demonstraram que a espécie possui atividade fungicida sobre cepas e isolados clínicos de *Tricophyton rubrus* e *Tricophyton mentagrophytes*, sendo resultados promissores para novos estudos direcionados à fungos dermatofitos. Outros estudos também obtiveram bons resultados da atividade antifúngica de extratos brutos das folhas em espécies de *Candida albicans* e não *Candida-albicans Candida* (FERREIRA *et al.*, 2013).

Além disso, extratos brutos das folhas também evidenciaram um potencial inibitório em três importantes fatores de virulência de *C. albicans* presentes no organismo de pacientes transplantados (SILVA-ROCHA *et al.*, 2015). Estes mesmos autores também relataram a influência da fração acetato de etila sobre a expressão de proteínas estruturais e vias metabólicas durante a morfogênese de *C. albicans*, reduzindo a filamentação e produzindo células defeituosas e inviáveis. Nestes estudos, foi constatado que não houve citotoxicidade, indicando que derivados da espécie podem ser potenciais agentes antifúngicos seguros para administração humana (SILVA-ROCHA *et al.*, 2017). Outro estudo também revelou a influência do extrato bruto sobre a adesão de cepas de *Candida* spp. a células epiteliais e formação de biofilme, reduzindo significativamente estes importantes fatores de virulência (SOUZA *et al.*, 2018).

Levando em consideração o uso empírico da espécie para tratamento de diabetes na medicina popular, Arai e colaboradores (1999) avaliaram os efeitos de extratos hidroalcoólicos das folhas sobre hiperglicemia e hipertrigliceridemia. Estes autores observaram redução de níveis de glicose no sangue em camundongos tratados com glicose e extrato etanólico via oral na dose de 300 mg/Kg. Para avaliação ação anti-hipertrigliceridêmica foi verificada a presença da inibição na atividade da enzima lipase pancreática pela ação de diferentes frações e doses do extrato de *E. uniflora*, sugerindo que a ação do extrato acontece por inibir a decomposição de açúcares e gordura no intestino. Extratos hidroalcoólicos das folhas também foram utilizados para avaliação sobre lesões agudas nos rins, evidenciando que a utilização do extrato por 28 dias possibilitou a prevenção de disfunção renal, aumento do processo oxidativo e de apoptose (MEIRA *et al.*, 2020).

Schumacher e colaboradores (2015) avaliaram em seus estudos o potencial antioxidante, anti-inflamatório e expressão de marcadores na diabetes. Os extratos aquosos apresentaram elevado potencial antioxidante, e o tratamento de ratos (diabéticos não obesos) com estes extratos diminuiu a infiltração inflamatória e o estresse oxidativo, aumentando a glutathione hepática e os níveis de insulina no soro, o que pode sugerir que estes extratos podem proteger

as células produtoras de insulina, as células  $\beta$  do pâncreas. Vinholes e Vizzoto (2017) encontraram em suas avaliações, efeitos inibitórios sobre a enzima  $\alpha$ -glicosidase de extratos de *Eugenia uniflora* e *Camelia sinensis*, individualmente e associados. A atividade reportada para a pitangueira foi de 40-1500 vezes superior à acarbose, sugerindo que a espécie pode ser utilizada para tratamento de pacientes portadores de diabetes tipo 2, pela inibição da enzima, e ainda executar um papel importante na redução do estresse oxidativo, corroborando com os resultados obtidos por Schumacher e seus colaboradores.

Com relação aos efeitos da pitangueira sobre o sistema cardiovascular, Consolini e colaboradores (1999) relataram a atividade hipotensora em ratos normotensos empregando dose efetiva de 3 mg/kg de extrato aquoso das folhas, e este efeito foi associado a uma ação vasodilatadora direta em vasos resistentes a perfusão e uma ligeira diurese em altas doses (120 mg/kg). Também foi relatado o possível mecanismo de ação do extrato bruto aquoso das folhas *E. uniflora*, evidenciando ação  $\beta$ -adrenérgica produzindo hipotensão e contribuindo para os efeitos cronotrópicos e inotrópicos no coração (CONSOLINI *et al.*, 2002). Em estudos sobre a atividade hipotensora, Wazlawik e colaboradores (1997) relataram que extratos hidroalcoólicos das folhas produziram um relaxamento de anéis de aorta e atribuiu a ação vasodilatadora de *E. uniflora* ao fato de que o extrato pode vir a estimular a síntese de óxido nítrico, sendo o responsável por manter o relaxamento endotelial e, consequentemente, manter a pressão arterial estável.

Extratos das folhas obtidos com diferentes solventes e consequente determinação de seus constituintes, mostraram potencial atividade inibitória sobre a xantina oxidase, atribuída aos flavonoides quercetina, quercitrina e miricetina, presentes na espécie (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 1987).

A atividade anti-inflamatória para a espécie foi evidenciada através da inibição de fatores pró-inflamatórios como a expressão de citocinas e da via COX-2, além do influxo de neutrófilos. Estudos realizados por Falcão e colaboradores (2018), utilizaram extratos brutos e frações das folhas da espécie, evidenciaram a redução da migração celular, bem como a redução de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (RATTMANN *et al.*, 2012; FALCÃO *et al.*, 2018).

Santos e colaboradores (2012) evidenciaram as propriedades contra a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. Outros estudos ainda relataram atividade relevante contra cepas de *Leishmania brasiliensis*, como Santos e colaboradores (2013) que relataram atividade contra a forma promastigota da *L. brasiliensis*, com inibição do crescimento de 65% da cepa na menor concentração testada (100  $\mu$ g/mL) de extratos hidroalcoólicos.

Rodrigues e colaboradores (2013) relataram que os óleos voláteis das folhas, predominantemente composto de sesquiterpenos, possuem atividade frente as cepas de *Leishmania amazonensis* em dois estágios. Além disso, foi observado que a ativação de macrófagos poderia estar relacionada às atividades anti-leishmania. Atividade antiparasitária também foram descritas para a espécie, como a anti-tricomona de frações semipurificadas obtidas a partir de extratos metanólicos das folhas, em que a atividade das frações possuiu potência superior ou comparável ao fármaco controle (metronidazol) (IBINKULE, *et al.*, 2011). A baixa toxicidade *in vitro* da espécie a torna bastante promissora para aplicação em terapias antiparasitárias (SANTOS *et al.*, 2012; 2013; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Outras propriedades biológicas, tais como as atividades antinoceptivas e antipiréticas, também foram reportadas para o óleo essencial e terpenoides isolados das folhas de *E. uniflora* (AMORIM *et al.*, 2009). Victoria e colaboradores (2012), evidenciaram as atividades antioxidantes em três diferentes métodos, além de uma DL<sub>50</sub> maior que 200 mg/kg em ratos e atividades antimicrobianas e antifúngicas. Óleos essenciais apresentaram ainda atividades antidrepressivas mediada pela modulação de sistemas serotoninérgicos e adrenérgicos (VICTÓRIA *et al.*, 2013). Além disso, também foram encontradas evidências de que estes óleos possuem atividades hepatoprotetoras, a partir de lesões induzidas por acetaminofeno (VICTÓRIA *et al.*, 2012).

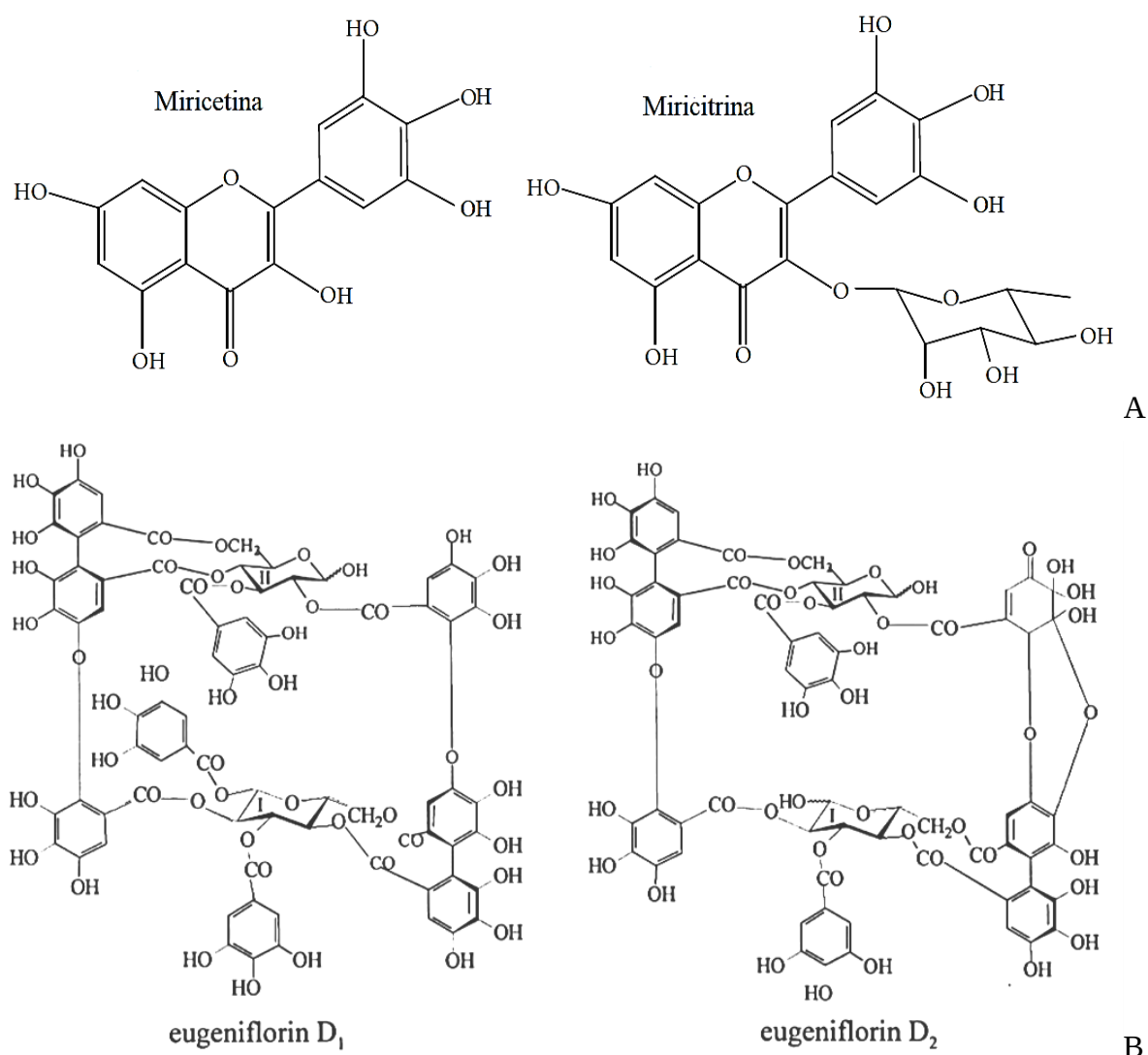
Meira e colaboradores (2020) relataram a administração de extratos hidroalcóolicos das folhas apresentaram propriedades preventivas para disfunção renal, além de propiciar a diminuição do estresse oxidativo e da apoptose das células em lesões agudas. Colocando a espécie como possível candidata para aplicação em terapias alternativas para doenças renais.

### 3.1.3 Aspectos químicos

Em relação à constituição química, a pitangueira apresenta grande diversidade de metabólitos secundários, sendo os óleos voláteis e polifenóis as principais classes de substâncias produzidas pela espécie. Estas classes foram objetos de diversos estudos com as folhas de *E. uniflora*, resultando em vários componentes isolados, tais como os flavonoides miricetina, miricitrina (Figura 2A) (miricetina-O-ramnosídeo), e alguns heterosídeos de quercetina, como a quercitrina (quercetina-O-ramnosídeo) (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 1995; RATTMANN *et al.*, 2012), e os taninos macrocíclicos hidrolisáveis oenoteína B, eugeniflorina D1 e eugeniflorina D2 (Figura 2B) sendo estes últimos taninos potentes agentes inibidores EBV (Epstein Barr Vírus) DNA polimerase (LEE, 1997; 2000). A respeito dos óleos

essenciais, muitos estudos apresentaram foco na caracterização química do óleo volátil, possibilitando a identificação dos componentes e a identificação dos compostos do tipo curzerenos (*cis* e *trans*) como substâncias majoritárias, além da identificação de outros compostos importantes como selinatrienona, atractilona e furanodieno (OGUNWANDE *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2007).

**Figura 2** - Flavonoides miricetina e miricitrina (miricetina-O-ramnosídeo) (A); Taninos macrocíclicos eugeniflorin D1 e D2.(B).



Fonte: Adaptado de Rattmann *et al.*, 2012 (A); Adaptado de Lee *et al.*, 2000 (B).

Fiúza e colaboradores (2008), em seus estudos de triagem fitoquímica com o macerado das folhas de *E. uniflora* evidenciaram a presença de derivados antracênicos, esteroidais, triterpênicos, heterosídeos flavonoídicos esaponínicos e taninos. Estes resultados foram confirmados pelas análises fitoquímicas realizadas por Bezerra (2016), que em análises

cromatográficas evidenciaram a presença de ácido gálico e elágico (taninos hidrolisáveis), flavonoides, derivados antracênicos, triterpenos e esteroides (como  $\beta$ -sitosterol), além de açúcares redutores (como frutose).

Ramos e colaboradores (2017) evidenciaram a presença de flavonoides, desenvolvendo metodologia geral para a quantificação destas substâncias na matéria prima da espécie, bem como em seus derivados através de espectrofotometria UV-Vis.

Assunção e colaboradores (2017) realizaram análises por cromatografia líquida, determinaram o teor de ácido elágico em extratos das folhas da espécie. Ainda em relação aos polifenóis, análises por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia de camada delgada de alta eficiência permitiram a identificação dos principais marcadores, sendo o flavonoide miricitrina e os monômeros de taninos ácido gálico e ácido elágico (BEZERRA *et al.*, 2018).

### 3.2 OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

No campo analítico, há sempre a necessidade responder diversos questionamentos, sendo necessário avaliar os problemas relacionados aos objetos de estudo para que haja maior eficiência e confiabilidade nos resultados. Normalmente, em quaisquer metodologias de análise, são apresentadas diversas variáveis que podem influenciar as respostas analíticas, abrindo inúmeras possibilidades de investigação destes efeitos individualmente. Entretanto, análises univariadas necessitam de um grande volume de experimentos, além de não permitirem a avaliação conjunta das variáveis de um processo, o que torna este tipo análise dispendiosa. Principalmente quando se é levado em consideração que o planejamento da investigação dos efeitos de diferentes fatores sobre diferentes propriedades é essencial para minimizar o volume e custos associados ao processo, além de avaliar como incrementar a qualidade dos produtos e possibilitar a definição dos fatores que são determinantes para as análises (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Nesse contexto está inserido o planejamento experimental, que aborda técnicas de avaliação multivariada possibilitando a análise de fatores individuais e a interação entre os fatores. Estas ferramentas são úteis na avaliação e tratamento de dados, permitindo a obtenção de modelos matemáticos que expliquem as respostas obtidas em determinado ensaio, possibilitando a previsão de respostas. Com os modelos de previsão torna-se possível simular variáveis para obter as melhores condições experimentais (BARROS NETO; SCARMINIO;

BRUNS, 2010; MONTGOMERY, 2013; MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2016).

Dentre as ferramentas estatísticas mais aplicadas no campo de otimização de extratos e desenvolvimento de formulações encontram-se os planejamentos fatoriais e os planejamentos de misturas.

### 3.2.1 Planejamentos Fatoriais

Planejamentos fatoriais figuram como uma das estratégias estatísticas mais utilizadas para aprimorar procedimentos e experimentos. É ferramenta analítica útil, e tem como principal aplicação a triagem de variáveis relevantes para a execução de um determinado processo (VINCENTINI *et al.*, 2011). Assim, planejamentos fatoriais fornecem dados sobre o sistema em estudo, de forma que o pesquisador possa modificar os parâmetros em análise até as condições ótimas para a realização da operação desejada.

Para a realização de um planejamento fatorial, deve-se ter o conhecimento de quais são as variáveis de interesse, desde variantes inclusas dentro do processo, até as variáveis de resposta. As variáveis do processo, conhecidas também como variáveis de entrada, fatores ou fatores independentes, podem ser qualitativos ou quantitativos dentre quaisquer uma das variáveis do processo. As variáveis de resposta, também chamadas de variáveis de saída, resposta, fatores dependentes, são as variáveis que são (ou não) afetadas pelas modificações realizadas nos fatores; estas respostas também podem ser qualitativas ou quantitativas (CUNICO *et al.*, 2008; MONTGOMERY, 2013).

Planejamentos fatoriais são normalmente representados por uma potência  $b^k$ , onde a base ( $b$ ) representa o número de níveis a ser utilizado (número de condições testadas para uma variável), e o expoente ( $k$ ) corresponde ao número de variáveis de entrada. Assim, se um planejamento possuir dois níveis e dois fatores, a representação será  $2^2$ , se possuir três níveis e dois fatores,  $3^2$  e assim por diante. Os planejamentos  $2^k$  são os mais utilizados, onde comumente se inicia a partir de um fatorial  $2^2$ , aumentando o número de fatores de acordo com as respostas obtidas, modificando os experimentos e aumentando o número de ensaios a serem realizados. Ensaios fatoriais com três níveis ( $3^2$  e  $3^3$ ) também são usados com frequência, o aumento na quantidade de níveis permite uma maior varredura no campo experimental, aumentando a confiabilidade dos resultados. Entretanto, quando se utilizam números de fatores relativamente

grandes, a possibilidade de eles não possuírem influência significativa sobre a resposta aumenta (MONTGOMERY, 2013; MYERS; MONTGOMERY; COOK, 2016).

Com a realização dos ensaios nas condições propostas, os resultados obtidos podem ser aplicados em algoritmos para mensurar os efeitos sobre as respostas, e, a partir destes efeitos, gerar os modelos matemáticos que descrevam e possam prever as respostas obtidas. Este tipo de planejamento pode ser calculado através de softwares estatísticos que fornecem os dados necessários para a análise do resultado (dados de regressão, análise de variância, modelos matemáticos) e ainda fornece gráficos dos tipos de efeitos padronizados e de superfície de resposta, que proporciona a representação visual das respostas, complementando e facilitando a interpretação dos dados (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Dentre as diversas vantagens da realização de ensaios fatoriais, destacam-se: a redução do número de ensaios (em caso de avaliação de poucos fatores) sem prejuízo da qualidade da informação; o estudo simultâneo de diversas variáveis; a determinação da confiabilidade dos resultados; a realização da pesquisa em etapas, num processo iterativo de acréscimo de novos ensaios; a seleção das variáveis que influenciam um processo com número reduzido de ensaios; a representação do processo estudado através de expressões matemáticas; a elaboração de conclusões a partir de resultados qualitativos (CUNICO *et al.*, 2008).

### 3.2.2 Planejamentos de Misturas

Os planejamentos de misturas também são ferramentas estatísticas para a análise da influência de variáveis sobre as respostas de interesse, entretanto, ao contrário de experimentos fatoriais, geralmente, apenas a composição é avaliada. No planejamento de mistura não existe independência, pois são avaliadas as proporções dos componentes, levando em consideração que as características dos produtos são decorrentes das percentagens de seus ingredientes, e não por valores absolutos (BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010; MONTGOMERY, 2013). Neste sentido, as somas de todas as proporções dos diversos componentes das misturas sob análise serão sempre 100%, ou 1.

Quaisquer misturas de  $q$  componentes podem ser descritas segundo:

$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1$$

No qual  $x_i$  representa a proporção do  $i$ -ésimo componente. Para definir especificamente a composição da mistura, é necessário fixar as proporções de  $q - 1$  componentes. A proporção do último componente será sempre o que resta para completar 100% (BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010; MONTGOMERY, 2013).

Como resultado da restrição da equação os valores de (proporção do  $i$ -ésimo ingrediente), o espaço torna-se uma região simplex. Um simplex é uma configuração espacial determinada por um número de pontos a mais do que o número de dimensões do espaço. Cada um dos  $q$  pontos que determinam o simplex representam uma mistura no qual um dos  $q$  componentes assume a proporção 1 (MONTGOMERY, 2013; MYERS; MONTGOMERY; COOK, 2016).

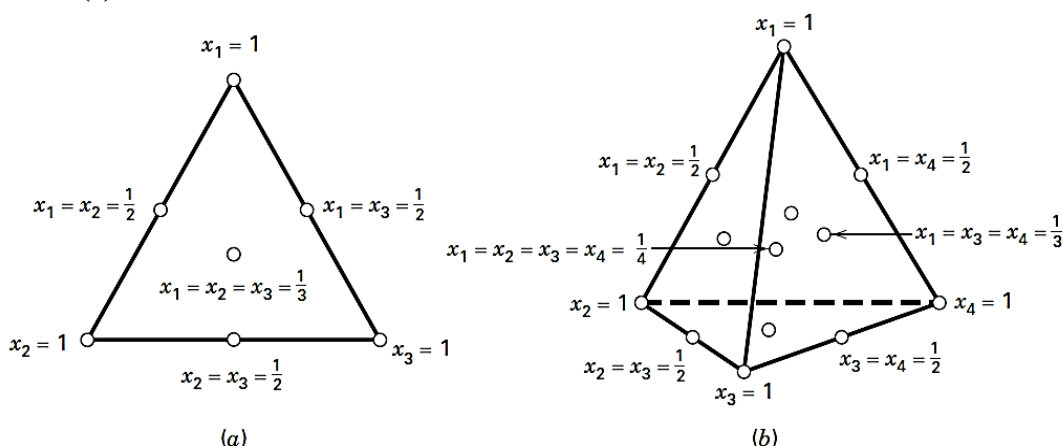
Comumente são trabalhadas misturas binárias e ternárias, nas quais podem ser aplicados modelos simples modelos matemáticos para explicar os fenômenos. Os modelos para misturas contendo mais de três componentes são simples extensões dos modelos para três componentes (MONTGOMERY, 2013). Para o caso geral de  $q$  componentes, os modelos linear, quadrático e cúbico especial são dados respectivamente pelas equações abaixo:

$$\begin{aligned}\hat{y} &= \sum_{i=1}^q b_i^* x_i \\ \hat{y} &= \sum_{i=1}^q b_i^* x_i + \sum_{i < j}^q \sum_j^q b_{ij}^* x_i x_j \\ \hat{y} &= \sum_{i=1}^q b_i^* x_i + \sum_{i < j}^q \sum_j^q b_{ij}^* x_i x_j + \sum_{i < j}^q \sum_{j < k}^q \sum_k^q b_{ijk}^* x_i x_j x_k\end{aligned}$$

Há também a possibilidade de aplicação de mais um componente, resultando em misturas quaternárias que podem apresentar um modelo quártico, entretanto, a possibilidade de interações de quarto grau é bastante pequena, por este motivo os modelos cúbicos (*full cubic e special cubic*) são mais utilizados para a previsão das respostas (BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010).

A figura 3 mostra um exemplo de um simplex com quatro componentes. As composições da mistura quaternária são representadas pelos pontos pertencentes ao tetraedro. Os vértices correspondem aos componentes puros e os lados às misturas binárias, em cada face do tetraedro os pontos representam misturas ternárias e no ponto central do tetraedro temos a mistura quaternária (MONTGOMERY, 2013).

**Figura 3** - Planejamento centróide simplex para o estudo de misturas de três componentes (a) e de quatro componentes (b).



Fonte: Montgomery, 2013.

Este tipo de planejamento tem como objetivo principal mensurar os efeitos de cada componente da mistura nas características do produto, avaliadas através do conjunto de variáveis de resposta definidas pelo analista. No planejamento de misturas é possível verificar se há sinergismo, quando há um aumento nas respostas obtidas em relação aos efeitos individuais dos fatores; ou antagonismo, quando as respostas são inferiores aos efeitos individuais (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; GARCIA *et al.*, 2010; DÍCIAULA *et al.*, 2011; YOSHIARA *et al.*, 2012).

### 3.3 EXTRATOS SECOS POR ASPERSÃO

Com o crescente interesse no desenvolvimento de fitoterápicos, a utilização de técnicas para secagem de extratos vegetais torna-se um importante passo para a produção destes medicamentos, tanto para a manutenção da estabilidade dos produtos, quanto pela versatilidade de aplicações em formas farmacêuticas, podendo ser utilizadas em formas sólidas, semissólidas e líquidas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; COUTO *et al.*, 2012; CORTEZ-ROJAS *et al.*, 2015).

Dentre as técnicas mais frequentemente utilizadas, encontra-se a secagem por aspersão (atomização ou *spray drying*), que vem sendo amplamente aplicada em indústrias alimentícias, químicas e farmacêuticas, principalmente por ser um processo contínuo e de fácil uso na escala industrial (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; KLEIN *et al.*, 2015; BACCARIN *et al.*, 2016; SHAIKH *et al.*, 2018). A secagem por aspersão é basicamente constituída em três etapas, que ocorrem quase que instantaneamente devido à velocidade das etapas. O primeiro passo da secagem ocorre com a formação de gotículas (elevada superfície de contato); no segundo passo,

ocorre a transferência de calor da corrente de ar aquecida e as gotículas, no qual solvente é rapidamente evaporado, resultando na última etapa, que é a formação das partículas geralmente de mesmo tamanho e forma da gotícula que a originou. Devido a esta elevada velocidade na evaporação do solvente, a técnica mantém as gotículas abaixo da temperatura do ar aquecido, sendo frequentemente utilizado para uma grande diversidade de substâncias (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; SOLLOHUB; CAL, 2010; VIDOVIC *et al.*, 2014; KLEIN *et al.*, 2015; SHISHIR; CHEN, 2017; O’SULLIVAN *et al.*, 2019).

Os produtos secos resultantes da secagem por aspersão podem ter sua qualidade afetada por fatores relacionados ao processo (temperatura de entrada, temperatura de saída, velocidade de corrente de ar aquecido, tamanho das gotículas e fluxo de alimentação) e às características físico-químicas do fluido de entrada (viscosidade, total de sólidos em solução e tensão superficial). Se tratando de extratos vegetais, composto por substâncias geralmente desconhecidas e com propriedades físico-químicas distintas, a secagem por aspersão gera pós higroscópicos e com características físicas desfavoráveis. Para contornar estes problemas, a definição das melhores condições do processo e a utilização de adjuvantes é essencial para que sejam obtidos pós com características tecnológicas favoráveis e elevados rendimentos, além de boa solubilidade e estabilidade (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; KLEIN *et al.*, 2015; DAZA *et al.*, 2016; O’SULLIVAN *et al.*, 2019).

A secagem por aspersão como vantagens: produção pós com maior estabilidade microbiológica e química; com tamanho de partícula uniforme e formato esférico; além de ser uma técnica indicada para substâncias termosensíveis. Com relação ao processo, as vantagens são: rapidez da secagem, bom rendimento, processo contínuo e pode ser alterado no decorrer da secagem. Dentre as desvantagens, se encontram custo inicial elevado para aquisição do equipamento e adequação das instalações (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; CAL; SOLLOHUB, 2010; SHISHIR; CHEN, 2017).

### **3.3.1 Caracterização de pós e extratos secos**

Como parte do desenvolvimento tecnológico de produtos farmacêuticos, é necessário o conhecimento de todas as características dos insumos e substâncias ativas para que seja avaliada a qualidade e a viabilidade da obtenção de formas farmacêuticas. Quando se trata de insumos na forma de pós, alguns ensaios são essenciais para determinar a possibilidade de sua aplicação em formas farmacêuticas como cápsulas e comprimidos. Fatores como densidade aparente, densidade compactada, ângulo de repouso, índice de Carr, Fator de Hausner, estão diretamente

relacionados com tamanho, distribuição, formato e tipo de superfície das partículas, assim como teor de umidade, são as principais propriedades que influenciam as características tecnológicas. Estes fatores possuem grande importância para a determinação das propriedades de fluxo de materiais, bem como para a determinação da compactabilidade e compressibilidade. O estudo destas propriedades tecnológicas pode indicar a adequabilidade de um material a ser aplicado em determinado tipo de forma farmacêutica, além de permitir a determinação dos parâmetros que podem ser modificados em uma formulação para que esta possua as características desejáveis para a produção de formas sólidas (SHAH; TAWAKKUL; KHAN, 2008; HOWARD, 2008; AULTON; SUMMERS, 2016; NEIKOV; IEFIMOV, 2019).

Uma das desvantagens tecnológicas mais relatadas para produtos secos vegetais é o reduzido tamanho de partícula proveniente da etapa de aspersão da secagem. O tamanho e a distribuição das partículas influenciam no desempenho físico dos materiais, principalmente nas propriedades de fluxo dos pós, pois podem impactar na fricção através do entrelaçamento mecânico das partículas irregulares dos pós, facilitando os processos de adesão e coesão que são influenciados por interações eletrostáticas. No caso de extratos secos por *spray dryer*, além do tamanho reduzido das partículas, ainda existem interações químicas entre as diversas substâncias presentes na matriz complexa, contribuindo para a obtenção de pós coesos. Além disso, distribuições distintas dos tamanhos de partícula podem interferir na uniformidade de volume de enchimento de cápsulas e afetar a quantidade de massa do insumo ativo presente (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; KLEIN, 2014; STANIFORTH; TAYLOR, 2016).

As análises relativas às partículas podem incluir tamanho, morfologia e superfície de partículas, e podem ser realizadas por diferentes técnicas, onde é possível verificar tamanho e morfologia, como a microscopia (óptica, de transmissão e de varredura), técnicas por tamisação, sedimentação, difração laser, espectroscopia de correlação de fótons (dispersão dinâmica de luz) (HOWARD, 2008; STANIFORTH; TAYLOR, 2016; YEKOV; IEFIMOV, 2019).

Outra desvantagem relacionada à extratos secos por *spray dryer* é a possibilidade de obtenção de pós com elevados teores de umidade e/ou pós higroscópicos devido ao processo de remoção do solvente, e pela complexidade química do material *spray-drying* (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; KLEIN, 2014; REIS *et al.*, 2017).

A avaliação deste parâmetro é importante por exercer influência sobre outras características dos extratos secos, como ângulo de repouso, densidade e índice de compressibilidade (propriedades de fluxo), além de ser indicativo de estabilidade e eficiência do processo de remoção do solvente (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; REIS *et al.*, 2017). A Farmacopeia Brasileira determina que extratos secos devam possuir no máximo 5% de teor de

umidade residual, entretanto na literatura é frequentemente relatado que a faixa de umidade residual presente em extratos secos aceitável é entre 3-8% (EUROPEAN PHARMACOPAEA 7, 2010; COUTO *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2017; FB6, 2019).

Os compêndios oficiais apresentam técnicas titulométricas, volumétricas e gravimétricas para a determinação da umidade. As técnicas gravimétricas, como a perda por dessecação, são as mais difundidas para a caracterização dos teores de umidade em pós, por maior simplicidade, além de poderem ser aplicadas diferentes procedimentos, como secagem em estufa e balança de infravermelho. Entretanto, as técnicas termogravimétricas podem ser afetadas pela perda de constituintes voláteis (HOLLENBECK, 2008; COUTO *et al.*, 2011; FREITAS; TEIXEIRA; ZAMARIOLI, 2017; REIS *et al.*, 2017).

A complexidade química de extratos secos associada à fatores como tamanho e distribuição de partículas e teor de umidade contribuem para uma das principais desvantagens destes sistemas particulados, o que frequentemente resulta em pós com propriedades de fluxo (propriedades físicas/tecnológicas) muito pobres (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; KLEIN, 2014; REIS *et al.*, 2017).

O ângulo de repouso é um parâmetro associado à fluidez de pós e à fricção interparticular do material. A medida deste parâmetro é realizada a partir de diferentes métodos, que procuram determinar a inclinação formada por partículas amontoadas até que ela forme uma altura elevada o suficiente para superar as forças de atrito dos pós, possibilitando o deslizamento do material após a transposição das forças adesivas e coesivas entre as partículas, até que as forças gravitacionais e interparticulares obtenham o equilíbrio (YEKOV; IEFIMOV, 2019).

Menores partículas geralmente possuem menor fluxo de escoamento por possuírem maior superfície de contato e maior força coesiva; enquanto partículas de maior tamanho e de formato esférico tem melhor fluxo de escoamento que partículas com formas angulares, em agulha e irregulares. Fatores externos estão geralmente relacionados à umidade presente no material, onde elevado teor de umidade da amostra, leva à maior agregação inter-particular devido à presença de água adsorvida na superfície (MEDEIROS *et al.*, 2001; ASTOLFI-FILHO *et al.*, 2005; ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2013; AULTON, 2016; YEKOV; IEFIMOV, 2019).

A forma mais comum de se obter valores de ângulo de repouso é a avaliação do ângulo da tangente formada através do escoamento de pós por um funil (com altura fixa do cone, ou base fixa do cone), sobre uma superfície. Dentre os outros métodos para a determinação do ângulo de repouso, como cilindro rotatório, mesa basculante, ambos do tipo ângulo de repouso

dinâmico; e os métodos de *ledge*, formação de cratera e plataforma (MEDEIROS *et al.*, 2001; ASTOLFI-FILHO *et al.*, 2005; ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2013; AULTON, 2016; YEKOV; IEFIMOV, 2019).

Outro fator importante é densidade do pó, frequentemente determinada como as densidades: bruta inicial (densidade aparente) e de compactação (densidade bruta final). Ambas as medidas são uma relação entre o peso do material e o volume por ele ocupado, resultando em um valor unitário expresso em g/mL ou cm<sup>3</sup>. A diferença entre as duas consiste no fato de que a densidade inicial refere-se ao pó solto, livre de qualquer empacotamento, enquanto que a densidade de compactação é resultante de uma série de movimentos e impactos mecânicos que proporcionam o empacotamento do material até o completo equilíbrio, atingindo um nível de empacotamento invariável mesmo com a persistência das vibrações e impactos. A densidade de um material é fortemente relacionada com o tamanho, formato e distribuição das partículas, assim, diminuição do tamanho das partículas, geralmente proporciona a diminuição da densidade; e, a distribuição permite que partículas de tamanhos inferiores se acomodem nos espaços interparticulares formados pelas partículas de maior tamanho, diminuindo o volume ocupado (NARASHIMHAN; AMUDA, 2017; YEKOV; IEFIMOV, 2019).

As análises destas densidades são realizadas comumente em dispositivos como o *Tap Density* (YEKOV; IEFIMOV, 2019). As medidas de densidade bruta inicial e de compactação podem indicar se o pó/extrato seco possui características desejáveis para a produção de formas farmacêuticas, geralmente materiais com densidades muito baixas não possuem boas características para a compressão, principalmente a compressão direta. Além disso, estas medidas permitem a inferência das propriedades de fluxo dos pós a partir da avaliação das medidas do índice de compressibilidade de Carr e do fator de Hausner (HOWARD, 2007; AULTON; SUMMERS, 2016).

O fator de Hausner é uma das mais difundidas avaliações das propriedades de fluxo de pós, onde a razão entre a densidade de compactação e a densidade aparente está relacionada com o atrito entre as partículas. Quanto maiores os valores para o fator de Hausner, mais pobre será o fluxo do pó analisado; e, quanto maior a taxa de empacotamento do material melhor será o fluxo do material (HOWARD, 2007).

Outro método para a medição indireta das propriedades de fluxo dos pós a partir das densidades brutas foi desenvolvido por Carr, que relatou que quanto maior a compactação mais pobre são as propriedades de fluxo deste material. Carr definiu que o percentual de compressibilidade de pós são medidas diretas da resistência potencial dos arcos ou das pontes de um pó, onde altos valores para esta resistência resultam em baixas propriedades de fluxo.

Assim, é possível inferir que propriedades de fluxo diminuem de acordo com o aumento do índice de Carr (HOWARD, 2007).

As medidas de índice de compressibilidade e fator de Hausner são as mais difundidas para a avaliação do fluxo de pós por sua simplicidade e boa correlação com as propriedades reais de fluxo de materiais. Entretanto existem diversos métodos que podem ser aplicados quando há a necessidade de dados científicos mais concretos acerca das propriedades dos materiais, como análises de coesividade, testes em células de cisalhamento, penetrometria, microscopia de força atômica, entre outros podem ser utilizados para a definição das propriedades de fluxo de pós (SHAH; TAWAKKUL; KHAN, 2008; HOWARD, 2007; AULTON; SUMMERS, 2016; YEKOV; IEFIMOV, 2019).

### 3.4 ADJUVANTES FARMACÊUTICOS NA OBTENÇÃO DE EXTRATOS SECOS

Os adjuvantes são usados para melhorar as propriedades físicas dos pós, sendo utilizados diversos excipientes, como: amido, ciclodextrinas, celulose, lactose, dióxido de silício coloidal, maltodextrina, gelatina, goma arábica, entre outros (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009).

Além da influência sobre as propriedades físicas dos produtos secos, a utilização de adjuvantes pode proporcionar o encapsulamento das substâncias da matriz complexa, protegendo-as de influências externas como luz, temperaturas elevadas e agentes oxidantes. Além de interferirem em características essenciais para a terapêutica, como estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade (KLEIN *et al.*, 2015; DAZA *et al.*, 2016).

Para a realização destes estudos foram selecionados os excipientes: dióxido de silício coloidal, lactose, celulose microcristalina, maltodextrina e goma xantana, quais figuram como adjuvantes amplamente utilizados para a obtenção de produtos secos derivados de espécies vegetais; facilmente encontrados no mercado e que podem realizar um incremento dentre as características físico-químicas dos produtos finais, consequentemente impactando na viabilidade e qualidade das formas farmacêuticas.

### 3.4.1 Dióxido de silício coloidal (Aerosil®)

Dióxido de silício coloidal (DSC), ou Aerosil®, é uma substância cuja principal aplicação é incrementar as características de fluxo de pós usados em processos de compressão e preenchimento de cápsulas, devido ao seu tamanho de partículas reduzido e sua grande superfície de contato, que acabam reduzindo a densidade bruta de pós (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; EL-GIZAWI *et al.*, 2015).

O dióxido de silício coloidal possui ampla aplicação como componente inativo de produtos farmacêuticos (cápsulas, comprimidos, suspensões, preparações transdérmicas e vaginais), e como aditivos em alimentos. Todas estas aplicações são baseadas na baixa toxicidade e irritabilidade deste excipiente (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; EL-GIZAWI *et al.*, 2015).

O aerosil tem uso difundido devido a sua grande versatilidade como excipiente, apresentando diversas funções, como: adsorvente, deslizante, desintegrante, agente de viscosidade, estabilizante térmico, estabilizante de emulsões, entre outras. Além disso, a capacidade adsorvente deste adjuvante fomenta a aplicação dele em processos que envolvem substâncias higroscópicas, além de ser constantemente utilizado como diluente por ser não tóxico, puro e quimicamente inerte (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; BACCARIN *et al.*, 2016). Um exemplo é a aplicação de dióxido de silício coloidal no aprimoramento de drogas com baixa solubilidade a partir de microencapsulamento e inclusão em dispersões sólidas, proporcionando o aumento da solubilidade de fármacos, as taxas das substâncias ativas no plasma e a biodisponibilidade (TEIXEIRA *et al.*, 2016; DAVIS; WALKER, 2018).

O DSC é um dos adjuvantes mais utilizados para extratos vegetais pelo seu importante papel na manutenção da estabilidade dos produtos frente à umidade atmosférica. Além disso, as características multifuncionais deste adjuvante o tornam ainda mais vantajoso para uso em processos de obtenção de extratos secos, melhorando as propriedades dos pós, bem como aumento em rendimentos devido à diminuição da aderência às paredes dos equipamentos (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; COUTO *et al.*, 2011; CORTES-ROJAS *et al.*, 2015).

### 3.4.2 Lactose

A lactose é um dos adjuvantes mais empregados em formas sólidas, enquadrada na classe dos diluentes. É amplamente aplicada em comprimidos devido às suas boas propriedades de enchimento, como: elevada solubilidade em água, sabor agradável, baixa capacidade de absorver água e boas características de compressão; entretanto, apresenta como desvantagem suas baixas características de fluxo, além da restrição do uso em pessoas com intolerância (SOARES, 1999; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; AULTON; TAYLOR, 2016).

A lactose se apresenta tanto na forma amorfa quanto na cristalina, e é quimicamente constituída de uma unidade de galactose e uma unidade de glicose. Há duas possíveis formas isoméricas:  $\alpha$ - e  $\beta$ -lactose, onde a principal diferença entre os isômeros está relacionada à temperatura de cristalização (SOARES, 1999; AULTON; TAYLOR, 2016; HEBBINK; DICKHOFF, 2019).

A  $\alpha$ -lactose monohidratada é usualmente empregada como diluente na preparação de comprimidos que envolve o processo de granulação úmida. Algumas frações contendo partículas finas de cristais de lactose monohidratada são mais utilizadas para compressão direta. As frações que contém partículas de  $\alpha$ -lactose monohidratada de maior diâmetro possuem boas propriedades de fluxo, porém pobre capacidade aglutinante. A  $\alpha$ -lactose anidra obtida pela desidratação térmica da fração cristalina de  $\alpha$ -lactose monohidratada, apresenta um aumento significativo em sua capacidade aglutinante sem promover alteração nas propriedades de fluxo do produto original. Outra forma de obtenção de lactose é através da secagem por aspersão, resultando num produto constituído por cristais de  $\alpha$ -lactose monohidratada, unida por lactose amorfa, sendo o adjuvante mais recomendado para compressão direta, possuindo boas características de fluxo e aglutinação (SOARES, 1999; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; AULTON; TAYLOR, 2016; HEBBINK; DICKHOFF, 2019).

A utilização da lactose como diluente e sua boa solubilidade tem fomentado seu uso para a produção de dispersões sólidas de drogas de baixa solubilidade através de secagem por aspersão, proporcionando uma melhora na solubilização de drogas pouco solúveis (PAUDEL *et al.*, 2013). Além disso, a lactose é conhecida pelo uso na microencapsulação de produtos alimentícios e derivados de vegetais, proporcionando o aumento da estabilidade e maior resistência à oxidação (KOÇ *et al.*, 2012; YINGNGAM *et al.*, 2018).

#### .4.3 Celulose microcristalina

Celuloses são polissacarídeos provenientes de diversas plantas superiores, sendo um dos compostos orgânicos naturais mais abundantes, que consiste de uma cadeia de glicoses anidras através de ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), e o número de cadeias será dependente do tipo de celulose em questão (YANG; LI, 2018).

As celuloses possuem variadas aplicações em produtos farmacêuticos devido às suas propriedades. Geralmente são biocompatíveis, biodegradáveis, possuem baixa toxicidade e boas propriedades de compressão e desintegração, e além de serem inertes quimicamente conferem aos produtos boas características reológicas, térmicas e mecânicas. Geralmente possuem compatibilidade com muitos fármacos, e tem sido amplamente utilizada na produção de extratos secos de espécies vegetais. Embora essa substância possua vantagens de melhoramento das características de fluxo, a higroscopicidade deste material pode ser uma desvantagem quando associados à fármacos/extratos com susceptibilidade à degradação (SOARES, 1999; AULTON; TAYLOR, 2016; TRACHE *et al.*, 2016; NSOR-ATINDANA *et al.*, 2017; YANG; LI, 2018).

Dentre as diferentes celuloses disponíveis no mercado, a mais utilizada no campo farmacêutico é a celulose microcristalina (MCC). A MCC tem sua estrutura parcialmente despolimerizada através de hidrólise em meio ácido após tratamento mecânico da  $\alpha$ -celulose. É usada normalmente com a função de diluente em compressão direta devido a sua suscetibilidade a formação de compactos em que há a manutenção da plasticidade. Também pode ser utilizada em granulação úmida, e possui como funções tecnológicas o poder aglutinante e desintegrante, o que torna um excipiente vantajoso para a produção de formas comprimidas. (SOARES, 1999; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; TRACHE *et al.*, 2016).

Em relação às formulações derivadas de espécies vegetais, a celulose microcristalina destaca-se tanto na preparação de extratos secos, quanto como excipiente em formas sólidas como cápsulas e comprimidos. No caso de extratos secos, diversos relatos demonstraram que a celulose proporcionou uma melhora nas propriedades físicas dos materiais derivados de vegetais, aumentando densidade, compressibilidade e rendimento. Este aprimoramento pode ser observado em extratos obtidos de *Rapanea ferruginea* (BACCARIN *et al.*, 2016); *Bidens pilosa* (CORTES-ROJAS *et al.*, 2015); *Gymnema sylvestre* (CARBINATTO *et al.*, 2011).

### 3.4.4 Maltodextrina

Maltodextrina é um polissacarídeo constituído de glicose e dextrose, em que as unidades de D-glicose possuem ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), enquanto as cadeias ramificadas possuem ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6). É utilizada como agente de revestimento, agente de viscosidade, diluente em cápsulas e comprimidos, além da capacidade aglutinante. Estas duas últimas funções geralmente são verificadas quando estas são usadas para compressão direta e na granulação úmida (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; VIDOVIC *et al.*, 2014).

A utilização de maltodextrina como adjuvante é uma forma para aumentar a meia vida e melhorar as características organolépticas e tecnológicas de produtos derivados de espécies vegetais, principalmente produtos secos originados de secagem por aspersão. Uma das vantagens, é que, por ser uma substância polimérica, pode encapsular as substâncias ativas/fitocomplexo, e formar uma barreira física para o oxigênio e outras moléculas, o que serve para inibir a degradação química e enzimática das substâncias protegidas. Além de possibilitar o aumento na solubilidade/dissolução das substâncias componente da matriz, e proteger as possíveis substâncias que possuam sensibilidade à temperatura, como alguns polifenóis termossensíveis (SANSONE *et al.*, 2011; VIDOVIC *et al.*, 2014).

Diversos estudos com matrizes vegetais aplicam a maltodextrina, usado principalmente como agente encapsulante de extratos, e para o incremento da solubilidade e de propriedades tecnológicas. Sablania e Don Bosco (2018) evidenciaram em seu estudo de otimização das condições de secagem de *Murraya koenigii* que a maltodextrina apresenta-se como um eficiente carreador do extrato, incrementando também a solubilidade e rendimento. Aguiere-Alonso e colaboradores (2019) avaliaram produtos secos derivados de baunilha (*Vanilla planifolia*) contendo tanto maltodextrina, quanto ciclodextrina e sílica precipitada, na qual a maltodextrina obteve o melhor desempenho na retenção de substâncias aromáticas e proporcionou elevados rendimentos.

### 3.4.5 Goma Xantana

Goma xantana, é um composto natural de alto peso que possui diversas aplicações no desenvolvimento de produtos alimentícios, cosméticos e sistemas de liberação de fármacos (GARCIA-UCHOA *et al.*, 2000; KUMAR; RAO; HAN, 2018). Com boa solubilidade em água, biocompatibilidade e ausência de toxicidade, a goma xantana possui uma estrutura polimérica

primária baseada em unidades repetidas de um pentasacarídeo formado por duas unidades de glicose, duas de manose e uma de ácido glicurônico (GARCIA-UCHOA *et al.*, 2000; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; KUMAR; RAO; HAN, 2018).

Possui diversas aplicações como excipiente, dentre as principais estão os usos como estabilizante, gelificante, agente de viscosidade, suspensor e agente de liberação estendida. Isso se deve às propriedades da goma, que possui a habilidade de formar soluções com elevada viscosidade em baixas forças de cisalhamento. A goma xantana pode ser usada em comprimidos obtidos por compressão direta, embora em alguns casos possa ser reportada uma pequena erosão no produto devido à deformação do polímero, que possui comportamento pseudoplástico. Além disso, possui também propriedade aglutinante, o que pode ser vantajoso para a obtenção de formas farmacêuticas sólidas. A goma xantana pode ainda ser utilizada como excipiente em processos de secagem por *spray dryer* e liofilização, para a melhoria das propriedades físicas dos pós obtidos nestes processos (ROSALAM; ENGLAND, 2005; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

### 3.5 SISTEMAS DISPERSOS

Dentre as formas farmacêuticas mais utilizadas encontram-se as emulsões. Devido a sua enorme versatilidade de aplicação em diversas vias de administração, além da ampla adesão de pacientes principalmente quando a via de administração é tópica. No que se refere à utilização desta forma para a incorporação de extratos secos derivados das folhas de *Eugenia uniflora* destaca-se a viabilidade de incorporação, além do grande potencial antimicrobiano, cicatrizante e antioxidante da espécie, sendo um promissor produto para a utilização terapêutica, bem como a aplicação na cosmética.

#### 3.5.1 Emulsões - generalidades

Sistemas dispersos consistem basicamente em uma fase dispersa (em forma de partículas ou gotículas) em outra fase, que será a fase contínua, resultando em aerossóis (líquidos ou sólidos), coloides, suspensões, espumas, emulsões, suspensões sólidas. Dentre os sistemas dispersos mais comuns, estão as emulsões, que podem ser caracterizadas como sistemas heterogêneos, produtos de misturas de dois ou mais líquidos imiscíveis, geralmente de óleo e água, onde necessariamente um se apresenta na forma de gotículas finas (fase dispersa),

e outro como uma fase contínua (fase dispersante) (TADROS, 2013; PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015; ECCLESTON, 2016).

As emulsões são termodinamicamente instáveis e para a manutenção do equilíbrio entre as fases é necessária a presença de um terceiro componente, um agente estabilizante/emulsificante. Estes podem ser sólidos finamente divididos, polímeros ou tensoativos, e são responsáveis pela preservação da miscibilidade das fases, atuando de forma a diminuir a tensão interfacial entre os componentes, permitindo assim que o produto obtido se mantenha estável (GARCIA, 2009; FERREIRA *et al.*, 2010; DAMASCENO *et al.*, 2011; MCCLEMENTS, 2011; TADROS, 2013; ECCLESTON, 2016).

As emulsões têm destaque no campo farmacêutico, compondo uma parcela considerável das formulações líquidas e semissólidas, devido à versatilidade de administração e aplicações em sistemas de liberação prolongada e no transporte de fármacos por diversas vias. Além disso, podem ser aplicados para resolver inúmeros problemas farmacotécnicos, e para o incremento de características essenciais como solubilidade, dissolução e biodisponibilidade de alguns fármacos (ZANON, 2010; DAMASCENO *et al.*, 2011; ZORZI *et al.*, 2015).

As emulsões farmacêuticas podem ser tipo O/A (óleo em água) e A/O (água em óleo). As emulsões O/A, são aquelas cujas gotículas de óleo compõem a fase dispersa, e a água a fase dispersante. São formulações não oclusivas, e que por apresentarem como fase dispersante a água, são mais indicadas para uso tópico. Já nas emulsões A/O, a água compõe a fase dispersa e o óleo a fase dispersante, são mais lipofílicas, geralmente são produtos viscosos e com elevada aderência à superfície de aplicação (ECCLESTON, 2016).

Ainda podem existir emulsões complexas, onde uma gotícula de óleo revestindo uma gotícula de água podem estar suspensas em uma outra fase aquosa dispersante, resultando em emulsões múltiplas A/O/A (água-óleo-água). Uma emulsão múltipla O/A/O (óleo-água-óleo) é homóloga à emulsão A/O/A, possuindo as fases inversas. Devido à complexidade estrutural das gotículas, preparações deste tipo podem ser empregadas com frequência em sistemas de liberação e ação prolongada de fármacos (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015; ECCLESTON, 2016).

Além disso, as emulsões podem ser categorizadas de acordo com o tamanho de suas gotículas, permitindo a separação em macroemulsões, microemulsões e nanoemulsões. As macroemulsões são mais facilmente encontrados no mercado, e são definidas como “emulsões grosseiras” devido ao seu elevado tamanho de gotícula ( $> 400$  nm), possuem aspecto turvo e coloração esbranquiçada/amarelada. As nanoemulsões são semelhantes às emulsões comuns, diferenciando-se pelo menor tamanho de gotícula (entre 100-400 nm), possuem estabilidade

cinética e coloração com reflexos azulados. Já as microemulsões, são sistemas homogêneos, termodinamicamente estáveis, e diferenciam-se dos outros sistemas pela sua transparência e por apresentarem tamanho de gotícula que varia de 5 a 140 nm (TADROS, 2013; ECCLESTON, 2016; CALLENDER *et al.*, 2017).

Um aspecto importante a ser considerado na obtenção de emulsões é a composição e a seleção das fases tem impacto na fase final, sendo relevantes os aspectos relacionados à solubilidade do princípio ativo na fase dispersa, via de administração, tipo de tensoativo, entre outros (ECCLESTON, 2016).

Quanto à escolha do tensoativo, devem ser analisados: tipo de tensoativo (aniônico, catiônico, não iônico etc.); se serão usadas misturas destas substâncias, além de dados sobre a toxicidade. (ECCLESTON, 2016; CALLENDER *et al.*, 2017). Para a seleção do tensoativo/mistura de tensoativos, é importante que seja o HLB (*Hidrophilic-Lipophilic Balance*) seja levado em consideração. Esta é uma medida que determina o grau de lipofilicidade ou hidrofiliicidade do tensoativo. (TADROS, 2013; CALLENDER *et al.*, 2017).

Além de emulsões estabilizadas com tensoativos, também existem os sistemas estabilizados por polímeros e partículas sólidas finamente divididas, sendo denominados como emulsões livres de tensoativo ou emulsões *Pickering*. Dentre as principais substâncias utilizadas para a estabilização de emulsões, encontram-se polímeros derivados da celulose (hidroxipropilmetilcelulose - HPMC), polímeros com propriedades espessantes e gelificantes (maltodextrina, goma xantana, goma arábica e outros polímeros naturais); além de partículas sólidas finamente divididas como argilas e derivados de sílica (dióxido de silício coloidal) (ROSALAM; ENGLAND, 2005; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; LUNTER; DANIELS, 2012; SONG *et al.*, 2015; ZHANG; ZHOU; YANG, 2015; MARTO *et al.*, 2016).

A estabilização de emulsões por partículas sólidas ocorre pela diferença de afinidade/molhabilidade das partículas sólidas com os líquidos componentes do sistema. Esta característica permite uma dupla molhabilidade, que proporciona o acúmulo espontâneo das partículas na interface líquido-líquido, estabilizando as gotículas do sistema por exclusão de volume e impedimento estérico. A eficácia da estabilização dessas emulsões depende do tamanho, forma, concentração, molhabilidade e interações entre as partículas aderidas na superfície das gotículas da fase dispersa (MARTO *et al.*, 2016).

Quando os sistemas são estabilizados por polímeros (primariamente solúveis ou dispersíveis em água), a estabilização ocorre pelo aumento da viscosidade da fase dispersante (devido a presença do polímero), produzindo uma proteção ao sistema através da diminuição

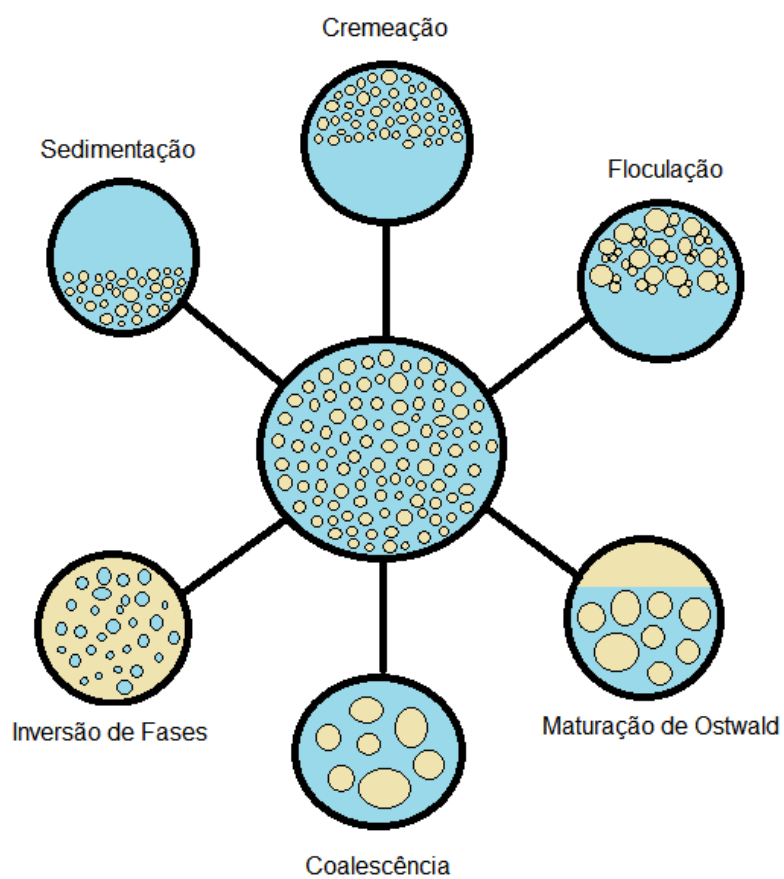
da colisão entre as gotículas e resultando na estabilização do sistema (LUNTER; DANIELS, 2012).

As emulsões Pickering têm sido utilizadas para como alternativa para a utilização de sistemas convencionais visto que apresentam maior resistência à fenômenos de instabilidade como coalescência e maturação de Ostwald, além de possibilitarem a formação de sistemas com gotículas de tamanho elevado mais estáveis (MARTO *et al.*, 2016). Além disso, apresentam boa tolerância e baixa toxicidade, sendo uma vantagem sobre sistemas estabilizados por tensoativos, que podem apresentar toxicidade, baixa tolerância fisiológica e irritabilidade na administração (ALWADANI; FATEHI, 2018).

### **3.5.2 Estabilidade das emulsões e métodos de avaliação**

Um ponto crítico para o desenvolvimento de emulsões é a determinação de sua estabilidade, visto que a maioria destes sistemas são termodinamicamente instáveis, sendo necessário a monitoração de quaisquer fenômenos ou alteração nas características físicas do produto durante os estudos de pré-formulação. A estabilidade física de uma emulsão é determinada ausência de fenômenos relacionados ao comportamento das gotículas, como: cremeação, sedimentação, floculação, coalescência, inversão de fases e separação de fases (Figura 4); normalmente atreladas à concentrações equivocadas dos componentes, tensoativos incompatíveis, problemas na homogeneização, distribuição dos tamanho de gotículas, densidade e forma de armazenamento (TADROS, 2013; ECCLESTON, 2016).

**Figura 4** - Representação esquemática de emulsões e seus processos de instabilidade.



Fonte: Adaptado de Tadros, 2013.

Para avaliar a estabilidade de emulsões geralmente são utilizadas diversas metodologias. A análise de características visuais é simples e rápido de verificar a presença de incompatibilidades relacionadas às forças gravitacionais e centrífugas, como a sedimentação e cremação (HU *et al.*, 2017).

Para a visualização de outros fenômenos de instabilidade pode ser aplicada a análise microscópica. A microscopia possibilita a visualização de distribuição e dimensão das gotículas de um sistema disperso, evidenciando quando o sistema possui distribuição homogênea e quando possui fenômenos de instabilidade como a presença de floculados, creme, sedimentos e coalescência (HU *et al.*, 2017).

As características das cargas elétricas da superfície das gotículas de um sistema também possuem importância em relação à estabilidade da emulsão. A magnitude e o sinal das cargas derivam das características iniciais do próprio sistema emulsificante, entretanto, normalmente estas cargas são sensíveis ao pH e às substâncias presentes no meio. A mensuração das cargas é importante devido aos fenômenos floculação e coalescência, que possuem influência de cargas eletrostáticas e de repulsão para acontecerem. Para mensurar as cargas pode ser utilizada técnica microeletroforética (BHATTACHARJEE, 2016; HU *et al.*, 2017), que mensura as características das superfícies das gotículas baseadas na velocidade e direção que estas se movimentam quando um campo elétrico é aplicado (BHATTACHARJEE, 2016; HU *et al.*, 2017).

Estas medidas são realizadas para determinar o potencial Zeta, que é geralmente a diferença do potencial das cargas da dupla camada elétrica de partículas eletroforicamente móveis e a fase dispersante ao redor (BHATTACHARJEE, 2016). Os valores de resultantes de potencial Zeta comumente são associados à estabilidade de sistemas dispersos, onde valores obtidos nas faixas de  $\pm 0-10$  mV,  $\pm 10-20$  mV,  $\pm 20-30$  mV e  $> \pm 30$  mV são considerados altamente instáveis, moderadamente instáveis, moderadamente estáveis e altamente estáveis, respectivamente (BHATTACHARJEE, 2016).

Outro parâmetro utilizado é a turbidez, uma medida simples que avalia capacidade óptica do sistema, onde quanto mais gotículas intactas existem no sistema, maior será o espalhamento da radiação, e, portanto menor será a luz incidida no detector, resultando numa elevada turbidez. As respostas obtidas por essa análise são frequentemente associadas à aparência da emulsão, sendo comumente associadas com as análises macroscópicas. A turbidimetria pode ser mensurada com a utilização de espectrofotômetros, através de medidas de absorbância e transmitância das emulsões, utilizando leituras em cubetas de quartzo nas regiões do visível (entre 380 e 780 nm) (HU *et al.*, 2017).

Os ensaios abordados anteriormente expõem as formulações às condições que possam levar às incompatibilidades farmacêuticas comuns às emulsões, como cremeação e sedimentação. Adicionalmente, podem ser aplicados métodos que simulam as condições de armazenamento extremo e transporte, como ciclos gelo-degelo e centrifugação (SILVA-JUNIOR *et al.*, 2012; BOUYER *et al.*, 2012).

Por fim, ensaios acelerados e de longa duração devem seguir protocolos oficiais, bem como as normas estipuladas pelas agências reguladoras, apresentando em suas metodologias as definições requeridas de acondicionamento, temperatura e umidade que permitam a avaliação do tempo de vida útil do produto.

### **3.5.3 Métodos para a obtenção de emulsões**

A obtenção de emulsões necessita além dos componentes (fase aquosa e oleosa, agente estabilizante), da adição de energia mecânica suficiente para modificar a interface e produzir gotículas que estarão dispersas na fase externa. Esta energia será responsável pela desrupção, misturando os componentes e formando as gotículas de tamanho reduzido. Para macroemulsões, normalmente são utilizados homogeneizadores de alta rotação; para obter nanoemulsões e microemulsões, é necessária a utilização de homogeneizadores de alta energia (TADROS, 2013). Diversos aparatos podem ser usados para estas preparações, como misturadores estáticos, ultraturrax, moinhos coloidais, homogeneizadores de alta pressão e aparelhos de ultrassom (MOLLET; GRUNBENMANN, 2001; TADROS, 2013).

A desrupção é uma etapa crítica na produção de emulsões, e a eficiência deste processo determinará a estabilidade do sistema, visto que a estabilidade está diretamente relacionada com o tamanho e a distribuição de gotículas. Assim, o tipo de homogeneizador deve ser avaliado com cuidado no desenvolvimento de formulações. Em escala laboratorial, os mais utilizados são ultraturrax, moinhos coloidais e sondas ultrassônicas. Tanto ultraturrax quanto moinhos coloidais são do tipo rotor-estator, e o uso normalmente é limitado às macroemulsões (MOLLET; GRUNBENMANN, 2001; TADROS, 2013).

As sondas ultrassônicas possibilitam a formação de emulsões através do fenômeno de cavitação gerado a partir da introdução de ondas ultrassônicas nos líquidos a serem homogeneizados. A eficiência do processo de emulsificação depende de fatores como quantidade de energia irradiada, potência, proporção dos componentes da formulação e características do óleo. Quanto maior a potência, maior a energia inserida no sistema, e,

menores serão as gotículas resultantes, proporcionando assim a formação de um sistema disperso de maior estabilidade (SILVA *et al.*, 2015).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Reagentes, solventes, padrões e excipientes

Solventes: acetona (Cinética<sup>®</sup>), etanol (Cinética<sup>®</sup>), metanol (Cinética<sup>®</sup>), metanol grau HPLC (Tédia<sup>®</sup>; JTBaker<sup>®</sup>), ácido trifluoroacético, ácido fórmico (Vetec<sup>®</sup>), ácido acético (Dinâmica<sup>®</sup>), acetato de etila (Dinâmica<sup>®</sup>), tolueno (Cinética<sup>®</sup>), ácido clorídrico (Dinâmica<sup>®</sup>), miglyol 812.

Reagentes: Cloreto de alumínio (Neon<sup>®</sup>), carbonato de sódio (Dinâmica<sup>®</sup>), polivinilpirrolidona (PVP), caseína, pó de pele, Folin Ciocalteau (Dinâmica<sup>®</sup>).

Padrões: Ácido gálico (Sigma<sup>®</sup>), ácido elágico (Sigma<sup>®</sup>), rutina (Merck<sup>®</sup>), miricitrina (Sigma<sup>®</sup>), quercetina (Merck<sup>®</sup>),  $\beta$ -sitosterol (Sigma<sup>®</sup>), D-maltose, D-frutose (USP).

Excipientes: Dioxido de silício coloidal, celulose 101, maltodextrina, goma xantana, lactose (spray dried), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).

#### 4.1.2 Vidrarias e materiais complementares

Vidrarias: Pesa-filtros, cadinhos de porcelana, dessecadores, balões de fundo redondo de 250, 500 e 1000 mL, balões volumétricos de 10, 25, 50, 100 e 250 mL, pipetas volumétricas de 0,5 - 10,0 mL, béqueres 50 - 1000 mL, erlenmeyers de 50 - 1000 mL.

Materiais complementares: pipetas automáticas de 25-250 e 100-1000  $\mu$ L (Brand<sup>®</sup>), cuba cromatográfica (Camag<sup>®</sup>), seringas de 5 mL, filtros de seringa PVDF 0,45  $\mu$ m (Macheray-Nagel<sup>®</sup>), papéis de filtro (comum e quantitativo), pinças, espátulas, pipetadores, ponteiros azuis e amarelos, placas cromatográficas para CCD (Macheray-Nagel<sup>®</sup>) e CCDAE (Merck<sup>®</sup>).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Obtenção, Identificação e Tratamento do Material Vegetal

O material vegetal composto das folhas de *E. uniflora* amostras foi coletado em Igarassu, Pernambuco, Brasil (Lat.: 7,8278180; Long.: 34,918168) e identificadas, sendo depositada sob o número de tombamento de 91670 no herbário Dárdano de Oliveira do Instituto Agrônomo de Pernambuco. O acesso ao material foi cadastrado Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (Sisgen) sob número A449575. O material foi estabilizado em estufa de circulação de ar (Mod. 82/480, Lucadema®) durante 48 h à 40 °C. Em seguida, as folhas foram trituradas em moinho de facas (Mod. Willye TE-680, Tecnal®) em seguida foram caracterizadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª Ed. (BRASIL, 2019).

#### 4.2.1.1 Caracterização do material vegetal

A material vegetal foi caracterizado empregando Métodos Gerais em Farmacognosia de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª Ed. (BRASIL, 2019). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (desvio padrão relativo).

##### a) Determinação de matéria estranha

Cerca de 50 g do material vegetal foram espalhadas em uma fina camada sobre uma superfície coberta com papel, e a partir da técnica de quarteamento, os materiais estranhos às amostras foram separados manualmente. Inicialmente a olho nu e, em seguida com o auxílio de lente de aumento (cinco a dez vezes). O material separado foi pesado e com base no peso da amostra submetida ao ensaio, foi calculada a porcentagem de matéria estranha em porcentagem de massa.

b) Determinação de teor de umidade

Amostras com 1 g do material vegetal foram pesadas em balança de infravermelho (Mod. ID50, Marte<sup>®</sup>) e submetidas a dessecação a 105 °C até que variações de no mínimo 0,03% no peso do material não fossem detectadas em um intervalo de 60 segundos.

c) Determinação do teor de cinzas

Amostras contendo 3,0 g do material vegetal foram transferidas para cadinhos de porcelana previamente calcinados, arrefecidos e pesados. As amostras foram incineradas em mufla por 3 horas, mantendo-se a temperatura de 600 °C. Em seguida foram arrefecidos por 30 minutos em dessecador e pesados.

d) Análise granulométrica por tamisação

Amostras de 25 g do material vegetal foram submetidas à passagem através de tamises, previamente pesados e tarados, com abertura de malha 850, 600, 425, 250 e 125 µm. A tamisação foi realizada em tamisador (Bertel<sup>®</sup>) ajustado a 60 vibrações por segundo durante 15 minutos.

## 4.2.2 Otimização do Processo Extrativo

### 4.2.2.1 Preparação dos extratos e aplicação simplex centroide para planejamento de misturas

As soluções extrativas foram preparadas a partir do método de turbo extração, utilizando um rotor de alta velocidade (LAR.2, Metvisa<sup>®</sup>). O procedimento foi realizado utilizando o material vegetal na proporção droga: solvente 10% (p/v), em 4 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 5 minutos.

Nesta etapa foram avaliados sistemas de solventes determinados por metodologia simplex centroide para planejamento de misturas para quatro componentes. Foram usados como líquidos extratores: água, metanol, etanol e acetona em suas formas puras, bem como em misturas binárias, ternárias e quaternárias (Tabela 1), sendo obtidos 15 extratos.

**Tabela 1** - Proporção de solventes utilizados para cada sistema de extração obtido.

| <b>Extrato</b> | <b>H<sub>2</sub>O</b> | <b>MeOH</b> | <b>EtOH</b> | <b>Acetona</b> |
|----------------|-----------------------|-------------|-------------|----------------|
| <b>1</b>       | 1                     | 0           | 0           | 0              |
| <b>2</b>       | 0                     | 1           | 0           | 0              |
| <b>3</b>       | 0                     | 0           | 1           | 0              |
| <b>4</b>       | 0                     | 0           | 0           | 1              |
| <b>5</b>       | 0,5                   | 0,5         | 0           | 0              |
| <b>6</b>       | 0,5                   | 0           | 0,5         | 0              |
| <b>7</b>       | 0,5                   | 0           | 0           | 0,5            |
| <b>8</b>       | 0                     | 0,5         | 0,5         | 0              |
| <b>9</b>       | 0                     | 0,5         | 0           | 0,5            |
| <b>10</b>      | 0                     | 0           | 0,5         | 0,5            |
| <b>11</b>      | 0,333                 | 0,333       | 0,333       | 0              |
| <b>12</b>      | 0,333                 | 0           | 0,333       | 0,333          |
| <b>13</b>      | 0,333                 | 0,333       | 0           | 0,333          |
| <b>14</b>      | 0                     | 0,333       | 0,333       | 0,333          |
| <b>15</b>      | 0,25                  | 0,25        | 0,25        | 0,25           |

Onde: H<sub>2</sub>O: Água; MeOH: Metanol; EtOH: Etanol. 1: Solvente a 100%; 0,5: Solvente 50%; 0,333: Equivale a um terço do solvente e 0,25: Equivale a um quarto do solvente.

Fonte: Autoria própria.

Após a execução de todos os ciclos, as soluções extrativas foram filtradas sob vácuo e armazenadas em frascos âmbar sob resfriamento até a realização de todos os ensaios de caracterização. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (desvio padrão relativo).

#### 4.2.2.2 Caracterização dos Extratos

A caracterização dos extratos consistiu na avaliação das variáveis: resíduo seco e, teor de marcadores (flavonoides e taninos, por espectrofotometria no ultravioleta-visível e cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE), utilizando metodologias previamente desenvolvidas e validadas (RAMOS *et al.*, 2017; BEZERRA *et al.*, 2018), e a medida de eficiência de extração (CUNHA *et al.*, 2009). Estas variáveis de resposta foram analisadas isoladamente e usadas para a determinação do modelo. Também foram obtidos os *fingerprints*

por CLAE e cromatografia de camada delgada de alta eficiência (CCD-AE) para análise qualitativa dos perfis químicos dos extratos.

a) Determinação de resíduo seco

O resíduo seco foi determinado em balança de infravermelho. Foram utilizados 5 mL de cada solução extrativa, levadas à dessecação sob temperatura de  $130 \pm 2$  °C até que variação de massa mínima de 0,03% deixasse de ocorrer no intervalo de 30 segundos.

b) Determinação do teor de flavonoides totais por espectrofotometria UV-Vis

Para determinar o teor de flavonoides totais foi utilizada a metodologia de complexação com cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) validada para droga vegetal e extratos brutos de *E. uniflora* por Ramos e colaboradores (2017). Na aplicação deste método, foram realizadas adaptações no que concerne às diluições das amostras. Para as análises, alíquotas de 5 mL das soluções extrativas foram diluídas em balões volumétricos de 25 mL com etanólica 50% (v/v), originando as Soluções Estoque para Flavonoides Totais (SEFT). Em seguida, 5 mL das SEFT foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL, onde foram adicionados 2 mL de  $\text{AlCl}_3$  5% em metanol para a complexação. O volume foi aferido com solução etanólica 50% (Solução Amostra - SAFT). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Mod. AJX-1900, Micronal®) após 25 minutos de reação com  $\text{AlCl}_3$ , no comprimento de onda de 410 nm. A solução amostra sem adição de  $\text{AlCl}_3$  foi usada como solução branco (SB).

O teor de flavonoides totais foi expresso em m/m% de rutina e foi calculado pela equação:

$$TFT = \frac{A \times FD}{m \times E_{1\text{ cm}}^{1\%}}$$

Onde: TFT – teor de flavonoides totais; A – absorvância lida; FD – fator de diluição; m – massa da matéria prima (g);  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  – absorção específica do complexo rutina (259,4).

c) Determinação do teor de taninos totais por espectrofotometria UV-Vis

A determinação do teor de taninos totais foi realizada a partir do método de Folin-Ciocalteu através de procedimento validado para a espécie por Bezerra (2016) onde foram doseados os polifenóis totais e os polifenóis não adsorvidos utilizando polivinilpirrolidona como agente complexante. Para a determinação de polifenóis totais (PFT), alíquotas de 1 mL das soluções extrativas foram diluídas em balões volumétricos de 25 mL utilizando água destilada, resultando nas Soluções Estoque para Taninos Totais - SETT. 0,5 mL de cada SETT foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL, contendo de 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 10 mL de água destilada. O volume foi aferido com solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 10,75% (p/v). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro após 15 minutos da adição do último reagente no comprimento de onda de 780 nm (A1).

Para análise dos polifenóis não adsorvidos (PNA) ou fração não tanante (FNT) foi utilizado o método de complexação com macromolécula (polímero) para remoção dos taninos do meio. Neste sentido, foram transferidos 10 mL das SETT para erlenmeyers de 50 mL, onde foram adicionados 150 mg de polivinilpirrolidona (PVP). Essa mistura foi levada a agitação magnética por 30 minutos em agitador múltiplo (Mod. RO15 POWER, IKA®), sendo filtrada através de papel de filtro ao final. Em seguida, foram retirados 0,5 mL do filtrado, adicionados 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu, 10 mL de água destilada e o volume foi aferido com carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 10,75% (p/v). As leituras foram realizadas após 15 minutos após a adição da solução de carbonato de sódio no comprimento de onda de 780 nm (A2).

Para a análise do padrão, foram preparadas soluções de ácido gálico em água destilada, sob concentração de 1 mg/mL, resultando na solução estoque de ácido gálico (SEAG). Em seguida, alíquotas da SEAG foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL, contendo de 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 10 mL de água destilada. O volume foi aferido com solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 10,75% (p/v). As leituras foram realizadas após 15 minutos da adição do último reagente no comprimento de onda de 780 nm (A3).

O teor de taninos totais foi calculado pela equação:

$$TT = \frac{FD \times (A1 - A2) \times m_1}{m_2 \times A3}$$

Onde: TT: Taninos Totais; FD: Fator de Diluição; A1: Absorvância amostra polifenóis totais; A2: Absorvância para polifenóis não adsorvidos; A3: Absorvância solução padrão; m<sub>1</sub>: massa do padrão; m<sub>2</sub>: massa da droga/extrato bruto considerando a perda por dessecação.

d) Avaliação da eficiência de extração

A medida da eficiência de extração foi determinada através da relação entre os teores das classes de metabólitos de interesse (flavonoides e taninos), e os teores de sólidos totais (resíduo seco) obtidos para os extratos, de acordo com a equação abaixo (CUNHA *et al.*, 2009).

$$EE = \frac{T}{RS}$$

Onde: EE: Eficiência da Extração; T: teor de marcadores (taninos ou flavonoides); RS: Resíduo seco.

e) Determinação dos teores de ácido gálico, ácido elágico, flavonoides e aquisição de *fingerprint* por CLAE

As análises foram realizadas segundo metodologia de Bezerra e colaboradores (2018). As condições cromatográficas foram conduzidas em cromatógrafo (Mod. Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific®), equipado com bomba binária (Mod. HPG3x00RS, Thermo Fisher Scientific®), um degaseificador e auto-amostrador munido com loop de 20 µL (Mod. ACC-3000, Thermo Fisher Scientific®) e acoplado a detector de arranjo de fotodiodos (Mod. DAD - 3000; Thermo Fisher Scientific®). Para a análise e processamento dos dados, foi utilizado o software Chromeleon 6.8 (Dionex, Thermo Fisher Scientific®, USA). Os comprimentos de onda determinados foram de 254 nm, 270 nm e 350 nm. As análises foram efetuadas utilizando coluna C<sub>18</sub> (250 mm × 4,6 mm i.d., tamanho de partícula 5 µm) da Dionex® equipada com pré-coluna (C18, 4 mm × 3,9 µm, Phenomenex®). As análises foram conduzidas em forno de coluna sob temperaturas de 21 ± 2 °C. A fase móvel foi constituída de água ultrapura (A) e metanol (B), ambas acidificadas com 0,05% ácido trifluoracético (TFA), sob fluxo ajustado para 0,8 mL/min. Foi realizado um método em gradiente seguindo as proporções: 0–10 min, 10–25% B; 10–15 min, 25–40% B; 15–25 min, 40–70% B; 25–30 min, 75% B; 30–31 min, 75–10% B.

Para estas análises, 500 µL de cada solução extrativa foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL e o volume aferido com água ultrapura (Purelab Classic UV, Elga®). Em seguida as amostras foram filtradas através de membrana PVDF diretamente para os vials. Os resultados em teores foram expressos em %m/m das substâncias pesquisadas de acordo com a equação:

$$\frac{C_p \times AA}{A_p \times m} \times FD \times 100$$

Em que: Cp = concentração do padrão em g/mL (pureza dos padrões, 98%); Ap = área do padrão; AA = área da amostra; m = massa da amostra, considerando a perda por dessecação; FD = fator de diluição.

f) *Fingerprint* por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência CCD-AE

Placas de sílica gel 60-F<sub>254</sub> com partículas de 5-6 µm (Merck®) para CCD-AE foram usadas para estas análises. As amostras foram aplicadas com auxílio de equipamento semi-automático (Mod. Linomat V, Camag®) controlado pelo software Wincats® (Camag®). Foram aplicados 30 µL das amostras em bandas com largura de 10 mm e espaço entre as bandas de 5 mm. Os cromatogramas foram desenvolvidos em cuba de vidro (20 cm x 10 cm, Camag®) após saturação por 30 minutos com a fase móvel 90:5:5 (acetato de etila: ácido fórmico: água; v/v/v). Ao final, as placas foram derivatizadas com reagente natural A (NEU + PEG) e avaliadas sob UV em 366 nm. A observação das placas sob luz UV e aquisição das imagens foi realizada utilizando MultiDoc-It Imaging System® (Model 125, UVP®) com câmera Canon (Mod. Rebel T3 EOS 1100 D, Cannon®) acoplada e através de software UVP® (BEZERRA *et al.*, 2018).

#### 4.2.2.3 Otimização de Método Extrativo através de Planejamento Fatorial

Após a avaliação do sistema de solventes mais vantajoso, o processo de extração foi também foi otimizado. Foi realizado um planejamento fatorial 3<sup>2</sup>, utilizando como variáveis de entrada diferentes proporções de droga (5, 10 e 15%, p/v) e métodos extrativos (banho maria sob refluxo (Banho maria, Mod. LUCA-150/24/D, Lucadema Científica®), ultrassom (Sonda ultrassônica, Mod. Eco-sonics QR500 (500 Watts), Ultronique) e turbólise.

#### 4.2.2.4 Análise dos Dados

Após a realização de todos os ensaios, os dados obtidos pelo planejamento fatorial e simplex centroide foram analisados com auxílio dos softwares Statistica 8 (Statsoft®) e Minitab 17 (Minitab®).

### 4.2.3 Produção, otimização e caracterização de Extratos Secos

#### 4.2.3.1 Secagem por aspersão (*Spray Drying*)

Para a obtenção dos extratos secos, foi preparado um grande volume do extrato nas condições otimizadas: método de turboextração, utilizando a mistura de água: metanol: etanol: acetona (46:13:18:23, v/v/v/v) como líquido extrator e 5% de droga vegetal, na proporção droga:solvente. Os processos de secagem foram realizados em *spray dryer* (Mod. MSD 1.0, LabMaq®), utilizando o extrato nativo, e o mesmo incorporado com diferentes adjuvantes para melhorar as propriedades físicas do produto seco.

##### a) Incorporação dos adjuvantes

Para a incorporação dos adjuvantes, foi realizada a análise do teor de sólidos da solução extrativa para a determinação da massa de adjuvante a ser incorporada nas soluções. Após a determinação do teor de resíduo seco, em balança de infravermelho (item 4.2.2.1), os adjuvantes dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina, maltodextrina, lactose e goma xantana foram incorporados individualmente na proporção de 10% em relação ao total de sólidos presentes no extrato. A incorporação foi realizada através de agitação mecânica com auxílio de agitador magnético, com início uma hora antes da secagem. O processo de agitação foi mantido durante todo o processo para garantir a homogeneidade da solução durante a secagem.

##### b) Obtenção de extrato seco

A secagem do extrato foi realizada em *spray dryer* (Mod. MSD1.0, Labmaq®), cujas condições operacionais foram: temperatura de entrada 140 °C e de saída aproximadamente 110 °C; vazão da alimentação de 0,6 L/min; fluxo de ar no aspersor a 40 L/min e velocidade de corrente de ar quente igual a 1,65 m<sup>3</sup>/min.

#### 4.2.3.2 Caracterização de extratos secos

Após secagem, os extratos foram caracterizados quanto aos parâmetros de rendimento, teor de umidade residual, teores de polifenóis (taninos e flavonoides) por espectrofotometria UV-Vis e CLAE e propriedades tecnológicas: ângulo de repouso e densidades brutas e compactadas.

##### a) Avaliação de Rendimento

O rendimento em massa dos extratos foi calculado de acordo com a comparação entre o peso final do extrato seco e a massa esperada para o volume submetido à secagem, de acordo com o seu teor de sólidos, considerando a massa de adjuvante, quando aplicável.

##### b) Teor de umidade residual

Amostras com 1 g dos extratos secos foram pesados em balança de infravermelho e submetidas a dessecação a 105 °C até que variações de no mínimo 0,03% no peso do material não fossem detectadas em um intervalo de 60 segundos.

##### c) Doseamento de polifenóis por espectrofotometria UV-Vis e CLAE

Foram preparadas soluções de concentração de 1 mg/mL dos extratos secos por aspersão (ESA), gerando as soluções estoque. Estas soluções foram submetidas aos procedimentos descritos nas seções anteriores para determinação do teor de flavonoides totais e taninos totais por espectrofotometria e de ácido gálico, ácido elágico e miricitrina por CLAE, respectivamente.

##### d) Determinação de tamanho de partícula

O tamanho das partículas foi determinado de acordo com o diâmetro de Ferret. A determinação do tamanho médio a partir da medição de 1500 partículas para amostra em microscópio óptico (Lumen<sup>®</sup>), e a distribuição granulométrica dos pós foi realizada através da análise das frequências e histogramas.

e) Determinação do ângulo de repouso

O ângulo de repouso foi determinado através do escoamento de 8 g dos extratos secos por funil (diâmetro interior de 1 cm; superior de 10 cm; e altura de 17 cm), que ao final, foram recolhidos em uma placa de Petri com diâmetro de 15 cm. Após o escoamento, com auxílio de régua, foram determinadas a altura e o raio da base do pó escoado. O ângulo de repouso foi calculado de acordo com a equação:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{h}{r}$$

Em que:  $h$  = corresponde à altura do cone formado pelo pó;  $r$  = corresponde à base do cone formado pelo pó.

f) Determinação de densidade bruta e compactada

As densidades bruta e compactada foram determinadas com o auxílio de aparelho Tap Density (Mod. 50-1200, Vankel®). 3 g dos extratos foram pesados e transferidos cuidadosamente, para evitar a compactação, para provetas de 50 mL de volume. As provetas foram acopladas ao equipamento e submetidos a três diferentes valores de quedas (10, 500 e 1250) para promover a compactação. Os volumes foram aferidos antes de submeter os extratos às quedas, e ao final de cada programação. Ao final foram calculadas as relações entre o peso e os volumes obtidos antes e após a compactação.

g) Índice de Compressibilidade de Carr e Fator de Hausner

O índice de Carr e o Fator de Hausner foram calculados a partir das densidades compactadas obtidas para os extratos, segundo as fórmulas:

Fator de Hausner

$$FH = \frac{DC}{DI}$$

Índice de Carr

$$IC = \frac{DI - DC}{DC} \times 100$$

Onde: DI = Densidade Inicial e DC = Densidade Compactada.

#### 4.2.3.3 Otimização do processo de obtenção dos produtos secos

##### 4.2.3.3.1 Avaliação das condições de secagem por aspersão

As condições do processo de secagem foram avaliadas através de ensaio fatorial  $2^3$  com adição de dois pontos centrais, onde foram avaliados os fatores temperatura (T °C), vazão (L/h) e velocidade de fluxo de ar quente (m<sup>3</sup>/min).

**Tabela 2.** Parâmetros, fatores e variáveis modificadas em ensaio fatorial  $2^3$ .

| Extrato | Variáveis Codificadas |           |                             | Variáveis Naturais |           |                             |
|---------|-----------------------|-----------|-----------------------------|--------------------|-----------|-----------------------------|
|         | T (°C)                | Vazão (L) | Fluxo (m <sup>3</sup> /min) | T (°C)             | Vazão (L) | Fluxo (m <sup>3</sup> /min) |
| 1       | 0                     | 0         | 0                           | 150                | 0,5       | 1,55                        |
| 2       | 0                     | 0         | 0                           | 150                | 0,5       | 1,55                        |
| 3       | -                     | -         | -                           | 140                | 0,4       | 1,45                        |
| 4       | +                     | +         | +                           | 160                | 0,6       | 1,65                        |
| 5       | +                     | +         | -                           | 160                | 0,6       | 1,45                        |
| 6       | -                     | +         | +                           | 140                | 0,6       | 1,65                        |
| 7       | +                     | -         | -                           | 160                | 0,4       | 1,45                        |
| 8       | -                     | -         | +                           | 140                | 0,4       | 1,65                        |
| 9       | -                     | +         | -                           | 140                | 0,6       | 1,45                        |
| 10      | +                     | -         | +                           | 160                | 0,4       | 1,65                        |

##### a) Avaliação das condições de secagem da concentração de adjuvante

A concentração de adjuvantes foi determinada através da secagem do extrato de pitanga utilizando 3 diferentes concentrações de adjuvante. As secagens das formulações foram realizadas em *spray dryer*, cujas condições operacionais foram: temperatura de entrada 140 °C

e de saída aproximadamente 110 °C; vazão da alimentação de 0,6 L/min; fluxo de ar no aspersor a 40 L/min e velocidade de corrente de ar quente igual a 1,65 m<sup>3</sup>/min.

b) Avaliação de misturas de adjuvantes

Para a avaliação das misturas de adjuvantes, foi utilizado o planejamento simplex centroide de três componentes, utilizando os adjuvantes que obtiveram os melhores desempenhos no ensaio de viabilidade de adjuvantes de secagem: dióxido de silício coloidal (DSC); celulose microcristalina e goma xantana.

Foram realizadas 7 secagens de extratos com adjuvantes incorporados na proporção de 15% do teor de resíduo sólido da solução extrativa. Para a obtenção dos diferentes produtos, estes 15% dos adjuvantes selecionados foram incorporados ao extrato individualmente (100%), e em misturas binárias (50:50%) e ternárias (33,33:33,33:33,33%) (Tabela 3).

As secagens das formulações foram realizadas em *spray dryer*, cujas condições operacionais foram: temperatura de entrada 140 °C e de saída aproximadamente 120 °C; vazão da alimentação de 0,4 L/min; fluxo de ar no aspersor a 40 L/min e velocidade de corrente de ar quente igual a 1,45 m<sup>3</sup>/min.

**Tabela 3** - Tabela de planejamento de misturas de adjuvantes para planejamento simplex centroide de misturas.

| Extrato | DSC (Aerosil) | Celulose Microcristalina | Goma Xantana |
|---------|---------------|--------------------------|--------------|
| 1       | 1             | 0                        | 0            |
| 2       | 0             | 1                        | 0            |
| 3       | 0             | 0                        | 1            |
| 4       | 0,5           | 0,5                      | 0            |
| 5       | 0,5           | 0                        | 0,5          |
| 6       | 0             | 0,5                      | 0,5          |
| 7       | 0,333         | 0,333                    | 0,333        |

Onde: DSC: Dióxido de silício coloidal; 1: Adjuvante a 100%; 0,5: Adjuvante a 50%; 0,333: Equivale a um terço da proporção de adjuvante.

Fonte: Autoria própria.

#### 4.2.3.4 Fracionamento e Análise fitoquímica do extrato seco

##### 4.2.3.4.1 Obtenção das frações acetato de etila e aquosa

Após a produção dos extratos e de sua caracterização físico-química, foi realizado o fracionamento, para aumentar a concentração das substâncias fenólicas. Cerca de 10,0 g do extrato seco (sem adjuvante) foram reconstituídos em 100 mL de água destilada. Em seguida a solução aquosa foi particionada com 100 mL acetato de etila. O processo foi repetido até a saturação, totalizando 10 partições. As frações orgânicas foram reunidas e concentradas para total eliminação do solvente, congeladas e liofilizadas (Mod. L101, Liotop®). Ao final, o procedimento resultou nas seguintes frações: acetato (FAC), aquosa (FAq) e numa emulsão na região de interface que foi concentrada, congelada e liofilizada separadamente (FI).

##### 4.2.3.4.1 Análise fitoquímica do extrato e das frações

O extrato seco por aspersão e suas frações enriquecidas foram caracterizados, por CCD para as substâncias comumente detectadas na espécie, através da aplicação manual das amostras e empregando os sistemas eluentes e reveladores propostos por Wagner e Bladt (1996) e descritos no Quadro 1.

**Quadro 1** - Sistemas cromatográficos, reveladores e padrões utilizados para análise do perfil fitoquímico do extrato bruto e frações enriquecidas de *E. uniflora*.

| Metabólitos            | Sistema de eluição                                                                | Reveladores            | Padrões                         |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------|
| Açúcares redutores     | AcOEt:HCOOH:AcOH:H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>                                    | Timol                  | D-frutose                       |
| Flavonoides            | AcOEt:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O <sup>2</sup>                          | NEU                    | Quercetina/Rutina               |
| Triterpenos/Esteroides | Tolueno: AcOEt <sup>3</sup>                                                       | Liebermann<br>Buchard  | β-Sitosterol                    |
| Saponinas              | AcOEt:HCOOH:AcOH:H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>                                    | Liebermann<br>Buchard  | Saponina                        |
| Taninos Condensados    | AcOEt:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O <sup>3</sup>                          | VC                     | Catequina                       |
| Taninos hidrolisáveis  | AcOEt:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O <sup>2</sup>                          | Cloreto<br>férico/ NEU | Ácido gálico e ácido<br>elágico |
| Derivados Antracênicos | AcOEt:CH <sub>3</sub> CHOHCH <sub>3</sub> :AcOH<br>:H <sub>2</sub> O <sup>4</sup> | HNO <sub>3</sub> /KOH  | Antraquinona/<br>Senosídeo      |
| Derivados Cinâmicos    | AcOEt:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O <sup>2</sup>                          | NEU                    | Ácido Cafeico                   |

<sup>1</sup>100: 11: 11: 27 v/v; <sup>2</sup>90:5:5 v/v; <sup>3</sup> 90:10 v/v; <sup>4</sup>40:42:30:1 AcOEt – Acetato de etila; HCOOH – Ácido fórmico; AcOH – Ácido Acético; H<sub>2</sub>O – Água; CH<sub>3</sub>CHOHCH<sub>3</sub> - Isopropanol NEU – ácido etilborilaminoéster; VC – Vanilina Clorídrica; HNO<sub>3</sub> – ácido nítrico; KOH: hidróxido de potássio.

Fonte: Adaptado de Wagner e Bladt (1996).

Após a caracterização fitoquímica, foi obtido o *fingerprint* do extrato seco por aspersão e de suas frações através de CCD-AE, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente na sessão 4.2.2.2f.

#### **4.2.4 Estudos de pré-formulação e caracterização de Sistemas Dispersos para a Veiculação de Extratos das Folhas de *Eugenia uniflora* L.**

Para o desenvolvimento de formas farmacêuticas líquidas e semissólidas, foram realizados ensaios de pré-formulação de sistemas dispersos para a veiculação dos extratos de *E. uniflora*, onde foram avaliadas as condições de composição e preparação, além da caracterização dos produtos obtidos.

##### **4.2.4.1 Construção de diagrama de fases pseudo-ternários**

Para determinar a composição dos sistemas emulsionados e o comportamento das fases, foram obtidos diagramas pseudo-ternários, construídos a partir de dois métodos de obtenção (ultraturrax – IKA® e sonda ultrassônica – Ultronique®). As emulsões foram obtidas através das fases: oleosa, composta por triglicerídeos de cadeia média de ácido caprílico (Miglyol 812®) e Span® 80; e aquosa, composta por água destilada e Tween® 20.

Os sistemas de dispersão foram preparados utilizando diferentes proporções óleo/tensoativo, seguindo a razão 1:9 a 9:1, partindo de cada sistema de dispersão foram obtidas 9 formulações, utilizando de titulações crescentes com água destilada. Para ambas as metodologias de dispersão, o ciclo de obtenção foi o mesmo, sendo realizados 60 segundos de desrupção, seguidos de 3 minutos de agitação em banho de ultrassom. Este procedimento foi realizado duas vezes, com repouso de 5 minutos entre os ciclos, para realização de análise e caracterização visual.

##### **4.2.4.2 Obtenção dos sistemas emulsionados**

Decorrida a realização dos diagramas de fases pseudo-ternário, as regiões com comportamento de fases bem definidas foram selecionadas para a preparação da formulação. Estas foram preparadas através do método de inversão de fases, que consiste na dispersão dos tensoativos na fase aquosa (Tween 20®) e oleosa (Span 80®), separadamente, seguido do aquecimento de ambas as fases a 70 °C, em banho maria (Lucadema®). Após aquecimento, as

fases foram misturadas e homogeneizadas sob ação mecânica em sonda ultrassônica/ultraturrax por 10 minutos. Após a obtenção dos sistemas, suas características macroscópicas, morfológicas e de pH foram analisadas.

#### *4.2.4.2.1 Avaliação do método de obtenção das emulsões através de planejamento fatorial*

As condições para a obtenção das formulações foram otimizadas através de ensaio fatorial  $3^2$ , utilizando diferentes tempos (8, 10 e 12 min) e rotação/potência pelos diferentes meios de homogeneização: ultraturrax (11.500, 14.500 e 20.500 rpm) e sonda ultrassônica (80, 90 e 100%) como variáveis. As formulações foram caracterizadas após análise macroscópica, pH e turbidimetria. Os dados de pH e turbidimetria foram analisados com o auxílio do software Statistica 8 (Statsoft®).

#### *4.2.4.3 Caracterização dos sistemas emulsionados*

##### *4.2.4.3.1 Análise macroscópica e índice de cremagem*

A caracterização macroscópica foi realizada através da avaliação visual de características organolépticas (aspectos como coloração, viscosidade e estabilidade) durante as primeiras 24 h para verificar a presença de coalescência ou separação de fases. Estas características também foram monitoradas após a escolha das formulações de trabalho (XAVIER-JUNIOR *et al.*, 2012).

Os valores de índice de cremagem foram obtidos a partir da relação entre a altura total da camada de creme e a altura total da camada de emulsão medidos diretamente nos tubos de armazenamento com a ajuda de uma régua (FERREIRA *et al.*, 2010; XAVIER-JÚNIOR *et al.*, 2012).

##### *4.2.4.3.2 Determinação de tamanho e distribuição de gotículas*

O tamanho e a distribuição das gotículas das formulações escolhidas foi determinado em Zetasizer, através de light scattering (Malvern®) após a avaliação do processo de obtenção das emulsões.

#### 4.2.4.3.3 *Análise de pH*

A determinação do pH foi realizada através de pHmetro (Hanna Instruments®) pré calibrado em condições de temperatura ambiente.

#### 4.2.4.3.4 *Potencial zeta*

O potencial zeta foi calculado por rastreamento eletroforético das gotículas submetidas a um campo de tensão (MATTOS *et al.*, 2015) em Zetasizer (Malvern®) utilizando água como agente dispersante.

#### 4.2.4.3.5 *Análise turbidimétrica e densidade*

A turbidimetria foi avaliada após diluição das emulsões. Foram selecionadas duas emulsões segundo sua estabilidade e características físicas para o prosseguimento dos ensaios (emulsões 1 e 7). Para a formulação 1 foi realizada a diluição de 0,5 mL para 25 mL de água destilada; para a formulação 7 foi realizada inicialmente a diluição de 0,5 mL para 25 mL de água destilada, seguida de 2 diluições 12,5 mL para 25 mL. Em seguida foi realizada a mensuração da transmitância em espectrofotômetro a 600 nm (FERREIRA *et al.*, 2010). A turbidimetria foi determinada de acordo com a equação:  $\text{Turbidez} = 100 - \% \text{Transmitância}$ . A densidade das emulsões foi medida através da utilização de picnômetros previamente calibrados.

#### 4.2.4.4 *Análises de estabilidade*

##### 4.2.4.4.1 *Ciclo gelo-degelo*

Foram realizadas análises das características macroscópicas após submeter as emulsões a ciclos de congelamento (16 h) e descongelamento (8 h). Os ciclos foram repetidos cinco vezes (XAVIER-JUNIOR *et al.*, 2012).

#### 4.2.4.4.2 Estabilidade sob centrifugação

Foram realizadas análises das características macroscópicas após submeter 5 g das emulsões à centrifugação (Centífuga de bancada digital, Edutec<sup>®</sup>) sob as rotações de 1500, 2500 e 3500 rpm durante 15 min à temperatura ambiente. A temperatura utilizada não ultrapassou 30 °C para evitar alterações que pudessem ser acarretadas pela temperatura do procedimento (XAVIER-JUNIOR *et al.*, 2012).

#### 4.2.4.4.3 Estabilidade de acompanhamento preliminar

Foram realizadas análises das características físico-químicas das emulsões em condições normais de acondicionamento (frascos opacos, hermeticamente fechados e armazenados sob temperatura ambiente em local fresco e arejado) até 90 dias após a preparação.

#### 4.2.4.5 Obtenção de formulações convencionais, pickering e co-estabilizadas

Em resposta aos problemas de incompatibilidade obtidos nos primeiros sistemas desenvolvidos, foram testadas novas formulações visando obter novos sistemas e aumentar a estabilidade dos sistemas produzidos.

##### 4.2.4.5.1 Emulsões Pickering

Baseado na emulsão líquida obtida nos ensaios anteriores (FTS-1 - contendo 10% de fase oleosa), foram preparadas emulsões contendo 10% de miglyol utilizando soluções de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC – Metolose 90SH-100) e goma xantana. Foram testadas as concentrações de 2, 3 e 4% para soluções de ambos os polímeros como fase aquosa, e as formulações foram homogeneizadas em sonda ultrassônica, sob potência de 90%, durante 12 minutos.

##### 4.2.4.5.2 Emulsões Co-estabilizadas (Tensoativos + polímero estabilizante)

As emulsões co-estabilizadas foram preparadas utilizando a formulação da FTS-1 (com 10% de fase oleosa, 2% de tensoativos e 88% de fase aquosa) como base, substituindo a água pela solução dos polímeros HPMC (solução aquosa a 4%) e goma xantana (solução aquosa a

2%). As formulações foram homogeneizadas através de sonda ultrassônica, sob potência de 90%, durante 12 minutos.

**Tabela 4** - Composição dos sistemas emulsionados convencionais, pickering e co-estabilizados produzidos.

| Componentes                                    | Emulsão convencional | Emulsão Pickering | Emulsão Co-estabilizada |
|------------------------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------------|
| Miglyol 812                                    | 10%                  | 10%               | 10%                     |
| Tensoativos (Tween 20; Span 80)                | 2%                   | -                 | 2%                      |
| Água                                           | 87,1%                | -                 |                         |
| Extrato/Frações                                | 0,1%                 | 0,1%              | 0,1%                    |
| Solução de Polímero estabilizante (HPMC ou GX) | -                    | 89,1%             | 87,1%                   |
| Conservante (Nipaguard SCE)                    | 0,8%                 | 0,8%              | 0,8%                    |

HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; GX: Goma Xantana.

Fonte: Autoria própria.

#### 4.2.4.5.3 Emulsão convencional à base de cera auto-emulsionante (Cera Lanette N)

Para a obtenção da formulação contendo a cera auto-emulsionante foram avaliadas formulações já estabelecidas, por ser um tipo de formulação convencional amplamente difundida principalmente no campo da farmácia magistral. A formulação deste sistema foi adaptada de Gelaleti e colaboradores (2019).

**Tabela 5** - Composição da emulsão convencional à base de cera emulsionante (Lanette N).

| Fases         | Componentes     | Emulsões Co-estabilizadas |
|---------------|-----------------|---------------------------|
| <b>Fase A</b> | EDTA            | 0,1%                      |
|               | Propilenoglicol | 3%                        |
|               | Água destilada  | q.s.p                     |
| <b>Fase B</b> | Miglyol 812     | 5%                        |
|               | Lanette N       | 12%                       |
|               | BHT             | 0,2%                      |
|               | Nipaguard SCE   | 0,8%                      |
|               | Extrato/Frações | 0,1%                      |

BHT: hidroxitolueno butilado.

Fonte: Autoria própria.

As fases A e B foram aquecidas separadamente até a temperatura de 65 °C, e em seguida foi realizada a mistura da fase A na fase B, mantendo sob agitação mecânica até o resfriamento do produto.

As emulsões foram avaliadas macroscopicamente e caracterizadas segundo os procedimentos apresentados na seção 4.2.4.3.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

A segurança e a qualidade de um produto estão diretamente relacionadas aos insumos usados para a sua fabricação. Quando se trata de derivados de plantas medicinais, seja para a espécie *in natura* ou para o produto fitoterápico, esta regra também é válida. Assim, para garantir que o produto ou insumo possua a confiabilidade necessária para o uso, é preciso que sejam definidos critérios de qualidade, principalmente para os insumos de origem vegetal devido à sua complexidade de composição de matriz, variações ligadas à identificação, condições de cultivo, coleta, transporte, fornecimento e armazenamento, além de outros parâmetros que não costumam ser usados para materiais ativos constituídos de uma única substância (BARNI *et al.*, 2009; FURTADO *et al.*, 2016; SIMÕES *et al.*, 2017).

#### 5.1.1 Caracterização físico-química

Para certificar que a matéria prima possui qualidade necessária para a preparação de produtos farmacêuticos, são realizadas diversas análises físico-químicas para determinar as principais características do material. São requisitos obrigatórios para a obtenção de registro de quaisquer produtos fitoterápico, como especificado na Resolução Específica n. 26 de 2014. Como principais testes, além da identificação botânica e caracterização fitoquímica, estão as determinações de material estranho, teor de umidade, teor de cinzas totais e cinzas insolúveis, bem como a distribuição granulométrica (BRASIL, 2014; 2019).

A determinação de matéria estranha tem a função de evidenciar a presença de agentes adulterantes e contaminantes, tais como insetos, impurezas internas (como outra parte da mesma espécie) e externas (outras espécies vegetais adulterantes, areia, embalagens plásticas, entre outros). Este ensaio é comumente realizado em amostras/lotos adquiridos de fornecedores, mas também devem ser realizadas em amostras coletadas, principalmente se o local de coleta estiver exposto aos principais agentes contaminantes. Os resultados obtidos apresentaram um valor percentual de matéria estranha inferior ao limite de 2% preconizado na monografia da espécie da Farmacopeia Brasileira 6ª edição, obtendo valor médio de 0,66%, com variações de  $\pm 0,0026$  (3,95%), de acordo com o desvio padrão e desvio padrão relativo entre as análises, indicando que o material está praticamente ausente de resíduos contaminantes, que poderiam

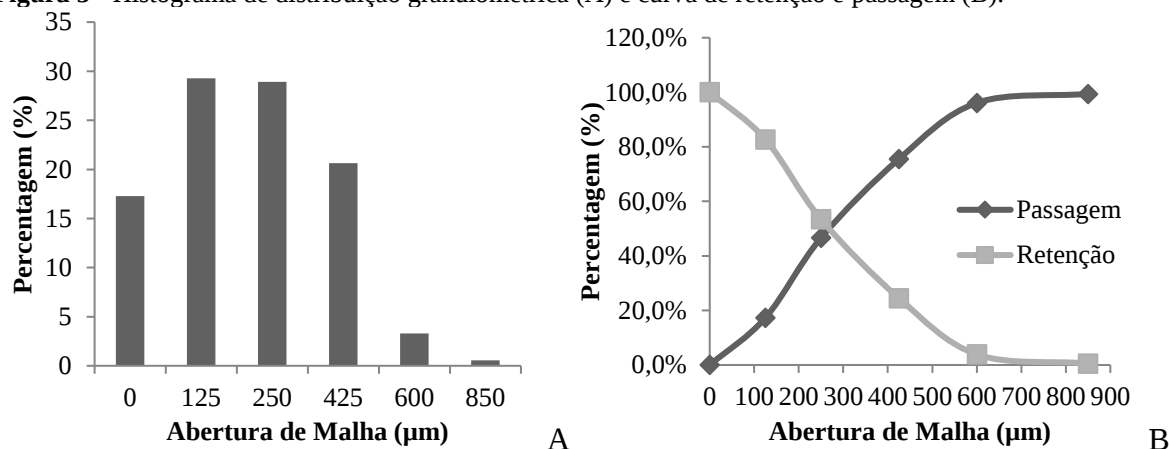
comprometer a qualidade do material e eficácia de qualquer produto fitoterápico obtido dele (FALKOWSKI *et al.*, 2009; BRASIL, 2019).

Outro parâmetro importante na análise da qualidade da prima vegetal é o percentual de umidade. Os resultados obtidos para a droga vegetal de *E. uniflora* evidenciaram teor de umidade médio de  $10,03\% \pm 0,2079$  (2,07%). A especificação preconizada para a espécie na FB6 é de no máximo 10%. Dessa forma, o material encontra-se dentro dos limites aceitáveis, o que assegura a boa conservação do material, prolongando a sua estabilidade (BRASIL, 2019).

O ensaio de cinzas possibilita a determinação de substâncias que não se solubilizam mesmo na presença de ácido, como os silicatos. O teor de cinzas totais obtido nesse estudo foi de  $5,69\% \pm 0,1094$  (1,92%), valor inferior ao máximo estabelecido para a espécie (11%), dispensando a necessidade de ensaio complementar.

A granulometria do material também é um dos parâmetros a serem analisados, entretanto, não está diretamente relacionado à qualidade do material, mas sim à qualidade de derivados da matéria prima vegetal. A distribuição granulométrica fornece dados à cerca da homogeneidade do tamanho de partículas, fator determinante nos processos extrativos, pois o tamanho das partículas está diretamente relacionado com a eficiência da extração. Neste ensaio, as partículas se encontraram distribuídas entre os tamises de abertura de malha de 125 e 850  $\mu\text{m}$  (Figura 5A). Quanto ao tamanho médio das partículas, determinado pelo ponto interseção das curvas de retenção e passagem (Figura 5B), apresentou valor médio de  $261 \mu\text{m} \pm 7,63$  (2,92%). De acordo com os resultados obtidos, as folhas pulverizadas podem ser classificadas como pó semi-fino (BRASIL, 2019).

**Figura 5** - Histograma de distribuição granulométrica (A) e curva de retenção e passagem (B).



Fonte: Autoria própria.

Considerando os aspectos analisados a matéria prima vegetal constituída de folhas de *E. uniflora*, os resultados estão de acordo com requisitos de qualidade preconizados na monografia da espécie pela Farmacopeia Brasileira 6ª edição.

## 5.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO

A primeira etapa para a obtenção de formas farmacêuticas à base de derivados das folhas de *E. uniflora*, parte da avaliação de parâmetros dos processos de extração. Para tanto, o planejamento do tipo simplex centroide foi escolhido para avaliar o efeito dos sistemas de solventes sobre o rendimento extrativo de marcadores e sólidos totais.

### 5.2.1 Planejamento Simplex Centroide

Os dados experimentais obtidos para as variáveis de resposta (Tabela 5) foram usados para elaboração de modelos matemáticos e a análise estatística das equações por análise de variância (ANOVA) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) com auxílio de programas computacionais (Statistica® e Minitab®), conforme apresentado na tabela 6.

Os modelos testados foram: linear; quadrático; cúbico (*special cubic*); e, quártico. Embora todas as equações tenham apresentado correlações estatisticamente significativas, os modelos lineares foram os que apresentaram menores coeficientes de determinação e foram descartados, isto se deve a natureza multifatorial dos fenômenos envolvidos na extração. Os modelos quadráticos proporcionaram melhor ajuste, mas também não foram suficientes para explicar a variabilidade das respostas experimentais.

Assim, os ajustes aceitáveis para os dados experimentais só foram possíveis pelos modelos *special cubic* e quártico, quando os coeficientes de correlação ( $r$ ) e determinação ( $R^2$ ) apresentaram valores próximos a 0,9. Estes coeficientes estimam a associação entre as variáveis dependentes e independentes evidenciadas pelo modelo. Neste sentido, os modelos avaliados para as variáveis de resposta descrevem satisfatoriamente a variabilidade experimental introduzida pelas variáveis independentes, possuindo valores de  $R^2$  superiores a 0,9. O único modelo que apresentou  $R^2$  inferior a 0,9 foi para a variável eficiência de extração de flavonoides com valor de 0,8661 para o modelo *special cubic*. Este valor ainda indica uma alta taxa de fenômenos explicados pelo modelo, embora este possa ser ajustado para obter melhores resultados (CALLEGARI-JACQUES, 2003; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; MONTGOMERY, 2013).

**Tabela 6** - Resultados obtidos para o planejamento simplex centrado.

| Extrato | Solventes (%; V/V) |      |      |         | Variáveis de Resposta |             |             |       |       |                 |               |              |               |
|---------|--------------------|------|------|---------|-----------------------|-------------|-------------|-------|-------|-----------------|---------------|--------------|---------------|
|         | H <sub>2</sub> O   | MeOH | EtOH | Acetona | Resíduo Seco (%)      | TFT (%)     | TT (%)      | EEF   | EET   | Miricitrina (%) | F2 (%)        | AG           | AE            |
| 1       | 1                  | 0    | 0    | 0       | 2,60 (2,61)           | 0,76 (2,07) | 5,20 (1,93) | 0,294 | 2,000 | 0,176 (2,28)    | *             | 0,133 (1,93) | 0,086 (0,03)  |
| 2       | 0                  | 1    | 0    | 0       | 2,75 (3,78)           | 1,02 (1,72) | 5,55 (1,18) | 0,374 | 2,023 | 0,230 (2,28)    | *             | 0,027 (4,26) | 0,011 (6,69)  |
| 3       | 0                  | 0    | 1    | 0       | 1,92 (2,34)           | 0,68 (1,41) | 2,66 (1,18) | 0,357 | 1,385 | 0,135 (1,47)    | *             | 0,011 (4,49) | 0,027 (5,09)  |
| 4       | 0                  | 0    | 0    | 1       | 1,53 (0,37)           | 0,62 (0,34) | 1,81 (2,63) | 0,411 | 1,189 | 0,136 (2,65)    | *             | 0,010 (4,41) | 0,006 (5,07)  |
| 5       | 0,5                | 0,5  | 0    | 0       | 3,02 (1,88)           | 0,95 (0,88) | 7,25 (0,38) | 0,315 | 2,399 | 0,307 (0,13)    | *             | 0,047 (0,35) | 0,019 (1,35)  |
| 6       | 0,5                | 0    | 0,5  | 0       | 3,21 (0,82)           | 1,19 (0,23) | 6,91 (2,22) | 0,372 | 2,155 | 0,312 (0,43)    | 0,042 (1,39)  | 0,039 (1,78) | 0,017 (0,84)  |
| 7       | 0,5                | 0    | 0    | 0,5     | 3,65 (0,96)           | 1,34 (1,27) | 6,58 (1,18) | 0,370 | 1,804 | 0,372 (0,12)    | 0,051 (2,79)  | 0,048 (1,93) | 0,019 (3,03)  |
| 8       | 0                  | 0,5  | 0,5  | 0       | 2,17 (2,17)           | 0,78 (1,27) | 5,12 (0,54) | 0,361 | 2,357 | 0,175 (1,02)    | 0,020 (5,71)  | 0,020 (2,11) | 0,034 (1,76)  |
| 9       | 0                  | 0,5  | 0    | 0,5     | 2,77 (3,50)           | 0,94 (1,67) | 3,18 (0,60) | 0,341 | 1,148 | 0,234 (0,57)    | 0,026 (1,54)  | 0,028 (3,25) | 0,010 (1,87)  |
| 10      | 0                  | 0    | 0,5  | 0,5     | 2,35 (7,90)           | 0,80 (1,19) | 4,93 (0,78) | 0,343 | 2,105 | 0,165 (0,11)    | 0,017 (10,15) | 0,017 (2,26) | 0,037 (3,33)  |
| 11      | 0,33               | 0,33 | 0,33 | 0       | 2,95 (1,35)           | 1,25 (0,26) | 6,46 (0,59) | 0,427 | 2,192 | 0,349 (0,29)    | 0,042 (15,20) | 0,032 (3,63) | 0,016 (0,61)  |
| 12      | 0,33               | 0    | 0,33 | 0,33    | 3,45 (0,76)           | 1,28 (1,20) | 6,21 (1,68) | 0,367 | 2,091 | 0,403 (0,35)    | 0,051 (2,84)  | 0,034 (3,15) | 0,013 (2,41)  |
| 13      | 0,33               | 0,33 | 0    | 0,33    | 3,27 (1,56)           | 1,28 (1,58) | 6,84 (0,42) | 0,374 | 1,800 | 0,403 (4,49)    | 0,052 (1,47)  | 0,035 (3,15) | 0,020 (14,27) |
| 14      | 0                  | 0,33 | 0,33 | 0,33    | 2,12 (5,03)           | 0,93 (0,88) | 4,24 (0,54) | 0,438 | 2,187 | 0,242 (0,35)    | 0,036 (1,36)  | 0,022 (1,92) | 0,019 (0,61)  |
| 15      | 0,25               | 0,25 | 0,25 | 0,25    | 3,55 (3,59)           | 1,31 (0,25) | 6,40 (1,02) | 0,369 | 1,805 | 0,399 (0,55)    | 0,047 (0,69)  | 0,038 (1,78) | 0,016 (7,94)  |

Onde: H<sub>2</sub>O: água; MeOH: metanol; EtOH: etanol. Média (Desvio Padrão Relativo); TFT: Teor de Flavonoides Totais; TT: Teor Taninos Totais; EEF: Eficiência de Extração de Flavonoides; EET: Eficiência de Extração Taninos; F2: Flavonoide 2; AG: Ácido Gálico; AE: Ácido Elágico. \*Valores não detectados para esta substância. Fonte: Autoria própria.

Tabela 7 - Modelos matemáticos e dados de ANOVA para as variáveis analisadas no planejamento de mistura por simplex centrado.

| Respostas             | Equação Matemática                                                                                                                                                                                                                                          | Cúbico especial |       |                | Quártico |       |                |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------|----------------|----------|-------|----------------|
|                       |                                                                                                                                                                                                                                                             | F               | p     | R <sup>2</sup> | F        | p     | R <sup>2</sup> |
| <b>Resíduo Sólido</b> | $RS = 2,60 x_1 + 2,75 x_2 + 1,92 x_3 + 1,53 x_4 + 1,39 x_1x_2 + 3,79 x_1x_3 + 6,73 x_1x_4 - 0,65 x_2x_3 + 2,55 x_2x_4 + 2,49 x_3x_4 + 0,59 x_1x_2x_3 - 4,31 x_1x_2x_4 + 0,87 x_1x_3x_4 - 11,60 x_2x_3x_4 + 149,11 x_1x_2x_3x_4$                             | 3,29            | 0,023 | 0,9553         | 84,27    | 0,000 | 0,9883         |
| <b>Flavonoides</b>    | $TF = 0,7657 x_1 + 1,0269 x_2 + 0,6857 x_3 + 0,6275 x_4 + 0,2227 x_1x_2 + 1,8790 x_1x_3 + 2,6107 x_1x_4 - 0,2870 x_2x_3 + 0,4733 x_2x_4 + 0,5961 x_3x_4 + 6,2527 x_1x_2x_3 + 0,6907 x_1x_2x_4 + 0,8433 x_1x_3x_4 + 1,6973 x_2x_3x_4 + 10,7327 x_1x_2x_3x_4$ | 166,59          | 0,000 | 0,9974         | 23,692   | 0,000 | 0,9985         |
| <b>EEF</b>            | $EEF = 0,29 x_1 + 0,37 x_2 + 0,36 x_3 + 0,41 x_4 - 0,08 x_1x_2 + 0,19 x_1x_3 + 0,07 x_1x_4 - 0,02 x_2x_3 - 0,21 x_2x_4 - 0,16 x_3x_4 + 2,02 x_1x_2x_3 + 0,82 x_1x_2x_4 + 0,25 x_1x_3x_4 + 2,71 x_2x_3x_4 - 17,34 x_1x_2x_3x_4$                              | 17,91           | 0,000 | 0,8661         | 461,24   | 0,000 | 0,9919         |
| <b>Taninos</b>        | $TT = 5,21 x_1 + 5,56 x_2 + 2,66 x_3 + 1,82 x_4 + 7,49 x_1x_2 + 11,93 x_1x_3 + 12,28 x_1x_4 + 4,05 x_2x_3 - 2,01 x_2x_4 + 10,80 x_3x_4 - 16,66 x_1x_2x_3 + 18,37 x_1x_2x_4 - 24,49 x_1x_3x_4 - 3,42 x_2x_3x_4 + 57,29 x_1x_2x_3x_4$                         | 116,27          | 0,000 | 0,9981         | 18,15    | 0,000 | 0,9988         |
| <b>EET</b>            | $EET = 2,00 x_1 + 2,02 x_2 + 1,39 x_3 + 1,19 x_4 + 1,55 x_1x_2 + 1,85 x_1x_3 + 0,84 x_1x_4 + 2,61 x_2x_3 - 1,83 x_2x_4 + 3,27 x_3x_4 - 7,53 x_1x_2x_3 + 7,89 x_1x_2x_4 - 10,44 x_1x_3x_4 + 5,54 x_2x_3x_4 - 74,57 x_1x_2x_3x_4$                             | 43,88           | 0,000 | 0,9755         | 43,88    | 0,000 | 0,975          |
| <b>Ácido Gálico</b>   | $AG = 0,1332 x_1 + 0,0274 x_2 + 0,0110 x_3 + 0,0108 x_4 - 0,1328 x_1x_2 - 0,1287 x_1x_3 - 0,0932 x_1x_4 + 0,0037 x_2x_3 + 0,0368 x_2x_4 + 0,0278 x_3x_4 + 0,0934 x_1x_2x_3 - 0,0375 x_1x_2x_4 + 0,1516 x_1x_3x_4 - 0,0348 x_2x_3x_4 + 1,9652 x_1x_2x_3x_4$  | 10,81           | 0,000 | 0,9957         | 53,43    | 0,000 | 0,9985         |
| <b>Ácido Elágico</b>  | $AE = 0,0862 x_1 + 0,0111 x_2 + 0,0265 x_3 + 0,0077 x_4 - 0,1191 x_1x_2 + 0,1564 x_1x_3 - 0,1099 x_1x_4 + 0,0651 x_2x_3 + 0,0047 x_2x_4 + 0,0808 x_3x_4 + 0,0029 x_1x_2x_3 + 0,2856 x_1x_2x_4 + 0,0082 x_1x_3x_4 - 0,5990 x_2x_3x_4 + 0,9762 x_1x_2x_3x_4$  | 165,08          | 0,000 | 0,9963         | 21,27    | 0,000 | 0,9978         |
| <b>Miricitrina</b>    | $MYR = 0,199 x_1 + 0,263 x_2 + 0,156 x_3 + 0,158 x_4 + 0,478 x_1x_2 + 0,751 x_1x_3 + 1,001 x_1x_4 - 0,048 x_2x_3 - 0,221 x_2x_4 + 0,142 x_3x_4 + 1,688 x_1x_2x_3 + 1,103 x_1x_2x_4 + 2,153 x_1x_3x_4 + 1,322 x_2x_3x_4 - 1,257 x_1x_2x_3x_4$                | 223,99          | 0,000 | 0,9981         | 11,34    | 0,285 | 0,9989         |
| <b>F2</b>             | $F2 = 0 x_1 - 0 x_2 - 0 x_3 + 0 x_4 + 0 x_1x_2 + 0,179 x_1x_3 + 0,214 x_1x_4 + 0,089 x_2x_3 + 0,115 x_2x_4 + 0,075 x_3x_4 + 0,429 x_1x_2x_3 + 0,500 x_1x_2x_4 + 0,120 x_1x_3x_4 + 0,047 x_2x_3x_4 - 1,764 x_1x_2x_3x_4$                                     | 37,42           | 0,000 | 0,9913         | 19,49    | 0,000 | 0,9948         |

\*Equações completas, sem a remoção dos termos não significativos. x<sub>1</sub>: Água; x<sub>2</sub>: Metanol; x<sub>3</sub>: Etanol; x<sub>4</sub>: Acetona; EEF: Eficiência de Extração de Flavonoides; EET: Eficiência de Extração Taninos; F2: Flavonoide 2.

Fonte: Autoria Própria.

Na avaliação dos modelos obtidos, foram realizadas análises de variância (ANOVA) para verificar se as respostas apresentam desvios estatisticamente significativos em suas variâncias e para a validação dos resultados. Dentre os fatores avaliados, os valores de F para as regressões apresentaram-se elevados, superiores aos tabelados, evidenciando que o teste de regressão apresentou significância para todas as variáveis testadas, desde a resposta de resíduo sólido até os teores de taninos e flavonoides por CLAE, contribuindo para a afirmação de que os modelos descritos se apresentam bem ajustados.

Além disso, o *valor-p*, cuja resposta é similar ao valor de F, apresenta valores próximos à zero, e inferiores a 5% indicam que a hipótese alternativa de significância da regressão é verdadeira. Outros fatores avaliados durante o teste de ANOVA foram os erros relacionados à falta de ajuste e erro puro. Estes dois componentes fazem parte da análise de resíduos, e indicam os desvios dos valores obtidos em relação às médias, e o quanto a média se distancia dos valores previstos, ou seja, o quão bem o modelo matemático está ajustado. Dentro dos modelos matemáticos analisados não foi evidenciada falta de ajuste dos modelos com 95% de confiança, indicando que estes apresentam adequabilidade para a descrição das respostas experimentais obtidas. Quaisquer variações experimentais apresentadas podem ser atribuídas ao erro aleatório (MONTGOMERY, 2013; MYERS *et al.*, 2016).

Após a análise estatística de cada modelo matemático e da significância das equações, estas foram usadas para gerar os gráficos de contorno, de Paretos e de probabilidade normal para cada variável dentro do campo experimental estudado, possibilitando uma análise mais completa de cada variável de resposta.

#### 5.2.1.1 Variáveis de resposta

##### 5.2.1.1.1 Resíduo Seco

A tabela 7 mostra a composição e os efeitos das misturas de solventes sobre o rendimento de sólidos (resíduo seco). Os resultados demonstram que o emprego de solventes puros apresenta menor rendimento em sólidos, ao passo que as misturas foram mais eficientes e resultaram no incremento do teor de substâncias extraíveis. Dessa forma, os dados mostraram que tanto a mistura binária água:acetona 50% (v/v) quanto a quaternária foram responsáveis pelos maiores rendimentos de sólidos. Nestas condições, os teores de sólidos obtidos foram de  $3,65\% \pm 0,0351$  (0,96%) e  $3,55\% \pm 0,1277$  (3,59%), para a mistura binária (água:acetona, 50%)

e mistura quaternária, respectivamente, não apresentando diferenças estatisticamente significativas.

**Tabela 8** - Teor de resíduo seco obtido no simplex centroide.

| <b>Extrato</b> | <b>H<sub>2</sub>O</b> | <b>MeOH</b> | <b>EtOH</b> | <b>Acetona</b> | <b>Teor de resíduo (%)</b> |
|----------------|-----------------------|-------------|-------------|----------------|----------------------------|
| <b>1</b>       | 1                     | 0           | 0           | 0              | 2,60 ± 0,0681 (2,61)       |
| <b>2</b>       | 0                     | 1           | 0           | 0              | 2,75 ± 0,1041 (3,78)       |
| <b>3</b>       | 0                     | 0           | 1           | 0              | 1,92 ± 0,0451 (2,34)       |
| <b>4</b>       | 0                     | 0           | 0           | 1              | 1,53 ± 0,0058 (0,37)       |
| <b>5</b>       | 0,5                   | 0,5         | 0           | 0              | 3,02 ± 0,0569 (1,88)       |
| <b>6</b>       | 0,5                   | 0           | 0,5         | 0              | 3,21 ± 0,0265 (0,82)       |
| <b>7</b>       | 0,5                   | 0           | 0           | 0,5            | 3,65 ± 0,0351 (0,96)       |
| <b>8</b>       | 0                     | 0,5         | 0,5         | 0              | 2,17 ± 0,0208 (2,17)       |
| <b>9</b>       | 0                     | 0,5         | 0           | 0,5            | 2,77 ± 0,0971 (3,50)       |
| <b>10</b>      | 0                     | 0           | 0,5         | 0,5            | 2,35 ± 0,1872 (7,90)       |
| <b>11</b>      | 0,333                 | 0,333       | 0,333       | 0              | 2,95 ± 0,0400 (1,35)       |
| <b>12</b>      | 0,333                 | 0           | 0,333       | 0,333          | 3,45 ± 0,0265 (0,76)       |
| <b>13</b>      | 0,333                 | 0,333       | 0           | 0,333          | 3,27 ± 0,0513 (1,56)       |
| <b>14</b>      | 0                     | 0,333       | 0,333       | 0,333          | 2,12 ± 0,1069 (5,03)       |
| <b>15</b>      | 0,25                  | 0,25        | 0,25        | 0,25           | 3,55 ± 0,1277 (3,59)       |

Onde: H<sub>2</sub>O: água; MeOH: metanol; EtOH: etanol. Média ± Desvio Padrão (Desvio Padrão Relativo).

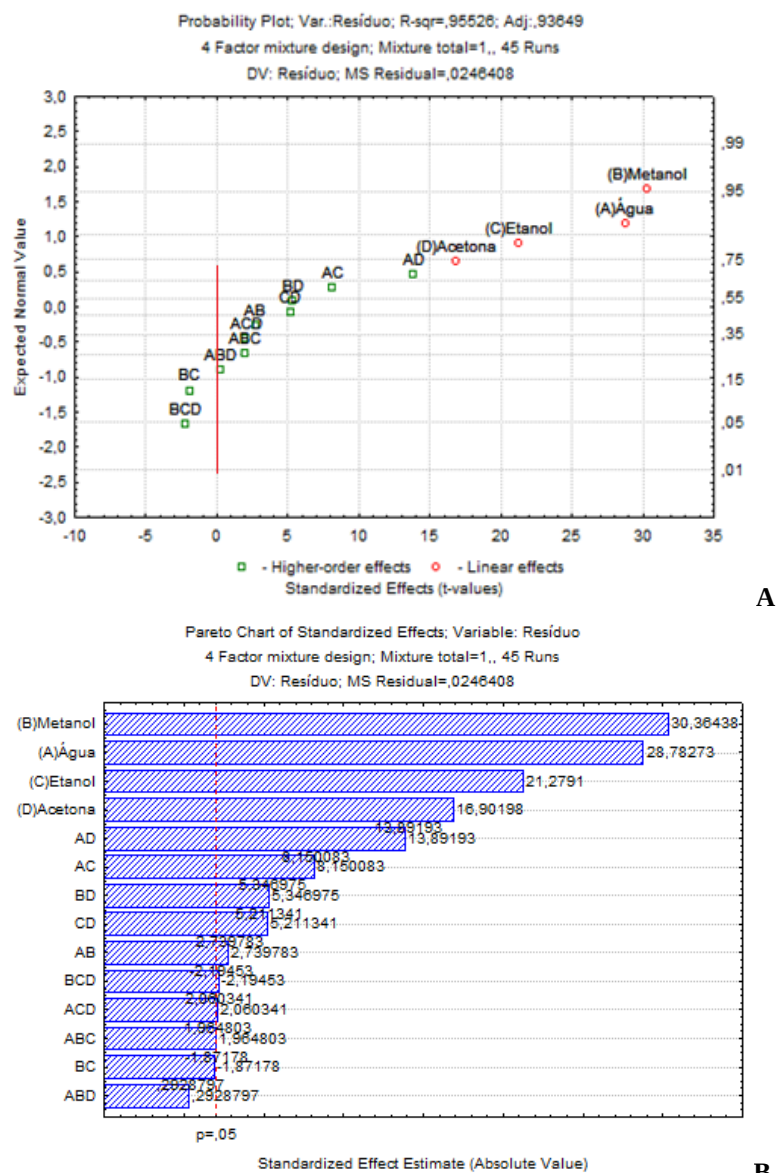
Fonte: Autoria própria.

A acetona como solvente apresentou a pior performance extrativa, indicando que a utilização isolada não possui grande seletividade para os constituintes desta matriz vegetal.

Partindo para a avaliação das respostas para esta variável seguindo os modelos matemáticos obtidos, foi possível avaliar que, para o resíduo seco, diversos fatores ultrapassaram o valor zero no gráfico de probabilidade normal (Figura 6A) e a linha de significância no gráfico de efeitos padronizados (Paretos) (Figura 6B). Em relação ao gráfico de probabilidade normal, é possível localizar com grande facilidade os efeitos. Os fatores conjuntos BC e BCD apresentaram-se à esquerda do zero na distribuição normal, indicando efeito negativo sobre a resposta, com menor teor. Enquanto a mistura dos fatores ABD não apresentou diferença estatisticamente significativa do zero, evidenciando que essa mistura não acarreta elevação ou diminuição dos teores de resíduo sólido. Todos os outros fatores que se

encontram a direita do zero no gráfico de distribuição normal apresentam influência positiva sobre a resposta analisada.

**Figura 6** - Gráficos de Probabilidade Normal (A) e de Efeitos Padronizados (Pareto) (B) para a variável Resíduo Seco.



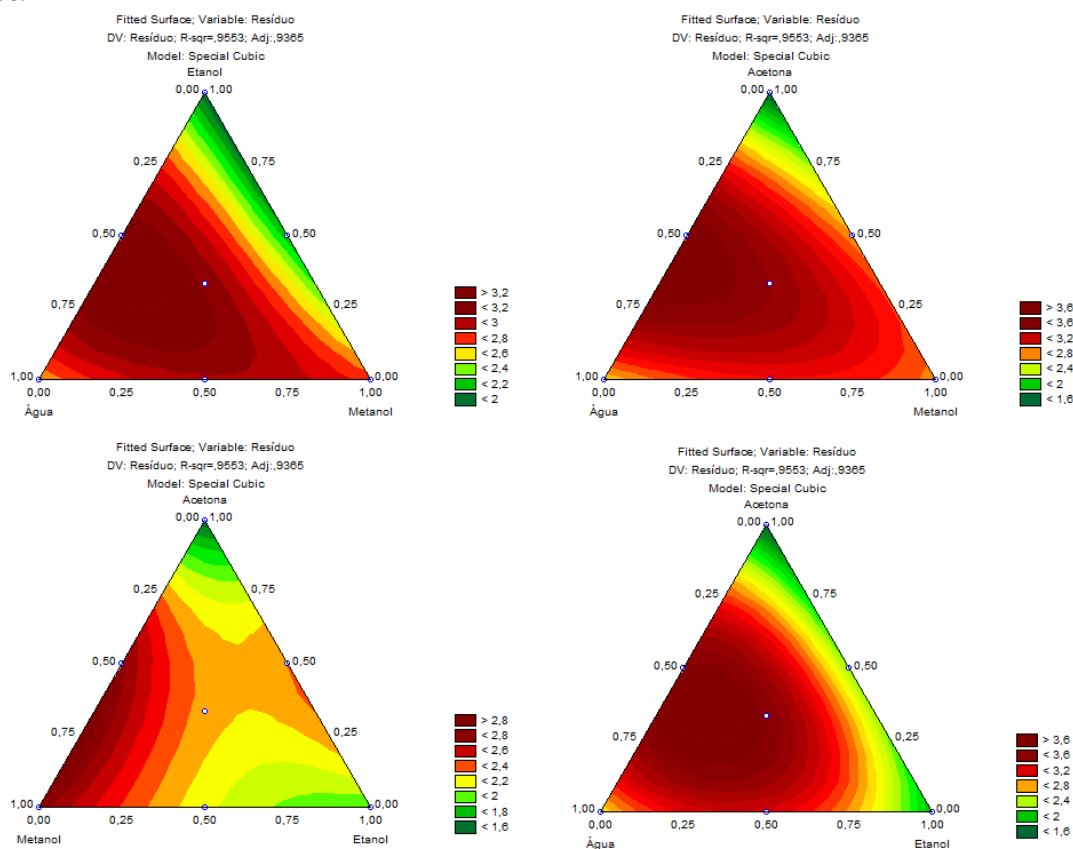
Fonte: Autoria Própria.

De acordo com o gráfico de Pareto, foi evidenciado que houve um maior impacto para os fatores lineares: metanol (+30,36), água (+28,78), etanol (+21,27) e acetona (+16,90), onde os valores representam a contribuição individual de cada solvente, evidenciando que metanol e água apresentam as melhores respostas. Além destes fatores, as interações que apresentaram influência positiva foram AD (+13,69), AC (+8,15), BD (+5,35), CD (+5,21). Apesar dos valores dos teores de resíduo seco para estas misturas terem apresentado valores superiores aos resultados dos individuais, a influência dos fatores em conjunto apresentou menor impacto.

Entretanto o valor evidencia comportamento sinérgico entre os componentes das misturas binárias. As misturas ternárias não apresentaram influência significativa sobre as respostas, de acordo com o modelo.

Os gráficos de contorno evidenciam através da coloração vermelha as regiões que obtiveram maior teor estimado de acordo com a composição nos diagramas. No resíduo seco, os diagramas evidenciam a importância da água e das regiões de misturas contendo água, metanol, etanol e acetona. No gráfico de contorno produzido para a mistura BCD (metanol: etanol: acetona) é possível observar que a maioria da área no diagrama apresenta colorações de menor intensidade de teor (colorações laranja, amarela e verde), apresentando a coloração vermelha mais próxima do eixo que representa o metanol. Corroborando com a avaliação de que, para a resposta de resíduo seco, os solventes água e metanol possuem maior impacto sobre o teor.

**Figura 7** - Gráficos de contorno obtidos para o teor de resíduo seco nas diferentes composições do simplex centroide.



Fonte: Autoria Própria.

O teor de sólidos ou de resíduo seco possui um importante papel com indicativo da eficiência da extração, sendo uma maneira simples de verificar a viabilidade de operações de secagem, visto que o rendimento em produto seco está diretamente relacionado com a

proporção de resíduo seco presente na amostra. Apesar da importância tecnológica, o teor de sólidos em soluções extrativas não apresenta necessariamente correlação com a composição química do extrato, pois dentro da variedade de substâncias presentes na matriz, há uma infinidade de compostos interferentes que podem possuir afinidade com o solvente extrator. Assim, esta medida não permite inferir sobre segurança e eficácia dos produtos. Portanto, a determinação da composição química é obrigatória para os devidos controles de processo e de qualidade, bem como para assegurar a viabilidade terapêutica dos produtos obtidos pelo processo (CUNHA *et al.*, 2009).

#### 5.2.1.1.2 Teor de flavonoides totais

A tabela 8 apresenta os resultados obtidos para os teores de flavonoides totais. Neste ensaio, a análise das respostas para os extratos preparados com os solventes puros revelou que todos os solventes quando usados isoladamente, apresentaram baixo teor, com exceção do metanol. Este solvente apresentou elevado rendimento ( $1,02\% \pm 0,0177$  (1,72%)), comparável e até superior a alguns dos extratos preparados com as misturas de solventes.

**Tabela 9** - Teor de Flavonoides Totais obtidos no simplex centroide.

| Extrato | H <sub>2</sub> O | MeOH  | EtOH  | Acetona | TFT (%)              |
|---------|------------------|-------|-------|---------|----------------------|
| 1       | 1                | 0     | 0     | 0       | 0,76 ± 0,0158 (2,07) |
| 2       | 0                | 1     | 0     | 0       | 1,02 ± 0,0177 (1,72) |
| 3       | 0                | 0     | 1     | 0       | 0,68 ± 0,0097 (1,41) |
| 4       | 0                | 0     | 0     | 1       | 0,62 ± 0,0021 (0,34) |
| 5       | 0,5              | 0,5   | 0     | 0       | 0,95 ± 0,0084 (0,88) |
| 6       | 0,5              | 0     | 0,5   | 0       | 1,19 ± 0,0027 (0,23) |
| 7       | 0,5              | 0     | 0     | 0,5     | 1,34 ± 0,0171 (1,27) |
| 8       | 0                | 0,5   | 0,5   | 0       | 0,78 ± 0,0099 (1,27) |
| 9       | 0                | 0,5   | 0     | 0,5     | 0,94 ± 0,0158 (1,67) |
| 10      | 0                | 0     | 0,5   | 0,5     | 0,80 ± 0,0096 (1,19) |
| 11      | 0,333            | 0,333 | 0,333 | 0       | 1,25 ± 0,0032 (0,26) |
| 12      | 0,333            | 0     | 0,333 | 0,333   | 1,28 ± 0,0154 (1,20) |
| 13      | 0,333            | 0,333 | 0     | 0,333   | 1,28 ± 0,0070 (1,58) |
| 14      | 0                | 0,333 | 0,333 | 0,333   | 0,93 ± 0,0082 (0,88) |
| 15      | 0,25             | 0,25  | 0,25  | 0,25    | 1,31 ± 0,0033 (0,25) |

Onde: H<sub>2</sub>O: água; MeOH: metanol; EtOH: etanol; TFT: Teor de flavonoides totais. Média ± Desvio Padrão (Desvio Padrão Relativo).

Fonte: Autoria própria.

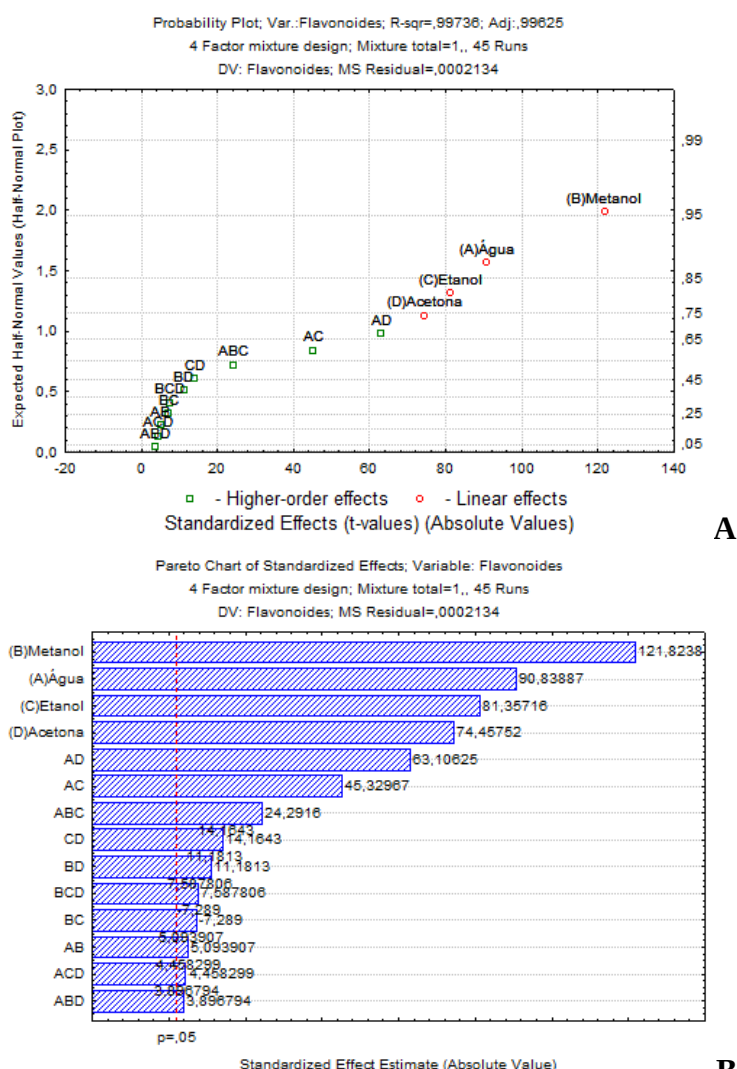
As misturas binárias obtiveram respostas superiores aos solventes isolados (exceto o metanol). As combinações de água:etanol e água:acetona foram as responsáveis pelos melhores desempenhos com TFT de 1,19% ± 0,0027 (0,23%) e 1,34% ± 0,0171 (1,27%), respectivamente. No caso da mistura dos fatores A (água) e D (acetona) o teor de 1,34% é bastante semelhante ao valor teórico de 1,38% da soma dos teores dos extratos obtidos para estes solventes individualmente (0,76% A (água) e 0,62% D (acetona)), o que indica que estes solventes atuam sinergicamente aumentando o desempenho extrativo, em relação aos solventes isolados.

As misturas ternárias apresentaram rendimento significativo, para as combinações que possuem água em sua composição. Por fim, o sistema quaternário apresentou teor de flavonoides de 1,31% ± 0,0033 (0,25%), aproximando-se também do resultado obtido para mistura água:acetona. Estes resultados demonstram que a mistura binária de água:acetona e a mistura quaternária alcançaram os melhores desempenhos extrativos, reforçando os resultados da análise de resíduo seco. Além disso, as respostas obtidas para os teores de flavonoides

corroboram com os relatos na literatura que propoem misturas hidroalcóolicas ou hidroacetônicas para extração de flavonoides, devido à seletividade e eficiência destes sistemas na extração destas substâncias da matriz vegetal (ROSTAGNO, 2009; SIMÕES *et al.*, 2017; RAMOS *et al.*, 2017).

Na avaliação dos efeitos, foi possível verificar que todos os fatores apresentaram influência positiva sobre o processo, evidenciado no gráfico de probabilidade normal. No gráfico de Pareto observa-se um maior impacto em relação aos fatores lineares (os solventes puros), além de alguns efeitos de maior ordem (interações, sistemas de solventes).

**Figura 8** - Gráficos de Probabilidade Normal (A) e de Efeitos Padronizados (Pareto) (B) para a variável de Flavonoides Totais.



Fonte: Autoria Própria.

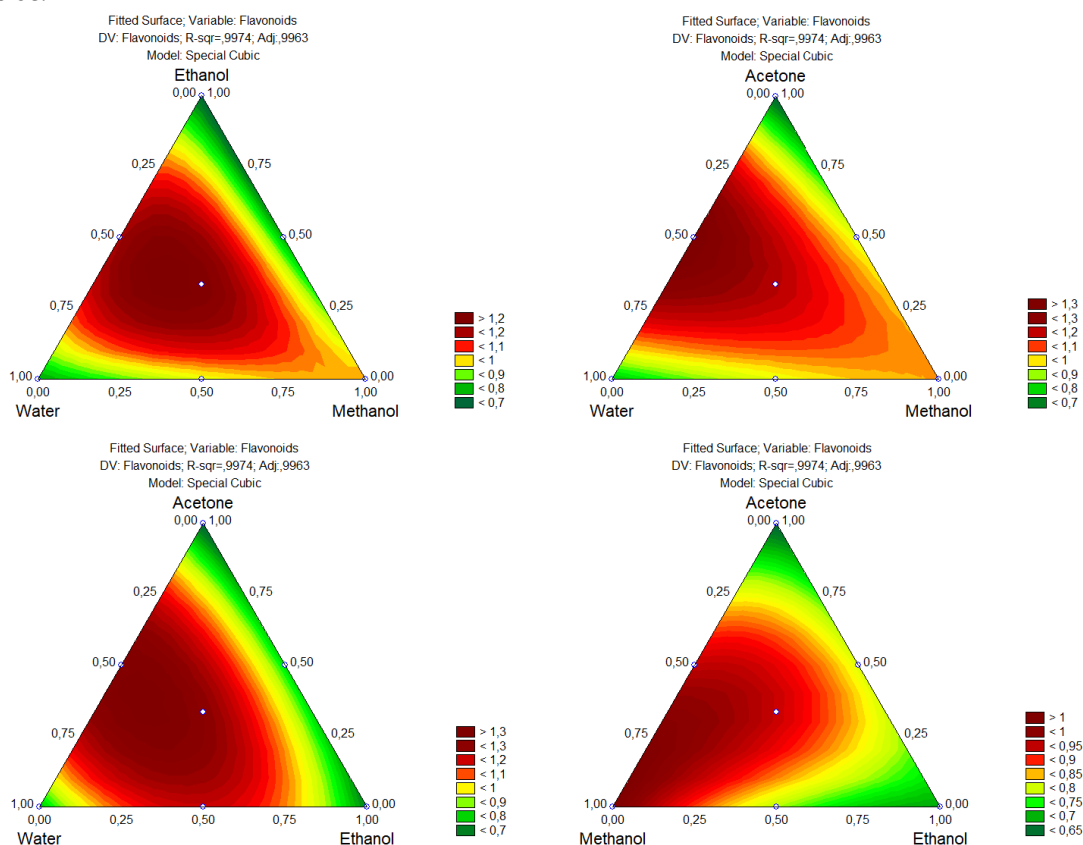
Os fatores que apresentaram maior influência foram os lineares B (metanol – +121,82), A (água – +90,83), C (etanol – +81,35), D (acetona – +74,95), e os efeitos de maior ordem para as misturas dos fatores AD (+63,10), AC (+45,32) e ABC (+24,29). Os demais fatores, apesar

de apresentarem valores superiores à linha de significância, possuem influências com valores baixos e muito próximos de zero no gráfico de probabilidade normal.

De forma semelhante ao que acontece para os fatores na resposta de teor de resíduos sólidos, os teores das misturas apresentam-se, em grande parte, superiores aos dos solventes puros. Mas na avaliação dos efeitos, o teor das misturas não apresenta a soma nominal dos valores obtidos para os seus componentes isoladamente. Porém, a influência positiva dos fatores das misturas, indicam que os sistemas analisados apresentam ação sinérgica para a extração de flavonoides na maioria das misturas binárias e ternárias, resultando em respostas analíticas superiores às suas respostas isoladas. Corroborando com os dados da literatura que relatam a maior extração destas substâncias por misturas de solventes orgânicos polares e água.

Os gráficos de contorno (Figura 9) evidenciam a importância da água e de seu efeito conjunto com os solventes metanol/etanol. Quando a água não está presente, é possível observar uma maior influência do metanol, reiterando a importância dos solventes água e metanol sobre a resposta de teores de flavonoides totais.

**Figura 9** - Gráficos de contorno obtidos para os teores de Flavonoides nas diferentes composições do simplex centroide.



Fonte: Autoria Própria.

### 5.2.1.1.3 Teor de taninos totais (TT)

A avaliação das respostas para o teor de taninos totais obteve resultados entre 1,81 e 7,25% (Tabela 9).

Em relação ao emprego de solventes puros, foi possível observar que os solventes A (água) e B (metanol) proporcionaram os melhores rendimentos entre os solventes isolados, sendo os teores de  $5,20\% \pm 0,1002$  (1,93%) e  $5,55\% \pm 0,0656$  (1,18%), respectivamente. Enquanto os solventes C (etanol) e D (Acetona) apresentaram menores rendimentos, (C =  $2,66\% \pm 0,0316$  (1,18%); D =  $1,81\% \pm 0,0047$  (2,63%)), apresentando respostas muito inferiores em comparação com os resultados obtidos para os solventes isolados (água e metanol) e para as combinações de solventes.

**Tabela 10** - Teor de taninos totais obtidos no simplex centroide.

| Extrato | H <sub>2</sub> O | MeOH  | EtOH  | Acetona | TT (%)                   |
|---------|------------------|-------|-------|---------|--------------------------|
| 1       | 1                | 0     | 0     | 0       | $5,20 \pm 0,1002$ (1,93) |
| 2       | 0                | 1     | 0     | 0       | $5,55 \pm 0,0656$ (1,18) |
| 3       | 0                | 0     | 1     | 0       | $2,66 \pm 0,0316$ (1,18) |
| 4       | 0                | 0     | 0     | 1       | $1,81 \pm 0,0047$ (2,63) |
| 5       | 0,5              | 0,5   | 0     | 0       | $7,25 \pm 0,0275$ (0,38) |
| 6       | 0,5              | 0     | 0,5   | 0       | $6,91 \pm 0,1536$ (2,22) |
| 7       | 0,5              | 0     | 0     | 0,5     | $6,58 \pm 0,0776$ (1,18) |
| 8       | 0                | 0,5   | 0,5   | 0       | $5,12 \pm 0,0275$ (0,54) |
| 9       | 0                | 0,5   | 0     | 0,5     | $3,18 \pm 0,0189$ (0,60) |
| 10      | 0                | 0     | 0,5   | 0,5     | $4,93 \pm 0,0384$ (0,78) |
| 11      | 0,333            | 0,333 | 0,333 | 0       | $6,46 \pm 0,0384$ (0,59) |
| 12      | 0,333            | 0     | 0,333 | 0,333   | $6,21 \pm 0,1043$ (1,68) |
| 13      | 0,333            | 0,333 | 0     | 0,333   | $6,84 \pm 0,0289$ (0,42) |
| 14      | 0                | 0,333 | 0,333 | 0,333   | $4,24 \pm 0,0253$ (0,54) |
| 15      | 0,25             | 0,25  | 0,25  | 0,25    | $6,40 \pm 0,0656$ (1,02) |

Onde: H<sub>2</sub>O: água; MeOH: metanol; EtOH: etanol; TT: Teor de taninos totais. Média  $\pm$  Desvio Padrão (Desvio Padrão Relativo).

Fonte: Autoria própria.

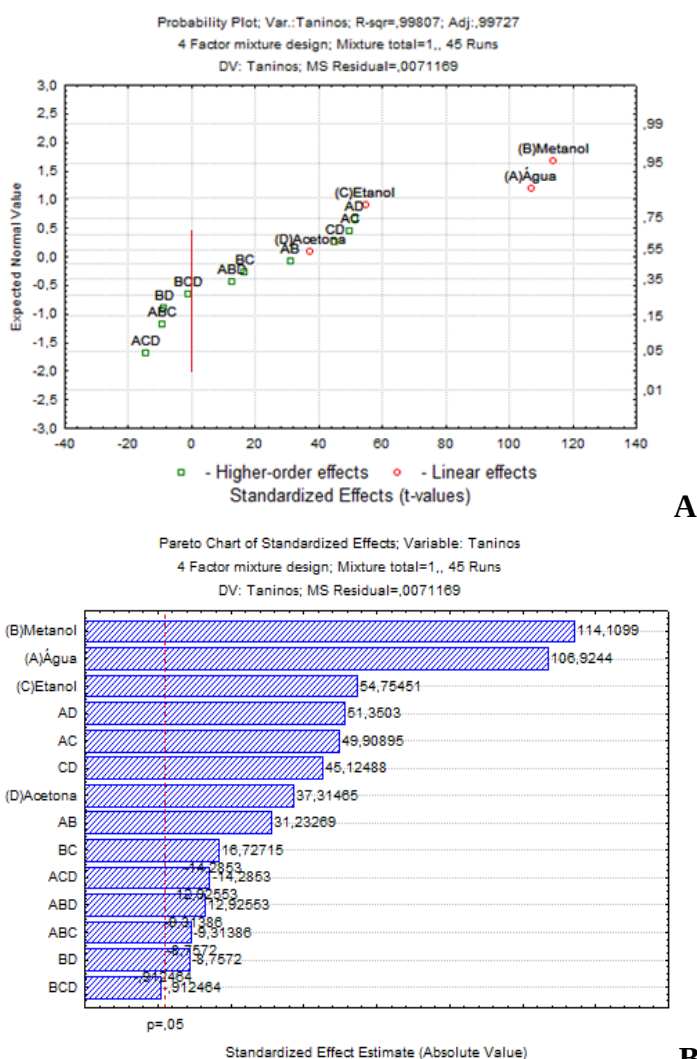
Em relação às misturas binárias, a mistura constituída por água:metanol foi responsável por maior rendimento de TT, igual a  $7,25\% \pm 0,0275$  (0,38%), seguida pelas misturas contendo

água:etanol e água:acetona. Os dados apresentados denotam a relevância da presença de água nas misturas tanto binárias quanto terciárias e quaternária, evidenciando elevado desempenho na extração de taninos.

Na análise do gráfico de probabilidade normal (Figura 10A), é possível observar com facilidade os parâmetros que possuíram influência negativa (BD, ABC e ACD); enquanto o termo BCD não apresentou diferença estatística significativa do zero.

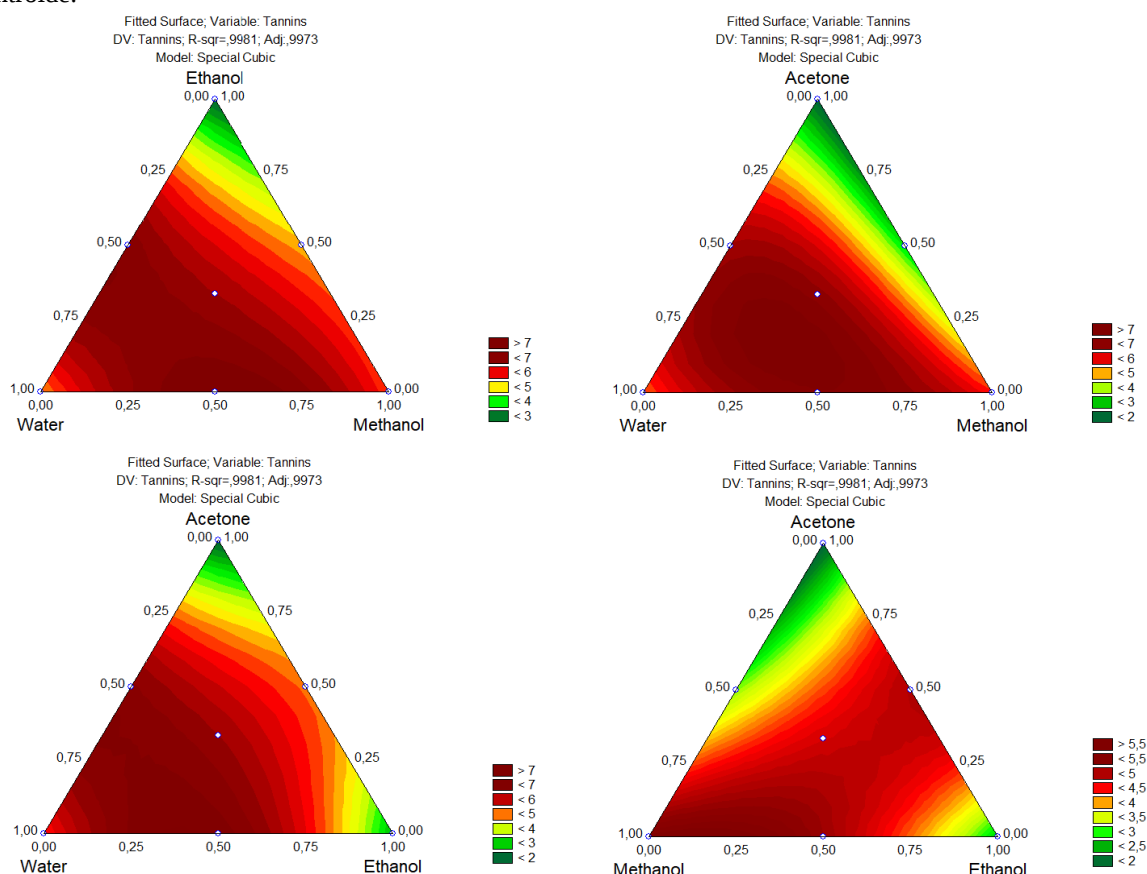
Os fatores lineares B (+114,10), A (+106,91) e C (+54,75), além dos fatores de interação entre variáveis de misturas binárias AD (+51,35), AC (+49,90) e ternárias ABD (+12,92) obtiveram respostas positivas significativas, enquanto a resposta conjunta ACD (-14,28) apresentou significativa resposta negativa, como pode ser verificado no gráfico de paretos (Figura 10B). As misturas AD, AC, AB, BC, CD e ABD apresentaram aumento nos teores e ação sinérgica entre os solventes.

**Figura 10** - Gráficos de Probabilidade Normal (A) e de Efeitos Padronizados (Paretos) (B) para a variável de Taninos Totais.



Os gráficos de contorno (Figura 11), assim como para as respostas anteriores de resíduo sólido e teor flavonoides totais, evidenciam a importância da água e de seu efeito conjunto com os solventes metanol, etanol e acetona, evidenciando uma maior intensidade de coloração onde há a presença de água nas misturas. Nessa resposta, também é possível observar uma influência do metanol na ausência de água.

**Figura 11** - Gráficos de contorno obtidos para o teor de Taninos Totais nas diferentes composições do simplex centroide.



Fonte: Autoria Própria.

Estes resultados corroboram com os resultados obtidos tanto para teores de resíduo seco e flavonoides, os quais também possuem maior influência dos solventes água e metanol. A água possui maior desempenho isoladamente, além de apresentar valores elevados quando em mistura, resultando em ação sinérgica com os demais solventes. A influência da água está relacionada com o caráter mais hidrofílico dos taninos devido ao elevado número de hidroxilas que os taninos elágicos possuem (TSAO, 2010; SIMÕES *et al.*, 2010; 2017; QUIDEAU *et al.*, 2011; BEZERRA *et al.*, 2018).

#### 5.2.1.1.4 Eficiência de Extração

A avaliação de eficiência de extração é uma medida que relaciona o teor dos marcadores (flavonoides e taninos) com o teor de sólidos que cada extrato apresenta. Desta forma, a medida expressa a composição qualitativa e quantitativa das substâncias extraídas e que compõe o resíduo sólido de cada extrato. A informação permite estabelecer as condições das operações de transformação para ajustar a composição química de produtos secos preparados a partir destes extratos (CUNHA *et al.*, 2009). De acordo com os resultados apresentados na tabela 10, maior eficiência de extração de flavonoides (maior proporção destes compostos nos sólidos) foi observada para extratos obtidos com acetona isoladamente e com as misturas ternárias de água:metanol:etanol e metanol:etanol:acetona. Para o caso da extração de taninos, maior performance foi observada para as misturas binárias de água:metanol e água:etanol; e para as misturas ternárias de água:metanol:etanol e metanol:etanol:acetona.

**Tabela 11** - Valores de eficiência de extração para os extratos obtidos no simplex centroide.

| Extrato | H <sub>2</sub> O | MeOH  | EtOH  | Acetona | EEF   | EET   |
|---------|------------------|-------|-------|---------|-------|-------|
| 1       | 1                | 0     | 0     | 0       | 0,294 | 2,000 |
| 2       | 0                | 1     | 0     | 0       | 0,374 | 2,023 |
| 3       | 0                | 0     | 1     | 0       | 0,357 | 1,385 |
| 4       | 0                | 0     | 0     | 1       | 0,411 | 1,189 |
| 5       | 0,5              | 0,5   | 0     | 0       | 0,315 | 2,399 |
| 6       | 0,5              | 0     | 0,5   | 0       | 0,372 | 2,155 |
| 7       | 0,5              | 0     | 0     | 0,5     | 0,370 | 1,804 |
| 8       | 0                | 0,5   | 0,5   | 0       | 0,361 | 2,357 |
| 9       | 0                | 0,5   | 0     | 0,5     | 0,341 | 1,148 |
| 10      | 0                | 0     | 0,5   | 0,5     | 0,343 | 2,105 |
| 11      | 0,333            | 0,333 | 0,333 | 0       | 0,427 | 2,192 |
| 12      | 0,333            | 0     | 0,333 | 0,333   | 0,367 | 2,091 |
| 13      | 0,333            | 0,333 | 0     | 0,333   | 0,374 | 1,800 |
| 14      | 0                | 0,333 | 0,333 | 0,333   | 0,438 | 2,187 |
| 15      | 0,25             | 0,25  | 0,25  | 0,25    | 0,369 | 1,805 |

Onde: H<sub>2</sub>O: água; MeOH: metanol; EtOH: etanol; EEF: Eficiência de extração de Flavonoides; EET: Eficiência de extração de taninos.

Fonte: Autoria própria.

Estes resultados diferem das máximas respostas obtidas para os teores dos marcadores, visto que quanto maior o resíduo sólido do material, menor será a eficiência de extração se o teor do marcador não possuir a mesma proporcionalidade. Esta proporcionalidade é dependente da eficiência e seletividade do solvente ou sistema de solvente na extração dos componentes da matriz, o que em alguns casos pode resultar em comportamentos inversos. Entretanto, esta variável auxilia a identificação dos sistemas vantajosos, em que há tanto a presença de resíduos sólidos elevados, quanto de altos teores de marcadores, sendo uma medida complementar para a escolha das melhores condições experimentais.

#### 5.2.1.1.5 Quantificação de ácido gálico, elágico e flavonoides por CLAE

##### a) Obtenção do Perfil Cromatográfico

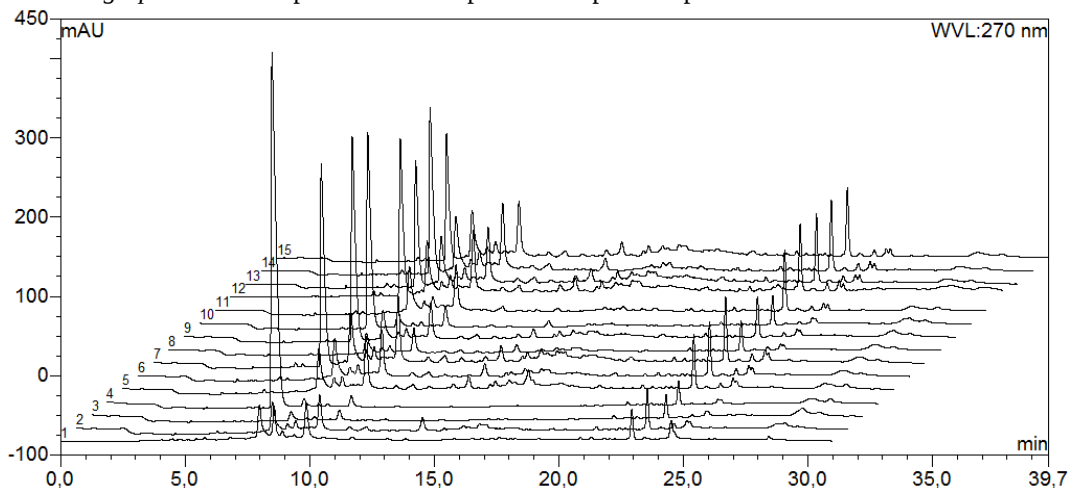
A análise dos marcadores específicos foi realizada por CLAE, obtendo cromatogramas com variações na intensidade das áreas dos picos de interesse e na presença/ausência de picos. Os marcadores da espécie (ácido gálico, elágico e miricitrina) foram encontrados em todos os extratos. Estas substâncias apresentaram tempo de retenção igual a 8,7 min (ácido gálico), 22,8 min (miricitrina) e 25,2 min (ácido elágico), e foram identificadas através da comparação dos espectros de varredura e verificação de aumento de área após fortificação com substâncias padrão. Além destes marcadores, também foi analisado o teor de outro flavonoide presente na amostra e que não foi identificado, mas qual possui espectro e máximos de absorção semelhantes ao da miricitrina, com tempo de retenção de 24,5 min. Para fins de análise, este composto foi nomeado flavonoide 2 e o teor foi expresso em %m/m de miricitrina.

A partir desta análise cromatográfica, foram obtidos os *fingerprints* dos extratos, permitindo a avaliação do perfil químico típico e comparação das respostas obtidas com os resultados descritos de *fingerprints* descritos por Bezerra e colaboradores (2018) para os materiais vegetais e produtos derivados de *E. uniflora*. Os cromatogramas obtidos podem ser visualizados na figura 12, onde é possível observar as regiões características de *fingerprints* nos intervalos de 7-11 min e 22-27 min, onde estão presentes os marcadores (ácido gálico, ácido elágico, micicitrina e outros flavonoides) evidenciando similaridade entre os extratos obtidos do modelo simplex centroide e os existentes na literatura, confirmando o perfil químico obtido como o típico da *E. uniflora*.

Este perfil químico pode ser utilizado para a autenticação de derivados das folhas de *E. uniflora*, assim como pode ser usado para verificar a equivalência terapêutica caso haja um

perfil químico definido para determinada atividade da espécie (MA *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2015; BEZERRA, 2016).

**Figura 12** - Fingerprints obtidos para os extratos produzidos pelo simplex centroide.



1 - 15: extratos obtidos para construção de modelo simplex centroide.

Fonte: Autoria própria.

#### b) Quantificação de flavonoides

A tabela 11 mostra os resultados obtidos experimentalmente para as análises da miricitrina e do flavonoide 2 nos extratos obtidos no planejamento simplex centroide. Em relação ao flavonoide 2, os extratos obtidos nas condições descritas de 1 a 5 (solventes puros e mistura água:metanol), não apresentaram a seletividade necessária para promover a extração do flavonoide 2, só sendo possível sua detecção nas condições descritas de 6 a 15, ainda assim apresentando rendimento cerca de 10 vezes menor que o da miricitrina. As misturas que não apresentam água em sua composição obtiveram menor teor para ambas as substâncias.

**Tabela 12** - Teores de miricitrina e flavonoide 2 (F2) obtidos no simplex centroide.

| Extrato | H <sub>2</sub> O | MeOH  | EtOH  | Acetona | Miricitrina (%)       | F2 (%)                 |
|---------|------------------|-------|-------|---------|-----------------------|------------------------|
| 1       | 1                | 0     | 0     | 0       | 0,176 ± 0,0040 (2,28) | *                      |
| 2       | 0                | 1     | 0     | 0       | 0,230 ± 0,0007 (2,28) | *                      |
| 3       | 0                | 0     | 1     | 0       | 0,135 ± 0,0020 (1,47) | *                      |
| 4       | 0                | 0     | 0     | 1       | 0,136 ± 0,0037 (2,65) | *                      |
| 5       | 0,5              | 0,5   | 0     | 0       | 0,307 ± 0,0004 (0,13) | *                      |
| 6       | 0,5              | 0     | 0,5   | 0       | 0,312 ± 0,0013 (0,43) | 0,042 ± 0,0006 (1,39)  |
| 7       | 0,5              | 0     | 0     | 0,5     | 0,372 ± 0,0004 (0,12) | 0,051 ± 0,0014 (2,79)  |
| 8       | 0                | 0,5   | 0,5   | 0       | 0,175 ± 0,0018 (1,02) | 0,020 ± 0,0012 (5,71)  |
| 9       | 0                | 0,5   | 0     | 0,5     | 0,234 ± 0,0013 (0,57) | 0,026 ± 0,0004 (1,54)  |
| 10      | 0                | 0     | 0,5   | 0,5     | 0,165 ± 0,0002 (0,11) | 0,017 ± 0,0018 (10,15) |
| 11      | 0,333            | 0,333 | 0,333 | 0       | 0,349 ± 0,0010 (0,29) | 0,042 ± 0,0065 (15,20) |
| 12      | 0,333            | 0     | 0,333 | 0,333   | 0,403 ± 0,0014 (0,35) | 0,051 ± 0,0015 (2,84)  |
| 13      | 0,333            | 0,333 | 0     | 0,333   | 0,403 ± 0,0172 (4,49) | 0,052 ± 0,0008 (1,47)  |
| 14      | 0                | 0,333 | 0,333 | 0,333   | 0,242 ± 0,0008 (0,35) | 0,036 ± 0,0004 (1,36)  |
| 15      | 0,25             | 0,25  | 0,25  | 0,25    | 0,399 ± 0,0021 (0,55) | 0,047 ± 0,0003 (0,69)  |

Onde: H<sub>2</sub>O: água; MeOH: metanol; EtOH: etanol; F1: Flavonoide 1; F2: Flavonoide2. Média ± Desvio Padrão (Desvio Padrão Relativo). \*Não foram detectados.

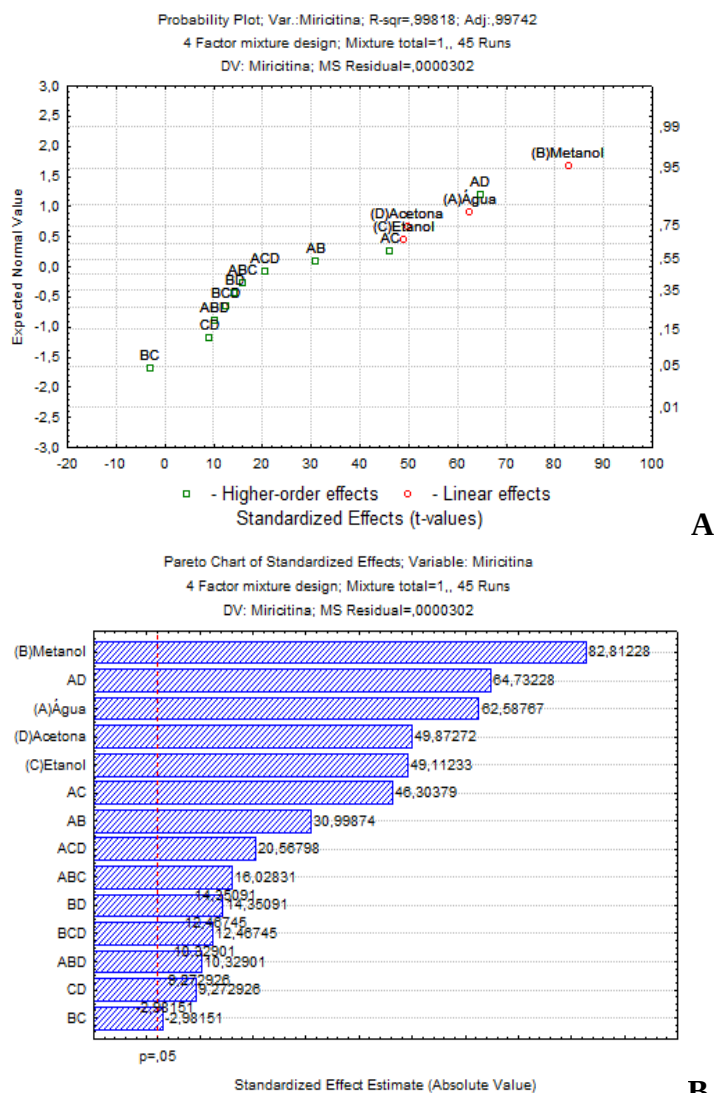
Fonte: Autoria própria.

Para as misturas binárias é possível verificar o aumento expressivo do teor nas misturas contendo água. Para a miricitrina, as três misturas (água:metanol, água:etanol e água:acetona) apresentaram aumento, resultando em teores de 0,307 ± 0,0004 (0,13%), 0,312 ± 0,0013 (0,43%) e 0,372 ± 0,0004 (0,12%) respectivamente. Para o flavonoide 2, as misturas água:etanol e água:acetona apresentaram aumento no teor, sendo a mistura água:acetona um dos melhores para esse composto.

As condições mais favoráveis a extração dos marcadores flavonoídicos corresponde as misturas ternárias de água:metanol:acetona e água:etanol:acetona, cujos rendimentos para a miricitrina e para o flavonoide 2 foram de 0,403 ± 0,0014 (0,35%) e 0,051 ± 0,0015 (2,84%); e 0,403% ± 0,0172 (0,35%) e 0,052 ± 0,0008 (2,84%), respectivamente.

Na análise dos efeitos para o teor de miricitrina, foi possível verificar que todos os fatores possuíram significância estatística (Figuras 13A e 13B). Dentre todas as misturas avaliadas para esta variável, apenas a mistura dos fatores B (metanol) e C (etanol) apresentou influência negativa, mas não apresentaram impacto relevante, em comparação com os outros fatores. Os fatores de maior influência foram: linear B (metanol - 82,81) e AD (água e acetona - 64,73), seguidos de A (água - 62,58), D (acetona - 49,87).

**Figura 13** - Gráficos de Probabilidade Normal (A) e de Efeitos Padronizados (Pareto) (B) para a variável Miricitrina.

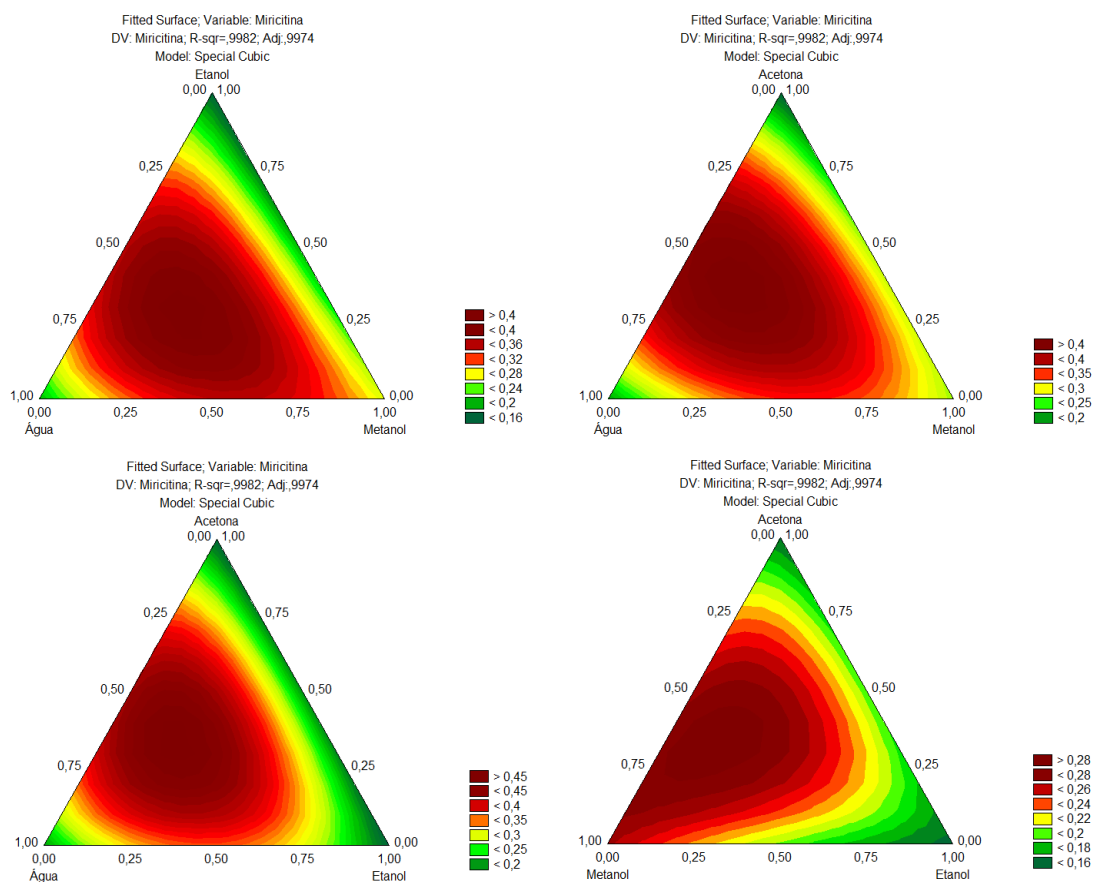


Fonte: Autoria Própria.

Os dados obtidos por CLAE apresentaram correlação com os resultados obtidos para a variável de flavonoides totais por UV-Vis, fato observado a semelhança nos gráficos de contorno para ambas respostas.

Os gráficos de contorno (Figura 14), assim como reportado para a variável de flavonoides totais, evidenciam a importância da água e de seu efeito conjunto com os demais solventes. Quando a água não está presente, é possível observar influência do metanol, principalmente sobre as maiores proporções (de onde as curvas de intensidade partem).

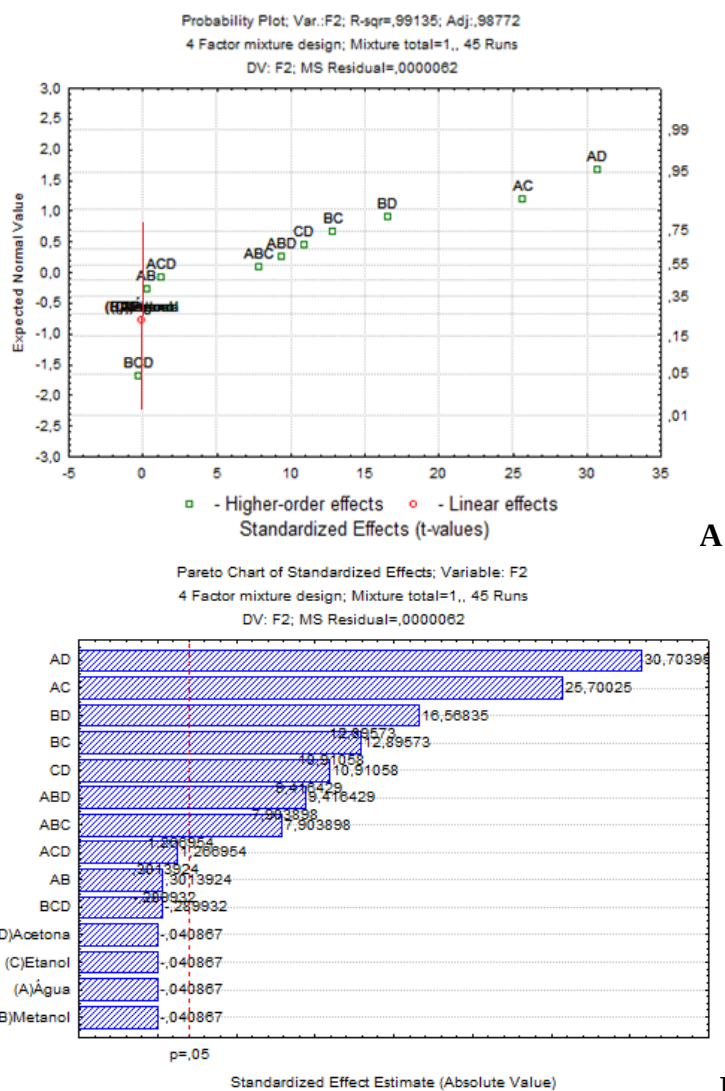
**Figura 14** - Gráficos de contorno obtidos para os teores de Miricitrina (MYR) nas diferentes composições do simplex centroide.



Fonte: Autoria Própria.

Os fatores que obtiveram influência estatisticamente significativa (Figura 15) sobre a extração foram os fatores conjuntos binários de AD (água:acetona – 30,70), AC (água:etanol – 25,70), BD (metanol:acetona – 16,56), BC (metanol: etanol – 12,89) e CD (etanol:acetona – 10,91). Além dos fatores de interação entre três componentes ABD (água:metanol:acetona – 9,41) e ABC (água:metanol:etanol – 7,90).

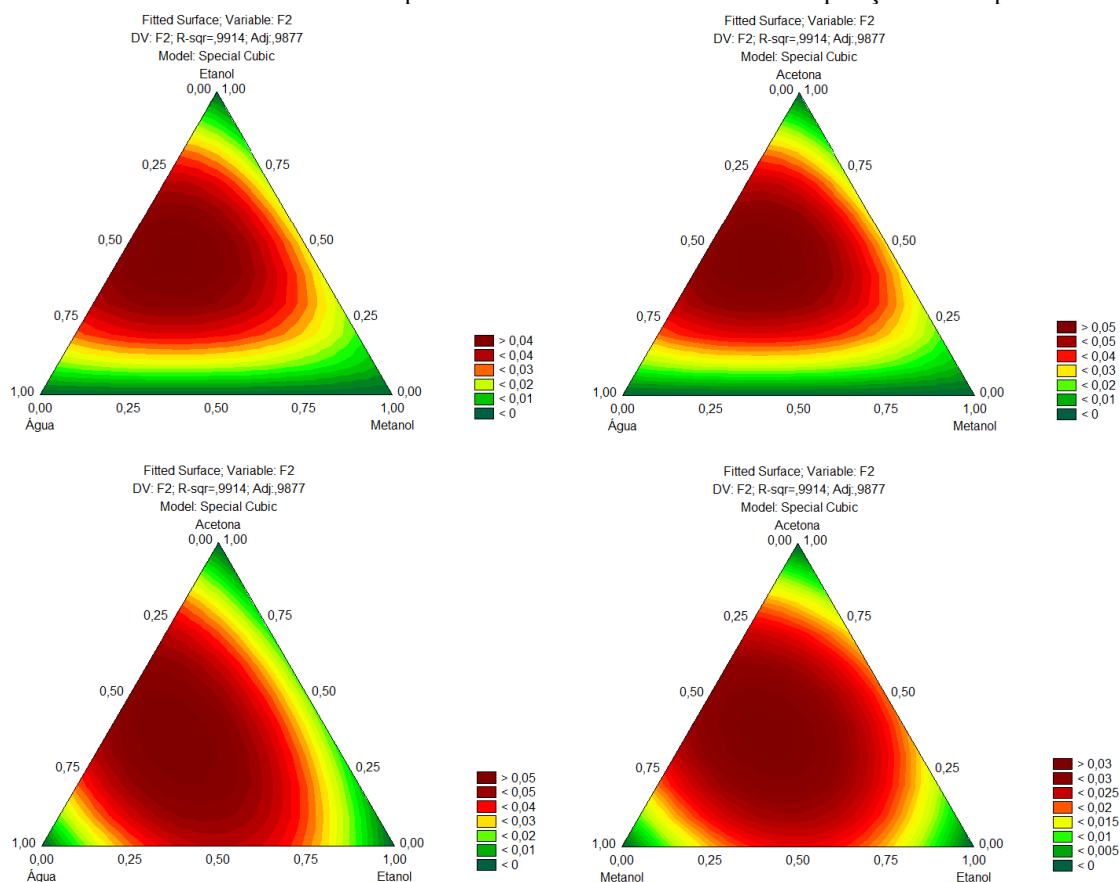
**Figura 15** - Gráficos de Probabilidade Normal (A) e de Efeitos Padronizados (Pareto) (B) para a variável flavonoide 2.



Fonte: Autoria Própria.

Em relação ao flavonoide 2, as respostas se apresentam distintas das obtidas para a miricitrina no que se refere às influências dos fatores. A substância não foi detectada em nenhum dos extratos produzidos com os solventes isolados, bem como na mistura de água:metanol; apresentando menor teor que a miricitrina, indicando que este flavonoide não possui afinidade com os 5 primeiros solventes extratores utilizados (Figura 16).

**Figura 16** - Gráficos de contorno obtidos para os teores de F2 nas diferentes composições do simplex centroide.

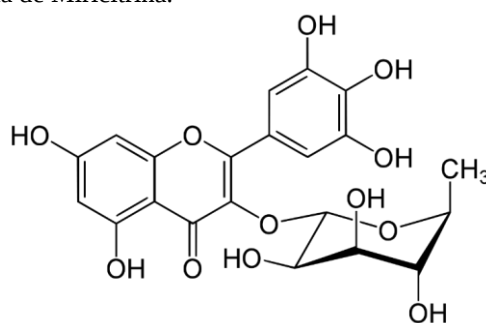


Fonte: Autoria Própria.

Os resultados demonstram a importância dos sistemas de solventes hidrofílicos para a extração dos compostos flavonoídicos presentes na matriz, corroborando com diversos relatos na literatura que indicam que a presença de grupos hidroxila e resíduos de açúcares na estrutura dos flavonoides são os responsáveis pela elevada solubilidade destas substâncias em solventes polares, o que é um fator determinante na seletividade dos sistemas de solventes avaliados (MARQUES *et al.*, 2012; HANDA *et al.*, 2016; SIMÕES *et al.*, 2017).

A miricitrina, flavonol glicosilado (miricetina-O-rhamnosídeo), possui maior polaridade do que outros flavonóis aglicosilados. Em relação ao flavonoide 2(F2), a miricitrina possui maior polaridade visto que, nas análises cromatográficas, a miricitrina possui menor tempo de retenção (22,7 min) que o flavonoide 2 (24,5 min), possuindo mais afinidade com as cadeias C-18 da coluna, do que com a fase móvel. Neste sentido, o F2 pode ser correspondente a uma aglicona ou um flavonoide metilado, como relatado por Rattmann e colaboradores (2012), que descreveu uma série de compostos derivados de quercetina e miricitrina com estas características.

**Figura 17** - Estrutura da molécula de Miricitrina.



Fonte: Adaptado de Rattmann *et al.*, 2012.

Diante desta diferença entre a retenção com a cadeias  $C_{18}$  para os dois flavonoides, foram avaliadas as constantes dielétricas das misturas para identificar as possíveis diferenças de afinidade a partir da polaridade dos solventes e misturas de solventes. A constante dielétrica é uma importante característica que permite a descrição do comportamento de polarização das moléculas em um campo elétrico e de interações moleculares, servindo como uma referência para a determinação do poder de solvatação dos solventes. Quanto maior a contante dielétrica, maior a polarizabilidade, possibilitando a maior solubilização de íons, permitindo determinar a polaridade do solvente (MIRRE *et al.*, 2017).

**Tabela 13** - Valores de constantes dielétricas para os solventes/sistemas de solventes calculadas a partir das proporções dos componentes da mistura.

| Solvente/Mistura                            | Constantes Dielétricas |
|---------------------------------------------|------------------------|
| *Água                                       | 80,4                   |
| *Metanol                                    | 33,6                   |
| *Etanol                                     | 24,5                   |
| *Acetona                                    | 21,5                   |
| **Água:Metanol (50:50)                      | 56,5                   |
| **Água:Etanol (50:50)                       | 52,25                  |
| **Água:Acetona (50:50)                      | 50,5                   |
| **Metanol:Etanol (50:50)                    | 28,5                   |
| **Metanol:Acetona (50:50)                   | 27,0                   |
| **Etanol:Acetona (50:50)                    | 22,75                  |
| **Água:Metanol:Etanol (33:33:33)            | 45,83                  |
| **Água:Metanol:Acetona (33:33:33)           | 44,66                  |
| **Água:Etanol:Acetona (33:33:33)            | 41,83                  |
| **Metanol:Etanol:Acetona (33:33:33)         | 26,16                  |
| **Água:Metanol:Etanol:Acetona (25:25:25:25) | 39,625                 |

\*Constantes dos solventes apresentados por BRAGA, 2006.

\*\*Constantes dos sistemas de solventes calculadas a partir das proporções dos solventes primários no sistema.

Fonte: Autoria Própria.

Avaliando os resultados obtidos para a miricitrina, percebe-se o motivo pelo qual o metanol, dentre os solventes isolados, apresentou o melhor desempenho extrativo. O metanol isoladamente apresenta a maior constante dielétrica (33), sendo o valor de constante mais próximo ao dos valores que apresentaram maior eficiência na extração (AD, ABD, ACD e ABCD).

Em relação aos sistemas binários, a mistura de água:metanol (AB) proporcionou um aumento em relação aos solventes isolados, entretanto a constante dielétrica resultante obteve um valor elevado (56,5), indicando um sistema muito polar. Em comparação com a mistura AB, os sistemas contendo água:etanol (AC) e água:acetona (AD) apresentaram constantes dielétricas um pouco inferiores (52,25 e 50,5, respectivamente) e melhores desempenhos extrativos em relação tanto a miricitrina, quanto ao flavonoide 2, com aumentos significativos com a diminuição das constantes dielétricas dos sistemas. As faixas de constantes dielétricas que obtem os melhores desempenhos para a extração dos flavonoides das folhas de pitanga são

superiores à 33 (valores da constante dielétrica do metanol) até aproximadamente 50, valor da constante da mistura binária com maior rendimento extrativo.

Em relação as misturas terciárias e quaternária, três apresentaram os melhores desempenhos. As misturas ternárias de água:metanol: acetona (ABD); água:etanol:acetona (ACD); e, a mistura quaternária (ABCD). Estas misturas apresentaram constantes dielétricas na faixa de 39 a 44, e obtiveram os maiores teores para os dois flavonoides. A mistura dos três solventes orgânicos (BCD) apresentou menores resultados, já esperados pela ausência da água. A mistura terciária ABC, embora apresente constante dielétrica de 45,86, obteve menores rendimentos para os flavonoides que as outras misturas terciárias e a quaternária, o que pode indicar que a presença de acetona nas misturas incrementa a seletividade do sistema.

#### c) Teores de ácido gálico e ácido elágico

A determinação do teor de taninos por CLAE indica que o extrato aquoso foi o que apresentou maior eficiência de extração, tanto para o ácido elágico quanto para o ácido gálico (Tabela 13) o que pode ser correlacionado com a elevada solubilidade destas substâncias em água e por sua afinidade com solventes polares (QUIDEAU *et al.*, 2011). Analisando as misturas dos diferentes solventes, foi possível observar que os sistemas não obtiveram os melhores desempenhos para a extração, ao contrário dos resultados observados para os dados de espectrofotometria que revelaram sinergismo significativo para a maioria dos sistemas testados.

Para o ácido gálico os solventes puros etanol e acetona foram os menos eficazes na extração (0,016%). O mesmo comportamento foi observado para a mistura binária destes dois solventes, evidenciando que mesmo em mistura, não há efeito sinérgico para esta resposta. Para o ácido elágico, os piores desempenhos foram apresentados pelos solventes metanol e acetona, seguidos pela mistura binária destes dois solventes. De maneira geral, os dados obtidos para a avaliação do rendimento de marcadores revelaram a importância da água como solvente extrator.

**Tabela 14** - Teores de ácido gálico (AG) e ácido elágico (AE) obtidos no simplex centróide.

| Extrato | H <sub>2</sub> O | MeOH  | EtOH  | Acetona | AG                    | AE                     |
|---------|------------------|-------|-------|---------|-----------------------|------------------------|
| 1       | 1                | 0     | 0     | 0       | 0,133 ± 0,1002 (1,93) | 0,086 ± 0,0000 (0,03)  |
| 2       | 0                | 1     | 0     | 0       | 0,027 ± 0,0012 (4,26) | 0,011 ± 0,0007 (6,69)  |
| 3       | 0                | 0     | 1     | 0       | 0,011 ± 0,0045 (4,49) | 0,027 ± 0,0013 (5,09)  |
| 4       | 0                | 0     | 0     | 1       | 0,010 ± 0,0005 (4,41) | 0,006 ± 0,0004 (5,07)  |
| 5       | 0,5              | 0,5   | 0     | 0       | 0,047 ± 0,0002 (0,35) | 0,019 ± 0,0003 (1,35)  |
| 6       | 0,5              | 0     | 0,5   | 0       | 0,039 ± 0,0007 (1,78) | 0,017 ± 0,0001 (0,84)  |
| 7       | 0,5              | 0     | 0     | 0,5     | 0,048 ± 0,0009 (1,93) | 0,019 ± 0,0006 (3,03)  |
| 8       | 0                | 0,5   | 0,5   | 0       | 0,020 ± 0,0004 (2,11) | 0,034 ± 0,0006 (1,76)  |
| 9       | 0                | 0,5   | 0     | 0,5     | 0,028 ± 0,0009 (3,25) | 0,010 ± 0,0002 (1,87)  |
| 10      | 0                | 0     | 0,5   | 0,5     | 0,017 ± 0,0004 (2,26) | 0,037 ± 0,0002 (3,33)  |
| 11      | 0,333            | 0,333 | 0,333 | 0       | 0,032 ± 0,0012 (3,63) | 0,016 ± 0,0013 (0,61)  |
| 12      | 0,333            | 0     | 0,333 | 0,333   | 0,034 ± 0,0011 (3,15) | 0,013 ± 0,0001 (2,41)  |
| 13      | 0,333            | 0,333 | 0     | 0,333   | 0,035 ± 0,0011 (3,15) | 0,020 ± 0,0029 (14,27) |
| 14      | 0                | 0,333 | 0,333 | 0,333   | 0,022 ± 0,0004 (1,92) | 0,019 ± 0,0013 (0,61)  |
| 15      | 0,25             | 0,25  | 0,25  | 0,25    | 0,038 ± 0,0007 (1,78) | 0,016 ± 0,0014 (7,94)  |

Onde: H<sub>2</sub>O: água; MeOH: metanol; EtOH: etanol; F1: Flavonoide 1; F2: Flavonoide2. Média ± Desvio Padrão (Desvio Padrão Relativo).

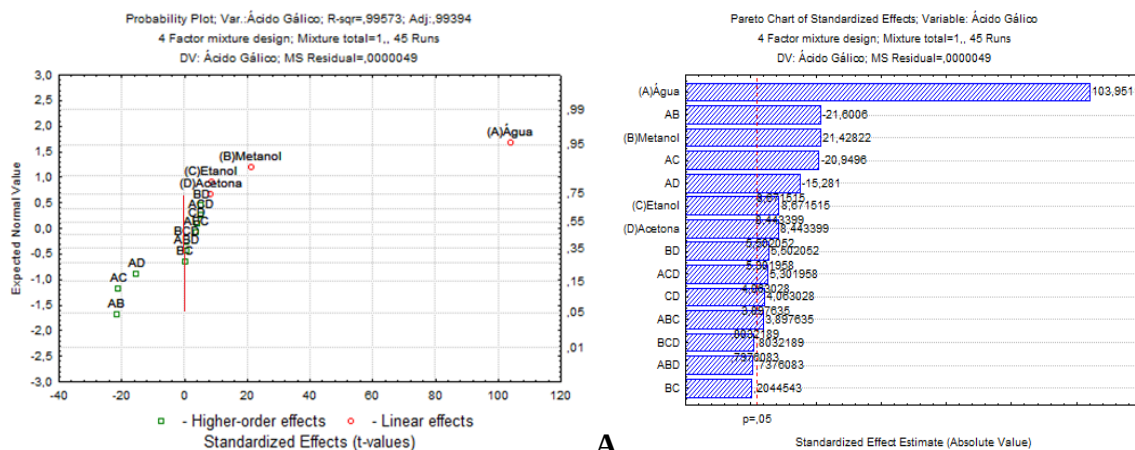
Fonte: Autoria Própria.

Em relação a influência dos fatores sobre o teor de ácido gálico, maior influência foi atribuída ao termo linear do fator água (+103,95) seguido pelo fator metanol (+21,42). Para os demais sistemas, sejam os seus termos lineares ou as interações, o rendimento foi sempre inferior à resposta observada para a água (Figura 18). Este resultado está relacionado com a polaridade e afinidade com água do ácido gálico, e, é explicado pela presença de grupamento ácido e por sua estrutura poli-hidroxilada (TSAO, 2010).

Para o ácido elágico, a maior influência também foi verificada para a água (+109,06), entretanto houve maior influência de outros fatores como etanol (+33,52) e de misturas contendo este solvente, CD (etanol:acetona – +20,56) e BC (metanol:etanol – +16,56), indicando que o composto possui afinidade também com os solventes orgânicos polares (Figura 19).

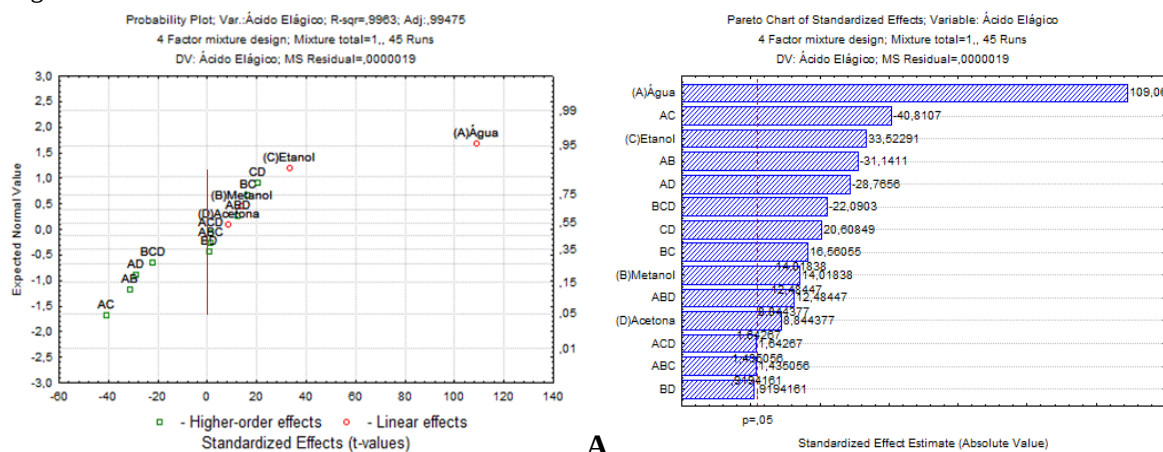
Nos gráficos de probabilidade normal considerando o ácido gálico, por exemplo, houve os fatores apresentaram menor influência e permaneceram próximos à linha de significância no gráfico de paretos.

**Figura 18** - Gráficos de Probabilidade Normal (A) e de Efeitos Padronizados (Pareto) (B) para a variável de Ácido Gálico.



Fonte: Autoria Própria.

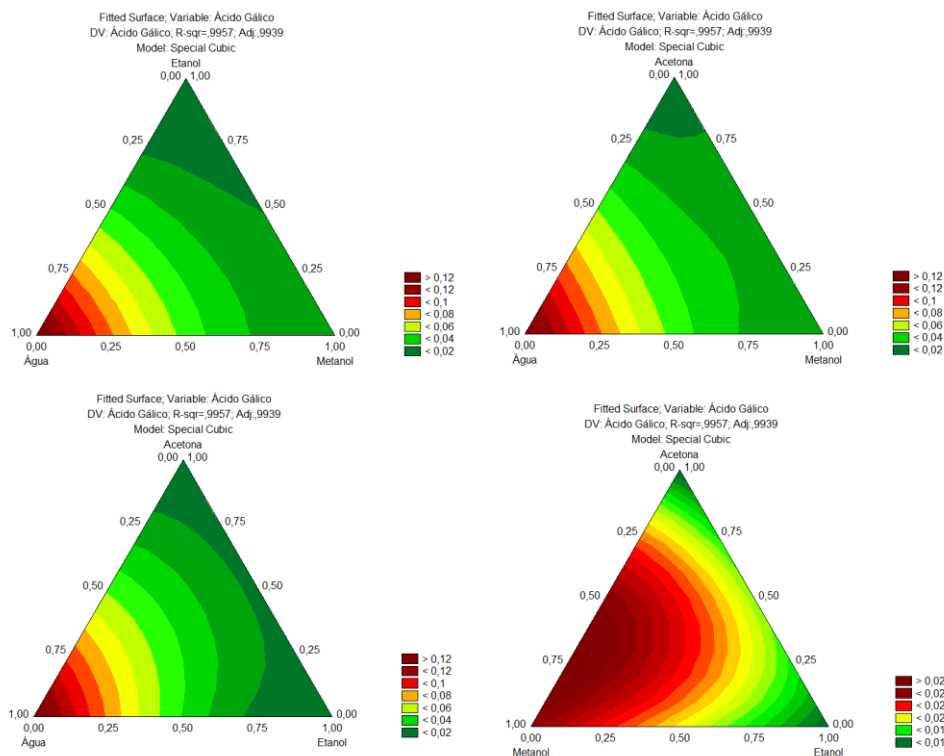
**Figura 19** - Gráficos de Probabilidade Normal (A) e de Efeitos Padronizados (Pareto) (B) para a variável Ácido Elágico.



Fonte: Autoria Própria.

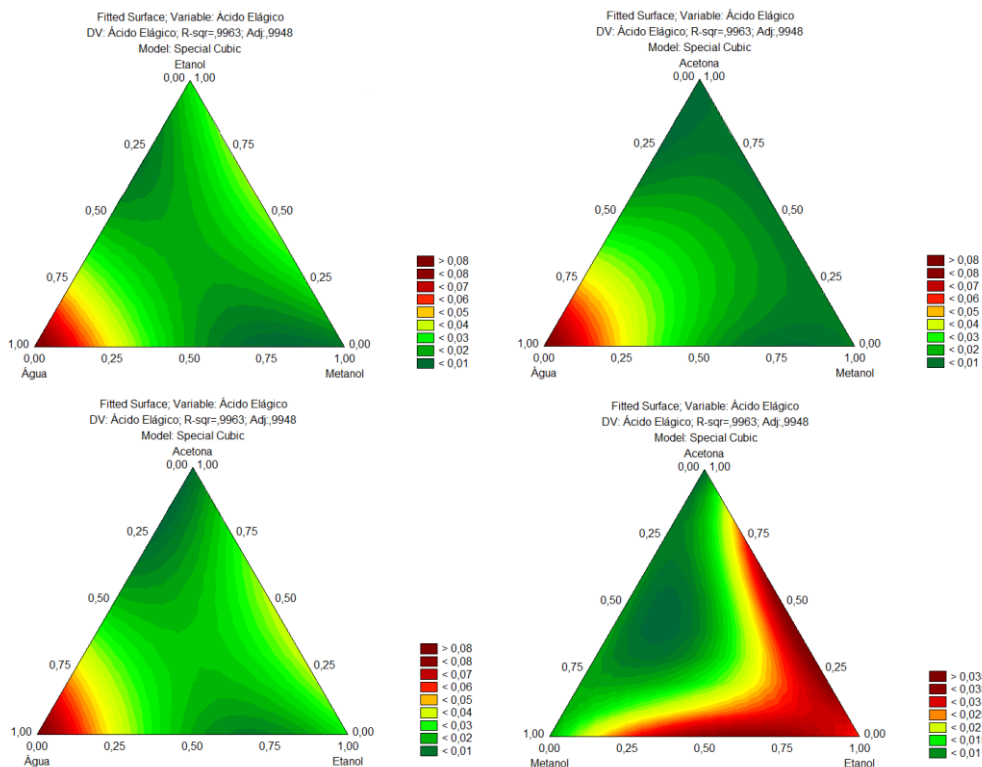
Analisando os gráficos de contorno para os dois monômeros, maior teor foi observado em regiões com maior concentração de água. Quando a água não está presente, as regiões de coloração vermelha se deslocam para os solventes aos quais as substâncias possuem maior afinidade, metanol para o ácido gálico e etanol para o ácido elágico (Figuras 20 e 21).

**Figura 20** - Gráficos de contorno obtidos para os teores de Ácido Gálico (AG) nas diferentes composições do simplex centroide.



Fonte: Autoria Própria.

**Figura 21** - Gráficos de contorno obtidos para os teores de Ácido Elágico (AE) nas diferentes composições do simplex centroide.



Fonte: Autoria Própria.

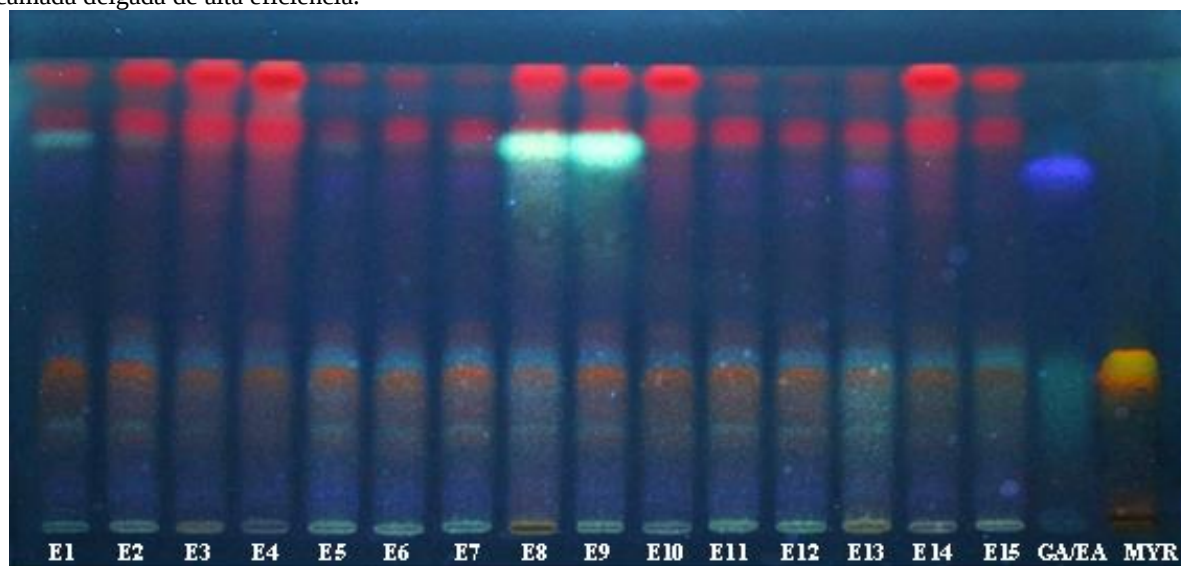


contendo as mesmas bandas, porém, há uma evidente diferença nas intensidades das manchas existentes nos diferentes extratos, o que pode indicar maior/menor concentração da substância no extrato (Figura 23).

Mesmo que os extratos tenham apresentado em seu perfil bandas correspondentes a ácido gálico, ácido elágico e a miricitrina, em concentrações distintas, evidenciadas pelos diferentes níveis de intensidade, alguns extratos possuem bandas que não são reproduzidas por todas as misturas. Demonstrando a diferença na seletividade destes sistemas de extração. Um exemplo é a banda de coloração esverdeada que é evidenciada com bastante intensidade pelos extratos 1, 8 e 9, e em menor intensidade nos extratos 2, 5 e 7.

Este tipo de análise é complementar, realizada para a identificação e confirmação do perfil químico típico dos extratos, que a partir da comparação com *fingerprints* obtidos para extratos com atividade biológica confirmada, pode evidenciar a manutenção da atividade, de acordo com a presença das substâncias marcadoras. Além de servir como ferramenta para autenticação da identidade do material vegetal e de seus derivados (GOODARZI *et al.*, 2013; BEZERRA *et al.*, 2018). Neste sentido, para a obtenção de respostas mais conclusivas e definitivas, estas análises qualitativas devem estar associadas com dados quantitativos.

**Figura 23** - Fingerprint para polifenóis dos extratos produzidos por simplex centróide através de cromatografia de camada delgada de alta eficiência.



Onde: E1-E15: Extrato 1-15; GA: Ácido Gálico; EA: Ácido Elágico; MYR: Miricitrina.

Fonte: Autoria própria.

#### 5.2.1.1.7 Avaliação das respostas significativas e modelagem de novas misturas

As análises das respostas individuais possibilitaram a identificação dos fatores com influência sobre os teores de resíduo sólido e de marcadores. Os gráficos de contorno mostraram os pontos em que as misturas obtiveram os maiores teores, auxiliando na escolha das condições ideais para que o maior desempenho extrativo fosse alcançado. Foi possível observar que, para as análises dos teores de flavonoides e taninos por UV-Vis, a maioria das misturas apresentou maiores teores que os solventes isolados, principalmente as regiões que continham misturas com elevadas proporções de água.

Quando os gráficos de contorno obtidos para os teores das análises por UV-Vis são comparadas com as respostas geradas na avaliação por CLAE dos marcadores, na extração de ácido gálico e elágico a eficiência apresentou queda quando a extração foi realizada por sistemas de solventes, apresentando máximo desempenho de extração com a utilização de água. Entretanto, as análises dos flavonoides por CLAE apresentaram respostas semelhantes às obtidas por espectrofotometria, com teores mais elevados nas regiões de misturas. Estes resultados servem para determinar quais são os principais fatores que podem ser utilizados para os modelos de previsão.

Entretanto, diante das avaliações de cada variável individualmente, e de respostas contrárias que algumas das variáveis de saída tiveram entre si, apenas a avaliação dos gráficos de contorno não foi suficiente para definir a melhor mistura de solventes. Neste sentido, foram avaliadas novas misturas através de estimativas e previsões obtidas utilizando as equações, superfícies de resposta e parâmetros de *desirability* como abordagem de avaliação dos múltiplos fatores.

A ferramenta da função *desirability* permite a análise e otimização simultânea de diversas respostas sob análise, permitindo a que sejam determinados os valores de *desirability* global, envolvendo todos os fatores em análise, além das estimativas para cada performance de cada variável dependente (SAFARALIE; FATEMI; SALIMI, 2010; YOSHIARA *et al.*, 2012; ADALARASAN; SANTHANAKUMAR, 2015; ESMIZADEH *et al.*, 2015; FADIL *et al.*, 2018; NIST/SEMATECH, 2019).

Estas misturas foram baseadas principalmente nos fatores que obtiveram maior eficiência, assim foram realizadas misturas binárias de água e acetona; ternárias de água:metanol:etanol e água:etanol:acetona; e, quaternárias com todos os componentes avaliados. Assim, novas proporções foram testadas, duas binárias; três ternárias; e duas

quaternárias; e, a eficiência das novas misturas foi determinada de acordo com os parâmetros de resíduo seco, de flavonoides e de taninos.

Os resultados experimentais obtidos para os extratos provenientes das novas misturas apresentaram comportamento semelhante ao observado para as misturas de maior eficiência no estudo do simplex centroide (Tabela 14).

**Tabela 15** - Respostas de teores de resíduo sólido, flavonoides e taninos totais por espectrofotometria UV-Vis, Eficiência de extração para flavonoides e taninos, e os marcadores ácido gálico e elágico e os flavonoides miricitrina e flavonoide 2 expresso em miricitrina, para os extratos modelados.

| <b>Misturas de solventes<br/>(proporções)</b> | <b>RS (%)</b> | <b>TFT (%)</b> | <b>TT (%)</b> | <b>EEF</b> | <b>EET</b> | <b>AG (%)</b>    | <b>AE (%)</b>    | <b>MYR (%)</b>   | <b>F2 (%)</b>    |
|-----------------------------------------------|---------------|----------------|---------------|------------|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>AQ/ACT<br/>(0,4/0,6)</b>                   | 2,95 (2,94)   | 1,05 (2,22)    | 6,86 (0,80)   | 0,333      | 2,325      | 0,0389<br>(4,29) | 0,0093<br>(6,91) | 0,3100<br>(4,31) | 0,0345<br>(5,32) |
| <b>AQ/ACT<br/>(0,6/0,4)</b>                   | 3,15 (0,95)   | 1,06 (0,56)    | 6,71 (0,52)   | 0,360      | 2,130      | 0,0379<br>(6,17) | 0,0102<br>(1,87) | 0,2656<br>(0,57) | 0,0286<br>(1,54) |
| <b>AQ/ME/ET<br/>(0,43/0,24/0,33)</b>          | 3,01 (0,69)   | 1,10 (0,53)    | 6,70 (0,50)   | 0,342      | 2,225      | 0,0423<br>(1,30) | 0,1331<br>(4,29) | 0,3161<br>(0,49) | 0,0490<br>(4,01) |
| <b>AQ/ET/ACT<br/>(0,5/0,2/0,3)</b>            | 3,41 (0,45)   | 1,19 (0,26)    | 6,66 (1,61)   | 0,326      | 1,953      | 0,0430<br>(1,63) | 0,0117<br>(3,47) | 0,3432<br>(4,49) | 0,0393<br>(4,26) |
| <b>AQ/ET/ACT<br/>(0,5/ 0,25/ 0,25)</b>        | 3,40 (0,61)   | 1,12 (0,57)    | 6,81 (0,16)   | 0,308      | 2,003      | 0,0435<br>(1,69) | 0,1661<br>(4,59) | 0,3502<br>(1,27) | 0,0525<br>(0,55) |
| <b>AQ/ME/ET/ACT<br/>(0,4 /0,1/0,2/ 0,3)</b>   | 3,26 (0,98)   | 1,13 (0,77)    | 6,61 (2,67)   | 0,324      | 2,028      | 0,0352<br>(1,29) | 0,2496<br>(0,83) | 0,3177<br>(0,37) | 0,0399<br>(4,88) |
| <b>AQ/ME/ET/ACT<br/>(0,46/0,13/0,18/0,23)</b> | 3,40 (2,65)   | 1,35 (0,72)    | 8,65 (0,12)   | 0,399      | 2,544      | 0,0451<br>(0,76) | 0,2634<br>(1,40) | 0,4659<br>(0,38) | 0,0523<br>(1,74) |

AQ – água; Me – Metanol; ET – Etanol; ACT – Acetona; RS – Resíduo Sólido; TFT – Teor de flavonoides totais; TT – Teor de taninos totais. Resultados expressos em Média (Desvio Padrão Relativo).

Fonte: Autoria Própria.

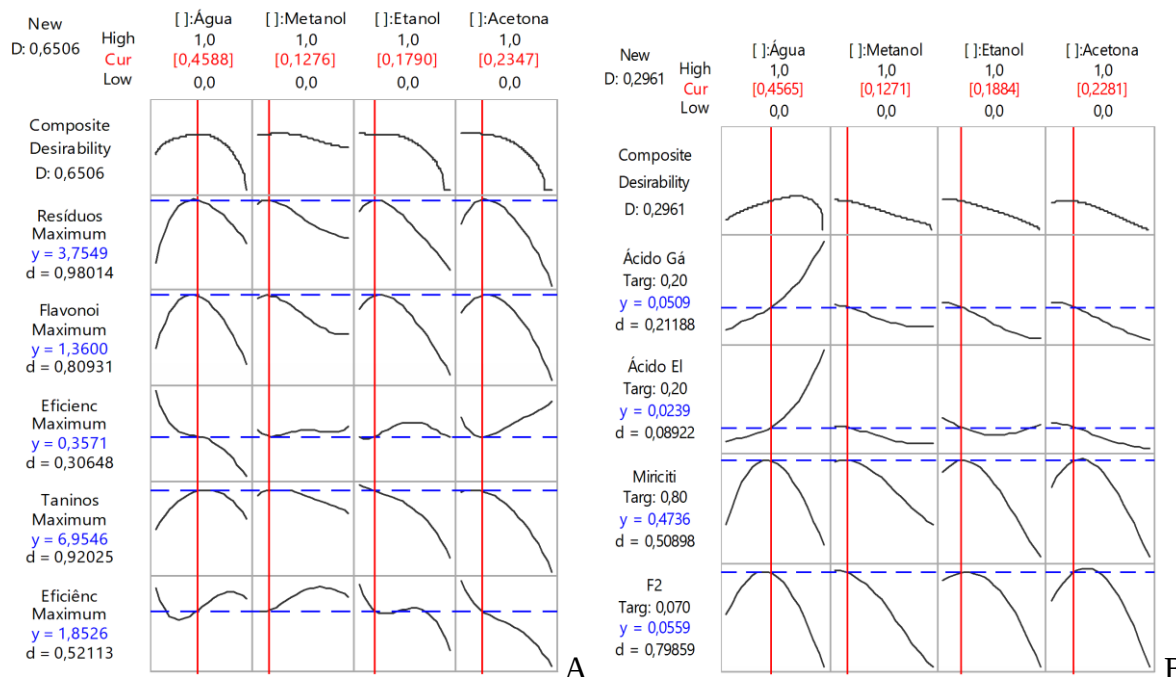
Avaliando as respostas obtidas nas análises quantitativas de resíduo seco não foram detectados incrementos significativos nas respostas dos novos extratos, havendo diversas variações e diminuição nas respostas. Para os teores de flavonoides totais, foram detectadas diversas flutuações nas respostas, na maioria dos casos houve diminuição nas respostas com valores inferiores aos obtidos nas misturas preparadas para a aquisição do modelo, exceto para a mistura quaternária de água:metanol:etanol:acetona (46:13:18:23, v/v/v/v), que obteve valores equivalentes à máxima resposta para flavonoides.

Em relação ao teor de taninos totais, a mistura quaternária de água:metanol:etanol:acetona (46:13:18:23, v/v/v/v), apresentou incremento sobre as respostas, obtendo teor médio de 8,65 (0,12%) enquanto a mistura que obteve maior resposta na etapa anterior possui 7,25% (0,38%).

No que diz respeito às respostas obtidas para os marcadores por CLAE, a mistura água:metanol:etanol:acetona (46:13:18:23, v/v/v/v), obteve os melhores teores dentre os extratos modelados, resultando em incremento nos teores de ácido elágico, miricitrina e flavonoide 2.

Considerando as curvas apresentadas nos dados dos parâmetros *desirability* (Figura 24), a mistura quaternária de água:metanol:etanol:acetona (46:13:18:23, v/v/v/v) apresenta as proporções favoráveis para resultar no máximo desempenho pelo modelo matemático proposto, encontrando-se alinhadas com os pontos mais elevados das curvas de respostas para cada variável em todos os solventes utilizados neste ensaio. Quando comparados os valores experimentais para resíduo seco, espectrofotometria e CLAE com os calculados pela função *desirability*, foi possível observar que houve grande semelhança entre as variáveis de respostas experimentais e as previstas pelo modelo. Para os teores de taninos totais e para os teores de ácido elágico, os valores foram superiores aos valores preditos, indicando maior eficiência da nova mistura. Estes resultados asseguram que esta combinação de solventes representa a condição mais apropriada extração de maior espectro de polifenóis das folhas de *E. uniflora*.

**Figura 24** - Gráficos de *desirability* para a composição da mistura quaternária de água:metanol:etanol:acetona (46:13:18:23, v/v/v/v) e previsão de teores de resíduos, flavonoides, eficiência de extração de flavonoides totais, taninos totais, eficiência de extração de taninos (A) e para ácido gálico, ácido elágico, miricitrina e F2 (B).

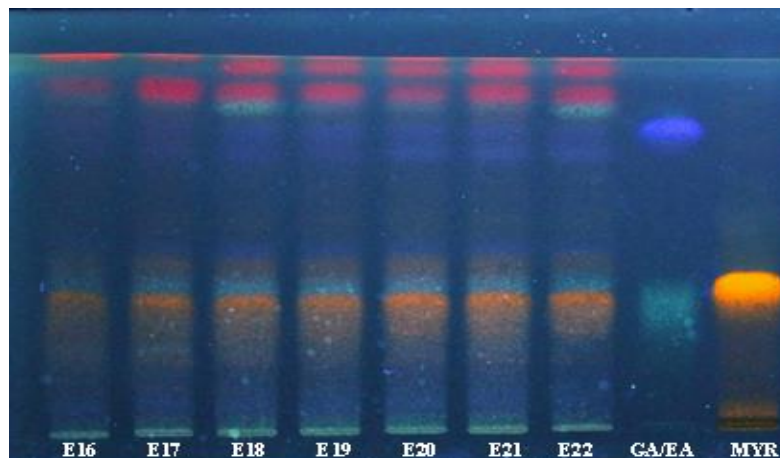


Fonte: Autoria Própria.

Estes resultados permitem inferir que a ferramenta de *desirability* é uma abordagem apropriada para a avaliação e otimização das respostas obtidas pelo planejamento simplex centroide de misturas, alcançando respostas experimentais muito similares às previstas pela função matemática (SAFARALIE, 2010; YOSHIARA *et al.*, 2010; ADALARASAN; SANTHANAKUMAR, 2015; FADIL *et al.*, 2018).

Na análise qualitativa por CCDAE para obtenção do *fingerprint* dos extratos modelados (Figura 25), foi possível visualizar a manutenção do perfil químico nos extratos preparados utilizando os novos sistemas de misturas, evidenciando a presença dos marcadores ácido gálico, ácido elágico e miricitrina. A mistura quaternária de água:metanol:etanol:acetona (46:13:18:23) apresentou manchas de maior intensidade, sugerindo melhor eficiência.

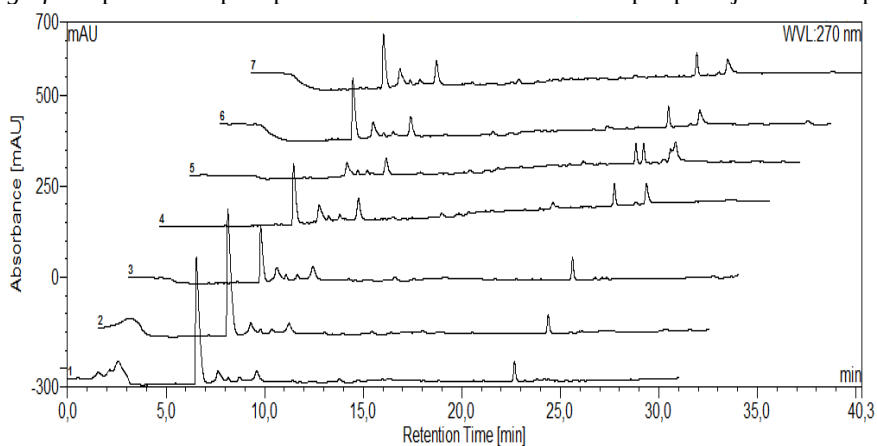
**Figura 25** - *Fingerprint* por CCDAE para polifenóis obtido dos extratos modelados por planejamento simplex centroide.



Onde: E16-E22: Extrato 16-22; GA: Ácido Gálico; EA: Ácido Elágico; MYR: Miricitrina.  
Fonte: Autoria Própria.

O perfil cromatográfico por CLAE também foi realizado com os extratos modelados (Figura 26). Foram obtidas respostas semelhantes às descritas para espécie em número de picos totais, e nas regiões de 7-11 min e de 22-27, onde os picos dos marcadores foram detectados. Os dados qualitativos por CLAE, assim como os quantitativos, apontam que a mistura quaternária de água:metanol:etanol:acetona (46:13:18:23) apresentou o melhor desempenho.

**Figura 26** - *Fingerprint* por CLAE para polifenóis de extratos modelados por planejamento simplex centroide.



Fonte: Autoria Própria.

### 5.2.3 Planejamento fatorial: otimização de método extrativo

Na etapa seguinte do processo de otimização do método extrativo para as folhas de *Eugenia uniflora*, foi utilizado o planejamento fatorial para a seleção das variáveis utilizadas para a execução do método (Tabela 15).

**Tabela 16** - Matriz do planejamento fatorial para avaliar a influência da quantidade de droga e método extrativo sobre as respostas dos teores de resíduos, flavonoides, taninos e eficiência de extração.

| Variáveis Naturais |       | Variáveis Codificadas |       | Respostas – Variáveis Dependentes* |             |              |      |      |               |               |               |               |
|--------------------|-------|-----------------------|-------|------------------------------------|-------------|--------------|------|------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Método             | Droga | Método                | Droga | RS (%)                             | TFT (%)     | TT (%)       | EEF  | EET  | GA (%)        | EA (%)        | MYR (%)       | F2 (%)        |
| R                  | 5     | -1                    | -1    | 1,62 (1,55)                        | 1,38 (0,59) | 9,05 (0,37)  | 0,85 | 5,57 | 0,3138 (0,29) | 0,1835 (5,03) | 1,0134 (0,56) | 0,1529 (3,55) |
| R                  | 10    | -1                    | 0     | 3,37 (2,19)                        | 1,26 (0,45) | 6,66 (0,25)  | 0,37 | 1,98 | 0,1016 (0,33) | 0,0556 (3,18) | 0,9148 (2,14) | 0,0453 (3,59) |
| R                  | 15    | -1                    | 1     | 4,95 (3,13)                        | 1,15 (2,45) | 5,54 (0,68)  | 0,23 | 1,12 | 0,0340 (1,47) | 0,0180 (6,03) | 0,9111 (2,92) | 0,0129 (4,48) |
| U                  | 5     | 0                     | -1    | 2,05 (4,14)                        | 1,36 (0,18) | 9,54 (0,23)  | 0,66 | 4,65 | 0,2250 (0,51) | 0,1995 (2,01) | 0,9766 (0,82) | 0,1634 (299)  |
| U                  | 10    | 0                     | 0     | 3,51 (5,16)                        | 1,26 (0,54) | 8,19 (0,48)  | 0,36 | 2,34 | 0,0789 (5,55) | 0,0604 (5,89) | 0,9645 (2,48) | 0,0503 (5,87) |
| U                  | 15    | 0                     | 1     | 5,21 (2,47)                        | 1,11 (0,20) | 5,55 (0,30)  | 0,21 | 1,07 | 0,0287 (4,87) | 0,0172 (5,06) | 0,9608 (0,46) | 0,0172 (4,82) |
| T                  | 5     | 1                     | -1    | 2,07 (2,66)                        | 1,52 (0,51) | 10,80 (1,07) | 0,73 | 5,21 | 0,2632 (0,31) | 0,2019 (3,54) | 1,2327 (2,02) | 0,2038 (3,22) |
| T                  | 10    | 1                     | 0     | 3,14 (1,29)                        | 1,26 (0,31) | 8,44 (0,93)  | 0,40 | 2,69 | 0,0648 (4,21) | 0,0515 (3,02) | 0,9130 (3,04) | 0,0502 (1,16) |
| T                  | 15    | 1                     | 1     | 4,70 (2,95)                        | 1,11 (0,69) | 5,99 (0,32)  | 0,24 | 1,27 | 0,0273 (4,87) | 0,0169 (5,09) | 0,8724 (3,21) | 0,0162 (1,68) |

R – Refluxo; U – Ultrassom; T – Turbólise; ME – Método Extrativo; RS – Resíduo seco; TFT – Flavonoides Totais; TT – Taninos Totais; EEF – Eficiência de Extração de Flavonoides; EET – Eficiência de Extração Taninos.

\*Valores expressos em Média (Desvio Padrão Relativo), todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Fonte: Autoria Própria.

Com o auxílio do software Statística 8 as variáveis de resposta foram analisadas e seus efeitos foram mensurados, e suas equações matemáticas foram geradas. As respostas foram analisadas segundo os modelos lineares e quadráticos, entretanto os modelos lineares não foram suficientes para descrever as respostas, Os modelos quadráticos apresentaram elevados coeficientes de determinação ( $R^2$ ), superiores a 0,99, (demonstrando que os modelos obtidos explicam ao menos 99% das respostas experimentais) (Tabela 16). Além disso, a análise de variância dos modelos resultou em elevados valores para  $F$  e baixos valores de  $p$  (próximos de zero e menores que 5%) indicando que a hipótese alternativa da significância da regressão é verdadeira, afirmando que as regressões dos modelos apresentam elevada significância e que se apresentam bem ajustadas, satisfazendo os parâmetros recomendados na literatura para a validação dos modelos matemáticos. Nestas análises, o teste de falta de ajuste não apresentou significância (WEHRLÉ *et al.*, 1993; CALLEGARI-JACQUES, 2003; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; MONTGOMERY, 2013; MYERS *et al.*, 2016). As equações resultantes da análise das respostas e seus  $R^2$  estão apresentados na tabela 16.

**Tabela 17** - Valores de coeficiente de determinação e equações matemáticas obtidas no planejamento fatorial.

| Respostas                             | Equação Matemática                                                                                                        | $R^2$   |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>Resíduo Sólido</b>                 | $RS = 3,5248 + 1,5188x + 0,09777x^2 - 0,005y - 0,2805y^2 - 0,175xy - 0,0866xy^2 + 0,165x^2y - 0,0333x^2y^2$               | 0,99418 |
| <b>Flavonoides</b>                    | $TFT = 1,2522 - 0,1225x - 0,01645x^2 + 0,00286y + 0,00419y^2 - 0,04372xy + 0,03834xy^2 + 0,02217xy + 0,048542x^2y^2$      | 0,99493 |
| <b>Eficiência de Ext. Flavonoides</b> | $EEF = 0,35858 - 0,22426x + 0,07957x^2 + 0,01401y + 0,02895y^2 + 0,03058xy - 0,05472xy^2 - 0,42396x^2y + 0,045566x^2y^2$  | 0,99635 |
| <b>Taninos</b>                        | $TT = 8,19116 - 1,99280x - 0,647662x^2 + 0,88947y - 0,63794y^2 - 0,32808xy - 0,08870xy^2 - 0,33902x^2y + 0,93929x^2y^2$   | 0,99942 |
| <b>Eficiência de Ex. Taninos</b>      | $EET = 2,33983 - 1,79154x + 0,51819x^2 + 0,35584y - 0,00397y^2 + 0,12863xy - 0,30735xy^2 - 0,40738x^2y + 0,44117x^2y^2$   | 0,99759 |
| <b>Ácido Gálico</b>                   | $AG = 0,07889 - 0,09815x + 0,04791x^2 - 0,01841y + 0,00434y^2 + 0,00913xy - 0,03262xy^2 + 0,005265x^2y + 0,02959x^2y^2$   | 0,99955 |
| <b>Ácido Elágico</b>                  | $AE = 0,061098 - 0,090956x + 0,04742x^2 - 0,00152y - 0,00703y^2 - 0,004741xy + 0,00344xy^2 + 0,00596x^2y + 0,00373x^2y^2$ | 0,9962  |
| <b>Miricitrina</b>                    | $MYR = 0,32146 - 0,43494x + 0,22022x^2 - 0,00031y - 0,016855y^2 - 0,05553xy - 0,07718xy^2 + 0,05392x^2y + 0,08659x^2y^2$  | 0,99962 |
| <b>F2</b>                             | $F2 = 0,05032 - 0,07290x + 0,040189x^2 + 0,00345y - 0,00362y^2 - 0,012047xy - 0,00731xy^2 + 0,00998x^2y + 0,00818x^2y^2$  | 0,99531 |

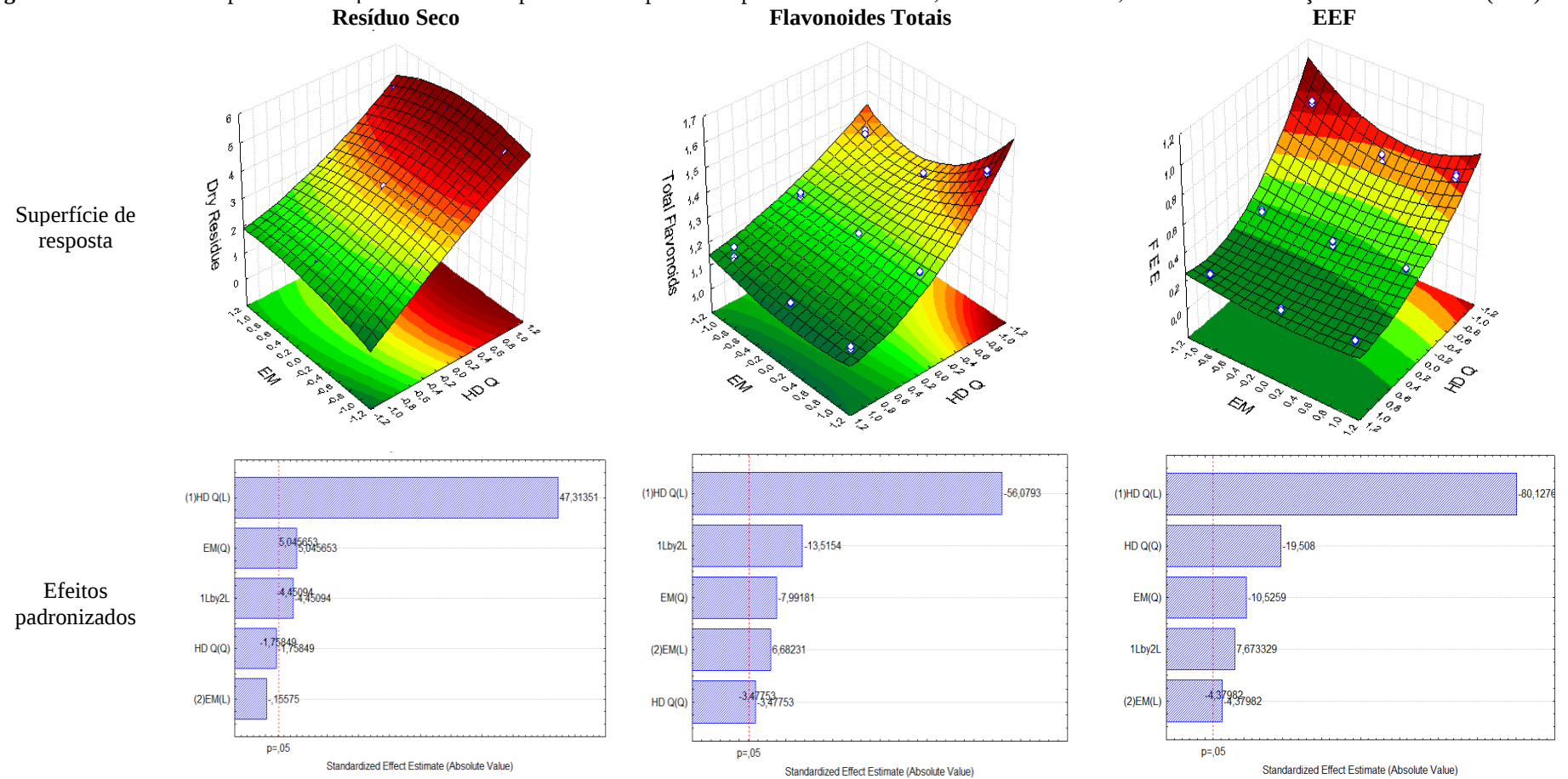
Fonte: Autoria Própria.

Os fatores individuais e a interação destes, estão expressos no gráfico de Paretos (efeitos padronizados) nas Figuras 27-30. Os gráficos de efeitos padronizados revelaram que tanto os fatores principais, quanto a interação entre os fatores apresentaram influência significativa sobre grande parte das variáveis dependentes estudadas. Neste caso, a variabilidade das

respostas observadas para o resíduo seco, flavonoides, taninos, e eficiência de extração de taninos e flavonoides, assim como nos teores dos marcadores ácido gálico, ácido elágico e os flavonoides micitrina e F2 foram influenciados pelos ajustes realizados nas variáveis independentes ou de entrada.

Considerando a intensidade dos efeitos das variáveis de entrada, o fator com maior influência sobre as respostas foi a quantidade de droga, que obteve, em todas as variáveis dependentes, valores que ultrapassaram a linha de significância nos gráficos de paretos (RS: +47,31; FT: -56,07; TT: -164,73; EEF: -80,12; EET: -82,94; AG: -31,07; AE: -69,06; MYR: -42,47; F2: -42,03).

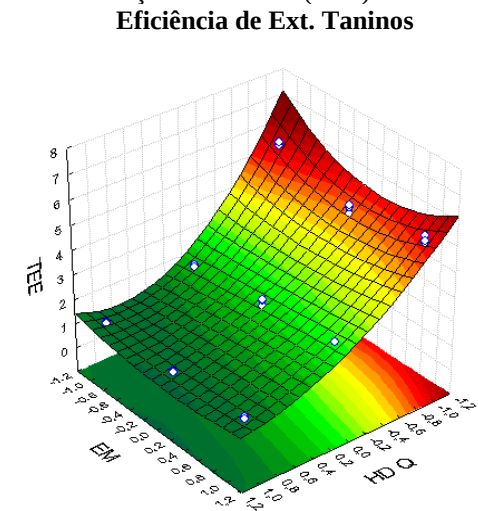
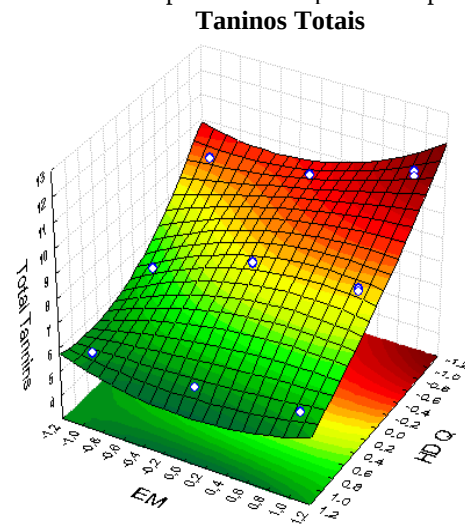
**Figura 27** - Gráficos de superfície de resposta e de efeitos padronizados para as respostas: Resíduo Seco, Flavonoides Totais, Eficiência de Extração de Flavonoides (EEF).



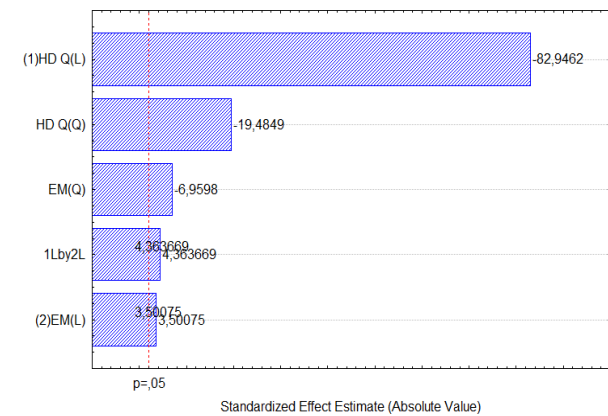
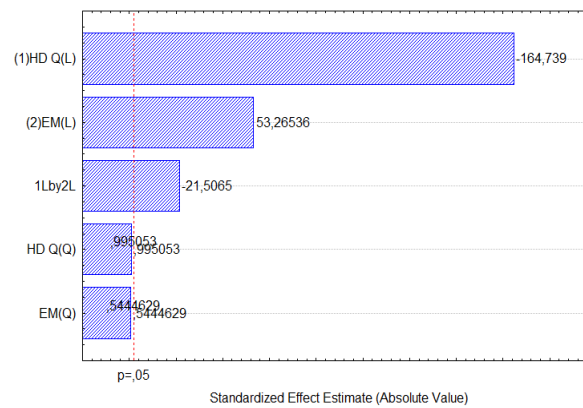
Fonte: Autoria Própria.

**Figura 28** - Gráficos de superfície de resposta e de efeitos padronizados para as respostas: Taninos Totais e Eficiência de Extração de Taninos (EET).

Superfície de resposta



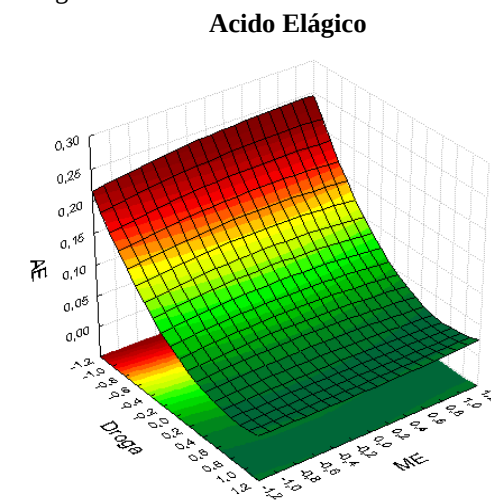
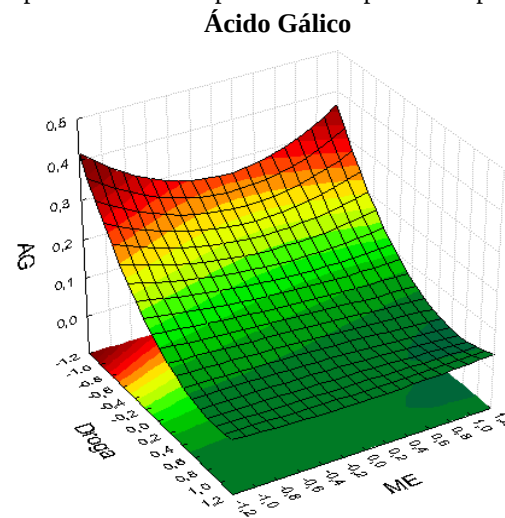
Efeitos padronizados



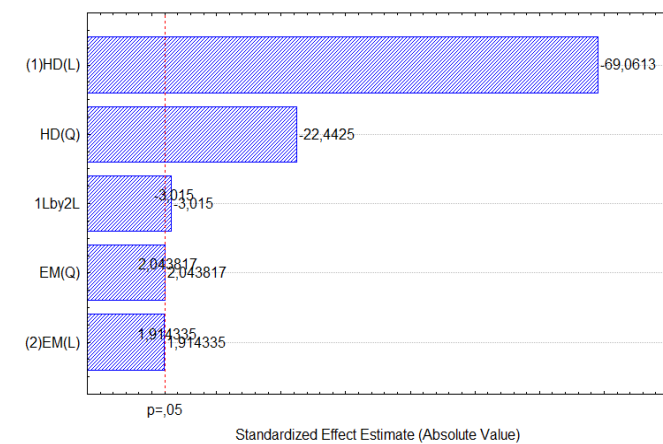
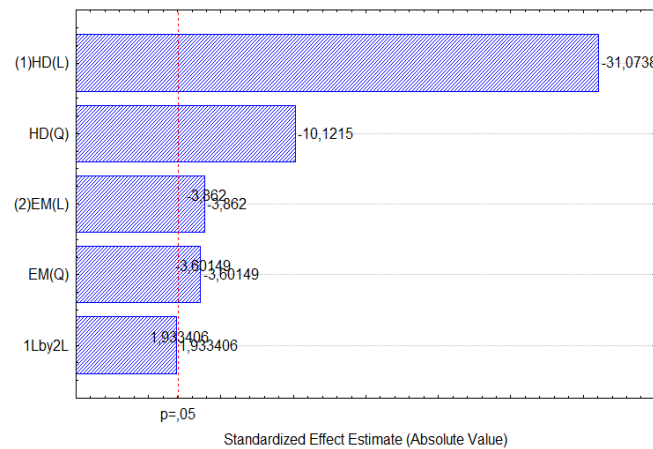
Fonte: Autoria Própria.

**Figura 29** - Gráficos de superfície de resposta e de efeitos padronizados para as respostas: Ácido Gálico, Ácido Elágico.

Superfície de resposta



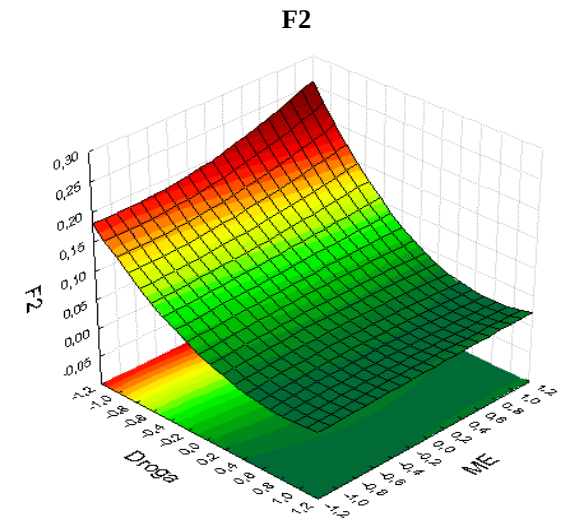
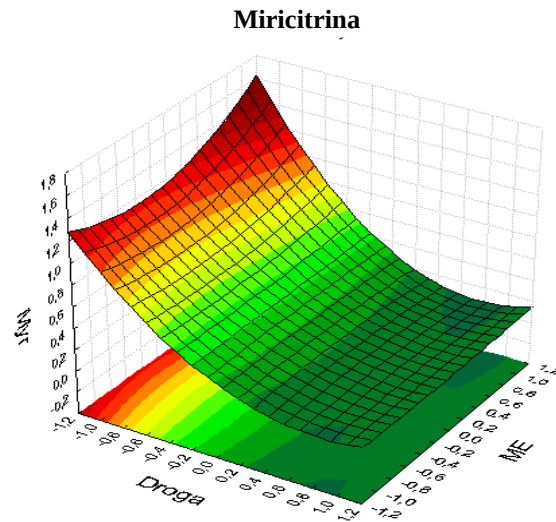
Efeitos padronizados



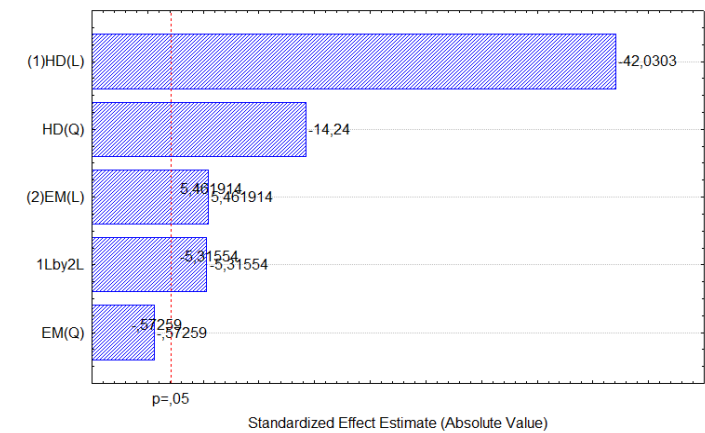
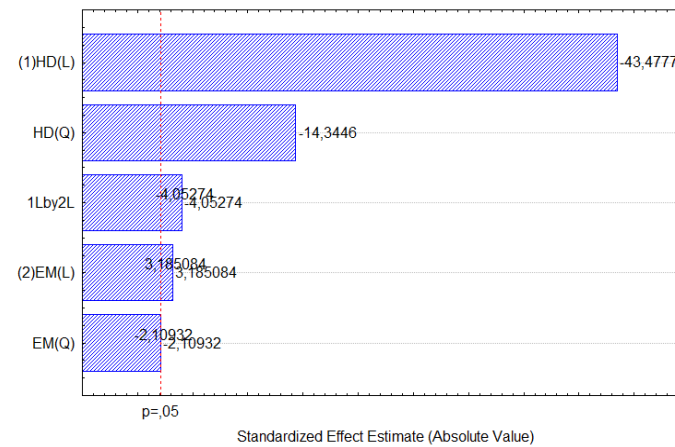
Fonte: Autoria Própria.

**Figura 30** - Gráficos de superfície de resposta e de efeitos padronizados (Pareto) para as respostas: Miricitrina e F2.

Superfície de resposta



Efeitos padronizados



Fonte: Autoria Própria.

Para as análises dos marcadores, as respostas obtidas indicam que a mudança de nível do fator quantidade de droga apresenta influência negativa sobre os teores, ou seja, o aumento da quantidade de droga de 5 g (-1) para os níveis intermediário 10 g (0) e superior 15 g (+1) representam rendimento proporcionalmente menor para os teores dos marcadores e da eficiência de extração. Este rendimento pode estar relacionado com a solubilidade das substâncias no líquido extrator, saturação do sistema de solvente usado, ou mesmo às limitações do processo extrativo (SIMÕES *et al.*, 2017).

No caso do resíduo seco, a influência deste fator foi positiva, o aumento da massa da droga ocasionou maior teor de substâncias extraíveis. Esses resultados estão relacionados com o aumento da concentração de droga para um volume fixo de líquido extrator. Entretanto, o aumento de substâncias extraídas não necessariamente possui uma influência positiva e vantajosa para o objetivo final, visto que objetiva-se aumentar a eficiência da extração das substâncias ativas, o que não ocorreu. Assim, pode-se inferir que o aumento da massa foi resultante de outras substâncias presentes na matriz, mas que não são relacionadas com os marcadores da espécie.

Considerando o fator método extrativo, também foi observada importância estatística para o fator isolado. A variável apresentou influência favorável sobre a maioria das respostas (RS: +5,04; FT: +6,68; TT: +53,26; EEF: -4,37; EET: +3,50; AG: -3,86; AE: +1,91; MYR: +3,18; F2: +5,46). A turbólise resultou no incremento das respostas de resíduo e teor de marcadores, entretanto, apresentou uma contribuição negativa para as variáveis: eficiência de extração de flavonoides e teor de ácido gálico, que pode ser explicada pelo aumento do rendimento de sólidos obtidos

A utilização de métodos sob temperatura proporciona ao sistema um aumento na energia cinética, diminuição da viscosidade do solvente extrator, facilitando o processo de difusão e aumentando a solubilidade das substâncias na matriz, proporcionando um aumento na eficiência da extração (SIMÕES *et al.*, 2017). Entretanto, o método extração sob refluxo (85 °C) não apresentou melhor desempenho em comparação com os métodos de ultrassom e turboextração. A maior eficiência da extração por ultrassom pode estar associada com o fenômeno de cavitação que proporciona o aumento da energia cinética, e a formação de bolhas de ar dentro do sistema, que cria zonas de elevada pressão e temperatura e possibilita ruptura dos tecidos da matriz vegetal, permitindo o aumento da eficiência do processo de difusão, facilitando a remoção dos marcadores de interesse do material vegetal (KHODDAMI *et al.*, 2013).

No caso da turbólise o processo também fornece elevada energia cinética e taxa de cisalhamento, proporcionando a diminuição do tamanho do material em extração, causando o rompimento dos tecidos da matriz pelas lâminas do equipamento e facilitando a entrada do líquido extrator que está sob elevada rotação. A turbólise é uma técnica extrativa bastante versátil, que resulta em um material vegetal praticamente exaurido (SIMÕES *et al.*, 2017).

Considerando a análise das variáveis de resposta, no teor de ácido gálico, foi verificada influência negativa com a mudança de nível para o fator método extrativo. Esta resposta apresenta aparente dependência da aplicação de calor durante o processo de extração, indicando que o aumento da temperatura provém um aumento no desempenho extrativo do ácido gálico, considerando que o calor aumenta a solubilidade da substância e a energia cinética do sistema. Entretanto, esta melhora não acontece para os outros marcadores, o que pode estar relacionado com o tamanho e polaridade da molécula do ácido gálico, onde o menor tamanho possibilita que a energia cinética fornecida tenha impacto sobre a solubilidade da substância e aumente o desempenho da extração. Os resultados obtidos para estes ensaios apontam que a máxima extração dos compostos é evidenciada quando há a próxima mudança de nível no experimento, ou seja, quando os extratos são obtidos por turbólise (QUIDEAU *et al.*, 2010; SIMÕES *et al.*, 2017).

Avaliando os efeitos conjuntos, a maioria das variáveis de resposta não apresenta dependência da interação dos fatores (RS: -4,45; FT: -13,51; TT: -21,50; EEF: +7,67; EET: +4,36; AG: +1,93 (não significativos); AE: -3,01; MYR: -4,05; F2: -5,31). Neste caso, o efeito negativo sobre as variáveis dos marcadores flavonoides totais e taninos totais foram tomadas como referência. Foi possível concluir que a mudança simultânea dos níveis inferiores para os superiores de ambas as variáveis independentes, apresenta na maioria dos casos, uma redução na resposta, demonstrando que a mudança é desfavorável à extração dos compostos.

Para a definição das condições finais, foram avaliados os gráficos de superfície de respostas gerados a partir dos modelos matemáticos obtidos dos dados do ensaio fatorial. A análise destas superfícies revelou que a contribuição da quantidade de droga foi fundamental para todas as variáveis de respostas, especialmente para o teor de sólidos extraídos (influência positiva) e taninos totais (efeito negativo), indicando que o aumento da quantidade de droga não apresenta resposta interessante quando levada em consideração a composição química do extrato e concentração de marcadores. No que pese a menor influência do método de extração sobre as variáveis de respostas, a contribuição do fator também foi importante, especialmente sobre a qualidade química dos extratos.

Assim, diante das respostas para os efeitos padronizados e dos gráficos de superfície de respostas, foi possível concluir que as condições de melhor desempenho para a obtenção de extratos é utilizando o menor nível de quantidade de droga (-1, 5 g de droga) e o maior nível da variável método extrativo (+1, extração por turbólise).

### 5.3 EXTRATOS SECOS POR ASPERSÃO

Após a eleição das condições mais favoráveis para realizar o procedimento extrativo das folhas de *E. uniflora*, em prosseguimento da avaliação das condições tecnológicas para obtenção de formas farmacêuticas derivadas de extratos da pitangueira, foi realizado o processo de secagem por aspersão para verificar a viabilidade de produção de extratos secos a partir do extrato otimizado.

Previamente ao processo de secagem foi determinado o teor de sólidos do extrato produzido para realizar a estimativa da quantidade de extrato seco. O extrato otimizado utilizando o sistema de solventes água:metanol:etanol:acetona (43:13:18:23, v/v/v/v), 5 g de droga e turbólise para a extração, obteve 2,15% (m/m) de sólidos em sua constituição.

O extrato otimizado foi seco por *spray dryer*, obtendo seis diferentes produtos secos: sem adjuvante; e contendo os adjuvantes: dióxido de silício coloidal (DSC) celulose microcristalina, maltodextrina, lactose e goma xantana, todos na proporção de 10% (m/m) considerando o teor de sólidos. Para este ensaio foram secos 1000 mL de cada solução extrativa obtida. Os dados de resíduo sólido e quantidade de material vegetal foram utilizados para a realização dos cálculos de rendimentos obtidos para esta operação (Tabela 17).

**Tabela 18** - Rendimentos dos extratos secos produzidos através de secagem por aspersão.

| Amostra                      | Rendimento |              |            |                 |
|------------------------------|------------|--------------|------------|-----------------|
|                              | Teórico*   | Experimental | Rendimento | Em relação a DV |
|                              | (g)        | (g)          | (%; m/m)   | (%; m/m)        |
| <b>Extrato Sem Adjuvante</b> | 21,50      | 9,70         | 45,11      | 16,17           |
| <b>DSC</b>                   | 23,88      | 11,03        | 46,18      | 18,38           |
| <b>Celulose</b>              | 23,88      | 11,20        | 46,90      | 18,67           |
| <b>Maltodextrina</b>         | 23,88      | 9,00         | 37,68      | 15,00           |
| <b>Lactose</b>               | 23,88      | 11,40        | 47,78      | 19,00           |
| <b>Goma Xantana</b>          | 23,88      | 11,20        | 46,90      | 18,67           |

\*Calculado a partir do teor de sólidos da solução extrativa.

Fonte: Autoria Própria.

Todos os rendimentos obtidos foram abaixo de 50% levando-se em conta o rendimento esperado em relação à quantidade de sólidos presentes na solução extrativa submetida à secagem. Os rendimentos também foram calculados em relação a massa de matéria prima vegetal utilizada para a preparação da solução extrativa seca por *spray drying*. Neste caso os rendimentos encontram-se entre 15 – 19%, ou seja, para cada 100 g de material vegetal utilizado para preparação do extrato, são obtidos entre 15 – 19 g de extrato seco. Alguns relatos na literatura apontam que baixos rendimentos são frequentemente obtidos com a utilização de *spray dryers* de bancada, com vazão de até 1L/h, sendo comum a eficiência para este tipo de equipamento na faixa de 20-50%. Além disso, é reportada importância dos teores de sólidos presentes no material de secagem, valores reduzidos desta característica podem resultar em baixos rendimentos (SOARES, 2002; AMERI; MAA, 2008; OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; MARTINS *et al.*, 2013).

De modo geral, os rendimentos próximos de 50% podem ser considerados vantajosos diante dos baixos teores de sólidos obtidos para os extratos de *E. unifora* e do tipo de equipamento, entretanto, no aspecto tecnológico e de produção, estes valores indicam a necessidade de modificação de parâmetros do processo de secagem para que sejam avaliadas as melhores condições de secagem e maiores rendimentos sejam alcançados. Dentre os diversos fatores que podem influenciar os rendimentos de produtos secos por *spray dryer*, os principais parâmetros relatados na literatura podem ser relacionados à natureza da amostra, como teor de sólidos, viscosidade da solução extrativa, tipo e concentração de adjuvantes; e relacionados ao processo, como temperaturas de entrada e saída, velocidade de corrente de ar aquecido e fluxo de alimentação OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; CAL; SOLLOHUB, 2010; KLEIN *et al.*, 2015).

Considerando a adição de adjuvantes de secagem, os dados mostraram que a incorporação de 10% de dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina, lactose ou goma xantana não causou impacto sobre os rendimentos da operação de secagem. Entretanto, quando foi empregado o uso de maltodextrina, os resultados apresentaram-se desfavoráveis, com redução de 16,47% no rendimento do produto. Este resultado pode ser decorrente de mudança nas características do líquido após a adição do adjuvante, que necessitou de diluição para que fosse realizada a total solubilização/incorporação do polímero ao extrato. Na operação, o volume do solvente necessário para total incorporação do excipiente foi o dobro do volume da solução extrativa, resultando em uma diminuição proporcional do resíduo sólido da solução. Além desta dificuldade, durante a operação de secagem foi observada maior aderência do produto seco às paredes do equipamento.

Em alguns casos, a natureza e/ou proporção de adjuvantes utilizados no processo de secagem podem ser correlacionados com os rendimentos obtidos. Maiores concentrações incorporadas nas soluções submetidas à secagem, proporcionam maiores rendimentos, por aumentarem a quantidade de sólidos em solução, e por melhorarem as características físico-químicas, incrementando a fluidez e diminuindo a adesão do material ao equipamento, diminuindo as perdas operacionais. Neste sentido, os resultados obtidos podem indicar que a concentração de adjuvante utilizada não foi suficiente para impactar nos rendimentos dos produtos secos a partir de extratos de *E. uniflora*. Entretanto, o aumento da concentração dos adjuvantes utilizados pode modificar a viscosidade e comprometer a solubilidade das substâncias ativas presentes na solução extrativa, ou mesmo alterar a sua dispersibilidade o que dificultaria o processo de secagem (TEWA-TAGNE *et al.*, 2006; OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; CALISKAN; DURIN, 2013; KLEIN *et al.*, 2015; BACCARIN *et al.*, 2016).

No que concerne aos rendimentos, o desempenho da secagem dos produtos secos contendo adjuvantes, foram obtidos resultados discrepantes dos relatados na literatura para derivados de vegetais, mesmo quando foram utilizados os mesmos tipos de excipientes. Entretanto, para a preparação dos produtos secos derivados das folhas de *E. uniflora* foram utilizados extratos com baixos teores de sólidos e equipamento de bancada, o que pode estar correlacionado com os baixos rendimentos obtidos, e poderia justificar o rendimento baixo após a adição de adjuvantes (AMERI; MAA, 2008; OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; MARTINS *et al.*, 2013; KLEIN *et al.*, 2015).

### 5.3.1 Umidade residual

O processo de secagem tem como objetivo, além de obter produtos secos intermediários (pós como insumos para aplicação em formas farmacêuticas líquidas, semissólidas e sólidas) e produtos finais (no caso de formulações em pó, como sachês e chás instantâneos), conferir maior estabilidade (tanto microbiológica quanto físico-química) e possibilitar uma maior proteção, melhor manuseio e acondicionamento do produto seco. Neste sentido, um dos fatores mais importantes a serem avaliados é o teor de umidade residual, pois a presença de elevado teor de água pode indicar que o procedimento utilizado não apresentou a eficiência desejada, reduzir a estabilidade e levar a proliferação de microrganismos, assim como a degradação química dos constituintes químicos. A umidade residual pode estar relacionada às condições de secagem, como temperatura de entrada e de saída, onde temperaturas menores podem impactar na remoção total do solvente, sendo o responsável pela permanência da umidade residual; o uso de adjuvantes dessecantes, como o dióxido de silício coloidal, pode ajudar a diminuir a umidade final do produto (COUTO *et al.*, 2011; KLEIN *et al.*, 2015; ARPAGAUS *et al.*, 2018).

De acordo definições apresentadas na Farmacopeia Brasileira, extratos secos não possuem perda por dessecação superior a 5% (FB5, 2010); alguns autores apontam que a umidade residual deve se encontrar no limite de 5% (PEIXOTO; FREITAS, 2013; COUTO *et al.*, 2013); outros indicam que o intervalo de umidade aceitável e viável para extratos secos geralmente se encontra entre 3-7% (COUTO *et al.*, 2011; FREITAS; TEIXEIRA; ZAMARIOLI, 2017; REIS *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos para o ensaio de dessecação dos produtos secos das folhas de *E. uniflora* apresentaram diferentes comportamentos, tanto para o produto sem adição de adjuvantes quanto para os produtos contendo 10% dos adjuvantes, resultando em faixa de umidade entre 4,8 e 8,2%. O extrato nativo, sem excipientes, apresentou o valor de umidade igual a 5,9%. A ausência de adjuvantes permite inferir que este resultado é proveniente apenas do processo de secagem e da natureza dos constituintes químicos presentes nos produtos. Estes resultados se encontram próximos de 5% e dentro da faixa de 3-7% relatada como aceitável. Os valores podem ser considerados favoráveis para a manutenção da estabilidade do material e permitem inferir que o processo apresentou eficiência na remoção do solvente.

**Tabela 19** - Dados de umidade residual dos produtos secos por aspersão.

| <b>Amostra</b>               | <b>Umidade (%)</b>  |
|------------------------------|---------------------|
| <b>Extrato Sem Adjuvante</b> | 5,9 ± 0,0354 (0,60) |
| <b>DSC 10%</b>               | 4,8 ± 0,0778 (1,62) |
| <b>Celulose 10%</b>          | 5,2 ± 0,1202 (2,29) |
| <b>Maltodextrina 10%</b>     | 8,2 ± 0,1980 (2,40) |
| <b>Lactose 10%</b>           | 7,8 ± 0,3323 (4,21) |
| <b>Goma Xantana 10%</b>      | 6,2 ± 0,2263 (3,64) |

Resultados expressos em: Média ± Desvio Padrão (Desvio Padrão Relativo (%))

Fonte: Autoria Própria.

Em relação aos resultados obtidos para os produtos contendo 10% dos excipientes testados, apenas o produto seco preparado com dióxido de silício coloidal (DSC) apresentou umidade residual inferior a 5%. Esta baixa umidade é decorrente de uma das principais características deste adjuvante, que é a natureza dessecante. Por este motivo o DSC é usado frequentemente para manter a estabilidade de produtos higroscópicos de maneira independente, tal como extratos secos, ou, ainda, integrando a composição de formulações farmacêuticas para proteção de produtos acabados (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; COUTO *et al.*, 2011).

Para o produto seco contendo celulose microcristalina também foi observada redução na umidade residual, quando comparado ao produto isento de adjuvantes. Isoladamente, este adjuvante apresenta características higroscópicas, considerada uma desvantagem para aquisição de produtos contendo este adjuvante em sua composição; fato que pode ter contribuído para a umidade residual apresentar-se superior a 5% (NSOR-ATINDANA *et al.*, 2017; YANG; LI, 2018).

Entretanto, a redução do teor de umidade em comparação com o extrato externas da partícula à ponto de alterar a quantidade de água residual adsorvida. Além disso, a menor umidade também pode estar associada a uma maior eficiência no processo de secagem.

O aumento pronunciado na umidade residual dos produtos contendo lactose e maltodextrina pode estar relacionado aos fatores operacionais, como a introdução de solvente adicional, no caso do produto contendo maltodextrina; de flutuações na temperatura de saída, ou até mesmo da natureza higroscópica dos excipientes e do extrato, são necessários mais testes para determinar a real influência destes parâmetros nos produtos.

O produto obtido com a adição de goma xantana apresentou resultados superiores aos obtidos para o extrato sem adjuvante, apesar de próximos. Estes resultados indicam que o

adjuvante não possuiu grande interferência sobre a umidade residual da mesma forma que foi observada para os demais adjuvantes. Seu desempenho foi o mais próximo ao obtido pela celulose microcristalina, e isso pode ser atribuído à estrutura praticamente idêntica da cadeia principal destes polímeros, que podem ser diferenciadas apenas pela presença de cadeias laterais de trissacarídeos alternadas com unidades de anidroglicose (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Dentre os adjuvantes utilizados para obtenção de produtos secos derivados de extrato das folhas de pitangueira, a goma xantana é o excipiente que apesar de relatado para melhoramento das características de pós secos por spray dryer, não apresenta muitos relatos sobre extratos secos e outros produtos derivados vegetais. Este excipiente foi escolhido devido à possibilidade de influenciar nos produtos finais (sistemas dispersos), por possuir boas propriedades físicas, além de ser utilizado para compressão direta por obter características de deformação plástica e ser usado como agente gelificante e estabilizante em emulsões (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; KUMAR; RAO; HAN, 2018).

Diante deste contexto, os resultados obtidos demonstram que, para o parâmetro de umidade residual, os adjuvantes que apresentaram o melhor desempenho foram: dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina e goma xantana.

### 5.3.2 Diâmetro e distribuição de Partículas

O tamanho e distribuição de partículas é uma medida de grande importância na caracterização de produtos na forma de pós, visto que a fluidez dos pós geralmente pode estar correlacionada com tamanho, formato e distribuição das partículas. O tamanho pode explicar a coesão e baixo fluxo de pós, quanto menor as partículas, mais facilmente acontece o atrito entre as superfícies, contribuindo para maior adesão, diminuindo a fluidez do material (COUTO *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2017).

Para análise do tamanho das partículas, foi realizado um teste prévio usando tamisação, entretanto, o pó apresentava-se muito fino, atravessando mesmo as menores malhas testadas. Diante disso, as análises dos tamanhos de partícula foram realizadas a partir do diâmetro de Feret mensurado em microscópio óptico, o que permitiu a avaliar da morfologia das partículas, as quais se apresentaram, para todos os produtos secos avaliados, como uma mistura dos formatos irregulares e esféricos. Os resultados indicaram que os pós apresentaram tamanhos muito reduzidos, distribuindo-se entre os tamanhos de 1,6 - 9,6  $\mu\text{m}$  (COUTO *et al.*, 2011; FREITAS; TEIXEIRA; ZAMARIOLI, 2017; REIS *et al.*, 2017).

Mais de 50% das partículas mensuradas, para todos os produtos secos, apresentaram tamanhos entre 2,5 – 3,3  $\mu\text{m}$ , exceto pelo extrato seco sem adjuvante que apresentou menor tamanho, com 50% de suas partículas entre 1,7 – 2,4  $\mu\text{m}$ . Os valores médios das partículas (Tabela 19) encontram-se dentro destas faixas, e estes resultados apresentam aumento de acordo com a adição dos diferentes adjuvantes.

**Tabela 20** - Dados de tamanho e distribuição de partículas dos produtos secos por aspersão.

| Amostra               | Mínimo ( $\mu\text{m}$ ) | Máximo ( $\mu\text{m}$ ) | Média ( $\mu\text{m}$ ) | Distribuição Média 50% ( $\mu\text{m}$ ) |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------------------------|
| Extrato Sem Adjuvante | 1,6                      | 9,6                      | 2,48                    | 2,4                                      |
| DSC 10%               | 1,6                      | 9,1                      | 2,88                    | 3,3                                      |
| Celulose 10%          | 1,6                      | 8,0                      | 3,21                    | 3,3                                      |
| Maltodextrina 10%     | 1,6                      | 6,9                      | 3,06                    | 3,3                                      |
| Lactose 10%           | 1,6                      | 7,4                      | 2,75                    | 3,3                                      |
| Goma Xantana 10%      | 1,6                      | 7,5                      | 3,15                    | 3,3                                      |

Fonte: Autoria Própria.

Na análise comparativa entre os resultados obtidos para os produtos contendo a adição dos adjuvantes, foi evidenciado que houve aumento no tamanho das partículas com a adição dos excipientes, entretanto, este aumento não proporcionou uma variação que possa impactar nas propriedades de fluxo do material. O maior aumento foi evidenciado para os produtos contendo 10% de celulose microcristalina, seguido pelos produtos contendo 10% de maltodextrina e 10% de goma xantana. Estes três adjuvantes possuem características poliméricas, aglutinantes e podem ser utilizadas para o encapsulamento de substâncias (principalmente a maltodextrina) pela sua capacidade de formação de uma barreira física protetora sobre as partículas. E esta formação de camada física sobre a superfície dos pós pode ter sido o fator que contribuiu para um maior aumento do tamanho das partículas dos produtos em questão em comparação com os demais (COUTO *et al.*, 2011; VIDOVIC *et al.*, 2014).

Para verificar se os adjuvantes possuem este impacto sobre o tamanho das partículas dos produtos secos são necessárias mais avaliações de tamanho e distribuição utilizando métodos mais específicos para a determinação do tamanho, como a análise por difração de raios x; e da estrutura e morfologia das partículas através de microscopia de varredura, onde poderão ser coletados dados mais acurados e confiáveis acerca desta variável.

### 5.3.3 Ângulo de repouso

A elevada higroscopicidade e tamanho reduzido de partículas, tipicamente obtidos em extratos secos por aspersão, são frequentemente relatados como fatores que desfavorecem as propriedades de fluxo destes sistemas particulados (GALLO *et al.*, 2015). Como parte do desenvolvimento de formas sólidas, a avaliação das propriedades mecânicas dos materiais é realizada para verificar viabilidade da utilização dos pós, bem como avaliar comportamento dos pós frente à sua aplicação em formulações, bem como aos equipamentos a serem utilizados nos processamentos. Uma das medidas que auxilia a avaliação das propriedades de fluxo é a avaliação do ângulo de repouso, que serve para verificar tanto o movimento quanto a aderência dos pós devido às forças coesivas que atuam entre as partículas (GALLO *et al.*, 2015; AULTON, 2016; AL-HASHEMI; AL-AMOUDI, 2018).

Os resultados obtidos (Tabela 20) evidenciaram que todos os produtos secos por aspersão alcançaram respostas consideradas excelentes para este parâmetro, com ângulos de repouso inferiores a 30°. Pós com ângulos de repouso abaixo de 40° apresentam propriedades de escoamento de excelentes à medianas, indicando que os produtos secos derivados de extratos de folhas de pitanga apresentaram baixa coesão entre as partículas nesta avaliação; valores superiores indicam que as forças de coesão entre as partículas atuam com maior força, aumentando o atrito entre elas e dificultando o movimento e escoamento (HOWARD, 2007; YEKOV; IEFIMOV, 2019).

**Tabela 21** - Dados de ângulo de repouso obtidos para os pós de extratos secos por aspersão.

| <b>Amostra</b>               | <b>Ângulo de Repouso</b> | <b>Especificações de ângulo de repouso*</b> |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------|
| <b>Extrato Sem Adjuvante</b> | 25                       | 25-30 – Excelente                           |
| <b>DSC 10%</b>               | 20                       | 31-35 – Bom                                 |
| <b>Celulose 10%</b>          | 25                       | 36-40 – Mediano                             |
| <b>Maltodextrina 10%</b>     | 27                       | 41-45 – Fraco                               |
| <b>Lactose 10%</b>           | 27                       | 46-50 – Deficiente                          |
| <b>Goma Xantana 10%</b>      | 22                       | 51-65 – Muito Deficiente                    |

Fonte: Autoria Própria; \*Garcia et al, 2012.

O produto contendo DSC apresentou os menores valores de ângulo de repouso, corroborando com os diversos relatos do uso deste adjuvante em insumos farmacêuticos e derivados vegetais, promovendo o melhoramento das características físicas do material por suas

propriedades deslizantes. Além disso, o formato esférico do produto e a propriedade dessecante deste adjuvante podem ter contribuído para o elevado desempenho no quesito ângulo de repouso, tendo em vista que partículas esféricas possuem maior facilidade no deslizamento das partículas e que elevados teores de umidade contribuem para a adesão interparticular, o que proporciona o aumento da coesão e diminuição do fluxo do material (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; GALLO *et al.*, 2015; CORTES-ROJAS *et al.*, 2015; BACCARIN *et al.*, 2016).

A celulose manteve o desempenho apresentado pelo extrato seco sem adjuvante, enquanto a goma xantana possibilitou valores ainda menores, aproximando-se dos resultados obtidos pelo DSC. Estes resultados semelhantes entre os produtos contendo goma xantana e celulose podem ser atribuídos à semelhança estrutural destas substâncias poliméricas, que possibilitam um encapsulamento do material através da formação de uma camada externa, o que pode ter possibilitado o aprimoramento/manutenção das características físicas do material (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; OLIVEIRA; PETROVICK, 2009).

Em relação aos produtos contendo maltodextrina e lactose, os resultados obtidos foram maiores resultando em menor fluidez. No caso da maltodextrina, a incorporação/encapsulamento pode não ter sido realizado de forma efetiva para o produto seco por aspersão de *E. uniflora*, impactando nas características do pó obtido na secagem.

#### **5.3.4 Densidade bruta inicial e de compactação, Fator de Hausner e Índice de Carr**

Dentre os fatores que podem ser avaliados a partir da definição das características dos materiais, podem ser citados o Fator de Hausner (FH) e Índice de Carr (IC), considerados medidas empíricas de previsão do fluxo de pós, e que seguem como ensaios estudados na pré-formulação de formas sólidas, por permitirem a avaliação da capacidade e da viabilidade da aplicação de pós à compactação (AULTON, 2016; NARASHIMHAN; AMUDA, 2017; YEKOV; IEFIMOV, 2019).

Para o índice de Carr, valores de até 20, apresentam propriedades favoráveis para a compressibilidade, acima destes valores, as características de fluxo são consideradas desfavoráveis (Tabela 21). Já para o Fator de Hausner, valores de no máximo 1,25 são considerados admissíveis, portanto, apresentam baixas propriedades de fluxo de baixa compressibilidade, fazendo com que sejam necessários ajustes para o aprimoramento das características reológicas dos materiais que possuam valores superiores aos valores citados para o IC e FH (AULTON, 2016; NARASHIMHAN; AMUDA, 2017; YEKOV; IEFIMOV, 2019).

**Tabela 22** - Valores de referência para Fator de Hausner e Índice de Carr.

| <b>Especificações de FH</b>      | <b>Especificações de IC</b>    |
|----------------------------------|--------------------------------|
| 1,00 - 1,11 – Excelente          | 1 - 10 – Excelente             |
| 1,12 - 1,18 – Bom                | 11 - 15 – Bom                  |
| 1,19 - 1,25 – Razoável           | 16 - 20 – Razoável             |
| 1,26 - 1,45 – Fraco              | 21 - 30 – Fraco                |
| 1,46 – 1,59 – Muito fraco        | 31 - 37 – Muito fraco          |
| > 1,60 – Extremamente deficiente | > 38 – Extremamente deficiente |

Fonte: Garcia et al, 2012.

No que concerne aos produtos derivados de vegetais secos por aspersão, este tipo de avaliação possui grande importância na determinação das características físicas dos produtos, e possibilitam a avaliação da diversidade de desempenhos tecnológicos, embora em grande parte dos casos as características de fluxo apresentem propriedades reológicas desfavoráveis. Estas características adversas podem ser atreladas às naturezas físico-químicas complexas do material de origem (principalmente pela complexidade de composição química), pelo reduzido tamanho de partículas resultante no processo de secagem, além da higroscopicidade geralmente reportadas para os produtos resultantes do processo de transformação (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; COUTO *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2012; GALLO *et al.*, 2015).

A tabela 22 apresenta os resultados obtidos para a densidade bruta e de compactação, além dos dados para índice de Carr e Fator de Hausner. Para a densidade bruta, pode ser observado que a adição de adjuvantes proporcionou aumento em todas as situações analisadas.

**Tabela 23** - Dados de Índices de Carr e Fatores de Hausner para os pós obtidos após secagem por aspersão.

| <b>Amostra</b> | <b>Db(g/mL)</b> | <b>Dc (g/mL)</b> | <b>FH</b> | <b>IC</b> |
|----------------|-----------------|------------------|-----------|-----------|
| <b>ESA</b>     | 0,08289         | 0,21             | 2,53      | 60,52     |
| <b>A10%</b>    | 0,12076         | 0,21             | 1,73      | 42,10     |
| <b>C10%</b>    | 0,13304         | 0,34             | 2,55      | 60,87     |
| <b>M10%</b>    | 0,09468         | 0,20             | 2,13      | 53,12     |
| <b>L10%</b>    | 0,08941         | 0,20             | 2,26      | 55,88     |
| <b>GX10%</b>   | 0,12520         | 0,24             | 1,92      | 47,99     |

Db: Densidade bruta; Dc: Densidade de compactação; FH: Fator de Hausner; IC: Índice de Carr.

Fonte: Autoria Própria.

A adição dos excipientes proporcionou aumento da densidade na ordem lactose (0,08941 g/mL) < maltodextrina (0,09468 g/mL) < dióxido de silício coloidal (0,12076 g/mL) < goma xantana (0,12520 g/mL) < celulose (0,13304 g/mL). Os excipientes DSC, goma xantana e celulose microcristalina apresentaram um bom desempenho e incorporação ao produto, proporcionando incremento na densidade bruta, corroborando com os resultados obtidos para os ensaios anteriores de umidade residual, tamanho de partícula e ângulo de repouso. Quanto à densidade de compactação, após a acomodação todos os produtos apresentaram valores próximos aos obtidos para o produto sem adição de adjuvantes, seguindo a mesma ordem apresentada pela densidade bruta, lactose < maltodextrina < dióxido de silício coloidal < goma xantana < celulose.

O aumento significativo da densidade pela incorporação de celulose pode ser explicado pela formação de uma barreira física externa na superfície das partículas. Também foi reportado aumento da densidade para um produto contendo goma xantana, e assim como a celulose e seus derivados, a goma xantana também proporciona a formação de barreira física externa nos sistemas particulados, devido as suas características poliméricas e estruturas químicas similares (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; REIS *et al.*, 2017).

A utilização de DSC pode impactar na diminuição da densidade do material, devido à sua baixa densidade e elevada superfície de contato/reduzido tamanho de partícula (REIS *et al.*, 2017).

No âmbito geral, todos os produtos possuem baixos valores de densidade o que pode ser um fator limitante no que concerne à produção de formas comprimidas. Estas limitações podem tornar necessárias outras formas de processamento dos extratos prévios à compressão (AGARWAL *et al.*, 2007; MILLER; SHESKEY, 2007; AULTON, 2016).

Para o Índice de compressibilidade e fator de Hausner, os resultados obtidos em ordem crescente foram: dióxido de silício coloidal < goma xantana < maltodextrina < lactose < extrato sem adjuvante < celulose.

O adjuvante que apresentou o melhor desempenho foi o DSC, e embora o aumento tenha sido bastante significativo para as duas medidas, o pó contendo 10% de DSC ainda está classificado como extremamente deficiente nas características de compactabilidade, indicando fluxo não espontâneo (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; EL-GIZAWI *et al.*, 2015).

As propriedades de fluxo e compressibilidade também foram incrementadas com a adição de goma xantana, corroborando com os resultados obtidos para ângulo de repouso, tamanho de partícula e umidade, indicando que houve boa compatibilidade entre o extrato e o adjuvante. O produto contendo celulose, apesar de ter apresentado bons resultados para as variáveis analisadas, não apresentou incremento nas propriedades de fluxo e compressibilidade, com resultados semelhantes ao extrato seco sem adjuvante. O produto apresentou bom empacotamento, entretanto ainda assim apresentou fluxo desfavorável e tais resultados podem estar relacionados com alguma interação molecular entre o adjuvante e os constituintes do extrato (REIS *et al.*, 2017). Os resultados de baixo desempenho obtidos pelos produtos contendo lactose e maltodextrina podem ser explicados pelos baixos desempenhos obtidos pelos produtos nos ensaios anteriores que indicam que os produtos possuem uma maior coesão entre as partículas e menor fluidez.

Apesar de existir aprimoramento das características reológicas de todos os produtos contendo adjuvantes ainda apresentam algumas desvantagens quanto as propriedades físicas consideradas ideais para a obtenção de formas comprimidas, sendo necessário a avaliação de diferentes proporções de adjuvante e a viabilidade de uso de misturas dos adjuvantes ou adjuvantes co-processados.

### **5.3.5 Teores de marcadores por UV-Vis e CLAE**

Para estas análises, foram realizados os ensaios tanto por espectrofotometria no UV-Vis quanto por CLAE, seguindo as análises de controle de qualidade realizadas nas soluções extrativas. As respostas obtidas para os diferentes produtos nas variáveis analisadas permitiram identificar algumas flutuações de teores para os produtos incorporados com os diferentes adjuvantes (Tabela 23).

**Tabela 24** - Teor dos marcadores presentes nos extratos secos por aspersão.

| <b>Amostra</b>               | <b>Marcador</b>    | <b>Teor médio ± DP (DPR%)</b> |
|------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| <b>Extrato Sem Adjuvante</b> | Flavonoides Totais | 4,102 ± 0,1415 (3,45)         |
|                              | Taninos Totais     | 20,234 ± 0,1176 (0,58)        |
|                              | Ácido Gálico       | 0,1867 ± 0,0020 (1,08)        |
|                              | Ácido Elágico      | 0,5122 ± 0,0067 (1,30)        |
|                              | Miricitrina        | 0,8273 ± 0,0171 (2,07)        |
|                              | F2                 | 0,1103 ± 0,0032 (2,93)        |
| <b>DSC 10%</b>               | Flavonoides Totais | 4,257 ± 0,1415 (3,52)         |
|                              | Taninos Totais     | 20,187 ± 0,0754 (0,36)        |
|                              | Ácido Gálico       | 0,1825 ± 0,0024 (1,39)        |
|                              | Ácido Elágico      | 0,4854 ± 0,0201 (4,13)        |
|                              | Miricitrina        | 0,8108 ± 0,0195 (2,41)        |
|                              | F2                 | 0,1117 ± 0,0021 (1,86)        |
| <b>Celulose 10%</b>          | Flavonoides Totais | 4,193 ± 0,0651 (1,55)         |
|                              | Taninos Totais     | 22,037 ± 0,0754 (0,34)        |
|                              | Ácido Gálico       | 0,1831 ± 0,0006 (0,34)        |
|                              | Ácido Elágico      | 0,5193 ± 0,0060 (1,15)        |
|                              | Miricitrina        | 0,8017 ± 0,0030 (0,37)        |
|                              | F2                 | 0,1069 ± 0,0018 (1,64)        |
| <b>Maltodextrina 10%</b>     | Flavonoides Totais | 4,076 ± 0,0293 (0,72)         |
|                              | Taninos Totais     | 20,221 ± 0,0987 (0,49)        |
|                              | Ácido Gálico       | 0,1915 ± 0,0018 (0,94)        |
|                              | Ácido Elágico      | 0,4996 ± 0,0089 (1,79)        |
|                              | Miricitrina        | 0,8362 ± 0,0059 (0,70)        |
|                              | F2                 | 0,1130 ± 0,0014 (1,24)        |
| <b>Lactose 10%</b>           | Flavonoides Totais | 4,115 ± 0,1187 (2,88)         |
|                              | Taninos Totais     | 20,365 ± 0,0987 (0,48)        |
|                              | Ácido Gálico       | 0,1977 ± 0,0007 (0,34)        |
|                              | Ácido Elágico      | 0,5018 ± 0,0087 (1,74)        |
|                              | Miricitrina        | 0,8701 ± 0,0066 (0,75)        |
|                              | F2                 | 0,1195 ± 0,0018 (1,53)        |
| <b>Goma Xantana 10%</b>      | Flavonoides Totais | 4,239 ± 0,0802 (4,20)         |
|                              | Taninos Totais     | 19,554 ± 0,0226 (0,12)        |
|                              | Ácido Gálico       | 0,1953 ± 0,0026 (1,34)        |
|                              | Ácido Elágico      | 0,4798 ± 0,0036 (0,74)        |
|                              | Miricitrina        | 0,8295 ± 0,0073 (0,88)        |
|                              | F2                 | 0,0923 ± 0,0177 (19,13)       |

Fonte: Autoria Própria.

O produto seco sem adjuvante foi tomado como base para a comparação com os produtos incorporados, e foram calculados os coeficientes de variação entre os resultados dos diferentes produtos para comparação. Para a variável de flavonoides totais houve a menor flutuação entre os resultados, com coeficiente de variação de médio de 1,83% entre as diferentes amostras. Para taninos totais e os monômeros de ácido gálico, ácido elágico e miricitrina foram

obtidas variações inferiores a 5%. O flavonoide 2 obteve variações significativas nos teores, superior a 5%, evidenciada principalmente pelo produto contendo goma xantana que apresentou uma queda de aproximadamente 12% em relação ao produto sem adjuvante.

Estes resultados indicam que os marcadores não apresentaram diferenças significativas de teores entre os diferentes produtos, evidenciando que o processo de secagem e a adição de excipientes para incremento das propriedades tecnológicas não apresentaram influência sobre os valores quantitativos destes compostos, indicando que os extratos obtiveram o mesmo desempenho analítico nas análises espectrofotométricas e cromatográfica.

### **5.3.6 Otimização do processo de obtenção dos produtos secos**

#### **5.3.6.1 Avaliação das condições de secagem**

Diante dos resultados obtidos para os produtos secos na análise de viabilidade de adjuvantes, foi necessário a avaliação das condições de secagem para definir e padronizar os parâmetros utilizados na obtenção dos pós. Nesta etapa, foi utilizado o planejamento fatorial para a seleção das variáveis utilizadas para a secagem por aspersão. Para a seleção dos parâmetros de secagem, foram selecionadas três variáveis independentes (temperatura (°C), vazão de alimentação (L/h) e Velocidade de fluxo de ar aquecido (m<sup>3</sup>/min)), que tiveram suas influências sobre as variáveis de respostas (rendimento, umidade, ângulo de repouso, densidade inicial, densidade compactada, índice de Carr e fator de Hausner) analisadas. Esta avaliação foi realizada em dois níveis (inferior, -1 e superior, +1), com análise de dois pontos centrais (nível intermediário, 0), resultando em um ensaio fatorial 2<sup>3</sup>. Tanto as variáveis naturais quanto as variáveis codificadas e as respostas para os teores estão apresentadas na tabela 24.

**Tabela 25** - Dados obtidos no planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para avaliação das condições de secagem por aspersão.

| Extrato   | Variáveis Codificadas |           |                             | Variáveis Naturais |           |                             | Variáveis de Resposta |                |             |                   |                   |                      |                |                  |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------------|--------------------|-----------|-----------------------------|-----------------------|----------------|-------------|-------------------|-------------------|----------------------|----------------|------------------|
|           | T (°C)                | Vazão (L) | Fluxo (m <sup>3</sup> /min) | T (°C)             | Vazão (L) | Fluxo (m <sup>3</sup> /min) | Rendimento (g)        | Rendimento (%) | Umidade (%) | Ângulo de Repouso | Densidade Inicial | Densidade Compactada | Índice de Carr | Fator de Hausner |
| <b>1</b>  | 0                     | 0         | 0                           | 150                | 0,5       | 1,55                        | 10                    | 42,86          | 3,66        | 20                | 0,1171            | 0,2038               | 42,54          | 1,74             |
| <b>2</b>  | 0                     | 0         | 0                           | 150                | 0,5       | 1,55                        | 9,86                  | 42,26          | 3,38        | 20                | 0,1177            | 0,2040               | 42,30          | 1,73             |
| <b>3</b>  | -                     | -         | -                           | 140                | 0,4       | 1,45                        | 10,77                 | 46,16          | 2,87        | 21                | 0,1179            | 0,2044               | 42,31          | 1,73             |
| <b>4</b>  | +                     | +         | +                           | 160                | 0,6       | 1,65                        | 10,53                 | 45,13          | 2,47        | 21                | 0,1171            | 0,2029               | 42,28          | 1,73             |
| <b>5</b>  | +                     | +         | -                           | 160                | 0,6       | 1,45                        | 9,77                  | 41,88          | 3,08        | 21                | 0,1178            | 0,2043               | 42,34          | 1,73             |
| <b>6</b>  | -                     | +         | +                           | 140                | 0,6       | 1,65                        | 10,25                 | 43,93          | 3,26        | 21                | 0,1177            | 0,2040               | 42,30          | 1,73             |
| <b>7</b>  | +                     | -         | -                           | 160                | 0,4       | 1,45                        | 7,23                  | 31,00          | 2,76        | 21                | 0,1188            | 0,2059               | 42,30          | 1,73             |
| <b>8</b>  | -                     | -         | +                           | 140                | 0,4       | 1,65                        | 9,71                  | 41,62          | 2,83        | 20                | 0,1186            | 0,2056               | 42,31          | 1,73             |
| <b>9</b>  | -                     | +         | -                           | 140                | 0,6       | 1,45                        | 10,68                 | 45,77          | 2,87        | 20                | 0,1188            | 0,2060               | 42,33          | 1,73             |
| <b>10</b> | +                     | -         | +                           | 160                | 0,4       | 1,65                        | 7,16                  | 30,69          | 2,22        | 20                | 0,1185            | 0,2055               | 42,33          | 1,73             |

Fonte: Autoria Própria.

Com o auxílio do software Statistica 8 as variáveis de resposta foram analisadas e seus efeitos foram mensurados. Dentre as respostas avaliadas, foi possível verificar impacto apenas sobre o rendimento, pois apenas esta variável apresentou variações significativas frente às mudanças dos parâmetros estudadas. Para esta variável de resposta, foram testados os modelos lineares e quadráticos. Entretanto os modelos lineares não foram o suficiente para descrever as respostas, enquanto os modelos quadráticos foram considerados adequados para a previsão de respostas, visto que foi verificada a presença de efeitos de interações. O modelo quadrático apresentou elevado coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para o rendimento, apresentando valor superior a 0,98. Além disso, a análise de variância dos modelos resultou em elevados valores para  $F$  e baixos valores de  $p$  (próximos de zero e menores que 5%) (WEHRLÉ *et al.*, 1993; CALLEGARI-JACQUES, 2003; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; MONTGOMERY, 2013; MYERS *et al.*, 2016). Os dados obtidos para ANOVA e estimativas de efeitos das análises do ensaio fatorial estão apresentadas nas tabelas 25 e 26.

**Tabela 26** - Valores de efeitos estimados obtidos para a variável rendimento no planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

|                       | Effect | Std.Err.<br>- Pure Err | t(1)   | p      | Coeff  | Std.Err.<br>- Coeff. |
|-----------------------|--------|------------------------|--------|--------|--------|----------------------|
| <b>Mean/</b>          | 41,130 | 0,1342                 | 306,56 | 0,0021 | 41,130 | 0,1341               |
| <b>Interc.</b>        |        |                        |        |        |        |                      |
| <b>(1)T (°C)</b>      | -7,195 | 0,3000                 | -23,98 | 0,0265 | -3,597 | 0,1500               |
| <b>(2)Vazão</b>       | 6,810  | 0,3000                 | 22,70  | 0,0280 | 3,405  | 0,1500               |
| <b>(3)Fluxo de Ar</b> | -0,860 | 0,3000                 | -2,87  | 0,2137 | -0,430 | 0,1500               |
| <b>1 by 2</b>         | 5,850  | 0,3000                 | 19,50  | 0,0326 | 2,925  | 0,1500               |
| <b>1 by 3</b>         | 2,330  | 0,3000                 | 7,77   | 0,0815 | 1,165  | 0,1500               |
| <b>2 by 3</b>         | 1,565  | 0,3000                 | 5,22   | 0,1205 | 0,782  | 0,1500               |

Fonte: Autoria Própria.

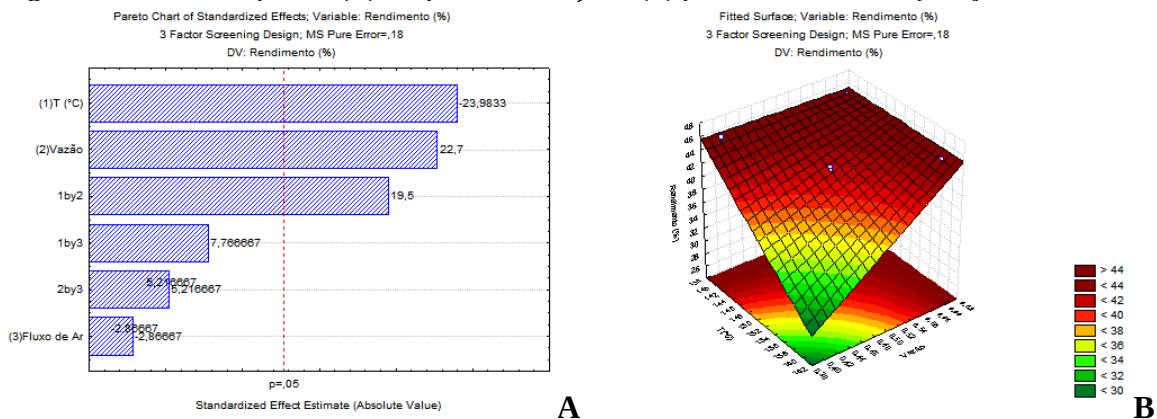
Tabela 27 – Tabela de ANOVA para a variável rendimento no planejamento fatorial.

|                 | Soma<br>Quadrática | Graus de<br>Liberdade | Média<br>Quadrática | F        | p        |
|-----------------|--------------------|-----------------------|---------------------|----------|----------|
| (1)T (°C)       | 103,5361           | 1                     | 103,5361            | 575,2003 | 0,026529 |
| (2)Vazão        | 92,7522            | 1                     | 92,7522             | 515,2900 | 0,028027 |
| (3)Fluxo de Ar  | 1,4792             | 1                     | 1,4792              | 8,2178   | 0,213674 |
| 1 by 2          | 68,4450            | 1                     | 68,4450             | 380,2500 | 0,032619 |
| 1 by 3          | 10,8578            | 1                     | 10,8578             | 60,3211  | 0,081520 |
| 2 by 3          | 4,8985             | 1                     | 4,8985              | 27,2136  | 0,120573 |
| Falta de Ajuste | 5,2047             | 2                     | 2,6023              | 14,4575  | 0,182833 |
| Erro Puro       | 0,1800             | 1                     | 0,1800              |          |          |
| Total SS        | 287,3534           | 9                     |                     |          |          |

Fonte: Autoria Própria.

Avaliando os resultados obtidos, pôde-se verificar que apenas duas das variáveis independentes testadas apresentaram influência sobre as respostas obtidas, a temperatura e a vazão de alimentação segundo o gráfico de Paretos (Figura 31A). A temperatura isolada apresentou maior influência (-23,98), entretanto, o aumento do foi negativo. Já o parâmetro vazão apresentou efeito positivo (+22,7), indicando que o aumento do nível -1 para o +1 acarretou aumento do rendimento. A combinação dos dois fatores gerou uma resposta positiva (+19,6). Os dados corroboram com a de superfície de respostas (Figura 31B), onde é possível identificar uma queda no rendimento quando a temperatura está em nível superior (+1) e a vazão em nível inferior (-1).

Figura 31 - Gráfico de paretos (A) e superfície de resposta (B) para o rendimento no planejamento fatorial.



Fonte: Autoria Própria.

Estes resultados, embora não tenham possibilitado a maximização das respostas testadas, permitiram identificar as variáveis que possuem impacto no processo de secagem de extratos das folhas de *E. uniflora*. Assim, os parâmetros de secagem adotados para a obtenção de produtos secos das folhas de pitangueira são: Temperatura (140 °C, nível -1), vazão de alimentação (0,4 L/h, nível -1) e velocidade de fluxo de ar aquecido (1,45 m<sup>3</sup>/min, nível -1).

#### 5.3.6.2 Determinação da concentração de adjuvantes

Para determinar qual a melhor concentração de adjuvante a ser utilizado para a obtenção de produtos secos de extratos das folhas da pitangueira foram testadas três diferentes concentrações 10, 15 e 20% de dióxido de silício coloidal (DSC). Os resultados obtidos para rendimento e características físico-químicas estão descritos na tabela 27.

**Tabela 28** - Dados de rendimento, umidade e propriedades físicas obtidos para avaliação de concentração de adjuvante.

| [Adj] | R (g) | R (%) | U (%) | Θ  | Db     | Dc     | IC    | FH    |
|-------|-------|-------|-------|----|--------|--------|-------|-------|
| 10%   | 10,77 | 46,16 | 2,87  | 20 | 0,1159 | 0,201  | 42,33 | 1,734 |
| 15%   | 12,87 | 53,88 | 2,93  | 21 | 0,1171 | 0,2038 | 42,54 | 1,740 |
| 20%   | 12,57 | 49,53 | 2,80  | 20 | 0,1276 | 0,2188 | 41,68 | 1,714 |

Onde: [Adj] = concentração de adjuvante; R = rendimento; U = umidade; Θ = ângulo de repouso; Db = densidade bruta; Dc = densidade compactada; IC = índice de Carr; FH = fator de Hausner.

Fonte: Autoria Própria.

O aumento da concentração do adjuvante (DSC) para 15% foi responsável por um aumento significativo no rendimento do produto em relação ao produto contendo 10% de DSC.

Estes resultados indicam que o aumento da concentração do DSC pode possuir impacto sobre as propriedades físico-químicas do produto quando o aumento é elevado. Entretanto, a queda no rendimento somado ao fato de que 20% de adjuvante é uma proporção elevada para o derivado de extrato das folhas de pitanga, principalmente considerando utilização deste produto seco como insumo ativo em outras formulações, a proporção escolhida como a ideal para ser utilizada na fabricação deste derivado de extrato de *E. uniflora* foi a de 15% de adjuvante.

### **5.3.6.3 Avaliação de misturas de adjuvantes através de planejamento de misturas**

Nesta etapa foram selecionados os adjuvantes com melhor desempenho para verificar se a utilização de misturas destes excipientes poderia resultar em incremento das propriedades físicas dos pós. Os dados experimentais obtidos na caracterização para as variáveis de resposta (Tabela 28) foram usados para elaboração de modelos matemáticos (Tabela 29) e a análise estatística das equações por análise de variância (ANOVA) com auxílio dos programas Statistica® e Minitab®.

**Tabela 29** - Dados de variáveis de respostas utilizadas para avaliação de planejamento de misturas.

| <b>Extrato</b> | <b>DSC</b> | <b>CMC</b> | <b>GX</b> | <b>R (g)</b> | <b>R (%)</b> | <b>U (%)</b> | <b>Θ (°)</b> | <b>Db</b> | <b>Dc</b> | <b>IC</b> | <b>FH</b> |
|----------------|------------|------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>1</b>       | 1          | 0          | 0         | 12,87        | 53,88        | 2,93         | 21           | 0,1171    | 0,2029    | 42,28     | 1,73      |
| <b>2</b>       | 0          | 1          | 0         | 11,84        | 49,57        | 3,28         | 26           | 0,1330    | 0,2782    | 52,19     | 2,09      |
| <b>3</b>       | 0          | 0          | 1         | 10,94        | 45,83        | 3,36         | 22           | 0,1234    | 0,2204    | 44,01     | 1,78      |
| <b>4</b>       | 0,5        | 0,5        | 0         | 11,81        | 49,47        | 3,15         | 24           | 0,1226    | 0,2357    | 47,98     | 1,92      |
| <b>5</b>       | 0,5        | 0          | 0,5       | 11,83        | 49,53        | 2,81         | 22           | 0,1328    | 0,2182    | 39,14     | 1,64      |
| <b>6</b>       | 0          | 0,5        | 0,5       | 11,59        | 48,52        | 3,02         | 25           | 0,1258    | 0,2246    | 43,99     | 1,78      |
| <b>7</b>       | 0,333      | 0,333      | 0,333     | 12,10        | 50,66        | 3,07         | 26           | 0,1436    | 0,2257    | 36,37     | 1,57      |

Onde: DSC = dióxido de silício coloidal; CMC: celulose microcristalina; GX = goma xantana; R = rendimento; U = umidade;  $\Theta$  = ângulo de repouso; Db = densidade bruta; Dc = densidade compactada; IC = índice de Carr; FH = fator de Hausner.

Fonte: Autoria Própria.

**Tabela 30** - Modelos matemáticos e valores de R<sup>2</sup> para as variáveis analisadas no planejamento de mistura de adjuvantes por Simplex Centroide.

| Respostas    | Equação Matemática                                                                                                                       | R <sup>2</sup> |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>R (%)</b> | $+53,88*x_1 + 49,57*x_2 + 45,83*x_3 - 9,019999999999999x_1x_2 - 1,2999999999999998x_1x_3 + 3,28x_2x_3 + 45,42x_1x_2x_3 + 0;$             | 1,00           |
| <b>U (%)</b> | $+ 2,93x_1 + 3,28x_2 + 3,36x_3 + 0,18x_1x_2 - 1,34x_1x_3 - 1,2x_2x_3 + 3,84x_1x_2x_3 + 0;$                                               | 1,00           |
| <b>Θ (°)</b> | $+21x_1 + 26x_2 + 22x_3 + 2,00x_1x_2 + 2,00x_1x_3 + 4,00x_2x_3 + 57x_1x_2x_3 + 0;$                                                       | 1,00           |
| <b>Db</b>    | $+0,1171x_1 + 0,133x_2 + 0,1234x_3 - 0,0097999x_1x_2 + 0,0502x_1x_3 - 0,0095999x_2x_3 + 0,4233x_1x_2x_3 + 0;$                            | 1,00           |
| <b>Dc</b>    | $+0,2029x_1 + 0,2782x_2 + 0,2204x_3 - 0,0194x_1x_2 + 0,0262x_1x_3 - 0,0988x_2x_3 + 0,056400x_1x_2x_3 + 0;$                               | 1,00           |
| <b>IC</b>    | $+42,2868x_1 + 52,192667*x_2 + 44,010889x_3 + 2,979889x_1x_2 - 16,04184*x_1x_3 - 16,44985553x_2x_3 - 175,7337185x_1x_2x_3 + 0;$          | 1,00           |
| <b>FH</b>    | $+1,7327071x_1 + 2,091729323x_2 + 1,7860615883306x_3 + 0,04117612x_1x_2 - 0,465248196x_1x_3 - 0,6140874x_2x_3 - 4,9433741x_1x_2x_3 + 0;$ | 1,00           |

Onde: R = rendimento; U = umidade; Θ = ângulo de repouso; Db = densidade bruta; Dc = densidade compactada; IC = índice de Carr; FH = fator de Hausner.  
 Fonte: Autoria Própria.

Para avaliação dos resultados, foram testados os modelos matemáticos linear, quadrático e cúbico (*special cubic*). Os dados de ANOVA para todas as variáveis testadas estão apresentados nas tabelas 30-36.

Para todas as variáveis testadas, os modelos apresentaram correlações estatisticamente significativas. Entretanto, os modelos lineares foram os obtiveram os menores coeficientes de determinação, indicando que apenas uma menor parcela das respostas poderia ser explicada por esse modelo, e por esse motivo foram descartados. Os modelos quadráticos proporcionaram melhor ajuste que os modelos lineares, apresentando aumento nos coeficientes de determinação, porém, ainda apresentaram menor correlação, resultando em um modelo que não explica o máximo da variabilidade das respostas experimentais.

**Tabela 31** - Dados de ANOVA para a variável rendimento no planejamento de misturas de adjuvantes.

|                       | SS (Efeito) | SS (Erro) | F        | p        | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Ajustado |
|-----------------------|-------------|-----------|----------|----------|----------------|-------------------------|
| <b>Linear</b>         | 29,23305    | 5,601290  | 10,43797 | 0,025856 | 0,839202       | 0,7588                  |
| <b>Quadrático</b>     | 3,86478     | 1,736512  | 0,74187  | 0,670375 | 0,950149       | 0,7009                  |
| <b>Special Cúbico</b> | 1,73651     | 0,000000  |          |          | 1,000000       | 1,0000                  |
| <b>Total Ajustado</b> | 34,83434    |           |          |          |                |                         |

Fonte: Autoria Própria.

**Tabela 32** - Dados de ANOVA para a variável umidade no planejamneto de misturas de adjuvantes.

|                       | SS (Efeito) | SS (Erro) | F        | p        | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Ajustado |
|-----------------------|-------------|-----------|----------|----------|----------------|-------------------------|
| <b>Linear</b>         | 0,092893    | 0,128992  | 1,440292 | 0,337963 | 0,418654       | 0,1280                  |
| <b>Quadrático</b>     | 0,116580    | 0,012412  | 3,130818 | 0,388529 | 0,944061       | 0,6644                  |
| <b>Special Cúbico</b> | 0,012412    | 0,000000  |          |          | 1,000000       | 1,0000                  |
| <b>Total Ajustado</b> | 0,221886    |           |          |          |                |                         |

Fonte: Autoria Própria.

**Tabela 33** - Dados de ANOVA para a variável ângulo de repouso no planejamento de misturas de adjuvantes.

|                       | SS (Efeito) | SS (Erro) | F        | p        | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Ajustado |
|-----------------------|-------------|-----------|----------|----------|----------------|-------------------------|
| <b>Linear</b>         | 18,53333    | 6,895238  | 5,375691 | 0,073528 | 0,728839       | 0,5932                  |
| <b>Quadrático</b>     | 4,16039     | 2,734848  | 0,507083 | 0,745147 | 0,892450       | 0,3547                  |
| <b>Special Cúbico</b> | 2,73485     | 0,000000  |          |          | 1,000000       | 1,0000                  |
| <b>Total Ajustado</b> | 25,42857    |           |          |          |                |                         |

Fonte: Autoria Própria.

**Tabela 34** - Dados de ANOVA para a variável densidade inicial no planejamento de misturas de adjuvantes.

|                       | SS (Efeito) | SS (Erro) | F        | p        | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Ajustado |
|-----------------------|-------------|-----------|----------|----------|----------------|-------------------------|
| <b>Linear</b>         | 0,000063    | 0,000402  | 0,313995 | 0,747025 | 0,135694       | 0,0000                  |
| <b>Quadrático</b>     | 0,000251    | 0,000151  | 0,554147 | 0,728260 | 0,675371       | 0,0000                  |
| <b>Special Cúbico</b> | 0,000151    | 0,000000  |          |          | 1,000000       | 1,0000                  |
| <b>Total Ajustado</b> | 0,000465    |           |          |          |                |                         |

Fonte: Autoria Própria.

**Tabela 35** - Dados de ANOVA para a variável densidade compactada no planejamento de misturas de adjuvantes.

|                       | SS (Efeito) | SS (Erro) | F        | p        | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Ajustado |
|-----------------------|-------------|-----------|----------|----------|----------------|-------------------------|
| <b>Linear</b>         | 0,002862    | 0,000504  | 11,35506 | 0,022427 | 0,850244       | 0,7754                  |
| <b>Quadrático</b>     | 0,000501    | 0,000003  | 62,42998 | 0,092707 | 0,999205       | 0,9952                  |
| <b>Special Cúbico</b> | 0,000003    | 0,000000  |          |          | 1,000000       | 1,0000                  |
| <b>Total Ajustado</b> | 0,003367    |           |          |          |                |                         |

Fonte: Autoria Própria.

**Tabela 36** - Dados de ANOVA para a variável índice de Carr no planejamento de misturas de adjuvantes.

|                       | SS (Efeito) | SS (Erro) | F        | p        | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Ajustado |
|-----------------------|-------------|-----------|----------|----------|----------------|-------------------------|
| <b>Linear</b>         | 82,9386     | 84,17537  | 1,970615 | 0,253714 | 0,496300       | 0,244450                |
| <b>Quadrático</b>     | 58,1801     | 25,99524  | 0,746036 | 0,669236 | 0,844446       | 0,066677                |
| <b>Special Cúbico</b> | 25,9952     | 0,00000   |          |          | 1,000000       | 1,000000                |
| <b>Total Ajustado</b> | 167,1140    |           |          |          |                |                         |

Fonte: Autoria Própria.

**Tabela 37** - Dados de ANOVA para a variável fator de Hausner no planejamento de misturas de adjuvantes.

|                       | SS (Efeito) | SS (Erro) | F        | p        | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Ajustado |
|-----------------------|-------------|-----------|----------|----------|----------------|-------------------------|
| <b>Linear</b>         | 0,102307    | 0,078842  | 2,595233 | 0,189428 | 0,564766       | 0,347149                |
| <b>Quadrático</b>     | 0,058272    | 0,020570  | 0,944300 | 0,620844 | 0,886448       | 0,318688                |
| <b>Special Cúbico</b> | 0,020570    | 0,000000  |          |          | 1,000000       | 1,000000                |
| <b>Total Ajustado</b> | 0,181149    |           |          |          |                |                         |

Fonte: Autoria Própria.

Com o modelo cúbico, as respostas apresentaram melhores valores do coeficiente de correlação, indicando os melhores ajustes para os dados experimentais. As respostas obtidas pelo modelo cúbico, apresentam valores de  $R^2$  igual a 1,0 para todas as variáveis, indicando que 100% das respostas são explicadas por este modelo (CALLEGARI-JACQUES, 2003; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; MONTGOMERY, 2013).

### 5.3.6.3.1 Avaliação de misturas de adjuvantes através de planejamento de misturas: Variáveis de resposta

#### a) Rendimento

Neste ensaio, é possível observar que o melhor rendimento foi apresentado pelo produto contendo DSC isoladamente (53,88%). As misturas binárias, não apresentaram incremento nesta variável, obtendo resultados comparáveis aos obtidos pelo produto contendo CMC. Dentre as misturas, o produto que apresentou os melhores resultados foi a mistura dos três adjuvantes, com 50,66% de rendimento (Tabela 37).

**Tabela 38** - Dados de rendimento obtidos no planejamento de misturas de adjuvantes.

| Extrato | DSC   | CMC   | GX    | R (g) | R (%) |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1       | 1     | 0     | 0     | 12,87 | 53,88 |
| 2       | 0     | 1     | 0     | 11,84 | 49,57 |
| 3       | 0     | 0     | 1     | 10,94 | 45,83 |
| 4       | 0,5   | 0,5   | 0     | 11,81 | 49,47 |
| 5       | 0,5   | 0     | 0,5   | 11,83 | 49,53 |
| 6       | 0     | 0,5   | 0,5   | 11,59 | 48,52 |
| 7       | 0,333 | 0,333 | 0,333 | 12,10 | 50,66 |

Onde: DSC = dióxido de silício coloidal; CMC: celulose microcristalina; GX = goma xantana; R = rendimento.  
Fonte: Autoria Própria.

Os gráficos de superfície de resposta e de contorno (Figura 32A e 32B) evidenciam a importância do DSC sobre o rendimento do produto seco. A superfície apresenta uma deformação e inclinação ascendente demonstrando que o rendimento do produto aumenta com o aumento da concentração de DSC no produto. Isso pode ser confirmado pelo gráfico de contorno que apresenta coloração vermelha intensa no ponto de maior proporção de DSC.

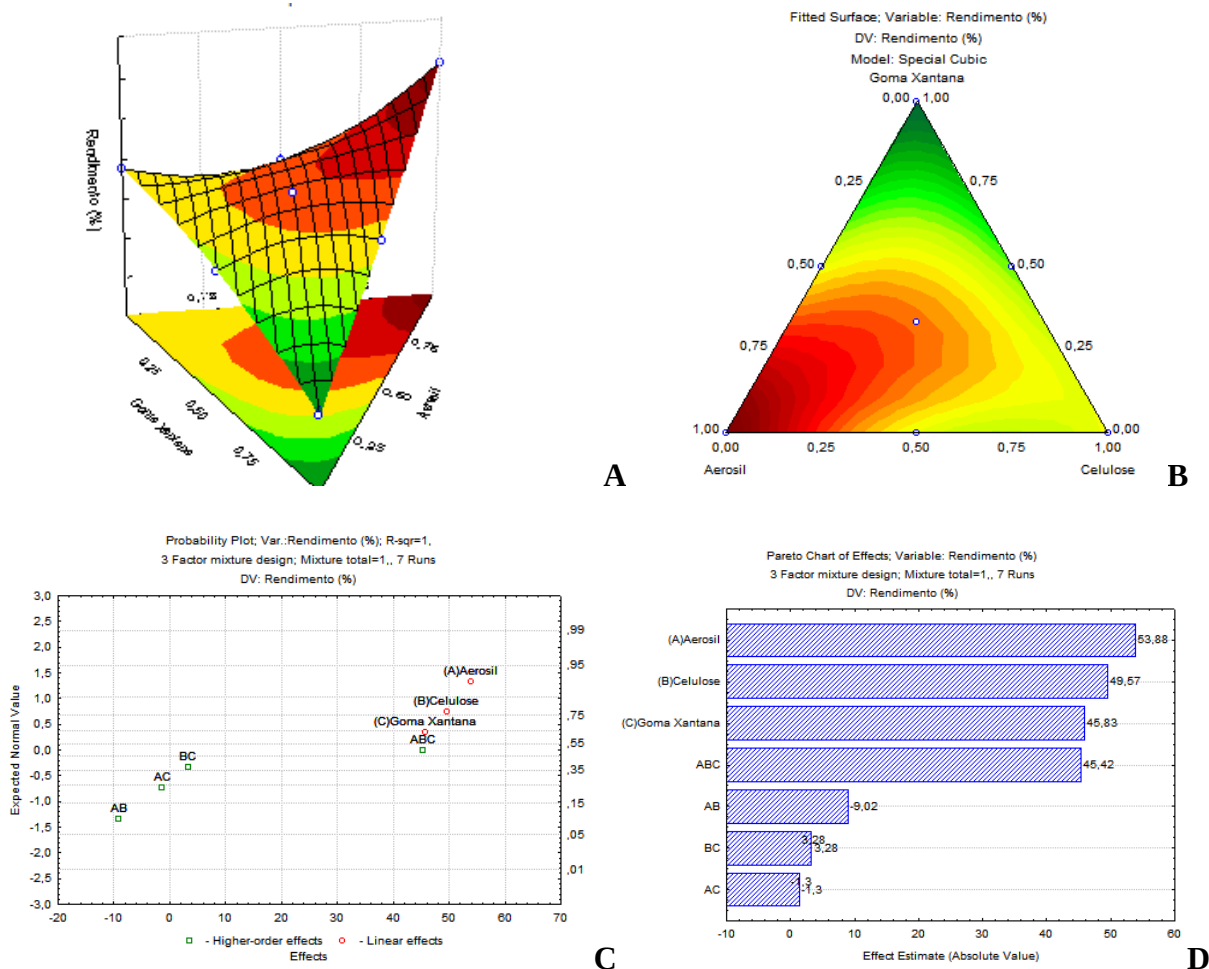
Na avaliação dos efeitos, foi possível verificar que dos sete fatores, cinco apresentaram influência positiva sobre o processo. No gráfico de probabilidade normal (Figura 32C) pode-se observar que as misturas de DSC com celulose e goma xantana, apresentaram queda nos valores de rendimento, e por consequência o efeito conjunto destes fatores apresenta efeito deletério.

Sumarizando os efeitos, os fatores que apresentaram maior influência sobre o rendimento, segundo o gráfico de paretos (Figura 32D), foram: A (DSC – +53,88), B (CMC – +49,57), C (GX – +45,83), ABC (DSC+CMC+GX – +45,42) AB (DSC+CMC – -9,02). Os

demais fatores, possuem influência com valores baixos e muito próximos de zero no gráfico de probabilidade normal, indicando que estas respostas não satisfazem aos interesses do ensaio.

Neste caso, o efeito conjunto dos três componentes apresenta um resultado promissor, visto que apresenta o segundo melhor resultado, mesmo que as misturas binárias contendo DSC tenham apresentado quedas nos teores, a combinação dos três componentes reflete em um resultado comparável ao produto de melhor desempenho.

**Figura 32** - Gráficos de superfície de resposta (A), contorno (B), probabilidade normal (C) e Paretos (D) obtidos para a variável rendimento no planejamento de misturas de adjuvantes.



Fonte: Autoria Própria.

## b) Umidade

As variações entre os resultados não apresentaram variações estatisticamente significativas. Entretanto é possível observar que o menor resultado para teor de umidade entre os produtos contendo o adjuvante isolado, foi apresentado pelo produto contendo dióxido de silício coloidal (DSC) (2,93%).

**Tabela 39** - Dados de umidade obtidos para planejamento de misturas de adjuvantes

| Extrato | DSC   | CMC   | GX    | Umidade (%) |
|---------|-------|-------|-------|-------------|
| 1       | 1     | 0     | 0     | 2,93        |
| 2       | 0     | 1     | 0     | 3,28        |
| 3       | 0     | 0     | 1     | 3,36        |
| 4       | 0,5   | 0,5   | 0     | 3,15        |
| 5       | 0,5   | 0     | 0,5   | 2,81        |
| 6       | 0     | 0,5   | 0,5   | 3,02        |
| 7       | 0,333 | 0,333 | 0,333 | 3,07        |

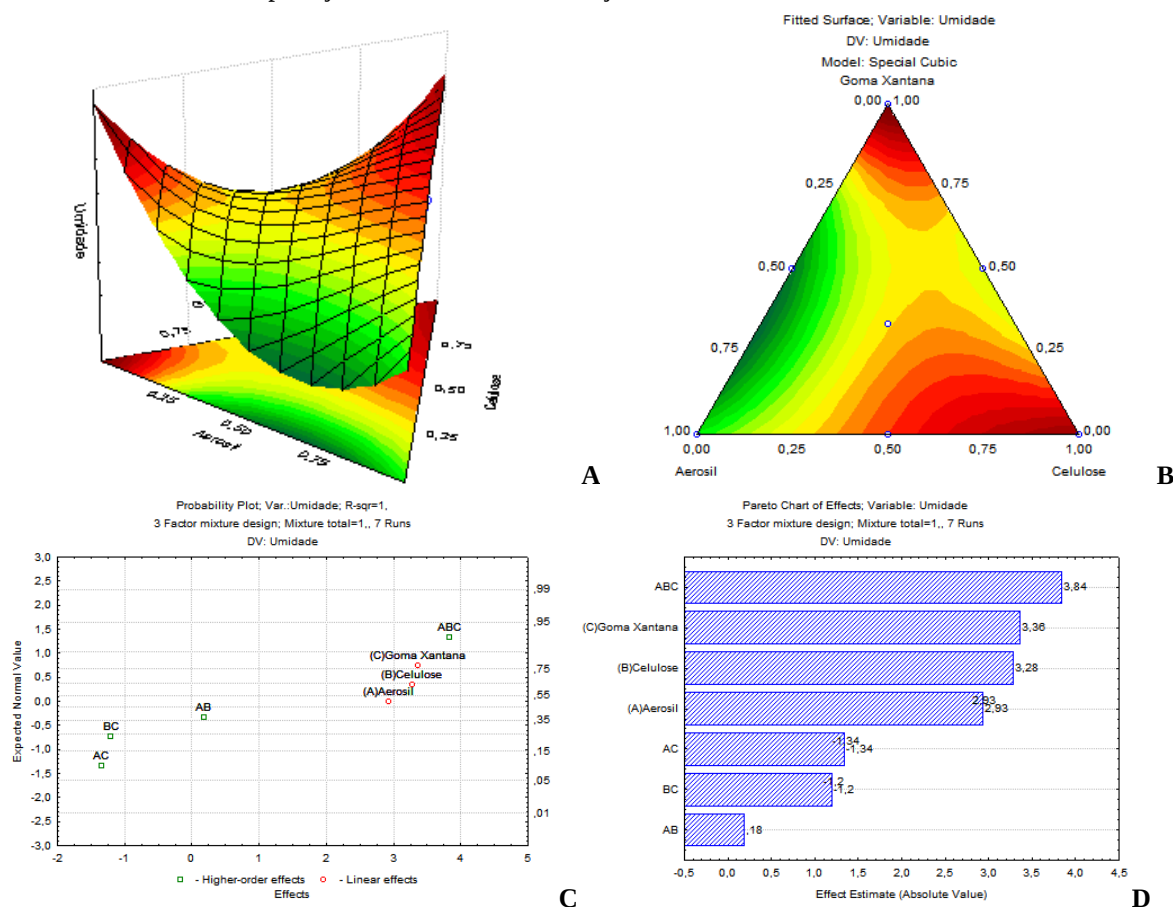
Onde: DSC = dióxido de silício coloidal; CMC: celulose microcristalina; GX = goma xantana; R = rendimento.  
Fonte: Autoria Própria.

Estes resultados podem ser justificados pela natureza dessecante do DSC, o qual é frequentemente utilizado para controlar a umidade de produtos secos (COUTO *et al.*, 2011; CORTES-ROJAS *et al.*, 2015 ARPAGAUS *et al.*, 2018), entretanto está um pouco abaixo da faixa de umidade considerada ótima para produtos secos por aspersão (3-7%) (FREITAS; TEIXEIRA; ZAMARIOLI, 2017; REIS *et al.*, 2017).

Os gráficos de superfície de resposta e diagrama de contorno (Figura 33A e 33B) evidenciam o impacto dos adjuvantes CMC e GX sobre a umidade, resultando no aumento do teor de umidade dos produtos secos.

Sumarizando os efeitos, os fatores que apresentaram maior influência sobre a umidade foram ABC (DSC+CMC+GX – +3,84), C (GX – +3,36), B (CMC – +3,38), A (DSC – +2,93). Os demais fatores, possuem influências com valores baixos e próximos de zero no gráfico de probabilidade normal, indicando que estas respostas não satisfazem aos interesses do ensaio.

**Figura 33** - Gráficos de superfície de resposta (A), contorno (B), probabilidade normal (C) e Paretos (D) obtidos para a variável umidade no planejamento de misturas de adjuvantes.



Fonte: Autoria Própria.

### c) Ângulo de Repouso

As respostas estão apresentadas na tabela 39. Todos os fatores apresentaram influência positiva, entretanto as misturas binárias apresentaram valores muito baixos (próximos do zero) na análise dos efeitos. Neste sentido as variáveis que apresentaram maior influência sobre as respostas foram os efeitos lineares DSC, CMC e GX, além do efeito de maior grau, com a interação dos três fatores ABC (DSC+CMC+GX).

**Tabela 40** - Dados de ângulo de repouso obtidos para planejamento de misturas de adjuvantes

| <b>Extrato</b> | <b>DSC</b> | <b>CMC</b> | <b>GX</b> | <b>Ângulo de Repouso (°)</b> |
|----------------|------------|------------|-----------|------------------------------|
| <b>1</b>       | 1          | 0          | 0         | 21                           |
| <b>2</b>       | 0          | 1          | 0         | 26                           |
| <b>3</b>       | 0          | 0          | 1         | 22                           |
| <b>4</b>       | 0,5        | 0,5        | 0         | 24                           |
| <b>5</b>       | 0,5        | 0          | 0,5       | 22                           |
| <b>6</b>       | 0          | 0,5        | 0,5       | 25                           |
| <b>7</b>       | 0,333      | 0,333      | 0,333     | 26                           |

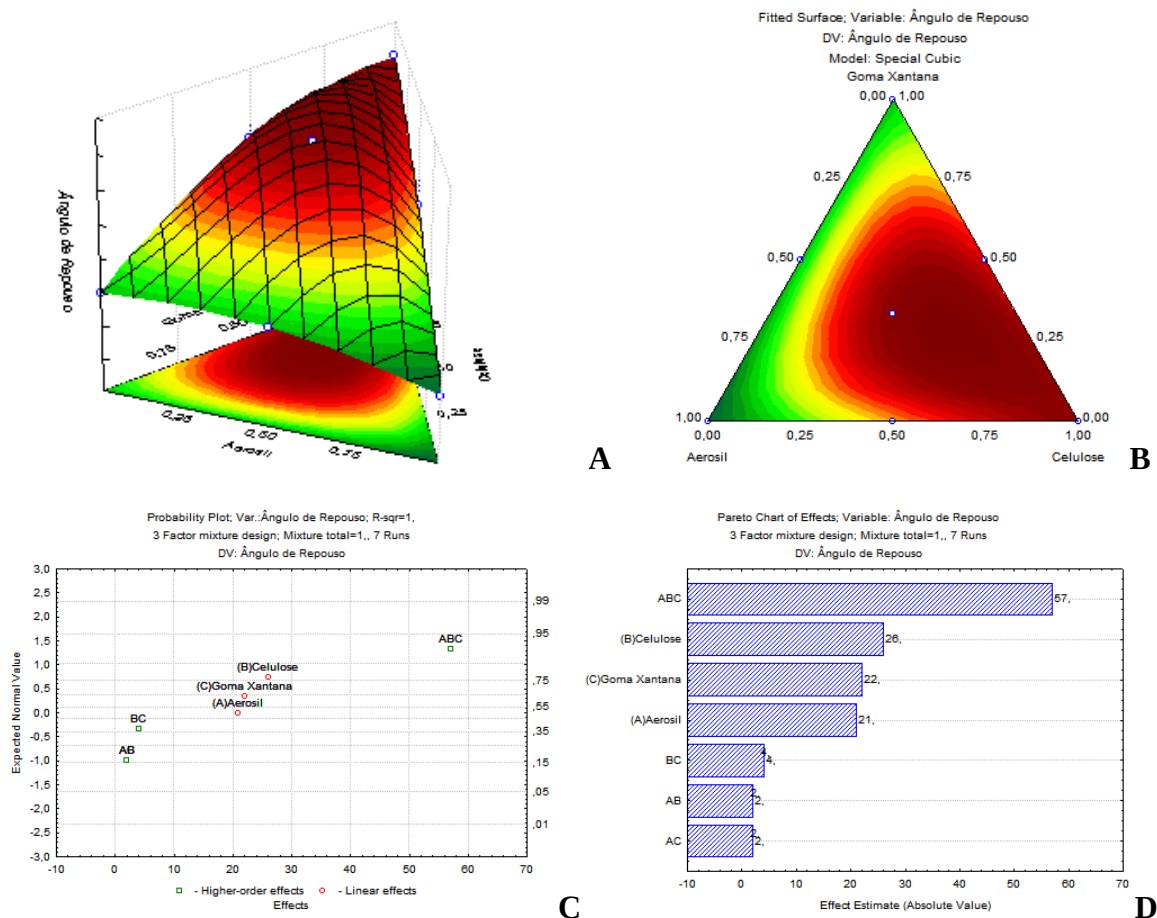
Onde: DSC = dióxido de silício coloidal; CMC: celulose microcristalina; GX = goma xantana; R = rendimento.  
 Fonte: Autoria Própria.

Todos os resultados obtidos na análise de ângulo de repouso foram considerados excelentes, entretanto a avaliação da influência de cada um dos adjuvantes isoladamente e suas interações permite mensurar a importância de cada componente na formulação, e caso sejam necessários ajustes, este ensaio permite a modificação das concentrações destas substâncias de acordo com o objetivo e grau de importância.

Os gráficos de superfície de resposta e diagrama de contorno (Figura 34A e 34B) evidenciam a importância da CMC sobre o aumento do ângulo de repouso do produto seco. A intensidade da cor vermelha nas regiões de mistura demonstra que as propriedades físicas da celulose causam maior impacto sobre o aumento do ângulo de repouso.

De acordo com a distribuição no gráfico de probabilidade normal (Figura 34C) todos os fatores estão dispersos à direita do zero indicando influência positiva. Os fatores que apresentaram maior influência sobre o ângulo de repouso, segundo o gráfico de paretos (Figura 34D), foram: ABC (+57), B (+26), C (+22), A (+21).

**Figura 34** - Gráficos de superfície de resposta (A), contorno (B), probabilidade normal (C) e Paretos (D) obtidos para a variável ângulo de repouso no planejamento de misturas de adjuvantes.



Fonte: Autoria Própria.

#### d) Densidade Bruta

Os dados de densidade aparente dos produtos secos estão sumarizados na tabela 40. A utilização de diferentes adjuvantes e misturas apresentou pequenas alterações nesta variável, com destaque para os produtos contendo celulose microcristalina. De acordo com os dados, é possível observar que o menor resultado para a densidade aparente entre os produtos contendo o adjuvante isolado, foi apresentado pelo produto contendo dióxido de silício coloidal (DSC) (0,1171 g/mL), o que pode estar correlacionado com a própria baixa densidade do adjuvante. O produto que apresentou maior densidade dentre os produtos contendo adjuvantes isolados, foi o produto contendo CMC (0,1330 g/mL). As misturas binárias apresentaram resultados próximos aos produtos contendo adjuvantes isolados, exceto para a mistura contendo DSC e CMC (0,1226 g/mL), que apresentou menor densidade em relação ao produto contendo apenas CMC, indicando efeito deletério da mistura de celulose microcristalina com dióxido de silício coloidal.

**Tabela 41** - Dados de densidade aparente obtidos para planejamento de misturas de adjuvantes

| <b>Extrato</b> | <b>DSC</b> | <b>CMC</b> | <b>GX</b> | <b>Densidade Aparente (g/mL)</b> |
|----------------|------------|------------|-----------|----------------------------------|
| <b>1</b>       | 1          | 0          | 0         | 0,1171                           |
| <b>2</b>       | 0          | 1          | 0         | 0,1330                           |
| <b>3</b>       | 0          | 0          | 1         | 0,1234                           |
| <b>4</b>       | 0,5        | 0,5        | 0         | 0,1226                           |
| <b>5</b>       | 0,5        | 0          | 0,5       | 0,1328                           |
| <b>6</b>       | 0          | 0,5        | 0,5       | 0,1358                           |
| <b>7</b>       | 0,333      | 0,333      | 0,333     | 0,1436                           |

Onde: DSC = dióxido de silício coloidal; CMC: celulose microcristalina; GX = goma xantana; R = rendimento.  
 Fonte: Autoria Própria.

O produto contendo a mistura dos três adjuvantes apresentou o maior incremento na densidade aparente (0,1436 g/mL), obtendo o melhor resultado dentre os produtos avaliados.

e) Densidade Compactada

Para a variável de densidade compactada (Tabela 41), os resultados não apresentaram grandes variações, exceto pelos produtos secos contendo apenas DSC, que apresentou a menor densidade dentre os testados (0,2029 g/mL); e, CMC que apresentou as maiores respostas para esta densidade (0,2782 g/mL). As misturas que apresentaram os maiores valores foram as contendo DSC e CMC (0,2357 g/mL), CMC e GX (0,2246 g/mL) e a mistura ternária (0,2257 g/mL).

**Tabela 42** - Dados de densidade compactada obtidos para planejamento de misturas de adjuvantes

| <b>Extrato</b> | <b>DSC</b> | <b>CMC</b> | <b>GX</b> | <b>Densidade Compactada (g/mL)</b> |
|----------------|------------|------------|-----------|------------------------------------|
| <b>1</b>       | 1          | 0          | 0         | 0,2029                             |
| <b>2</b>       | 0          | 1          | 0         | 0,2782                             |
| <b>3</b>       | 0          | 0          | 1         | 0,2204                             |
| <b>4</b>       | 0,5        | 0,5        | 0         | 0,2357                             |
| <b>5</b>       | 0,5        | 0          | 0,5       | 0,2182                             |
| <b>6</b>       | 0          | 0,5        | 0,5       | 0,2246                             |
| <b>7</b>       | 0,333      | 0,333      | 0,333     | 0,2257                             |

Onde: DSC = dióxido de silício coloidal; CMC: celulose microcristalina; GX = goma xantana; R = rendimento.  
 Fonte: Autoria Própria.

O ideal é que os valores de ambas as densidades não apresentem elevada variação, pois valores muito discrepantes podem resultar em altos índices de compressibilidade de Carr e fator de Hausner, indicadores para as propriedades de fluxo.

f) Índice de Carr

Para a variável índice de Carr (Tabela 42), os resultados apresentaram grandes variações. Dentre os produtos contendo os adjuvantes isolados, o produto seco com o melhor desempenho foi o contendo DSC (42,28). Todas as misturas binárias apresentaram diminuição no índice de Carr, sendo a mistura contendo DSC-GX a de melhor desempenho (39,14). O produto contendo a mistura ternária de adjuvantes apresentou o menor resultado dentre todos os testados (36,37).

**Tabela 43** - Dados de índice de Carr obtidos para planejamento de misturas de adjuvantes

| <b>Extrato</b> | <b>DSC</b> | <b>CMC</b> | <b>GX</b> | <b>IC</b> |
|----------------|------------|------------|-----------|-----------|
| <b>1</b>       | 1          | 0          | 0         | 42,28     |
| <b>2</b>       | 0          | 1          | 0         | 52,19     |
| <b>3</b>       | 0          | 0          | 1         | 44,01     |
| <b>4</b>       | 0,5        | 0,5        | 0         | 47,98     |
| <b>5</b>       | 0,5        | 0          | 0,5       | 39,14     |
| <b>6</b>       | 0          | 0,5        | 0,5       | 43,99     |
| <b>7</b>       | 0,333      | 0,333      | 0,333     | 36,37     |

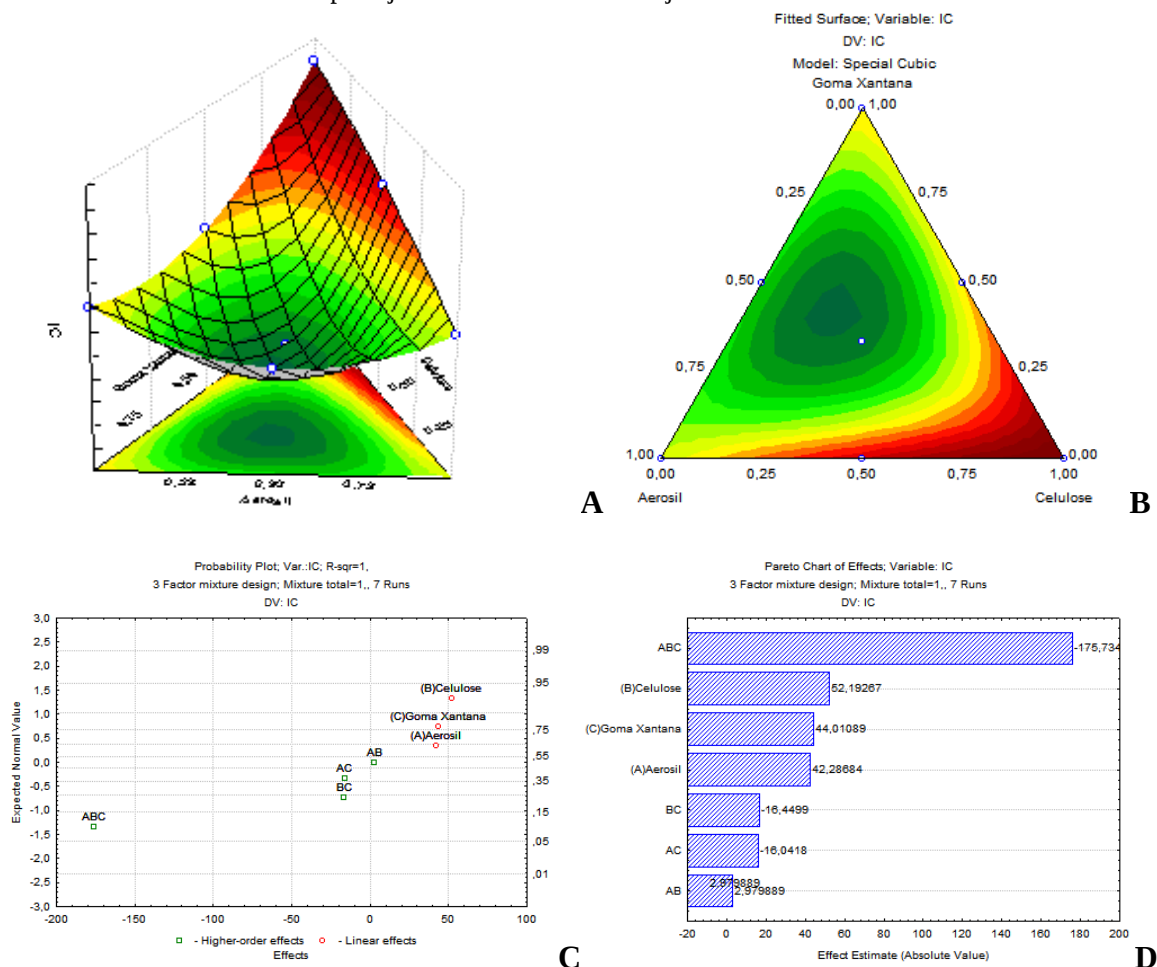
Onde: DSC = dióxido de silício coloidal; CMC: celulose microcristalina; GX = goma xantana; R = rendimento.  
 Fonte: Autoria Própria.

Quanto maior o IC pior serão as características de fluxo dos pós. A mistura dos três adjuvantes testados proporcionou uma queda significativa, sendo classificado com fluxo muito fraco (GARCIA *et al.*, 2012).

O gráfico de superfície de resposta (Figura 35A) apresenta duas deformações que demonstram as regiões de maior impacto. A primeira, é a inclinação ascendente no vértice referente à CMC, o que evidencia que este adjuvante é o responsável pelo aumento dos valores de resposta para esta variável. A segunda, é o ponto referente às regiões de mistura, localizado próximo ao centro da superfície de coloração verde intensa (não centralizado, com proximidade ao vértice referente ao DSC), onde há deslocamento descendente da superfície, o que evidencia a queda das respostas. Com o auxílio do gráfico de contorno (Figura 35B), é possível inferir que para um decréscimo ainda maior na resposta ao índice de Carr; assim, os ajustes necessários para trazer maior eficiência, seriam o aumento da concentração de DSC e diminuição das concentrações de CMC e GX.

Na avaliação dos efeitos, foi possível verificar que dos sete fatores, quatro apresentam influência positiva, e três apresentam a influência negativa esperadas para a avaliação dessa variável (Figura 35C). De acordo com o gráfico de paretos (Figura 35D), a mistura ABC apresenta o maior impacto, com efeito de -175,73, seguido do das misturas BC (-16,44) e AC (-16,04).

**Figura 35** - Gráficos de superfície de resposta (A), contorno (B), probabilidade normal (C) e paretos (D) obtidos para a variável índice de Carr no planejamento de misturas de adjuvantes.



Fonte: Autoria Própria.

### g) Fator de Hausner

Em relação ao fator de Hausner (Tabela 43), os resultados também apresentaram variações estatisticamente significativas, que corroboram com a variável anterior (índice de Carr), dentre os produtos contendo os adjuvantes isolados, o produto seco com o melhor desempenho foi o contendo DSC (1,73). O produto contendo mistura ternária apresentou o melhor resultado, resultando na queda mais expressiva das respostas para esta variável (1,57).

**Tabela 44** - Dados de Fator de Hausner obtidos para planejamento de misturas de adjuvantes

| <b>Extrato</b> | <b>DSC</b> | <b>CMC</b> | <b>GX</b> | <b>FH</b> |
|----------------|------------|------------|-----------|-----------|
| <b>1</b>       | 1          | 0          | 0         | 1,73      |
| <b>2</b>       | 0          | 1          | 0         | 2,09      |
| <b>3</b>       | 0          | 0          | 1         | 1,78      |
| <b>4</b>       | 0,5        | 0,5        | 0         | 1,92      |
| <b>5</b>       | 0,5        | 0          | 0,5       | 1,64      |
| <b>6</b>       | 0          | 0,5        | 0,5       | 1,78      |
| <b>7</b>       | 0,333      | 0,333      | 0,333     | 1,57      |

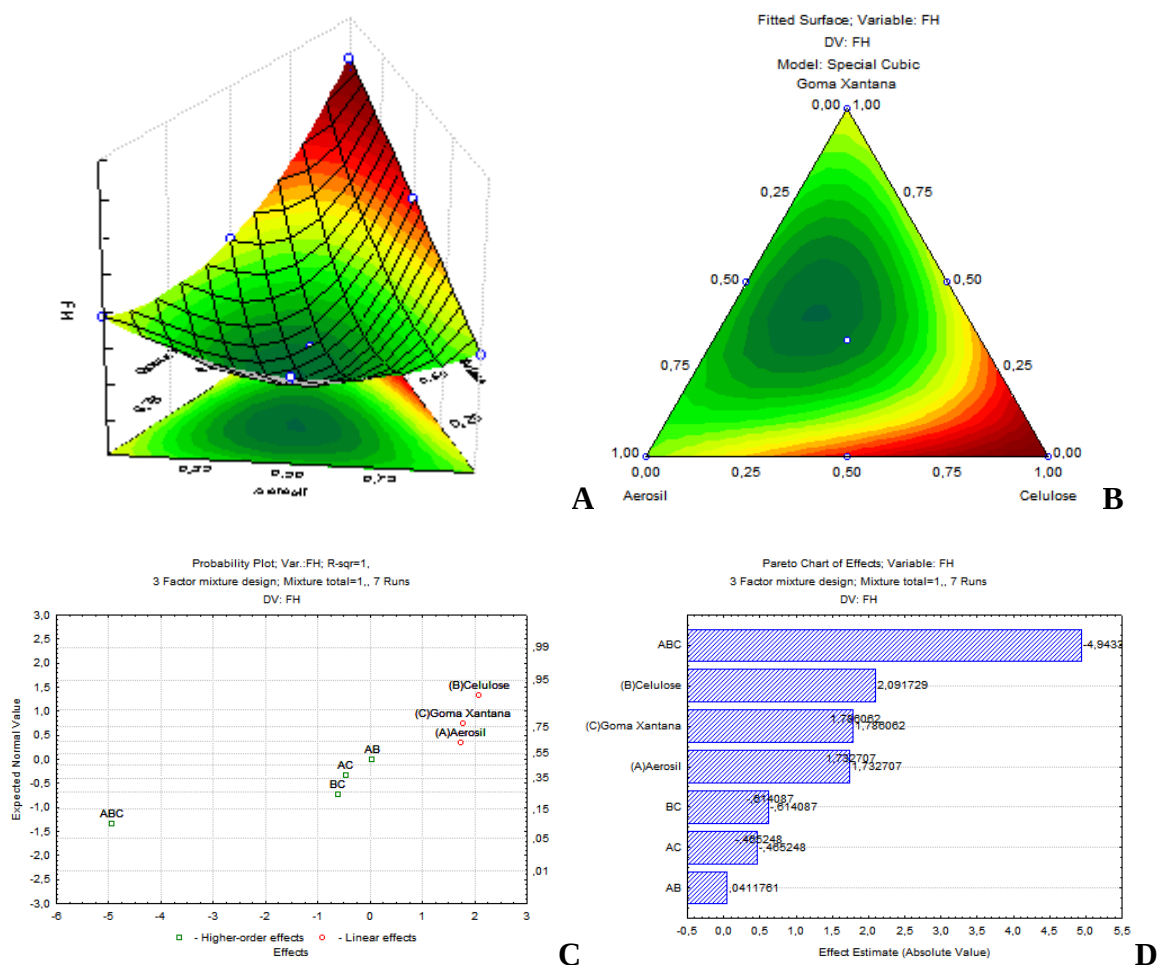
Onde: DSC = dióxido de silício coloidal; CMC: celulose microcristalina; GX = goma xantana; R = rendimento.  
 Fonte: Autoria Própria.

Assim como na variável anterior, quanto maiores os resultados para o Fator de Hausner, mais pobres serão as propriedades de fluxo dos pós. Corroborando com os resultados da variável de índice de Carr, a mistura dos componentes ABC resultou em uma queda significativa, quando comparados aos produtos secos contendo os adjuvantes isolados ou em misturas binárias (que apresentam fluxo extremamente deficiente) (GARCIA *et al.*, 2012).

O gráfico de superfície de resposta (Figura 36A) se apresenta bastante semelhante ao obtido na variável anterior, contendo duas deformações que demonstram as regiões de maior impacto sobre as respostas, onde a inclinação ascendente no vértice referente à CMC, com coloração vermelha indica que o aumento da concentração deste adjuvante resulta em aumento do fator de Hausner.

No gráfico de probabilidade normal (Figura 36C) é possível observar que os pontos referentes às misturas AC, BC e ABC se apresentam dispersos à esquerda do zero, correspondendo a um impacto negativo sobre os resultados e satisfazendo ao interesse da análise desta variável, de redução dos valores do fator de Hausner. No gráfico de paretos (Figura 36D), estão apresentados os valores dos efeitos de cada adjuvante. A mistura ABC apresenta o maior impacto, com efeito de -4,94, seguido do das misturas BC (-0,614) e AC (-0,465).

**Figura 36** - Gráficos de superfície de resposta (A), contorno (B), probabilidade normal (C) e paretos (D) obtidos para a variável fator de Hausner no planejamento de misturas de adjuvantes.



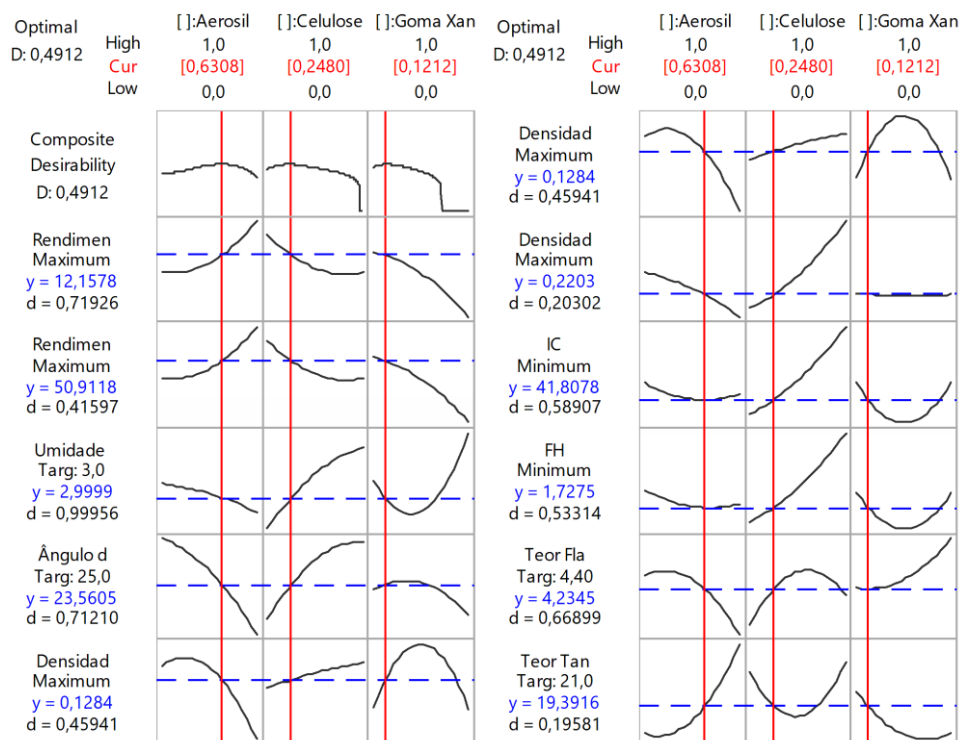
Fonte: Autoria Própria.

As análises das respostas individuais para cada variável de saída permitiram a identificação dos fatores com maior impacto sobre as características dos produtos secos. Os gráficos de contorno e superfície de respostas auxiliaram na determinação dos fatores de maior importância, evidenciando que maiores concentrações de DSC possibilitam incremento nas respostas referente à rendimento e umidade, além das medidas de fluxo. Neste sentido, os ajustes de concentrações dos adjuvantes para a otimização das características dos pós derivados de *E. uniflora*, devem ser realizados primordialmente nestes dois excipientes.

Para a avaliação de quais ajustes poderiam ser feitos para obter um pó com boas características de fluxo, foi utilizada a ferramenta de *desirability*. De acordo com os gráficos modelados a partir do software Minitab 17 (Figura 37), é possível verificar as diferentes curvas (ascendentes ou descendentes) que correspondem ao aumento ou decréscimo das respostas das variáveis estudadas de acordo com a mudança na concentração dos componentes em estudo. A *desirability* global do planejamento em análise na condição “ótima” (gerada automaticamente

pelo software) apresenta baixa correlação (0,4912), indicando que possíveis alterações apresentam baixa probabilidade de obterem melhora nas respostas. Nas curvas individuais, os valores resultantes também foram baixos, além de apresentarem previsões de respostas que não satisfazem os valores esperados para a otimização do ensaio, com características inferiores ao produto seco contendo mistura ternária dos adjuvantes obtido para a construção dos modelos.

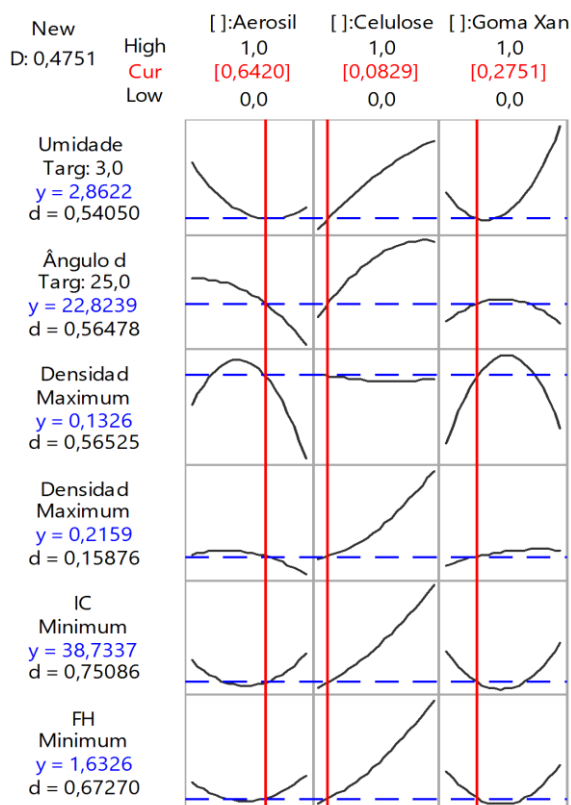
**Figura 37** - Curvas de desirability geradas no planejamento de misturas de adjuvantes na obtenção de produtos secos das folhas de *E. uniflora*.



Fonte: Autoria Própria.

Logo, foram avaliadas outras condições segundo as curvas de *desirability*, modificando manualmente as concentrações dos adjuvantes de acordo com a orientação das curvas obtidas para a obtenção das respostas esperadas para as variáveis referentes às características físicas dos produtos secos por aspersão. Mesmo modificando as concentrações dos adjuvantes nas curvas de *desirability* (Figura 38), as respostas previstas não apresentaram os resultados esperados para a maximização das respostas de densidade, e minimização das respostas dos indicadores de fluxo, embora tenham apresentado melhora em relação as curvas geradas automaticamente.

**Figura 38** - Curvas de *desirability* (modificadas manualmente) obtidas no planejamento de misturas de adjuvantes na obtenção de produtos secos das folhas de *E. uniflora*.



Fonte: Autoria Própria.

Neste sentido, o produto seco contendo a mistura ternária dos adjuvantes dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina e goma xantana (0,333:0,333:0,333, m/m/m) foi considerado o produto seco de melhor desempenho e, portanto, o produto seco otimizado das folhas de *E. uniflora*.

### 5.3.7 Fracionamento e análise fitoquímica do extrato seco através de cromatografia de camada delgada

Foram obtidas 3 frações, FAE - Fração acetato de etila, FAq – Fração aquosa e FI – Fração interfacial (emulsão resultante na operação de fracionamento). As frações liofilizadas apresentaram rendimentos de aproximadamente 1,5 g para frações acetato de etila, aquosa e interfacial, para cada 10 g do extrato seco utilizado para a realização das partições (dos quais foram obtidos a partir de aproximadamente 60 g de material vegetal). Os rendimentos foram considerados baixos, principalmente quando se leva em consideração a relação droga:extrato inicial (60 g: 10 g, m/m).

Na análise fitoquímica do extrato e das frações, através da cromatografia de camada delgada, foram evidenciadas as presenças de polifenóis, como taninos e flavonoides, conhecidos marcadores da espécie. Além de açúcares redutores, saponinas, triterpenos e esteroides. Também foram pesquisados derivados antracênicos e cinâmicos para o extrato e frações, entretanto, para esta amostra, não foram observados resultados positivos na CCD convencional para os padrões pesquisados. Estes resultados discordam dos obtidos por Bezerra (2016) para derivados antracênicos, onde foram encontradas substâncias correspondentes à antraquinonas.

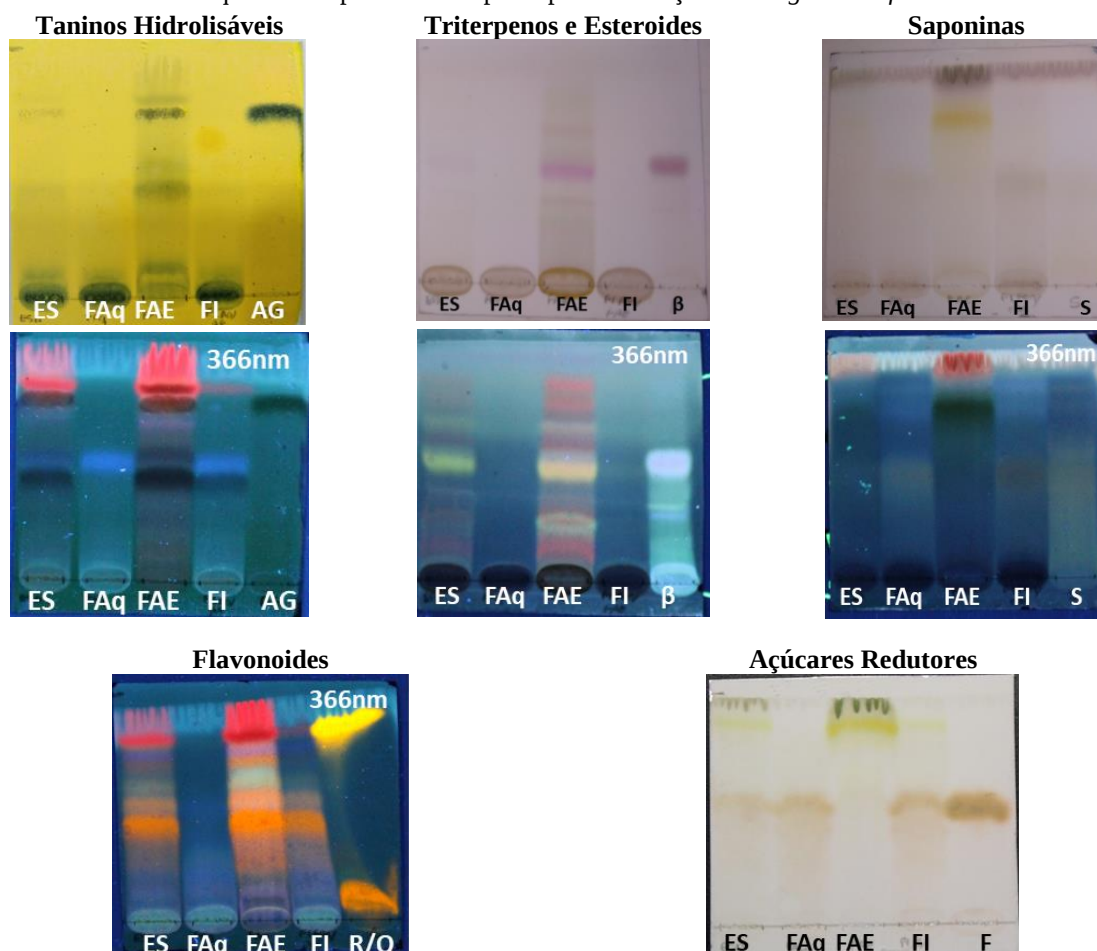
Os resultados da avaliação fitoquímica (Figura 39) evidenciaram o enriquecimento da fração acetato de etila, tanto para os polifenóis (taninos e flavonoides) quanto para as substâncias de origem esteroidal/triterpênica, devido à maior intensidade das bandas exibidas após o desenvolvimento e revelação das placas. A FAE não apresentou resultados positivos para as substâncias que tem maior solubilidade em água (saponinas e açúcares redutores) indicando a eficiência desse processo de fracionamento.

A fração aquosa apresentou resultado positivo para saponinas e açúcares redutores; e, apesar de apresentar bandas para flavonoides e taninos hidrolisáveis, estas não corresponderam aos padrões utilizados, indicando a ausência destas substâncias na fração aquosa. Para a pesquisa de derivados triterpênicos/esteroidais não foram evidenciadas manchas, o que pode ser explicado pela natureza lipofílica destas substâncias.

A fração interfacial, formada por uma emulsão resultante do processo de fracionamento, apresentou perfil químico semelhante ao observado para a fração aquosa. Ao contrário da FAQ, a FI apresentou resultado positivo para a pesquisa de flavonoides, evidenciando que a emulsão formada apresentava em sua composição substâncias presentes em ambas as fases. Esta fase não apresentou nenhuma banda, em nenhuma das pesquisas realizadas, que diferenciase das bandas encontradas no extrato seco e na fração aquosa, nesse sentido, a FI não foi considerada relevante para a aplicação nos testes posteriores.

Estes resultados corroboram com a composição química já descrita na literatura para a espécie, evidenciando grande diversidade de compostos presentes na amostra (LEE et al., 2000; FIÚZA et al., 2008; RATTMANN et al., 2012; BEZERRA, 2016; RAMOS et al., 2017; BEZERRA et al., 2018).

**Figura 39** - Análise fitoquímica de produto seco por aspersão e frações de *Eugenia uniflora*.



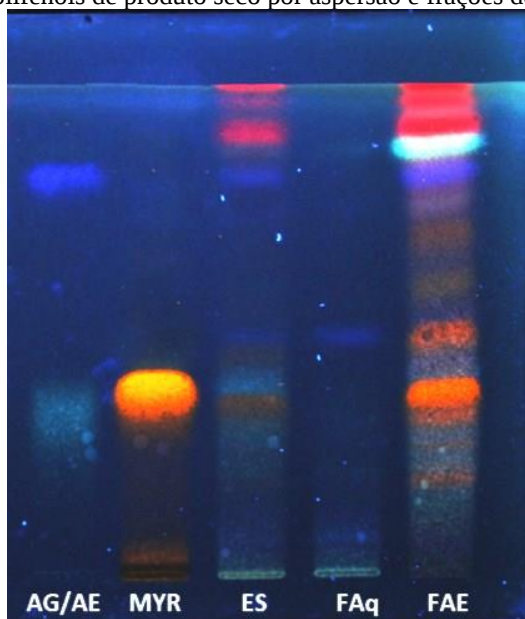
ES: Extrato Seco; FAq: Fração Aquosa; FAE: Fração Acetato de Etila; FI: Fração Interfacial; AG: Ácido Gálico; β: Beta-sitosterol; S: Saponina; R: Rutina; Q: Quercetina; F: Frutose.

Fonte: Autoria Própria.

Considerando os polifenóis como principais marcadores da espécie, a avaliação da identidade e controle da qualidade de derivados da espécie em relação a estas substâncias é essencial para avaliar a viabilidade terapêutica da espécie. Neste sentido, também foram adquiridos os *fingerprints* das frações (Figura 40), que podem ser usados como material para comparação entre os derivados, servindo de suporte para autenticação dos materiais e das atividades terapêuticas associadas a espécie (NICOLLETTI, 2011; BEZERRA *et al.*, 2018).

O perfil químico típico encontrado para as frações, corresponde ao mesmo obtido para os extratos produzidos na fase de otimização da extração, assim como ao *fingerprint* obtido por Bezerra e colaboradores (2018), evidenciando a presença de ácido gálico, ácido elágico e miricitrina, além das diferentes bandas amarelas correspondentes à flavonoides, comumente relatados na literatura como derivados de quercetina, miricetina e miricitrina (RATTMANN *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2017; BEZERRA *et al.*, 2018).

**Figura 40** - Fingerprint para polifenóis de produto seco por aspersão e frações de folhas de *Eugenia uniflora*.



Onde: AG = ácido gálico; AE = ácido elágico; MYR = miricitrina; ES = extrato seco; FAq = fração aquosa; FAE = fração acetato de etila.

Fonte: Autoria Própria.

Estes resultados indicam que mesmo após as operações de transformação (fracionamento e secagem) é possível verificar a manutenção das substâncias marcadoras e do perfil químico típico presente na espécie, o que possibilita além da autenticação dos produtos, a inferência da manutenção das atividades da espécie (pela presença das substâncias que compõem o perfil químico), permitindo que esta técnica seja aplicada ao controle de qualidade da espécie e de seus produtos, possibilitando um uso seguro de produtos derivados da espécie.

#### 5.4 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO - AVALIAÇÃO DE SISTEMAS DISPERSOS PARA INCORPORAÇÃO DE EXTRATOS SECOS DE *Eugenia uniflora* L.

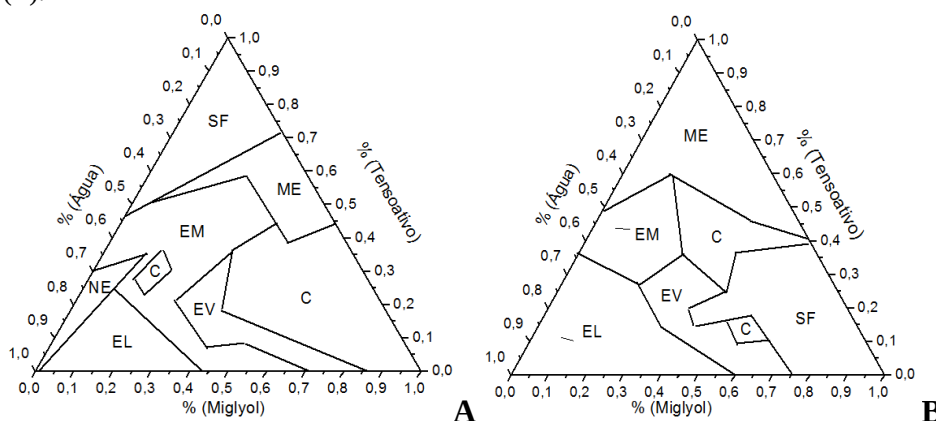
Diante das diversas atividades biológicas atreladas à *E. uniflora*, dentre elas as atividades anti-oxidante, antiinflamatória, antimicrobiana, antifúngica e cicatrizante (RATTMANN *et al.*, 2012; FALCÃO *et al.*, 2018; GARMUS *et al.*, 2014; DENARDIM *et al.*, 2015), a aplicação desta espécie em formulações tópicas para terapêutica e cosmética se tornou a força motriz deste estudo de pré-formulação. Principalmente levando em consideração o crescimento da procura e do consumo do público mundial de produtos com componentes sustentáveis, de origem natural e veganos (HANNA *et al.*, 2021), além da necessidade de novos compostos antimicrobianos e antifúngicos.

##### 5.4.1 Construção de Diagrama de Fases Pseudo-Ternários

A primeira etapa da pré-formulação de sistemas dispersos consistiu na avaliação da composição de formulações convencionais utilizando tensoativos. Foram selecionados o emoliente, Miglyol 812<sup>®</sup>, triglicerídeo de cadeia média com ampla aplicação em sistemas emulsionados (EHL = 15,4). Como agentes estabilizantes, foram utilizados os tensoativos não iônicos Tween<sup>®</sup> 20 (polissorbato 20, monolaurato de sorbitano etoxilado 20) e Span<sup>®</sup> 80 (monoleato de sorbitano 80) em mistura (89,52% Tween 20; 10,48% Span 80) para alcançar o valor requerido para estabilização do sistema pelo EHL da fase oleosa.

Para a seleção dos sistemas dispersos foram construídos diagramas pseudo-ternários por duas diferentes técnicas de homogeneização (ultra-turrax e sonda ultrassônica). A determinação dos tipos de sistema obtidos, foi realizada através de análise visual, sendo verificada a presença de separação de fases, além de: microemulsões (preparação translúcida, amarelada e de conteúdo uniforme); nanoemulsões (preparação com coloração azulada, líquida e de conteúdo uniforme); três diferentes tipos de emulsões determinadas qualitativamente de acordo com as características de viscosidade aparente: viscosas (preparação de coloração branca, opaca, viscosa), intermediárias (preparação de coloração branca, opaca, ligeiramente fluida e de conteúdo uniforme) e líquidas (preparação de coloração branca, líquida, opaca, com aspecto leitoso e conteúdo uniforme); e, cremes (preparação de coloração branca, opaca, de consistência semissólida e conteúdo uniforme) (Figura 41).

**Figura 41** - Diagramas de fases pseudo-ternários obtidos através de agitação por ultra-turrax (A) e sonda ultrassônica (B).



SF – Separação de Fases; ME – Microemulsão; NE – Nanoemulsão; EM – Emulsão; EV – Emulsão Viscosa; EL – Emulsão líquida; C – Creme.

Fonte: Autoria própria.

Ambos os métodos de homogeneização proporcionaram a obtenção de diagramas de fases contendo os tipos de sistemas descritos, entretanto, as emulsões obtidas por sonda ultrassônica apresentaram regiões bem delimitadas e melhores características visuais. Homogeneizadores do tipo rotor-estator como o ultra-turrax inserem no sistema menor energia, sendo mais indicada para sistemas macroscópicos, por resultarem maiores tamanhos de gotículas. Enquanto sondas ultrassônicas proporcionam a formação de sistemas com grande uniformidade de distribuição de tamanho de gotículas e menor tamanho médio, devido a capacidade do equipamento em gerar ondas ultrassônicas muito intensas e uniformes que resultam inicialmente em dispersões macroscópicas, e com a constante exposição à cavitação, formam gotículas menores devido à elevada energia do sistema (TADROS, 2013; MCCLEMENTS, 2012).

#### 5.4.2 Obtenção preliminar dos sistemas emulsionados

A partir dos diagramas, foram selecionadas três formulações, que correspondessem ao mesmo tipo de sistema para ambos os métodos. Estas formulações foram escolhidas de acordo com as suas características: as emulsões líquidas apresentam maior aceitabilidade, devido suas características sensoriais e facilidade de aplicação e espalhamento, e por serem fluidas, podem ser utilizadas na indústria cosmética, além de poderem ser aplicadas por diferentes vias de administração; o creme foi selecionado devido sua maior capacidade de carrear os ativos e devido à boa aderência à pele que estes sistemas possuem, o que pode aumentar o tempo de contato, e por consequência sua absorção, uma vantagem para as formulações tópicas que

necessitam de maior tempo de exposição, como formulações antimicrobianas (ISAAC, 2008; 2007; ECCLESTON, 2016).

Apenas as formulações obtidas através de sonda ultrassônica foram reprodutíveis, enquanto as obtidas através de ultra-turrax apresentaram separação de fases algumas horas após a sua fabricação (Tabela 44).

**Tabela 45** - Proporção dos constituintes das formulações selecionadas a partir do diagrama de fases obtido por sonda ultrassônica.

| <b>Formulação</b> | <b>% Água</b> | <b>% Óleo</b> | <b>% Tensoativos</b> |
|-------------------|---------------|---------------|----------------------|
| <b>FTS – 1</b>    | 88%           | 10%           | 2%                   |
| <b>FTS – 2</b>    | 70%           | 22%           | 8%                   |
| <b>FTS – 3</b>    | 40%           | 36%           | 24%                  |

FTS = Formulação Tween Span.

Fonte: Autoria própria.

As formulações obtidas apresentaram boas características macroscópicas, indicando que todas as formulações se apresentam: brancas, líquidas ou viscosas, uniformes e ausentes de creme tanto no momento da obtenção quanto na avaliação após as primeiras 24 h, e permanecendo nestas condições durante seu armazenamento após 7 dias. Este armazenamento foi realizado em recipientes plásticos opacos, sob temperatura ambiente.

As formulações FTS1 e FTS3 permaneceram estáveis após os primeiros 7 dias de análise. A formulação FTS2 apresentou a formação de filme da fase oleosa indicando a presença de um processo de incompatibilidade (coalescência ou amadurecimento de Ostwald) e por este motivo, o sistema foi descartado.

#### **5.4.3 Avaliação do método de obtenção das emulsões através de planejamento fatorial**

Com a escolha das formulações, a próxima etapa do estudo de pré-formulação foi a avaliação do método de homogeneização utilizando planejamento fatorial 3<sup>2</sup>. Neste ensaio foram avaliadas duas variáveis independentes tempo (8, 10 e 12 min) e potência (80, 90 e 100%), em três diferentes níveis. Para determinar as melhores condições para obtenção de emulsões foram realizadas como variáveis de respostas as análises macroscópicas, avaliação de pH (durante 7 dias) e turbidimetria (no dia 7).

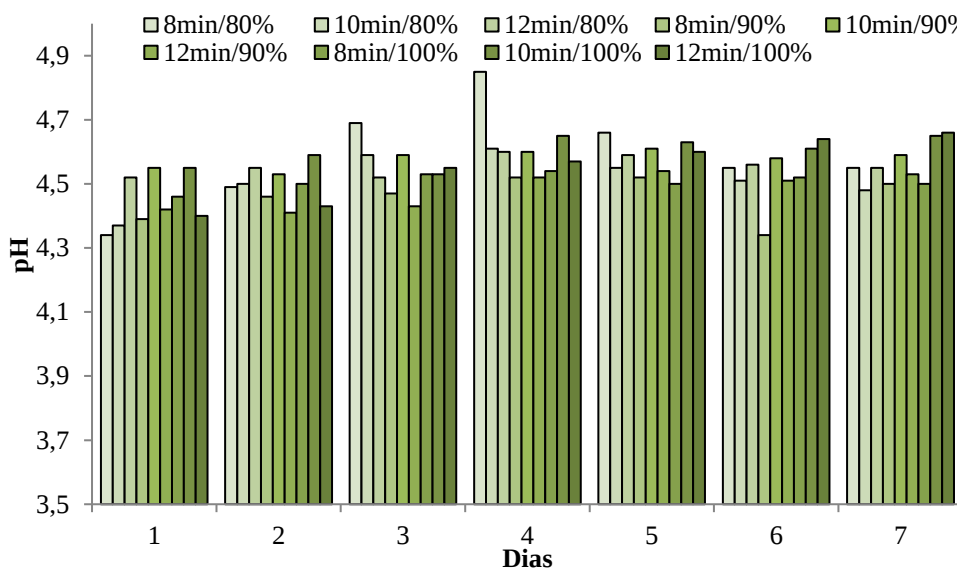
As análises de pH foram usadas como parâmetro por estar atrelada à estabilidade do sistema, visto que alterações bruscas podem estar relacionadas com degradação das cadeias dos agentes emulsificantes utilizados, além de impactar na condutividade alterando as forças de

repulsão e atração presentes no sistema, o que pode levar a fenômenos de instabilidade como coalescência e separação de fase (XAVIER-JUNIOR *et al.*, 2012; TOPAN, 2012; BHATTACHARJEE, 2016; HU *et al.*, 2017).

Já a turbidimetria é uma medida que apresenta relação com as características macroscópicas e é frequentemente relacionada com a integridade das gotículas presentes nos sistemas, a qual avalia diretamente a capacidade óptica do sistema, a partir da relação em que, quanto maior o número de gotículas estáveis estão presentes no sistema, maior será o espalhamento da radiação e menor será a luz incidida no detector, resultando numa elevada turbidez (XAVIER-JUNIOR *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2017).

Nas análises macroscópicas, todas as amostras obtidas em diferentes tempos e potências apresentaram-se brancas, líquidas, uniformes e ausentes de creme desde o momento de sua obtenção até o final dos 7 dias de monitoramento). Os dados brutos estão apresentados na figura 42 (pH) e tabela 45 (turbidimetria) para definir com maior precisão qual o impacto da potência e do tempo de preparação nas características das emulsões. Os resultados obtidos foram utilizados para a avaliação do ensaio fatorial (Tabelas 45 e 46).

**Figura 42** - Variação do pH das diferentes formulações na etapa de otimização do método de obtenção.



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 46** - Análise turbidimétrica das diferentes preparações obtidas através da variação de tempo e potência.

| Potência (%) | Tempo (Min) | Turbidimetria (Média ± DP; DPR%) |
|--------------|-------------|----------------------------------|
| <b>80%</b>   | 8           | 97,43% ±0,0012 (0,12)            |
|              | 10          | 98,10% ±0,0008 (0,08)            |
|              | 12          | 98,57% ±0,0004 (0,04)            |
| <b>90%</b>   | 8           | 98,87% ±0,0004 (0,04)            |
|              | 10          | 98,93% ±0,0004 (0,04)            |
|              | 12          | 99,27% ±0,0004 (0,04)            |
| <b>100%</b>  | 8           | 98,53% ±0,0009 (0,09)            |
|              | 10          | 98,77% ±0,0008 (0,04)            |
|              | 12          | 99,00% ±0,0008 (0,08)            |

\*DP: Desvio Padrão; DPR%: Desvio Padrão Relativo percentual; min: minutos.

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 47** - Matriz de planejamento fatorial 3<sup>2</sup> para avaliar a influência do tempo e potência sobre as características de pH e turbidimetria na obtenção de sistemas dispersos.

| Variáveis Naturais |          | Variáveis Codificadas |          | Respostas – Variáveis Dependentes* |               |
|--------------------|----------|-----------------------|----------|------------------------------------|---------------|
| Tempo              | Potência | Tempo                 | Potência | pH                                 | Turbidimetria |
| <b>8</b>           | 80       | -1                    | -1       | 4,59                               | 97,83%        |
| <b>8</b>           | 90       | -1                    | 0        | 4,55                               | 98,87%        |
| <b>8</b>           | 100      | -1                    | 1        | 4,50                               | 98,53%        |
| <b>10</b>          | 80       | 0                     | -1       | 4,51                               | 98,10%        |
| <b>10</b>          | 90       | 0                     | 0        | 4,59                               | 98,93%        |
| <b>10</b>          | 100      | 0                     | 1        | 4,65                               | 98,77%        |
| <b>12</b>          | 80       | 1                     | -1       | 4,55                               | 98,53%        |
| <b>12</b>          | 90       | 1                     | 0        | 4,48                               | 99,27%        |
| <b>12</b>          | 100      | 1                     | 1        | 4,66                               | 99,00%        |

Fonte: Autoria própria.

Para a obtenção dos resultados, foram testados modelos lineares e quadráticos, sendo selecionados os modelos quadráticos, mensurando além dos fatores individuais, as interações destas variáveis.

Avaliando os dados obtidos pelas análises de variância para as duas respostas testadas, foi possível evidenciar que a resposta para o pH não possui grande impacto sobre os resultados ( $R^2 = 0,24947$ ), indicando que a regressão não obteve grande significância. Quanto ao valor  $p$ , os resultados foram altos, rejeitando a hipótese de significância da regressão.

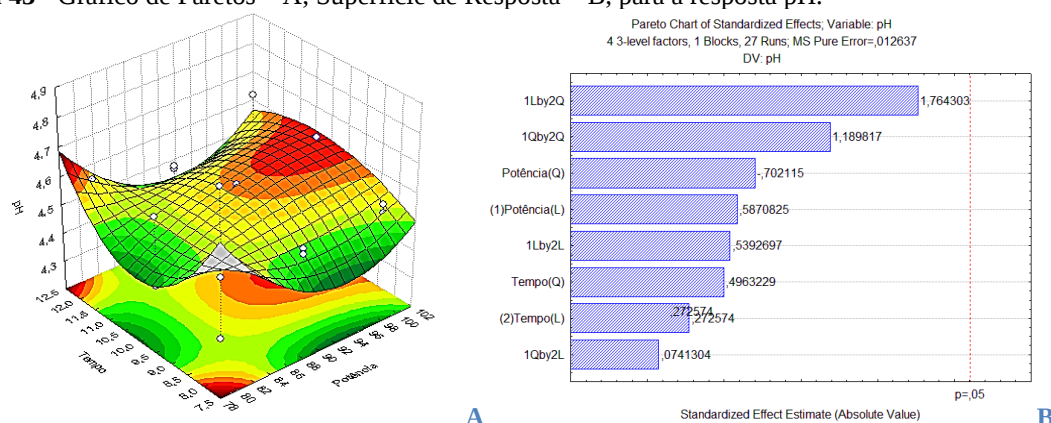
**Tabela 48** - Dados de ANOVA para a variável pH no ensaio fatorial 3<sup>2</sup>.

| Fatores        | SQ       | GL | MQ       | F        | p        |
|----------------|----------|----|----------|----------|----------|
| (1)Potência(L) | 0,004356 | 1  | 0,004356 | 0,344666 | 0,564440 |
| Potência(Q)    | 0,006230 | 1  | 0,006230 | 0,492966 | 0,491587 |
| (2)Tempo (L)   | 0,000939 | 1  | 0,000939 | 0,074297 | 0,788283 |
| Tempo (Q)      | 0,003113 | 1  | 0,003113 | 0,246336 | 0,625673 |
| 1L by 2L       | 0,003675 | 1  | 0,003675 | 0,290812 | 0,596309 |
| 1L by 2Q       | 0,039336 | 1  | 0,039336 | 3,112764 | 0,094644 |
| 1Q by 2L       | 0,000069 | 1  | 0,000069 | 0,005495 | 0,941724 |
| 1Q by 2Q       | 0,017890 | 1  | 0,017890 | 1,415665 | 0,249576 |
| Erro Puro      | 0,227467 | 18 | 0,012637 |          |          |
| Total SQ       | 0,303074 | 26 |          |          |          |

Onde: SQ = Soma Quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = Média Quadrática.

Fonte: Autoria própria.

No gráfico de Paretos é evidenciado que as resposta não são significativas; e, avaliando a superfície de respostas, os dados não possuem grande amplitude de diferenças de valores de pH para as amostras preparadas nas diferentes condições, além de pequenas inclinações, confirmando que esta variável possui baixo impacto sobre as características do produto (XAVIER-JUNIOR *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2017).

**Figura 43** - Gráfico de Paretos – A; Superfície de Resposta – B, para a resposta pH.

Fonte: Autoria própria.

Para a variável turbidimetria, os resultados apresentaram significância, sendo eficientes na avaliação da influência sobre as respostas. Os dados de análise de variância apresentaram elevados valores  $R^2$  (0,96903) e de F (Tabela 48), indicando a significância da regressão e da adequabilidade do modelo para avaliação das respostas. Além disso, os valores de  $p$  foram baixos e inferiores a 5%, confirmando a hipótese de que a regressão dos dados foi significativa.

**Tabela 49** - Dados de ANOVA para a variável Turbidimetria no ensaio fatorial 3<sup>2</sup>.

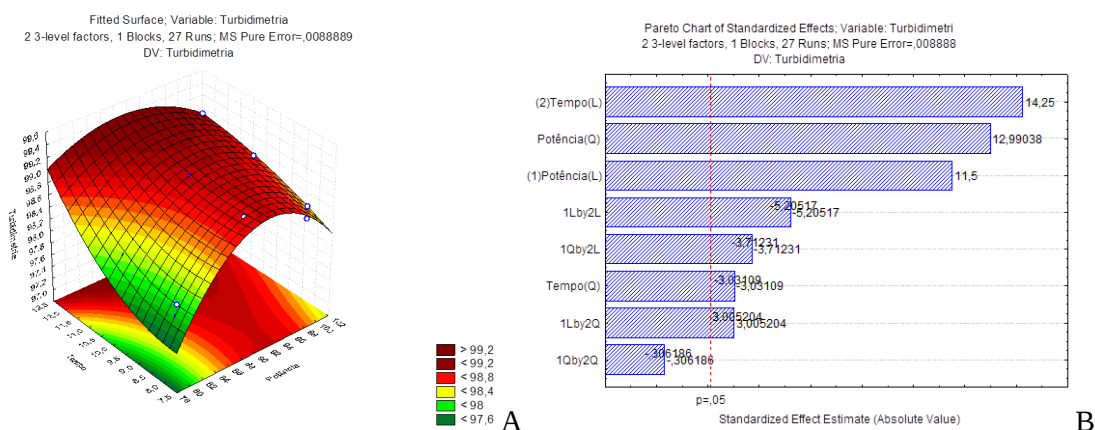
| Fatores               | SQ       | GL | MQ       | F        | p        |
|-----------------------|----------|----|----------|----------|----------|
| <b>(1)Potência(L)</b> | 1,175556 | 1  | 1,175556 | 132,2500 | 0,000000 |
| <b>Potência(Q)</b>    | 1,500000 | 1  | 1,500000 | 168,7500 | 0,000000 |
| <b>(2)Tempo (L)</b>   | 1,805000 | 1  | 1,805000 | 203,0625 | 0,000000 |
| <b>Tempo (Q)</b>      | 0,081667 | 1  | 0,081667 | 9,1875   | 0,007183 |
| <b>1L by 2L</b>       | 0,240833 | 1  | 0,240833 | 27,0938  | 0,000060 |
| <b>1L by 2Q</b>       | 0,080278 | 1  | 0,080278 | 9,0313   | 0,007599 |
| <b>1Q by 2L</b>       | 0,122500 | 1  | 0,122500 | 13,7813  | 0,001594 |
| <b>1Q by 2Q</b>       | 0,000833 | 1  | 0,000833 | 0,0937   | 0,762976 |
| <b>Erro Puro</b>      | 0,160000 | 18 | 0,008889 |          |          |
| <b>Total SQ</b>       | 5,166667 | 26 |          |          |          |

Onde: SQ = Soma Quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = Média Quadrática. Fonte: Autoria própria.

Para determinar a melhor condição no o espaço experimental testado, foi avaliado o gráfico de superfície de resposta (Figura 44A), onde foi possível determinar, através da curvatura da superfície, que a máxima resposta foi encontrada com a potência intermediária (nível 0) e tempo máximo (nível +1), apresentando elevada inflexão e maior intensidade de resposta neste ponto. Devido a obtenção de sistemas dispersos mais estáveis frente análise turbidimétrica, estas foram as condições escolhidas para a obtenção das formulações de trabalho.

As análises dos efeitos padronizados através do gráfico de Paretos (Figura 44B) revelaram que os fatores isolados, bem como a interação deles apresentaram influência sobre a resposta obtida para a turbidimetria com confiança de 95%. O fator tempo apresentou efeito positivo sobre a resposta avaliada, sendo responsável pelo incremento da resposta em +14,25; a potência também apresentou influência positiva, sendo responsável pelo aumento de +11,50. Na avaliação do efeito conjunto foi observado que a resposta é negativa (-5,20).

**Figura 44** - Gráfico de efeitos padronizados (Pareto) – A; Gráfico de Superfície de Resposta – B, para a resposta turbidimetria.



Fonte: Autoria própria.

#### 5.4.4 Obtenção de novas emulsões e caracterização dos sistemas

Após a definição das condições de obtenção dos sistemas, foram obtidas novas emulsões brancas, as quais permaneceram sem alteração após 24h de fabricação. Em seguida, as formulações FTS-1 e FTS-3 foram caracterizadas segundo: pH, turbidimetria, potencial zeta, tamanho e distribuição de gotícula e densidade (Tabela 49). Quanto às características macroscópicas, ambas as formulações foram analisadas visualmente, e apresentaram características de integridade, apresentando-se como emulsões brancas, líquida ou viscosa, uniformes e ausentes de flóculos, creme e coalescência. Mantendo a integridade dos sistemas durante o armazenamento (recipientes plásticos opacos, sob temperatura ambiente).

**Tabela 50** - Características físico-químicas das emulsões brancas.

| Análise                                 | FTS-1        | FTS-3        |
|-----------------------------------------|--------------|--------------|
| <b>pH</b>                               | 4,15         | 4,22         |
| <b>Turbidimetria (%)</b>                | 99,36%       | 99,05%       |
| <b>Potencial zeta</b>                   | - 39,20      | - 38,13      |
| <b>Tamanho médio das gotículas (nm)</b> | 371,57       | 1.066,24     |
| <b>Distribuição das gotículas (nm)</b>  | 105,6 - 4324 | 350,1 - 4752 |
| <b>Densidade</b>                        | 0,9959       | 1,1648       |

FTS = Formulação Tensoativos Tween/Span

Fonte: Autoria própria.

Estes resultados servem de base para a comparação das características das formulações durante as avaliações de estabilidade preliminar. Neste sentido, foi evidenciado que as emulsões fabricadas apresentaram boas características e permaneceram estáveis por 30 dias de acordo com os resultados obtidos.

#### **5.4.4.1 Estabilidade de acompanhamento preliminar**

O ensaio foi realizado com as emulsões brancas durante o período de 90 dias com armazenamento sob condições de temperatura e umidade ambiente, em frascos plásticos opacos hermeticamente fechados, acondicionados em local arejado sob temperatura ambiente. Estas condições simulam o tempo de prateleira, assim como o tempo de armazenamento após o produto chegar ao consumidor final. Adicionalmente, este ensaio foi realizado para confirmar a viabilidade dos sistemas para incorporação de substâncias ativas através do monitoramento das características das emulsões brancas.

As emulsões mantiveram suas características macroscópicas, permanecendo brancas, líquidas/viscosas, ausentes de indícios de fenômenos de instabilidade. Além disso, não foram encontradas variações que indicassem a presença de fenômenos de instabilidade para pH, turbidimetria, potencial zeta, tamanho e distribuição de gotículas. A emulsão FTS-1 apresentou menor variação nos resultados se comparada à emulsão FTS-3 (Tabela 50), principalmente no que se refere ao tamanho e distribuição de gotículas.

**Tabela 51** - Características físico-químicas das durante o ensaio de estabilidade de acompanhamento.

| Análise                                 | Formulação   | Dias    |         |         |         |         |
|-----------------------------------------|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                                         |              | 1       | 9       | 30      | 45      | 90      |
| <b>pH</b>                               | <b>FTS-1</b> | 4,15    | 4,20    | 4,18    | 4,12    | 3,90    |
|                                         | <b>FTS-3</b> | 4,22    | 4,15    | 4,20    | 4,12    | 4,05    |
| <b>Turbidez (%)</b>                     | <b>FTS-1</b> | 99,30%  | 99,40%  | 99,4%   | 99,40%  | 99,40%  |
|                                         | <b>FTS-3</b> | 99,05%  | 99,47%  | 99,20%  | 99,03%  | 99,00%  |
| <b>Potencial zeta</b>                   | <b>FTS-1</b> | -39,2   | -39,2   | -40,4   | -38,9   | -38,3   |
|                                         | <b>FTS-3</b> | - 38,1  | -39,1   | -40,2   | -38,3   | -39,7   |
| <b>Tamanho médio das gotículas (nm)</b> | <b>FTS-1</b> | 371,5   | 342,6   | 387,1   | 346,2   | 365,0   |
|                                         | <b>FTS-3</b> | 1.066,2 | 1.145,5 | 1,180,1 | 1.224,4 | 1.248,7 |
| <b>Distribuição das gotículas (nm)</b>  | <b>FTS-1</b> | 105,6 - | 109,3 - | 114,3 - | 144,6 - | 114,1 - |
|                                         |              | 4324    | 4146    | 4354    | 4624    | 4876    |
|                                         | <b>FTS-3</b> | 350,1 - | 360,1 - | 350,1 - | 350,1 - | 350,1 - |
|                                         |              | 4752    | 4856    | 4778    | 4952    | 5152    |

FTS = Formulação Tensoativos Tween/Span

Fonte: Autoria própria.

#### 5.4.5 Incorporação de derivados das folhas *E. uniflora*

##### 5.4.5.1 Produção de emulsões clássicas

No desenvolvimento das emulsões incorporadas com o extrato otimizado das folhas de pitangueira seco por aspersão (DSC 10%) e de sua fração, inicialmente foram avaliadas a solubilidade do extrato e fração nas fases componentes do sistema. Neste teste, foi verificado que o extrato apresenta solubilidade intermediária tanto na fase oleosa, e maior solubilidade na aquosa, porém com grumos e turbidez em ambas as fases. O mesmo ocorre com a fração acetato de etila, porém, a fração apresenta uma melhor solubilização na fase oleosa que o extrato. Com a solubilidade limitada, a quantidade de extrato ou fração foi restrita a 0,1% da formulação (100 mg/100g de formulação).

Das novas emulsões preparadas apenas as emulsões da formulação estabilizada por tensoativos (Tween/Span) FTS1 apresentaram-se estáveis nas primeiras 24h de preparação. A emulsão branca FTS3 apresentou estabilidade nas primeiras 24h, mas as formulações incorporadas apresentaram separação de fases imediatamente após a finalização do processo de obtenção. Neste contexto, apenas a emulsão líquida resistiu a fase de incorporação do produto seco.

#### 5.4.5.2 Produção de novas formulações

Foram testados novos sistemas dispersos para a obtenção de produtos com a estabilidade necessária para suportar a incorporação do extrato das folhas de pitangueira. Nesta etapa, foi analisado um novo sistema convencional (com cera auto emulsionante) e sistemas pickering (estabilizados por polímeros como hidroximetilpropilcelulose e goma xantana) além de sistemas co-estabilizados com a mistura dos tensoativos Tween 20 e Span 80 juntamente com as substâncias poliméricas HPMC e goma xantana.

HPMC e goma xantana foram escolhidas para a utilização nesse estudo de pré-formulação por serem substâncias poliméricas utilizadas tanto para a estabilização de emulsões através da formação de malha polimérica sobre a superfície micelar, que resulta na conservação da gotícula; quanto para o aumento da viscosidade de produtos farmacêuticos (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Os sistemas pickering e co-estabilizados foram baseados nas concentrações utilizadas na formulação FTS-1, para que fosse possível verificar a diferença entre o desempenho entre os 3 diferentes sistemas, além de possível aprimoramento dos sistemas.

Primeiramente foram testadas as concentrações das soluções dos polímeros utilizadas como fase aquosa (2, 3 e 4%). Os sistemas elaborados com HPMC 2 e 3% não apresentaram estabilidade após as primeiras 24h, e apresentaram separação de fases após o processo de obtenção. Dentre os sistemas elaborados com HPMC, apenas o de concentração de 4% apresentou estabilidade.

Enquanto os sistemas elaborados com goma xantana apresentaram dificuldades para a preparação nas concentrações de 3 e 4%, devido às soluções de goma xantana apresentarem-se como géis viscosos. Portanto, apenas o sistema obtido com 2% de goma xantana apresentou êxito na preparação, resultando em um sistema estável.

Dos sistemas co-estabilizados testados (Sistema F1B (T20+S80) + HPMC/GX), apenas o sistema co-estabilizado com a goma xantana apresentou boas características macroscópicas e estabilidade. A emulsão co-estabilizada com HPMC apresentou separação de fases algumas horas após a preparação. O sistema convencional contendo cera autoemulsionável, por ser um produto já estabelecido, foi adaptado a partir da formulação apresentada por Gelaleti e colaboradores (2019), e apresentou estabilidade após a preparação.

As emulsões brancas pickering, co-estabilizadas (T20S80 + GX) e convencional (Lanette) preparadas apresentaram estabilidade durante os 7 primeiros dias. Entretanto, a

emulsão pickering de goma xantana apresentou contaminação fúngica, indicando a necessidade de utilização de um agente conservante de formulação.

#### 5.4.5.2.1 Incorporação dos derivados de *E. uniflora* nas formulações

Nesta etapa, foram adicionados à todas as formulações o agente conservante Nipaguard SCE (caprilato de sorbitano (65%), propanediol (20%) e ácido benzóico (15%)), selecionado devido a utilização de agentes conservantes certificados ecologicamente e livres de parabenos (NOWAK; JABŁOŃSKA; RATAJCZAK-WRONA, 2020).

Todas as novas formulações foram submetidas a análises para caracterização de pH, índice de cremagem, potencial zeta, tamanho médio de gotículas e características macroscópicas.

De acordo com os resultados obtidos, pode ser observado que todas as formulações apresentam características indicativas de estabilidade. Todas as amostras apresentaram índices de cremagem inferior a 10% na mensuração após 24h de preparação. As únicas formulações que apresentaram esta característica foram as emulsões pickering-HPMC (Tabela 51).

As características eletrocinéticas mensuradas através do potencial zeta apresentaram valores inferiores a -30mV, que é considerado indicador alta estabilidade, com destaque para as formulações convencionais estabilizadas com cera auto-emulsionante e para os sistemas co-estabilizados com mistura de tween 20 e span 80 com a goma xantana (BOUYER *et al.*, 2012; BHATTACHARJEE, 2016).

Com relação ao tamanho médio de partículas, os diferentes sistemas apresentaram diferença entre os tamanhos médios. A emulsão estabilizada com tensoativos apresentaram diminuição nos tamanhos de gotícula em relação aos primeiros sistemas obtidos no primeiro ensaio de caracterização. Estes resultados podem estar relacionados com a introdução do novo componente na formulação, o conservante Nipaguard SCE. O conservante apresenta uma grande porcentagem de caprilato de sorbitano, que é um agente hidrótopo natural com capacidade emulsificante que aumenta a capacidade antimicrobiana de álcoois e ácidos orgânicos (CLARIANT, 2011). Neste sentido, a adição deste componente à formulação pode ter proporcionado um efeito sinérgico com os tensoativos não iônicos usados, possibilitando a diminuição do tamanho das gotículas e consequentemente aumentando a estabilidade do sistema.

**Tabela 52** - Dados de caracterização dos novos sistemas emulsionados.

| <b>Formulação</b>   | <b>IC* (%)</b> | <b>pH</b> | <b>Densidade (g/mL)</b> | <b>Potencial Zeta (mV)</b> | <b>Tamanho Médio (nm)</b> | <b>Características Macroscópicas</b>             |
|---------------------|----------------|-----------|-------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>F1-TS- Br</b>    | 0              | 3,96      | 0,9837                  | -33,6                      | 176,7                     | Líquida; Branca; Homogenea                       |
| <b>F1-TS-ESA</b>    | 0              | 4,02      | 0,9909                  | -31,7                      | 234,5                     | Líquida; Amarela esverdeada; Homogênea           |
| <b>F1-TS-FAE</b>    | 0              | 4,11      | 0,9920                  | -33,6                      | 264,2                     | Líquida; Verde; Homogênea                        |
| <b>F2-HPMC-Br</b>   | 5              | 3,29      | 1,0867                  | -39,2                      | 270,0                     | Semissólida; Branca; Homogênea                   |
| <b>F2-HPMC-ESA</b>  | 5              | 3,49      | 1,0903                  | -38,7                      | 252,6                     | Semissólida; Esverdeada; Homogênea               |
| <b>F2-HPMC-FAE</b>  | 5              | 3,43      | 1,0893                  | -38,6                      | 228,2                     | Semissólida; Verde; Homogênea                    |
| <b>F3-GX-Br</b>     | 0              | 4,18      | 1,1593                  | -45,3                      | 1226,0                    | Semissólida gelatinosa; Bege; Homogênea          |
| <b>F3-GX-ESA</b>    | 0              | 4,19      | 1,1561                  | -42,0                      | 1841,0                    | Semissólida gelatinosa; Verde clara; Homogênea   |
| <b>F3-GX-FAE</b>    | 0              | 4,26      | 1,1517                  | -38,6                      | 1168,0                    | Semissólida gelatinosa; Verde; Homogênea         |
| <b>F4-CTSGX-Br</b>  | 0              | 4,14      | 1,1494                  | -45,0                      | 359,7                     | Semissólida; Branca; Homogênea                   |
| <b>F4-CTSGX-ESA</b> | 0              | 4,11      | 1,1464                  | -40,3                      | 388,0                     | Semissólida; Amarela esverdeada; Homogênea       |
| <b>F4-CTSGX-FAE</b> | 0              | 4,14      | 1,1413                  | -41,8                      | 349,0                     | Semissólida; Verde clara; Homogênea              |
| <b>F5-Lan-Br</b>    | 0              | 4,05      | 1,1237                  | -80,1                      | 2253,0                    | Semissólida Creme; Branca; Homogênea             |
| <b>F5-Lan-ESA</b>   | 0              | 3,86      | 1,1273                  | -75,3                      | 2198,0                    | Semissólida Creme; Amarela esverdeada; Homogênea |
| <b>F5-Lan-FAE</b>   | 0              | 3,99      | 1,1293                  | -69,1                      | 2091,0                    | Semissólida Creme; Verde Clara; Homogênea        |

\*Após 24h.

F= formulação; TS = tensoativos Tween/Span; Br = branca; ESA = extrato seco por aspersão; FAE = fração acetato de etila; HPMC = hidroxipropilmetilcelulose; GX = goma xantana; CTSGX = tensoativos e goma xantan; Lan = Lanete.

Fonte: Autoria Própria.

As formulações Pickering de goma xantana e as estabilizadas com a cera, apresentaram os maiores tamanhos de gotículas, embora ainda estejam dentro os tamanhos considerados para macroemulsões (1000-2000 nm) (TADROS, 2013; 2016; CALLENDER *et al.*, 2017). Sistemas estabilizados com polímeros ou polissacarídeos, permitem que gotículas atinjam mm de diâmetro (MARTO *et al.*, 2016), ou seja, apesar das gotículas do sistema estabilizado por goma xantana apresentarem maior diâmetro podem representar estabilidade no sistema. Além disso, o sistema possui elevada viscosidade, com características de gel, o que diminui a possibilidade de colisão das gotículas e dos fenômenos de coalescência, floculação e amadurecimento de Ostwald, e consequentemente aumenta a estabilidade do sistema (LUNTER; DANIELS, 2012; MARTO *et al.*, 2016).

Os sistemas estabilizados por HPMC apresentam menores tamanhos de gotícula, e sistemas com viscosidade aparente menor que os sistemas estabilizados por goma xantana. Com relação ao sistema auto-emulsionante, este sistema é amplamente difundido e apresenta elevada estabilidade, sendo frequentemente aplicado para administração tópica dos mais variados insumos farmacêuticos. Neste caso, o elevado tamanho das gotículas está de acordo com as macroemulsões frequentemente obtidas para este agente (ECCLESTON, 2016).

Quanto às características macroscópicas, todas as emulsões apresentam-se íntegras, e estáveis durante as primeiras 24h após a preparação, assim como nos primeiros 7 dias de armazenamento. O que indica que os sistemas obtidos apresentaram as características necessárias para produtos com êxito na preparação.

#### 5.4.5.3 Estabilidade preliminar dos sistemas

##### 5.4.5.3.1 Estabilidade no ciclo gelo-degelo

O ensaio de gelo-degelo é uma forma comum de evidenciar a estabilidade do sistema frente à perturbações externas como mudanças bruscas de temperatura, que consiste em submeter a formulação a diferentes condições de temperatura em intervalos de tempo regulares, possibilitando observar previamente, possíveis alterações no decorrer do teste de estabilidade, assim como em todas as etapas até que o produto seja consumido (XAVIER-JUNIOR *et al.*, 2012).

As formulações F1TS apresentaram-se homogêneas até o quarto ciclo de congelamento/descongelamento. A partir do quinto, as emulsões incorporadas com extrato seco

por aspersão e fração acetato de etila das folhas de pitangueira apresentaram sedimentação (Tabela 52).

**Tabela 53** - Avaliação das características macroscópicas frente a ensaio de gelo-degelo.

| Formulações         | Ciclos gelo-degelo |           |           |           |                    |              |
|---------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------|--------------|
|                     | 1                  | 2         | 3         | 4         | 5                  | 6            |
| <b>F1-TS-Br</b>     | homogenea          | homogenea | homogenea | homogenea | homogenea          | homogenea    |
| <b>F1-TS-ESA</b>    | homogenea          | homogenea | homogenea | homogenea | sedimentação       | sedimentação |
| <b>F1-TS-FAE</b>    | homogenea          | homogenea | homogenea | homogenea | sedimentação       | sedimentação |
| <b>F2-HPMC-Br</b>   | cremeação          | cremeação | cremeação | cremeação | Separação de fases |              |
| <b>F2-HPMC-ESA</b>  | cremeação          | cremeação | cremeação | cremeação | Separação de fases |              |
| <b>F2-HPMC-FAE</b>  | cremeação          | cremeação | cremeação | cremeação | Separação de fases |              |
| <b>F3-GX-Br</b>     | homogenea          | homogenea | homogenea | homogenea | homogenea          | homogenea    |
| <b>F3-GX-ESA</b>    | homogenea          | homogenea | homogenea | homogenea | homogenea          | homogenea    |
| <b>F3-GX-FAE</b>    | homogenea          | homogenea | homogenea | homogenea | homogenea          | homogenea    |
| <b>F4-CTSGX-Br</b>  | homogenea          | homogenea | homogenea | homogenea | homogenea          | homogenea    |
| <b>F4-CTSGX-ESA</b> | homogenea          | homogenea | homogenea | homogenea | homogenea          | homogenea    |
| <b>F4-CTSGX-FAE</b> | homogenea          | homogenea | homogenea | homogenea | homogenea          | homogenea    |
| <b>F5-Lan-Br</b>    | homogenea          | homogenea | homogenea | homogenea | homogenea          | homogenea    |
| <b>F5-Lan-ESA</b>   | homogenea          | homogenea | homogenea | homogenea | homogenea          | homogenea    |
| <b>F5-Lan-FAE</b>   | homogenea          | homogenea | homogenea | homogenea | homogenea          | homogenea    |

F = Formulação; TS = tensoativos tween/span; Br = branca; ESA = extrato seco por aspersão; FAE = fração acetato de etila; HPMC = hidroxipropilmetilcelulose; GX = goma xantana; CTSGX = Coestabilizadas tensoativos tween e span e goma xantana; Lan = Lanette.

Fonte: Autoria Própria.

As emulsões Pickering-HPMC apresentaram cremagem desde o primeiro ciclo, resultando em separação de fases no quinto. Comumente a estabilização estérica de Pickering, assim como a formação de redes tipo gel na fase dispersante tem sido atribuída à maior estabilidade dessas emulsões sob condições de congelamento/descongelamento (ZHU *et al.*, 2017), entretanto no caso das emulsões preparadas com 4% de HPMC não foi verificada resistência necessária para a estabilidade do sistema. Alterações na concentração visando o aumento da viscosidade, ou alteração no número de cadeias do derivado de celulose poderiam ser vantajosos para a estabilização dos sistemas emulsionados incorporados de extratos secos das folhas de *E. uniflora*.

As emulsões pickering estabilizadas por goma xantana e as co-estabilizadas apresentaram resistência a todos os ciclos de gelo-degelo. Esta resistência pode estar atrelada à formação da cadeia em gel na fase dispersante proporcionada pela goma xantana, o que permitiu a manutenção das gotículas mesmo diante da cristalização das fases dispersa/dispersante. O

sistema auto-emulsionado também apresentou estabilidade frente aos sucessivos congelamentos, fato que também pode estar correlacionado com a elevada viscosidade do sistema e ao elevado impedimento estérico entre as gotículas estabilizadas com a cera.

#### 5.4.5.3.2 Estabilidade frente à aceleração centrífuga

As forças da gravidade e centrífuga são as principais responsáveis pelos fenômenos de instabilidade dos tipos sedimentação e floculação. Assim, uma forma simples e rápida para avaliar se o produto desenvolvido apresenta susceptibilidade à estas forças, é submeter o produto à um elevado estresse mecânico. Este estresse tem por finalidade elevar abruptamente a força gravitacional, que consequentemente causará um aumento na movimentação das partículas, o que possibilita determinar a tendência das gotículas em direção à sedimentação ou floculação, que são fenômenos que rapidamente induzem a separação das fases. A resistência de um sistema disperso à centrifugação depende da diferença de densidade entre as fases oleosas e aquosa, e, principalmente, da resistência do filme interfacial formado pelos tensoativos utilizados para estabilização do sistema (XAVIER-JUNIOR *et al.*, 2012; TADROS, 2013; SAMRUDHI; PADMINI, 2016).

Para as emulsões estabilizadas pela mistura de tensoativos (F1TS) a emulsão branca não apresentou alterações nem mesmo na maior rotação/força G. Enquanto as emulsões incorporadas não apresentaram cremagem, porém apresentaram sedimentação ao fundo dos tubos submetidos à centrifugação. As emulsões estabilizadas com HPMC apresentaram separação de fases após o processo de centrifugação (Tabela 53).

**Tabela 54** - Respostas de estabilidade das emulsões frente a força centrífuga.

| <b>Formulação</b>   | <b>IC (%)</b> | <b>Características Macroscópicas</b>             |
|---------------------|---------------|--------------------------------------------------|
| <b>F1-TS- Br</b>    | 0             | líquida, branca, homogênea                       |
| <b>F1-TS-ESA</b>    | 0             | líquida, amarela esverdeada, sedimentação        |
| <b>F1-TS-FAE</b>    | 0             | líquida, amarela esverdeada, sedimentação        |
| <b>F2-HPMC-Br</b>   | 0             | separação de fases                               |
| <b>F2-HPMC-ESA</b>  | 0             | separação de fases                               |
| <b>F2-HPMC-FAE</b>  | 0             | separação de fases                               |
| <b>F3-GX-Br</b>     | 0             | semissólida gelatinosa, bege, homogênea          |
| <b>F3-GX-ESA</b>    | 0             | semissólida gelatinosa, bege, homogênea          |
| <b>F3-GX-FAE</b>    | 0             | semissólida gelatinosa, bege, homogênea          |
| <b>F4-CTSGX-Br</b>  | 0             | semissólida, branca, homogênea                   |
| <b>F4-CTSGX-ESA</b> | 0             | semissólida, amarela esverdeada, homogênea       |
| <b>F4-CTSGX-FAE</b> | 0             | semissólida, verde clara, homogênea              |
| <b>F5-Lan- Br</b>   | 0             | semissólida creme, branca, homogênea             |
| <b>F5-Lan-ESA</b>   | 0             | semissólida creme, amarela esverdeada, homogênea |
| <b>F5-Lan-FAE</b>   | 0             | semissólida creme, verde clara, homogênea        |

F = formulação; TS = tensoativos tween/span; Br = branca; ESA = extrato seco por aspersão; FAE = fração acetato de etila; HPMC = hidroxipropilmetilcelulose; GX = goma xantana; CTSGX = tensoativos e goma xantan; Lan = Lanete; IC = índice de cremagem.

Fonte: Autoria Própria.

Tanto as emulsões pickering estabilizadas com goma xantana, quanto as co-estabilizadas e estabilizadas com cera auto-emulsionante apresentaram resistência a aplicação da força centrífuga sem quaisquer alterações nas características macroscópicas. Os sistemas foram capazes de suportar o aumento da força da gravidade simulada pela centrifugação, o que eleva o movimento das gotículas e permite a antecipação de possíveis instabilidades como precipitação, separação de fases, sedimentação ou coalescência (SAMRUDHI; PADMINI, 2016). Estas respostas podem estar correlacionadas com as características viscosas do meio, tendo em vista que elevadas viscosidades das fases dispersantes, proporcionam uma proteção ao sistema emulsionado através da diminuição da colisão entre as gotículas (LUNTER; DANIELS, 2012).

#### 5.4.5.3.3 Análises de acompanhamento

Na tabela 54 é possível observar que os sistemas apresentaram a manutenção das características de pH, potencial zeta e tamanho médio de gotículas. Apenas o sistema estabilizado por HPMC apresentou instabilidade, que culminou na separação das fases ao trigésimo dia.

**Tabela 55** - Dados de Caracterização das emulsões após 30 dias de preparação.

| Fomulação           | Potencial Zeta |         | Tamanho Médio |         | pH    |        |
|---------------------|----------------|---------|---------------|---------|-------|--------|
|                     | Dia 1          | Dia 30  | Dia 1         | Dia 30  | Dia 1 | Dia 30 |
| <b>F1-TS- Br</b>    | -33,467        | -40,733 | 177,27        | 233,17  | 3,96  | 3,90   |
| <b>F1-TS-ESA</b>    | -31,400        | -37,767 | 240,10        | 244,67  | 4,02  | 4,01   |
| <b>F1-TS-FAE</b>    | -34,567        | -39,500 | 283,77        | 238,93  | 4,11  | 4,00   |
| <b>F2-HPMC-Br</b>   | -39,133        | -       | 288,13        | -       | 3,29  | -      |
| <b>F2-HPMC-ESA</b>  | -38,100        | -       | 255,83        | -       | 3,49  | -      |
| <b>F2-HPMC-FAE</b>  | -38,367        | -       | 228,40        | -       | 3,43  | -      |
| <b>F3-GX-Br</b>     | -43,433        | -49,000 | 1411,67       | 1519,33 | 4,18  | 4,11   |
| <b>F3-GX-ESA</b>    | -42,533        | -54,033 | 1699,33       | 1465,67 | 4,19  | 4,13   |
| <b>F3-GX-FAE</b>    | -40,700        | -39,333 | 1307,67       | 1579,67 | 4,26  | 4,16   |
| <b>F4-CTSGX-Br</b>  | -46,033        | -45,167 | 385,67        | 341,77  | 4,14  | 4,05   |
| <b>F4-CTSGX-ESA</b> | -39,733        | -47,567 | 385,67        | 374,90  | 4,11  | 4,01   |
| <b>F4-CTSGX-FAE</b> | -42,300        | -44,300 | 340,00        | 347,17  | 4,14  | 4,06   |
| <b>F5-Lan- Br</b>   | -80,367        | -81,800 | 2211,00       | 2308,00 | 4,05  | 4,08   |
| <b>F5-Lan-ESA</b>   | -72,700        | -72,500 | 2104,67       | 2238,33 | 3,86  | 3,88   |
| <b>F5-Lan-FAE</b>   | -69,667        | -70,833 | 2002,33       | 1936,00 | 3,99  | 3,94   |

TS = tensoativos; Br = branca; ESA = extrato seco por aspersão; FAE = fração acetato de etila; HPMC = hidroxipropilmetilcelulose; GX = goma xantana; CTSGX = tensoativos e goma xantan; Lan = Lanete;  
Fonte: Autoria Própria.

Com relação as características macroscópicas, também houve manutenção das cores, homogeneidade e ausência de incompatibilidades ao trigésimo dia de preparação. Estes resultados indicam que os sistemas são promissores para o desenvolvimento de formas farmacêuticas semissólidas veiculadas com extratos e frações das folhas de *E. uniflora*. Entretanto, são necessários mais ensaios para determinar estabilidade de prateleira, além de outras características reológicas necessárias para a caracterização dos sistemas dispersos, bem

como a verificação da liberação dos compostos ativos e propriedades biológicas da forma farmacêutica.

Vale ressaltar que, apesar da estabilidade inicial, os sistemas F1TS incorporados com os extrato e fração apresentaram sedimentação nos ensaios de estabilidade sob estresse, o que indica incompatibilidade farmacêutica, mesmo que a sedimentação seja um processo reversível.

Merecem destaque as formulações emulsões pickering estabilizadas com goma xantana (F3GX) e os sistemas co-estabilizados, pela manutenção das características estáveis sem evidências de qualquer fenômeno de incompatibilidade. A emulsão pickering ainda possui maior importância pois a ausência de tensoativos proporciona melhor tolerância ao organismo, o que possibilita a aplicação deste sistema em vias de administração alternativas à via tópica.

O sistema obtido com cera auto-emulsionante também apresentou êxito em sua fabricação, entretanto, trata-se de um sistema bem estabelecido, com ampla aplicação na literatura. Além disso, por se tratar de um tensoativo aniônico, apresenta problemas de tolerância e restrição de administração por via tópica. O que permite inferir que os melhores sistemas obtidos neste estudo foram as formulações F3GX e F4TSGX.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento experimental realizado para a otimização de metodologias para a obtenção de extratos e produtos derivados das folhas de *Eugenia uniflora* L. permitiu o mapeamento das melhores condições extrativas para preparação de extratos com maior desempenho dentro do campo experimental investigado. Neste sentido, o emprego de modelagem de misturas através de planejamento do tipo Simplex Centroide possibilitou a identificação da contribuição dos solventes sobre o rendimento da extração dos marcadores químicos a partir das folhas de *E. uniflora*.

A viabilidade de secagem por aspersão foi investigada e nesta etapa, a contribuição da adição de adjuvantes de secagem sobre as propriedades dos sistemas particulados e sobre o rendimento da operação foi estudada. Conforme esperado, o uso de adjuvantes apresenta impacto sobre propriedades físico-químicas, merecendo destaque com objeto de estudo durante o desenvolvimento de produtos secos e formulações derivadas destes extratos. Em relação à análise das condições de secagem, foram avaliados os parâmetros ao processo, e os resultados permitiram inferir que as melhores condições de secagem para extratos das folhas de pitangueira partem dos níveis mais baixos testados. Na avaliação de diferentes proporções de adjuvantes, foram analisadas as concentrações de 10, 15 e 20% de dióxido de silício coloidal (DSC). Neste ensaio foi reportado o incremento de características como densidade (aparente e de compactação), além do rendimento, no aumento da proporção de 10 para 20% de DSC.

Para a conclusão da avaliação dos produtos secos por aspersão, foram testadas diferentes misturas de adjuvantes através de planejamento simplex centroide. Dos sete produtos testados, o produto contendo a mistura ternária dos três componentes testados (dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina e goma xantana) apresentou o maior incremento nas características físicas e de indicadores de fluxo, sendo responsável pelo produto seco com as melhores respostas. Este produto apresentou vantagem mesmo sobre misturas previstas pela ferramenta de *desirability*. Sendo este produto reconhecido como a forma farmacêutica sólida final deste estudo, o qual pode ainda ser utilizado como insumo para a fabricação de outras formas farmacêuticas sólidas como cápsulas e comprimidos.

Como parte do desenvolvimento de formas farmacêuticas derivadas de extratos de *E. uniflora*, foram realizados estudos de pré-formulação de sistemas dispersos para a incorporação extrato seco por aspersão e fração acetato de etila obtidos. Os testes permitiram observar que as emulsões pickering com goma xantana, co-estabilizado (Tween20/Span80 + goma xantana)

e estabilizada com cera emulsionante apresentaram melhores resultados, quando comparados com a emulsão convencional (Tween20/Span80). Como perspectivas futuras pode-se esperar a possível aplicação do produto seco em para obtenção de comprimidos e estudos aprofundados sobre estabilidade, características físicas e liberação dos componentes ativos dos sistemas dispersos contendo os produtos derivados das folhas de *E. uniflora*, além da avaliação dos produtos obtidos frente as atividades biológicas.

## REFERÊNCIAS

- ADALARASAN, R.; SANTHANAKUMAR, M. Response surface methodology and desirability analysis for optimizing parameters for Al<sub>6351</sub>/20%Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> composite. **International Journal of ChemTech Research**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 2625–2631, 2015.
- ADEBAJO, A.C.; OLOKE, K.J.; ALADESANMI, A.J. Antimicrobial activities and microbial transformations of volatile oils of *Eugenia uniflora*. **Fitoterapia**, v. 50, 451–5, 1989.
- AGUIRRE-ALONSO, R. O.; HUESCA-OSORIO, C.A.; SALGADO-CERVANTES, M.A. *et al.* State-space thermodynamic modeling of vanilla ethanolic extract spray drying with heat pump and N<sub>2</sub>. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 243, n. September 2018, p. 70–81, 2019.
- AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 875–877, 2007.
- AL-HASHEMI, H.M.B.; AL-AMOUDI, O.S.B.. A review on the angle of repose of granular materials. **Powder technology**, v. 330, p. 397–417, 2018.
- ALLEN JR, L.V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. Artmed Editora, 2013.
- ALWADANI, N.; FATEHI, P.. Synthetic and lignin-based surfactants: Challenges and opportunities. **Carbon Resources Conversion**, v. 1, n. 2, p. 126–138, 2018.
- AMERI, M.; MAA, Y. F.. Spray drying of biopharmaceuticals: Stability and process considerations. **Drying Technology**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 763–768, 2006.
- AMORIM, A.C.L.; LIMA, C.K.F.; HOVELL, A.M.C.; MIRANDA, A.L.P; REZENDE, C.M.. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 923–928, 2009.
- ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; HAYASHI, T.; KASAI, M.; MOMOSE, Y. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 68(1), 307–314, 1999.
- ARPAGAUS, C.; COLLENBERG, A.; RUTI, D.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S.M.. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 546, n. 1–2, p. 194–214, 2018.
- ASSUNÇÃO, P. I. D.; CONCEIÇÃO, E.C.; BORGES, L.L.; de PAULA, J.A.M. Development and Validation of a HPLC-UV Method for the Evaluation of Ellagic Acid in Liquid Extracts of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) Leaves and Its Ultrasound-Assisted Extraction Optimization. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2017, p. 1–9, 2017.

- ASTOLFI-FILHO, Z.; SOUZA, A.C.; REIPERT, E.C.D.; TELIS, V.R.N.. Encapsulação de Suco de maracujá por co-cristalização com sacarose : cinética de cristalização e propriedades físicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 1. [s. l.], v. 25, n. 4, p. 795–801, 2005.
- AULTON, M.E.. Fluxo de Pós, em: AULTON, M.E.; TAYLOR, K.M.G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4 ed. Porto Alegre: Elsevier, p. 872, 2016.
- AULTON, M.E.; SUMMERS, M.P.. Pós, grânulos e granulação, em: AULTON, M.E.; TAYLOR, K.M.G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4 ed. Porto Alegre: Elsevier, p. 872, 2016.
- AULTON, M.E.; TAYLOR, K.M.G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4 ed. Porto Alegre: Elsevier, p. 872, 2016.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga: propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62 p. 55-61, 2003.
- BACCARIN, T.; DEBRASSI, A.; de SOUZA, M.M.; YUNES, R.A. *et al.* Influence of process conditions on physicochemical properties and antinociceptive activity in vivo of spray-dried *Rapanea ferruginea* Mez. stem bark extract. **Powder Technology**, [s. l.], v. 291, p. 66–74, 2016.
- 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**, 19, 865-870, 2009.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria**. Campinas: UNICAMP, 2010.
- BEAKAWI AL-HASHEMI, H.M.; BAGHABRA AL-AMOUDI, O. S. A review on the angle of repose of granular materials. **Powder Technology**, [s. l.], v. 330, p. 397–417, 2018.
- BEZERRA, I. C. F., Investigação fitoquímica de extrato bruto e frações das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira). 2016. [Dissertação de Mestrado].
- BEZERRA, I.C.F.; RAMOS, R.T.M.; FERREIRA, M.R.A.; SOARES, L.AL.. Chromatographic profiles of extractives from leaves of *Eugenia uniflora*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 92–101, 2018.
- BEZERRA, I.C.F.; RAMOS, R.T.M.; FERREIRA, M.R.A.; SOARES, L.AL.. Optimization Strategy for Extraction of Active Polyphenols from Leaves of *Eugenia uniflora* Linn. **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 3, p. 735-750, 2020.
- BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 235, p. 337–351, 2016.
- BIASI-GARBIN, R. P.; DEMITTO, F. D. O.; AMARAL, R. C. R. D.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; YAMADA-OGATTA, S. F.. Antifungal potential

of plant species from Brazilian Caatinga against dermatophytes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 58, 2016.

BIASI-GARBIN, R. P.; DEMITTO, F.O.; AMARAL, R.C.R.; FERREIRA, M.R.A.; SOARES, L.A.L.; SVIDIZINSKI, T.I.E. *et al.*. Antifungal potential of plant species from brazilian caatinga against dermatophytes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 18–22, 2016.

BOUYER, E. *et al.* Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field. **International Journal of Pharmaceutics**, v.436, n.1-2, p.359-378, 2012.

BOY, H.I.A.; RUTILLA, A.J.H.; SANTOS, K.A.; TY, A.M.T. *et al.*. Recommended Medicinal Plants as Source of Natural Products: A Review. **Digital Chinese Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 131–142, 2019.

BRASIL, Ministério da Saúde, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. **Disposições sobre registro de medicamentos fitoterápicos**, Brasília: ANVISA, 2014.

BRASIL, MS - Ministério da Saúde. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2016.

BRASIL, MS - Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2006.

BRASIL, MS - Ministério da Saúde. **Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília, 2009.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed., Brasília: ANVISA, 2014.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 6 ed., Brasília: ANVISA, 2019.

CAL, K.; SOLLOHUB, K.. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 575–586, 2010.

CALISKAN, G.; NUR DIRIM, S. The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 91, n. 4, p. 539–548, 2013.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CALLENDER, S. P. *et al.* Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 526, n. 1-2, p. 425-442, 2017.

CARBINATTO, F. M.; CASTRA, A.D.; OLIVEIRA, A.G.; SILVA JUNIOR, A.A.. Preformulation studies of *Gymnema sylvestre* extract powder formulation for hard gelatin capsules. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 175–180, 2011.

CARMONA, F.; PEREIRA, A. M. S. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.23(2), p.379-385, 2013.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T.; Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, v.44, p. 2442–2451, 2011.

CLARIANT, Clariant introduces Nipaguard Zero preservative blends containing no parabens. **Focus on Surfactants**, V. 2013, Issue 12, p. 3, 2013.

CLARIANT, Clariant provides parabens-free preservation: how Velsan SC (sorbitan caprylate) helps to reduce the concentration of classical preservatives. **Focus on Surfactants**, V. 2011, Issue 9, p.4, 2011.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G.; Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 57-63, 2002.

CONSOLINI, AE; BALDINI, OAN; AMAT, AG. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 33–39, 1999.

CORTES-ROJAS, D.F.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W. P.. Optimization of spray drying conditions for production of *Bidens pilosa* L . dried extract. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 93, n. April, p. 366–376, 2015.

COSTA, L. M. Desenvolvimento de produto seco por aspersão obtido a partir das cascas do caule de *Libidibia ferrea* Martius var *ferrea* (fabaceae). 2012. [Dissertação de Mestrado].

COTTA, J. A. O.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D. Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. **Química Nova**, 32(8), 2026-2033, 2009..

COUTO, R. O., ARAÚJO, R.R.; TACON, L.A.; CONCEIÇÃO, E.C. *et al.*. Development of a phytopharmaceutical intermediate product via spray drying. **Drying Technology**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 709–718, 2011.

COUTO, R.O.; CONCEIÇÃO, E.C.; CHAUL, L.T.; OLIVEIRA, E.M.S.; MARTINS, F.S. *et al.* Spray-dried rosemary extracts: Physicochemical and antioxidant properties. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 131, n. 1, p. 99–105, 2012.

COUTO, R.O.; MARTINS, F.S.; CHAUL, L.T.; CONCEIÇÃO, E.C.; FREITAS, L.A.P. *et al.* Spray drying of *Eugenia dysenterica* extract: Effects of in-process parameters on product quality. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 115–123, 2013.

CUNICO, M. W. M. *et al.* Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, 2008.

da COSTA CÉSAR, I.; BRAGA, F.C.; VIANNA-SOARES, C.D. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17(4), p. 616-625. 2007.

DA CUNHA, F.A.B.; WACZUK, E.P.; DARTE, A.E.; BARROS, L.M.; ELEKOFEHINTI, O.O. *et al.* Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 84, p. 614–621, 2016.

DA CUNHA, F.P.; COSTA, L.J.L.; FERNANDES, A.J.D.; SOUZA, T.P.; SOARES, L.A.L.. Development and optimization of extractives from *Astronium urundeuva* (allemão) Engl. by factorial design. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 647–652, 2009.

DAMASCENO, B. P. G. L. *et al.* Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 01, p. 9-18, 2011.

DAVIES L. **Efficiency in Research, Development: The Statistical Design and Analysis of Chemical Experiments**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1993. p. 73-86.

DAVIS, M.; WALKER, G.. Recent strategies in spray drying for the enhanced bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 269, n. July 2017, p. 110–127, 2018.

DAZA, L.D.; FUJITA, A.; *et al.* Food and Bioproducts Processing Effect of spray drying conditions on the physical properties of Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extracts. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 97, p. 20–29, 2016.

DE FREITAS, L.A.P.; TEIXEIRA, C.C.C.; ZAMARIOLI, C.M.. **Recent Developments in Phytomedicine Technology**. 1ª ed. New York: Nova Science Publishers, p. 243-278, 2017.

DE MELO, J.G.; *et al.* FÁVARO-TRINDADE, C.S.; RODRIGUES-RACAT, J.N. *et al.* Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.

DENARDIN, C.C. *et al.* Autophagy induced by purple pitanga (*Eugenia uniflora* L.) extract triggered a cooperative effect on inducing the hepatic stellate cell death. **Cell Biology and Toxicology**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 197–206, 2017.

DENARDIN, C.C.; HIRSH, G.E.; ROCHA, R.F.; VIZZOTTO, M. *et al.* Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 387–398, 2015.

DENARDIN, C.C.; PARISI, M.M.; MARTINS, L.A.M.; TERRA, S.R. *et al.* Antiproliferative and cytotoxic effects of purple pitanga (*Eugenia uniflora* L.) extract on activated hepatic stellate cells. **Cell Biochemistry and Function**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 16–23, 2014.

DICIAULA, M. C.; LOPES, G. C.; SCARMINIO, I. S.; DE MELLO, J. C. P.. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a UV-VIS spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. **Química Nova**, 37(1), 158-163, 2014.

DOS SANTOS, J. F. S. *et al.* Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 261, n. November 2017, p. 233–239, 2018.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B.. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological research*, v.112, p. 4-29, 2016.

ECCLESTON, G.M.. Emulsões e Cremes, em: AULTON, M.E.; TAYLOR, K.M.G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4 ed. Porto Alegre: Elsevier, p. 872, 2016.

EL-GIZAWY, S.A.; OSMAN, M.A.; ARAFA, M.F.; EL MAGHRABY, G.M.. Aerosil as a novel co-crystal co-former for improving the dissolution rate of hydrochlorothiazide. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 478, n. 2, p. 773–778, 2015.

EMA. European Medicines Agency. Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products/Traditional Herbal Medicinal Products. EMEA/CVMP/814/00. 2006.

ESMIZADEH, Y.; BASHIRI, M.; PARSAMANESH, A. Robust Optimal Desirability Approach for Multiple Responses Optimization with Multiple Productions Scenarios. **Journal of Quality Engineering and Production Optimization**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 33–44, 2015.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA Commission and European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. 7.0 Ed., Council of Europe, 2011.

FADIL, M.; FIKRI-BENBRAHIM, K.; RACHIQ, S.; IHSSANE, B. *et al.* Combined treatment of *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils against *Salmonella typhimurium*: Optimization of antibacterial activity by mixture design methodology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 126, p. 211–220, 2018.

FALCÃO, T. R. ARAÚJO, A.A.; SOARES, L.A.L.; RAMOS, R.T.M.; BEZERRA, I.C.F.; FERREIRA, M.R.A.; SOUZA NETO, M.A. *et al.* Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. **BMC complementary and alternative medicine**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 84, 2018.

FALKOWSKI, G.J.S.; JACOMASSI, E.; TAKEMURA, O.S. Qualidade e autenticidade de amostras de chá de camomila (*Matricaria recutita* L.-Asteraceae). **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 68, n. 1, p. 64-72, 2009.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ª ed. Volume I. Brasília: ANVISA, 2010.

FARMACOPEIA EUROPEIA. 8ª Ed. 2013.

FDA. Working groups in the Medical Policy, Pharmacology and Toxicology, Complex Drug Substances Coordinating Committees. Guidance for Industry Botanical Drug Products. In: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) editors. Rockville: US Food and Drug Administration (FDA). 2004.

FERREIRA, M. R. A. *et al.* Development and evaluation of emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) oil. **Aaps Pharmscitech**, v. 11, n. 3, p. 1383–1390, 2010.

FERREIRA, M.R.A.; SANTIAGO, R.R.; LANGASSNER, S.M.Z.; MELLO, J.C.P.; SVIDZINSKI, T.I.E.; SOARES, L.A.L.. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, [s. l.], v. 7, n. 40, p. 3008–3013, 2013.

FIUZA, T.S.; REZENDE, M.H.; SABOIA-MORAES, S.M.T.; BARA, M.T.F. *et al.* Pharmacognostic characterization of the leaves of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia** [s. l.], v. V, n. 2, p. 1–11, 2008.

FIÚZA, T.S.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T.; PAULA, J.R.; TRESVENZOL, L.M.F.; PIMENTA, F.C. Evaluation of antimicrobial activity of the crude ethanol extract of *Eugenia uniflora* L. leaves. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 29, p. 245-50, 2008.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627-650, 1927.

FURTADO, N.A.J.C.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBROSIO, S.R.; EMERY, F.S.; MARCHETTI, J.M. (Org). **FARMACOGNOSIA**, 1º Ed., Atheneu, 2017.

GALLO, L.; RAMIREZ-RIGO, M.V.; PIÑA, J.; BUCALÁ, V.. A comparative study of spray-dried medicinal plant aqueous extracts. Drying performance and product quality. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 104, p. 681–694, 2015.

GARCIA, A.Q.R.; PEREIRA, T.C.B; Tamires; DIAS, I.L.T. Estudo das propriedades de fluxo no desenvolvimento de paracetamol pó veiculado em sachê. **Revista Brasileira de Farmácia**, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 469–475, 2012.

GARCIA, L.M.Z.; OLIVEIRA, T.F.; SOARES, P.K.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.E.. Statistical mixture design - Principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 1–7, 2010.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GÓMEZ, E.. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 549–579, 2000.

GARMUS, T.T.; PAVIANI, L.C.; QUEIROGA, C.L.; MAGALHÃES, P.M.; CABRAL, F.A. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents; **Journal of Supercritical Fluids** 86, 4-14, 2014.

GELALETI, Daniela *et al.* Estabilidade de formulação dermocosmética contendo extrato de *Pelargonium graveolens*. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 2, n. 1, p. 16-16, 2019.

GOODARZI, M.; RUSSELL, P.J.; VANDER, Y.. Similarity analyses of chromatographic herbal fingerprints : A review. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 804, p. 16–28, 2013.

HANDA, C.L.; LIMA, F.S.; GUELFY, M.F.G.; GEORGETTI, S.R.; IDA, E.I.. Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 197, p. 175–184, 2016.

HANNA, L.A.; CARABINE, F.; HALL, M.; CRAIG, R.; HANNA, A. (2021). Veganism: Are future pharmacists ready to provide advice? **Currents in Pharmacy Teaching and Learning**, 13(5), 512–519, 2021.

HASENCLEVER, Lia *et al.* A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 2559–2569, 2017.

HEALY, A.M.; AMARO, M.I.; PALUCH, K.J.; TAJBER, L.. Dry powders for oral inhalation free of lactose carrier particles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 75, p. 32–52, 2014.

HEBBINK, G.A.; DICKHOFF, B.H.J. Application of lactose in the pharmaceutical industry. [s.l.] : Elsevier Inc., 2019.

HOLLENBECK, R.G.. Moisture in Pharmaceutical Products, em: SWARBRICK, J. (Ed.). **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. [s.l.] : Informa Healthcare, 2007.

HOWARD, S.A.. Solids: Flow Properties, em: SWARBRICK, J. (Ed.). **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. [s.l.] : Informa Healthcare, 2007.

HU, Yin Ting *et al.* Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. **Journal of Food and Drug Analysis**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 16–26, 2017.

IBIKUNLE, G.F.; ADEBAJO, A.C.; FAMUYIWA, F.G.; ALADESSANI, A.J.; ADEWUNMI, C.O.. In-vitro evaluation of anti-trichomonal activities of *Eugenia uniflora* leaf. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 170–176, 2011.

ISAAC, V. L. B. *et al.* Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocósméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p. 85-100, 2008.

- KHODDAMI, A.; WILKES, M.A.; ROBERTS, T.H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 2328–2375, 2013.
- KLEIN, T. LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P.. Microparticles containing Guaraná extract obtained by spray-drying technique: Development and characterization. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 292–300, 2015.
- KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P.. Fitoterapicos: Um mercado promissor. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 241–248, 2009.
- KOÇ, B.; KOÇ, M.; GUNGOR, O.; SAKIN-ILMAZER, M. *et al.* Effects of Formulation on Stability of Spray-Dried Egg. **Drying Technology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 63–71, 2012.
- KUMAR, A.; RAO, K.M.; HAN, S.S.. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 180, n. August 2017, p. 128–144, 2018.
- LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; GOLC, WONDRA. A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 214–222, 2005.
- LEE, M. H.; CHIOU, J. F.; YEN, K. Y.; YANG, L. L. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Letters**, v.154, p. 131-136, 2000.
- LEE, M. H.; NISHIMOTO, S.; YANG, L.L.; YEN, K. Y.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T.. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1343-1349, 1997.
- LI, J.; HE, X.; LI, M.; ZHAO, W.; LIU, L.; KONG, X. Chemical fingerprint and quantitative analysis for quality control of polyphenols extracted from pomegranate peel by HPLC. **Food chemistry**, v. 176, p. 7-11, 2015.
- LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 2, p. 197-201, 2006.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.
- LUNTER, D. J.; DANIELS, R. New film forming emulsions containing Eudragit® NE and/or RS 30D for sustained dermal delivery of nonivamide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 2, p. 291–298, 2012.
- MA, T.; HUANG, C.; MENG, X.; ZHANG, Q.; ZHANG, L.; LV, X.; LI, J. Fingerprint analysis of Hawk-tea by high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 551-556, 2011.
- MALAMAN, F.S.; MORAES, L.A.B.; WEST, C.; FERREIRA, N.J.; OLIVEIRA, A.L.. Supercritical fluid extracts from the Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): Relationship

between the extracted compounds and the characteristic flavour intensity of the fruit. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 124, n. 1, p. 85–92, 2011.

MARQUES, G. S.. Desenvolvimento e avaliação de metodologias analíticas para quantificação de flavonóides totais e canferitrina em folhas de *Bauhinia forficata* Link. 2011. [Dissertação de Mestrado]

MARQUES, G. S.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F., XAVIER, H. S.; ROLIM-NETO, P. J.. Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 33(1), 57-62, 2012.

MARQUES, G.S.; LEÃO, W.F.; LYRA, M.A.M.; PEIXOTO, M.S.; MONTEIRO, R.P.M.; ROLIM, L.A.; XAVIER, H.S.; ROLIM NETO, P.J.; SOARES, L.A.L. Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 51-57, 2013.

MARQUES, G.S., MONTEIRO, R.P.M., LEÃO, W.F., LYRA, M.A.M., PEIXOTO, M.S., ROLIM-NETO, P.J., XAVIER, H.S., SOARES, L.A.L.; avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* link; **Química Nova**, v. 35 (3), p.517-522, 2012.

MARTINS, R.M.; PEREIRA, S.M.; SIQUEIRA, S.; SALOMÃO, W.F.; FREITAS, L.A.P.. Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. **Food Research International**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 657–663, 2013.

MARTO, J. *et al.* Pickering emulsions: challenges and opportunities in topical delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 8, p. 1093–1107, 2016.

MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques**. [s.l.] CRC press, 2015.

MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 251, p. 55–79, 2018.

MEIRA, E. F.; OLIVEIRA, N. D.; MARIANI, N. P.; PORTO, M. L.; SEVERI, J. A.; SIMAN, F. D.; GAVA, A.. *Eugenia uniflora* (pitanga) leaf extract prevents the progression of experimental acute kidney injury. **Journal of Functional Foods**, 66, 103818, 2020.

MEIRA, E.F.; OLIVEIRA, N.D.; MARIANI, N.P.; PORTO, M.L. *et al.* *Eugenia uniflora* (pitanga) leaf extract prevents the progression of experimental acute kidney injury. **Journal of Functional Foods**, V. 66, 2020.

MELLO, J.C.P.; SANTOS, S.C., Taninos; Em: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R.. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed, Porto Alegre, 2017.

MELO, J.G.; MARTINS J.D.G.R.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf ) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21 p. 27-36, 2007.

- MILLER, R.W.; SHESKEY, P.J.. Roller Compaction Technology for the Pharmaceutical Industry, em: SWARBRICK, J. (Ed.). **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. [s.l.] : Informa Healthcare, 2007.
- MOLLET, Hans; GRUBENMANN, Arnold. 2 Emulsions - Properties and Production. **Formulation Technology: Emulsions, Suspensions, Solid Forms**, [s. l.], 2001.
- MONTGOMERY, Douglas C. **Design and Analysis of Experiments**. 2013
- MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C.. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. 4th. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2016.
- NARASIMHAN, K. S.; AMUDA, M. O. H. **Powder Characterization**. In: Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. [s.l.] : Elsevier, p. 1–10, 2017.
- NEIKOV, O.D.; YEFIMOV, N.A. **Powder Characterization and Testing**. 2. ed. [s.l.] : Elsevier Ltd., 2019.
- NICOLETTI, M.. HPTLC fingerprint: A modern approach for the analytical determination of botanicals. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 818–823, 2011.
- NIST/SEMATECH, 2019. **NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods**, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>.
- NOWAK, K.; JABŁOŃSKA, E.; RATAJCZAK-WRONA, W.. Controversy around parabens: alternative strategies for preservative use in cosmetics and personal care products. **Environmental Research**, p. 110488, 2020.
- NOWAK, K.; JABŁOŃSKA, E.; RATAJCZAK-WRONA, W.. Controversy around parabens: alternative strategies for preservative use in cosmetics and personal care products. **Environmental Research**, p. 110488, 2020.
- NSOR-ATINDANA, J.; CHEN, M.; GOFF, H.D.; ZHONG, F.. Functionality and nutritional aspects of microcrystalline cellulose in food. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 172, p. 159–174, 2017.
- O’SULLIVAN, J.J.; NORWOOD, E.A.; O’MAHONY, J.A.; KELLY, A.L.. Atomisation technologies used in spray drying in the dairy industry: A review. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 243, n. August 2018, p. 57–69, 2019.
- OGUNWANDE, I.A.; OLAWORE, N.O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T.M.; SCHMIDT, J.M.; SETZER, W.N.. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, v.15, p. 147–152, 2005.
- OLIVEIRA, A. L.; LOPES, R. B.; CABRAL, F. A.; EBERLIN, M. N. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**, v.99, p. 1–5, 2006.
- OLIVEIRA, M. D. L. *et al.* Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its

potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 371–376, 2008.

OLIVEIRA, O.W.; PETROVICK, P.R.. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: Bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 641–650, 2010.

PAUDEL, A.; WORKU, Z.A.; MEEUS, J. *et al.* Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 453, n. 1, p. 253–284, 2012.

PEIXOTO, M.P.G.; FREITAS, L.A.P. Spray-dried extracts from *Syzygium cumini* seeds: Physicochemical and biological evaluation. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 145–152, 2013.

PEREIRA, L.J.B.; GARCIA-ROJAS, E.E.. Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 155–162, 2015.

PEREIRA, N.L. F.; AQUINO, P.E.A.; JÚNIOR, J.G.A.S.; CRISTO, J.S. *et al.* In vitro evaluation of the antibacterial potential and modification of antibiotic activity of the *Eugenia uniflora* L. essential oil in association with led lights. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 110, p. 512–518, 2017.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSÉGU, L.. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 586–621, 2011.

RAMOS, R.T.M.; BEZERRA, I.C.F; FERREIRA, M.R.A; SOARES, L.A.L.. Spectrophotometric quantification of flavonoids in herbal material, crude extract, and fractions from leaves of *Eugenia uniflora* Linn. **Pharmacognosy Research**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 253, 2017.

RATTMANN, Y.D.; SOUZA, L.M.; MALQUEVICZ-PAIVA, S.M.; DARTORA, N. *et al.* Analysis of flavonoids from *Eugenia uniflora* leaves and its protective effect against murine sepsis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2012, 2012.

REIS, R.A.S.P.; COSTA, A.R.M.; TACON, L.A.; TEIXEIRA, C.C.C.; FREITAS, L.A.P.. Recent Developments In Drying Extracts, em: FREITAS, L.A.P.; TEIXEIRA, C.C.C.; ZAMARIOLI, C.M. (Eds.) **Recent developments in phytomedicine technology**. [s.l.] Nova Science Publishers, 2017.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27 (5), 771–780, 2004.

RIBEIRO, F. A.L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C., DA SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de

mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, 31(1), 164-171, 2008.

RODRIGUES, K.A.F.; AMORIM, L.V.; OLIVEIRA, J.M.G.; DIAS, C.N. *et al.* *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti- Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action . **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2013, p. 1–10, 2013.

RODRIGUES, Sueli; DE OLIVEIRA SILVA, Ebenezer; DE BRITO, Edy Sousa (Ed.). **Exotic fruits reference guide**. Academic Press, 2018.

RODRIGUEZ, M.V.; MARTÍNEZ, M. L.; CORTADI, A.; CAMPAGNA, M. N.; DI SAPIO, O.; DERITA, M.; ZACCHINO, S.; GATTUSO, M.. Quality Control of Herbal Medicines with Spectrophotometry and Chemometric Techniques - Application to *Baccharis* L. Species Belonging to Sect - *Caulopterae* DC. (Asteraceae), **Macro To Nano Spectroscopy Edited by Jamal Uddin**, p. 399, 2012.

ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas comprestis* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 197–207, 2006.

ROSTAGNO, M. A.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; MARTÍNEZ, J.A.. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1216, n. 1, p. 2–29, 2009.

ROWE, R.; SHESKEY, P.; QUINN, M.. **Handbook of pharmaceutical excipients**, Sixth edition, [s. l.], p. 549–553, 2009.

SABLANIA, V.; DON BOSCO, S.J.. Optimization of spray drying parameters for *Murraya koenigii* (Linn) leaves extract using response surface methodology. **Powder Technology**, [s. l.], v. 335, p. 35–41, 2018.

SAFARALIE, A.; FATEMI, S.; SALIMI, A.. Experimental design on supercritical extraction of essential oil from valerian roots and study of optimal conditions. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 88, n. 2–3, p. 312–318, 2010.

SALMINEN, H.; ANKENBRAND, J.; ZEEB, B.; BÖNISH, G.B. *et al.* Influence of spray drying on the stability of food-grade solid lipid nanoparticles. **Food Research International**, [s. l.], v. 119, n. June 2018, p. 741–750, 2019.

SAMRUDHI, P.; PADMINI, R. Honey based clotrimazole microemulsion for topical delivery. **American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 11, 2016.

SANSONE, F.; MENCHERINI, T.; PICERNO, P. *et al.* Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 105, n. 3, p. 468–476, 2011.

SANTOS, K.K.A.; MATIAS, E. F.F.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E.S.A.; BRAGA, M. F.B.M.; GUEDES, G. M.M.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; ARIAS, A. R.; COSTA, J.G.M.;

MENEZES, I. R.A.; COUTINHO, H. D.M. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 130–132, 2012.

SANTOS, K.K.A.; ROLÓN, M.; VEGA, C.; ARIAS, A. R.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I. R.A.; COUTINHO, H. D.M. Atividade leishmanicida in vitro de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia* .**Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v.34, n.1, p. 47-50, 2013.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. **Fitoterapia**, v. 16, p. 373-74, 1995.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; DE ARIAS, A. R. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21,p.183-186, 1987.

SCHUMACHER, N.; COLOMEU, T.C.; FIGUEIREDO, D.; CARVALHO, V.C. *et al.* Identification and Antioxidant Activity of the Extracts of *Eugenia uniflora* Leaves. Characterization of the Anti-Inflammatory Properties of Aqueous Extract on Diabetes Expression in an Experimental Model of Spontaneous Type 1 Diabetes (NOD Mice). **Antioxidants**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 662–680, 2015.

SHAH, R.B.; TAWAKKUL, M.A.; KHAN, M.A. Comparative evaluation of flow for pharmaceutical powders and granules. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 250–258, 2008.

SHAIKH, R.; O'BRIEN, D.P.; CROKER, D.M.; WALKER, G.M.. The development of a pharmaceutical oral solid dosage forms. **Computer Aided Chemical Engineering**, [s.l: s.n.]. v. 41, 2018

SHEWIYO, D. H.; KAALE, E. A. K. K.; RISHA, P. G.; DEJAEGHER, B.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDER HEYDEN, Y. HPTLC methods to assay active ingredients in pharmaceutical formulations: a review of the method development and validation steps. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 66, p. 11-23, 2012.

SHISHIR, M.R.I.; CHEN, W.. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 65, p. 49–67, 2017.

SILVA-ROCHA, W.P.; AZEVEDO, M.F.; FERREIRA, M.R.A.; SILVA, J.F.; SVIDIZINSKI, T.I.E.; SOARES, L.A.L.; MILAN, E.P.; ROCHA, K.B.F. *et al.* Effect of the ethyl acetate fraction of *Eugenia uniflora* on proteins global expression during morphogenesis in *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. SEP, p. 1–16, 2017.

SILVA-ROCHA, W.P.; LEMOS, V.L.B.; FERREIRA, M.R.A.; SOARES, L.A.L.; SVIDIZINSKI, T.I.E.; MILAN, E.P.; CHAVES, G.M.. Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–15, 2015.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6. ed. 1104p. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R.. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed, Porto Alegre, 2017.

SOARES, D.J. *et al.* Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit juice and two major constituents thereof exhibit anti-inflammatory properties in human gingival and oral gum epithelial cells. **Food and Function**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 2981–2988, 2014.

SOARES, L. A. L. Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reissek-Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final. 2002 [Tese de doutorado].

SOARES, L. A. L.. Física da compressão. **Caderno de Farmácia**, v. 15, n. 2, p. 65-79, 1999.

SOARES, L.A.L.; FERREIRA, M.R.A.. Standardization and Quality Control of Herbal Medicines, in: Freitas, L.A.P., Teixeira, C.C.C., Zamarioli, C.M. (Eds.), **Recent Developments in Phytomedicine Technology**. Nova Science, New York, 2017.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. *Myrtaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10560>.

SOUZA, L. B. F. C. *et al.* Influence of *Eugenia uniflora* extract on adhesion to human buccal epithelial cells, biofilm formation, and cell surface hydrophobicity of candida spp. from the oral cavity of kidney transplant recipients. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 10, 2018.

STANIFORTH, J.N.; TAYLOR, K.M.G.. Análise do Tamanho de Partícula, em: AULTON, M.E.; TAYLOR, K.M.G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4 ed. Porto Alegre: Elsevier, p. 872, 2016.

SWARBRICK, J.. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. [s.l.] : Informa Healthcare, 2007.

TADROS, Tharwat F. **Dispersion of Powders Rheology of Dispersions Self-Organized Surfactant Structures and Particles Colloids and Interface Science Series**. [s.l.: s.n.], 2013.

TEIXEIRA, C. C. C. *et al.* Microparticles Containing Curcumin Solid Dispersion: Stability, Bioavailability and Anti-Inflammatory Activity. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 252–261, 2016.

TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H.. Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: Formulation aspects, liquid phase interactions and particles characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 325, n. 1–2, p. 63–74, 2006.

TOPAN, J. F. Emulsões à base de óleo de girassol (*Helianthus annus L.*) com cristal líquido: avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética, Ribeirão Preto, 2012.

TRACHE, Djalal *et al.* Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and bio-composites application—A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 93, p. 789–804, 2016.

TSAO, R.. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, [s. l.], v. 2, n. 12, p. 1231–1246, 2010.

VASCONCELOS, E. A. F. *et al.* Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 243–249, 2005.

VICENTINI, F.C. *et al.* Planejamento fatorial e superfície de resposta: Otimização de um método voltamétrico para a determinação de Ag(I) empregando um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono. **Química Nova**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 825–830, 2011.

VICTORIA, F. N. *et al.* Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. *Food and Chemical Toxicology*, [s. l.], v. 50, n. 8, p. 2668–2674, 2012.

VICTORIA, F. N.; ANVERSA, R. G.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E. J. Essential oils of *E. uniflora* leaves protect liver injury induced by acetaminophen. **Food Bioscience**, v. 4, p. 50-57, 2012.

VICTORIA, F. N.; DE SIQUEIRA BRAHM, A.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E. J. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neuroscience letters**, 544, 105-109, 2013.

VIDOVIĆ, S. S.; VLADIC, J.Z.; VASTAG, Z.G.; ZEKOVIC, Z.P.; POPOVIC, L.M.. Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. **Powder Technology**, [s. l.], v. 258, p. 209–215, 2014.

VINHOLES, J.; VIZZOTTO, M.. Synergisms in alpha-glucosidase inhibition and antioxidant activity of *Camellia sinensis* L. Kuntze and *Eugenia uniflora* L. Ethanolic Extracts. **Pharmacognosy Research**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 101, 2017.

WAGNER, H.; BLADT, S.. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Springer Science & Business Media, 1996.

WAZLAWIK, E.; SILVA, M.A.; PETERS, R.R.; CORREIA, J.F.G.; FARIAS, M.R.; CALIXTO, J.B.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Analysis of the Role of Nitric Oxide in the Relaxant Effect of the Crude Extract and Fractions from *Eugenia uniflora* in the Rat Thoracic Aorta **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v.49 p. 433-437, 1997.

WEHRLÉ, P.; NOBELIS, P.; CUINÉ, A.; STAMM, A.. Response Surface Methodology: An Interesting Statistical Tool For Process Optimization And Validation: Example Of Wet Granulation In A High-Shear Mixer. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 19, n. 13, p. 1637–1653, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Regional office for the Western Pacific. **The world medicines situation 2011**: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, p. 12, 2011.

XAVIER-JÚNIOR, F. H. *et al.* Prospective study for the development of emulsion systems containing natural oil products. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 22, n. 4, p. 367–372, 2012.

XU, Renliang. Light scattering: A review of particle characterization applications. **Particuology**, [s. l.], v. 18, p. 11–21, 2015.

YANG, J.; LI, J.. Self-assembled cellulose materials for biomedicine: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 181, n. August 2017, p. 264–274, 2018.

YINGNGAM, B.; TANTIRAKSAROJ, K.; Taweetao, T. *et al.* Modeling and stability study of the anthocyanin-rich maoberry fruit extract in the fast-dissolving spray-dried microparticles. **Powder Technology**, [s. l.], v. 325, p. 261–270, 2018.

YOSHIARA, L.Y.; MADEIRA, T.B.; DELAROZA, F.; SILVA, J.B.; IDA, E.I.. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, [s. l.], v. 63, n. 8, p. 978–986, 2012.

ZANON, A. B. Aspecto Teórico e prático sobre a avaliação da estabilidade de emulsão manipuladas em farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, 2010.

ZHANG, J. L.; CUI, M.; HE, Y.; YU, H. L.; GUO, D. A. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC–UV and HPLC–MS methods. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 36(5), 1029–1035, 2005.

ZHU, X.-F. *et al.* Freeze-thaw stability of Pickering emulsions stabilized by soy and whey protein particles. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 173–184, 2017.

ZORZI, G. K.; CARVALHO, E.L.S.; VON POSER, G.L.. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 426–436, 2015.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

Artigo publicado: Optimization Strategy for Extraction of Active Polyphenols from Leaves of *Eugenia uniflora* Linn

Isabelle Cristinne Ferraz Bezerra, Rhayanne Thaís de Moraes Ramos, Magda Rhayanny Assunção Ferreira & Luiz Alberto Lira Soares

Food Analytical Methods

Food Analytical Methods (2020) 13:735–750  
<https://doi.org/10.1007/s12161-019-01691-5>

### Optimization Strategy for Extraction of Active Polyphenols from Leaves of *Eugenia uniflora* Linn



Isabelle Cristinne Ferraz Bezerra<sup>1,2</sup> · Rhayanne Thaís de Moraes Ramos<sup>1,2</sup> · Magda Rhayanny Assunção Ferreira<sup>1,3</sup> · Luiz Alberto Lira Soares<sup>1,2,3</sup>

Received: 4 September 2019 / Accepted: 9 December 2019 / Published online: 19 December 2019  
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

#### Abstract

This study aimed to evaluate the performance of polyphenolic extraction from leaves of *Eugenia uniflora* by using solvent systems and different extractive conditions. The solvent systems containing water, methanol, ethanol, and acetone (binary, ternary, or quaternary mixtures) were used to produce extracts by turbo-extraction in accordance with a simplex centroid. The extraction performances were determined by dry residue, total tannin, and flavonoid contents, which were used to calculate the extractive efficiency, and content of markers gallic acid, ellagic acid, and myricitrin. Fingerprints were also obtained by high-performance liquid chromatography and high-performance thin layer chromatography. The mixture of H<sub>2</sub>O to MeOH to EtOH to acetone (46:13:18:23) demonstrate a larger extractive efficiency and was used as solvent to evaluate the influences of drug amount and extraction method. A 3<sup>2</sup>-design with response surface methodology allowed to optimize the extraction conditions, showing better extraction at 5% (w/v) of the herbal drug and by turbo-extraction, standardized condition for extracts from *Eugenia uniflora* leaves.

**Keywords** *Eugenia uniflora* · Polyphenols · Solvent system · Extraction · Optimization · Experimental designs