



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

WLIANA ALVES VITURINO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM HIDROGEL CONTENDO  
EXTRATO E FRAÇÕES DE *Acanthospermum hispidum* PARA TRATAMENTO  
DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS LEVES**

RECIFE

2024

**WLIANA ALVES VITURINO DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM HIDROGEL CONTENDO  
EXTRATO E FRAÇÕES DE *Acanthospermum hispidum* PARA TRATAMENTO  
DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS LEVES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestrado em Ciências farmacêuticas na área de obtenção e avaliação de produtos naturais e compostos bioativos.

Orientador: Luiz Alberto Lira Soares

Coorientadora: Mágda Rhayanny Assunção Ferreira

RECIFE

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Wliana Alves Viturino da.

Desenvolvimento e caracterização de um hidrogel contendo extrato e frações de *acanthospermum hispidum* para tratamento de doenças respiratórias leves / Wliana Alves Viturino da Silva. - Recife, 2024.

141f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Ciências da Saúde, Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

Orientação: Luiz Alberto Lira Soares.

Coorientação: Mágda Rhayanny Assunção Ferreira.

Inclui referências.

1. *Acanthospermum hispidum*; 2. Hidrogel; 3. Controle de qualidade. I. Soares, Luiz Alberto Lira. II. Ferreira, Mágda Rhayanny Assunção. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

**WLIANA ALVES VITURINO DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM HIDROGEL CONTENDO  
EXTRATO E FRAÇÕES DE *Acanthospermum hispidum* PARA TRATAMENTO  
DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS LEVES**

Aprovado em:

**BANCA EXAMINADOURA**

---

Prof. Dr Luiz Alberto Lira Soares (Orientador)

---

Prof. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Membro Interno)

---

Prof. Dra. Julia Aparecida Lourenço de Souza (Membro Externo)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que com sua infinita sabedoria, iluminou minha trajetória e permitiu que eu chegasse ao final de mais uma etapa da minha vida, mostrando durante o percurso que tudo é possível quando se há amor, esforço e dedicação.

Agradeço aos meus queridos pais Arlindo Viturino da Silva e Marinete Alves da Silva, que não mediram esforços para fornecer uma boa educação para mim e para meu irmão, colocando nossa educação como prioridade e sempre destacando a importância dessa para construir um bom futuro. Ao meu “Querido” irmão, Ubiratan Alves Viturino da Silva, por todo apoio, incentivo, por acreditar em mim, mostrando as infinitas possibilidades.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares, a quem tenho uma enorme admiração e que carinhosamente chamo de chefe, que possui um vasto conhecimento e poderosas palavras. Agradeço mais uma oportunidade e confiança e que me proporcionou desenvolvimento pessoal e profissional.

A minha Coorientadora Dr. Mágda Rhayanny Assunção Ferreira, agradeço a sua enorme paciência e oportunidade de ministrar aulas de Tecnologia dos alimentos, por ter acreditado na ideia do meu trabalho e levado a frente junto comigo. Agradeço a sua dedicação e confiança.

A toda equipe do núcleo analítico e tecnológico de fitoterápicos (NUDATEF) da universidade federal de Pernambuco (UFPE), meu muito obrigado, em especial as meninas da pós-graduação, Camylla Tenório, Eloisa Marcelle, Ewelyn Cinthia, Janaina Machado, Joyce Cristina e Thainá Dantas, pelo convívio, aprendizados, risadas, laços, hora do café, “Baladas”, conversas e muito trabalho em equipe, meu muito obrigada.

Agradeço a minha banca examinadora por ter aceitado o desafio e por todo o ensinamento.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho, todo meu reconhecimento e respeito.

“Enquanto eu tiver perguntas / e não houver respostas... / continuarei a escrever.”  
(LISPECTOR, 1998)

## RESUMO

*Acanthospermum hispidum*, popularmente conhecido como espinho de cigano, é amplamente usado na medicina tradicional, destacando-se seu uso para o tratamento de distúrbios respiratórios e gástricos. Neste sentido, novos medicamentos, como os de aplicação nasal permitem que substâncias ativas cheguem ao local, exercendo sua ação. Por isso, os hidrogéis figuram como estratégias importantes devido à sua capacidade de armazenamento e liberação. Assim, este trabalho objetivou desenvolver e caracterizar um hidrogel contendo extrato e frações de *A. hispidum* para o tratamento de doenças respiratórias leves. O material vegetal coletado foi identificado (n°94086) e, após caracterização e processamento, o método para controle químico por UV-vis foi validado para as partes aéreas e as raízes de *A. hispidum*. As condições de preparação e secagem dos extratos foram otimizadas através de desenhos experimentais (fatoriais clássicos e planejamento de misturas); considerando diferentes condições operacionais e adjuvantes de secagem (celulose, dióxido de silício coloidal e gelatina). Adicionalmente, foram obtidas e caracterizadas frações enriquecidas (FH, Fact e FAqr). Por fim, o potencial antifúngico dos extratos foi avaliado “in vitro”. Os hidrogéis termossensíveis sem e com os derivados vegetais foram preparados e caracterizados. Tanto as partes aéreas quanto as raízes de *A. hispidum* atenderam as especificações de qualidade estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira (6ªEd). Os métodos analíticos apresentaram desempenhos compatíveis com as exigências estabelecidas pela RDC 166/2017, e foram consideradas seguras e confiáveis. Após otimização das operações de extração e secagem, concluiu-se pela utilização de etanol: água 50% (v/v) como líquido extrator, para a extração dos compostos de interesse; enquanto o ajuste das condições de secagem ficou definida ao utilizar uma temperatura de secagem de 130°C, com fluxo de alimentação de 1L/h e a mistura composta por gelatina e dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem foi a ideal para auxiliar no armazenamento do material e aumentar o rendimento do processo de secagem. Em relação à atividade fúngica, o extrato bruto apresentou CIM e CFM de 500 µg/mL e as frações de 250 (FH) e 125 µg/mL (F<sub>Act</sub>). Além disso, as amostras apresentaram baixa toxicidade frente à artêmias salinas. Por fim, hidrogéis preparados com Pluronic F127 ou pela mistura de Pluronic F127:Carbopol 940 (18:0,1; m:m) foram estáveis e permitiram a liberação dos fitocompostos presentes no hidrogel. As formulações obtidas foram consideradas uma estratégia eficaz para a entrega de drogas e com estabilidade satisfatória. Entretanto, estudos complementares ainda precisam ser conduzidos para esclarecimento e comprovar a atividade frente a problemas respiratórios, assim como sua segurança.

**Palavras-chave:** *Acanthospermum hispidum*. Hidrogéis. Controle de qualidade.

## ABSTRACT

*Acanthospermum hispidum*, popularly known as gypsy thorn, is widely used in traditional medicine, especially for the treatment of respiratory and gastric disorders. In this sense, new medications, such as those for nasal application, allow active substances to reach the site, exerting their action. Therefore, hydrogels are important strategies due to their storage and release capacity. Thus, this study aimed to develop and characterize a hydrogel containing extract and fractions of *A. hispidum* for the treatment of mild respiratory diseases. The collected plant material was identified (n°94086) and, after characterization and processing, the method for chemical control by UV-vis was validated for the aerial parts and roots of *A. hispidum*. The preparation and drying conditions of the extracts were optimized through experimental designs (classical factorials and mixture planning); considering different operational conditions and drying adjuvants (cellulose, colloidal silicon dioxide and gelatin). Additionally, enriched fractions (FH, Fact, and FAqr) were obtained and characterized. Finally, the antifungal potential of the extracts was evaluated “in vitro”. Thermosensitive hydrogels without and with plant derivatives were prepared and characterized. Both the aerial parts and roots of *A. hispidum* met the quality specifications established by the Brazilian Pharmacopoeia (6th Ed.). The analytical methods presented performances compatible with the requirements established by RDC 166/2017, and were considered safe and reliable. After optimizing the extraction and drying operations, it was concluded that ethanol: water 50% (v/v) would be used as the extracting liquid to extract the compounds of interest; while the adjustment of the drying conditions was defined by using a drying temperature of 130°C, with a feed flow of 1 L/h, and the mixture composed of gelatin and colloidal silicon dioxide as a drying adjuvant was ideal to aid in material storage and increase the yield of the drying process. Regarding fungal activity, the crude extract presented MIC and MFC of 500 µg/mL and fractions of 250 (FH) and 125 µg/mL (FAct). In addition, the samples presented low toxicity against brine shrimp. Finally, hydrogels prepared with Pluronic F127 or by the mixture of Pluronic F127:Carbopol 940 (18:0.1; m:m) were stable and allowed the release of the phytochemicals present in the hydrogel. The obtained formulations were considered an effective strategy for drug delivery and with satisfactory stability. However, additional studies still need to be conducted to clarify and prove the activity against respiratory problems, as well as its safety.

Keywords: *Acanthospermum hispidum*. Hydrogels. Quality control

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem de <i>Acanthospermum hispidum</i> (A- inflorescência; B- Folhas; C- Espinho; D- Erva inteira) .....	26
Figura 2 - Planejamento de mistura simplex centroide usado para <i>A. hispidum</i> .....	36
Figura 3 - Esquema representativo do processo de secagem por aspensão .....	38
Figura 4 - Representação do ensaio de determinação da CIM dos extratos brutos/frações de <i>A. hispidum</i> .....	60
Figura 5 - Valores retidos no tamis, referentes as partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	69
Figura 6 - Valores retidos no tamis, referentes as raízes de <i>A. hispidum</i> .....	70
Figura 7 - Gráfico de retenção e passagem das partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	70
Figura 8 - Gráfico de retenção e passagem das raízes de <i>A. hispidum</i> .....	71
Figura 9 -Polifenóis totais nas partes aéreas de <i>A. hispidum</i> em diferentes proporções de solvente.....	72
Figura 10 - Polifenóis totais nas raízes de <i>A. hispidum</i> em diferentes proporções de solvente.....	73
Figura 11 - Polifenóis totais nas partes aéreas de <i>A. hispidum</i> em diferentes quantidades de droga .....	74
Figura 12 - Teor de polifenóis totais nas raízes de <i>A. hispidum</i> em diferentes quantidades de droga .....	74
Figura 13 - Influência das diferentes alíquotas de folin-ciocalteu nas partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	75
Figura 14 - Influência das diferentes alíquotas de folin-ciocalteu nas raízes de <i>A. hispidum</i> .....	76
Figura 15 - Cinética da reação para as partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	77
Figura 16 - Cinética da reação para as raízes de <i>A. hispidum</i> .....	77
Figura 17 - Curvas analíticas do pirogalol obtidas para a verificação da linearidade do método.....	79
Figura 18 - Curva analítica média do pirogalol obtida para a verificação da linearidade do método .....	80
Figura 19 - Gráfico dos resíduos obtido a partir da regressão da curva do pirogalol. ...	81
Figura 20 - Curvas analíticas para a verificação da linearidade do método a partir da solução extrativa das partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	83

Figura 21 - Curva analítica média obtida para a verificação da linearidade do método a partir da solução obtida das partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	84
Figura 22 - Gráfico dos resíduos obtido a partir da regressão da curva da solução obtida a partir das partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	85
Figura 23 - Curvas analíticas para a verificação da linearidade do método a partir da solução obtida das raízes de <i>A. hispidum</i> .....	86
Figura 24 - Curva analítica média obtida para a verificação da linearidade do método a partir da solução obtida das raízes de <i>A. hispidum</i> .....	87
Figura 25 - Gráfico dos resíduos obtido a partir da regressão da curva da solução obtida a partir das raízes de <i>A. hispidum</i> .....	89
Figura 26 - Curva de especificidade e linearidade das partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .	91
Figura 27 - Curva de especificidade e linearidade das raízes de <i>A. hispidum</i> .....	91
Figura 28 - Gráficos de contorno (A) e de Pareto (B) para os teores de resíduo seco nas diferentes composições de misturas testadas.....	99
Figura 29 - Gráficos de contorno (A) e de Pareto (B) para os teores de polifenóis nas diferentes composições de misturas testadas.....	100
Figura 30 - Gráficos de contorno e de Pareto para eficiência de extração nas diferentes composições de misturas testadas. ....	101
Figura 31 - Análise cromatográfica para dos extratos obtidos por planejamento simplex centroide.....	103
Figura 32 - Rendimento da análises das condições de secagem por spray dryer....	104
Figura 33 - Umidade residual das condições de secagem por spray dryer.....	105
Figura 34 - Teor de polifenóis das análises das condições de secagem por spray dryer.....	106
Figura 35 - Extrato seco por aspersão nos diferentes experimentos de secagem ...	108
Figura 36 - Gráfico de contorno (A) e gráfico de pareto (B) para a umidade residual nas diferentes composições de misturas de adjuvantes de secagem testadas. ....	109
Figura 37 - Gráfico de contorno (A) e gráfico de Pareto (B) para o teor de polifenóis nas diferentes composições de misturas de adjuvantes de secagem testadas. ....	109
Figura 38 - Análise cromatográfica dos extratos e frações das partes aéreas e raízes de <i>A. hispidum</i> .....	111

Figura 39 - Curva de concentração/resposta da mortalidade do extrato bruto de <i>A. hispidum</i> .....	113
Figura 40 - Formulações dos hidrogéis que conseguiram formar a transição Sol-Gel. .	115
Figura 41 - Avaliação do pH das formulações após 24h.....	116
Figura 42 - Gráfico dos de viscosidade dos hidrogéis obtidos da avaliação preliminar.	117
Figura 43 - Avaliação do pH por formulações de hidrogel termossensível durante a estabilidade em diferentes temperaturas. ....	123
Figura 44 - Avaliação do pH das formulações de hidrogel termossensível em diferentes condições de armazenamento .....	124
Figura 45 - Viscosidade por formulação de hidrogel termossensível durante a estabilidade.....	127
Figura 46 - Viscosidade das formulações de hidrogel termossensível em diferentes condições de armazenamento.....	128

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Proporção de solvente utilizado para cada experimento .....	53
Tabela 2 - Condições de secagem por aspersão de <i>A. hispidum</i> .....	55
Tabela 3 - Parâmetros da operação de secagem de <i>A. hispidum</i> .....	56
Tabela 4 - Resultados da prospecção fitoquímica das partes aéreas e raízes de <i>A. hispidum</i> .....	66
Tabela 5 - Perda por dessecação das amostras de <i>Acanthospermum hispidum</i> .....	68
Tabela 6 - Valores utilizados na curva de linearidade do pirogalol.....	78
Tabela 7 - Absorbâncias obtidas para a curva de linearidade do pirogalol, com seus respectivos valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação .....	78
Tabela 8 - Análise de Variância (ANOVA) realizada para a curva analítica média do pirogalol .....	80
Tabela 9 - Análise dos resíduos de acordo com a regressão.....	81
Tabela 10 - Valores de absorbância obtidos para as amostras das partes aéreas para o teor de polifenóis. ....	82
Tabela 11 - Valores de absorbância obtidos para as amostras das raízes para o teor de polifenóis.....	82
Tabela 12 - Análise de Variância (ANOVA) realizada para a curva analítica média da solução extrativa das partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	84
Tabela 13 - Análise dos resíduos de acordo com a regressão (Amostra).....	85
Tabela 14 - Análise de Variância (ANOVA) realizada para a curva analítica média da solução extrativa das raízes de <i>A. hispidum</i> .....	87
Tabela 15 - Análise dos resíduos de acordo com a regressão (Amostra).....	88
Tabela 16 - Resultados da análise de regressão da curva do pirogalol.....	89
Tabela 17 - Resultados de efeito matriz obtidos na análise de partes aéreas e raízes de <i>A. hispidum</i> .....	90
Tabela 18 - Repetibilidade do doseamento de polifenóis totais nas partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	92
Tabela 19 - Repetibilidade do doseamento de polifenóis totais nas raízes de <i>A. hispidum</i> .....	92
Tabela 20 - Precisão intermediária do doseamento de polifenóis totais nas partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	93
Tabela 21 - Precisão intermediária do doseamento de polifenóis totais nas raízes de <i>A. hispidum</i> .....	93

Tabela 22 - Ensaio de recuperação para as partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	94
Tabela 23 - Ensaio de recuperação para as raízes de <i>A. hispidum</i> .....	94
Tabela 24 - Robustez, parâmetro luminosidade para as partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	95
Tabela 25 - Robustez, parâmetro estabilidade da solução das partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	95
Tabela 26 - Robustez, parâmetro equipamento diferente para as partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	95
Tabela 27 - Robustez, parâmetro luminosidade nas raízes de <i>A. hispidum</i> .....	96
Tabela 28 - Robustez, parâmetro estabilidade da solução nas raízes de <i>A. hispidum</i> . 96	
Tabela 29 - Robustez, parâmetro equipamento diferente nas raízes de <i>A. hispidum</i> . 96	
Tabela 30 - Resultados obtidos no planejamento simplex centroide para as partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	97
Tabela 31 - Modelos obtidos no planejamento simplex centroide para as partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	97
Tabela 32 - Rendimento (%), umidade residual e teor de polifenóis por espectrofotometria UV-Vis das partes aéreas de <i>A. hispidum</i> .....	107
Tabela 33 - Concentração Inibitória Mínima e Concentração fungicida Mínima para extratos brutos/frações de <i>A. hispidum</i> .....	111
Tabela 34 - Toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> nos extratos brutos de <i>A. hispidum</i> . .... .....	112
Tabela 35 - Avaliação das características macroscópicas do hidrogéis termossensíveis contendo extratos de <i>A. hispidum</i> .....	119
Tabela 36 - Avaliação do estado de transição sol-gel das formulações de <i>A. hispidum</i> .....	120
Tabela 37 - Avaliação do pH das formulações do hidrogéis termossensíveis contendo extratos de <i>A. hispidum</i> .....	122
Tabela 38 - Avaliação da viscosidade das formulações do hidrogéis termossensíveis contendo extratos de <i>A. hispidum</i> .....	126

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Metabólitos encontrados em <i>Acanthospermum hispidum</i> .....	28
Quadro 2 - Prospecções de publicações com atividades biológicas encontrada do <i>A. hispidum</i> .....	30
Quadro 3 - Sistemas cromatográficos, reveladores e padrões utilizados para obtenção do perfil fitoquímico das partes aéreas e raízes da <i>Acanthospermum hispidum</i> .....	44
Quadro 4 - Experimento de secagem da <i>A. hispidum</i> com diferentes adjuvantes. ....	57
Quadro 5 - Formulações prévias para um mapeamento dos hidrogeis termossensíveis .....	114

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCD-AE	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
CG-MS	Cromatografica gasosa acoplado a massas
CFM	Concentração fungicida mínima
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória mediana
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CM	Celulose Microcristalina
DAD	Detector de arranjo de diodos
DL <sub>50</sub>	Dose letal mediana
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DSC	Dióxido de Silício Coloidal
EB	Extrato bruto
EE	Eficiência de Extração
ESA	Extrato Seco por Aspersão
ERO	Espécies reativas de oxigênio
F. al	Fluxo de alimentação
FAE	Fração Acetato de etila
Faqr	Fração aquosa residual
FH	Fração hexânica
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
IR	Infravermelho
MI	ágar Mueller Hinton
pH	Potencial hidrogeniônico
PSA	Produto Seco por Aspersão
PSA-EC	Produto Seco por Aspersão de Espinho de Cigano

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RF	Fator de Retenção
RMN	Ressonância Magnética nuclear
RS	Resíduo Seco
SD	Spray Drying
SE	Solução Extrativa
SE-EC	Solução Extrativa de Espinho de Cigano
SUS	Sistema Único de Saúde
TPG	Teor de Pirogalol
T.E.	Temperatura de entrada
TPT	Teor de Polifenóis Totais
UR	Umidade Relativa
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
V.ar	Vazão de ar
WI38	Linhagem celular

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
μg	microgramas
g	Gramas
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Milímetro
n°	Número
nm	Nanômetro
Y	Rendimento
β	Beta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>26</b>
3.1	ASPECTOS GERAIS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE <i>A. hispidum</i> .....	26
<b>3.1.1</b>	<b>Aspectos Botânicos e Históricos</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Composição Química</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Atividades Biológicas</b> .....	<b>29</b>
3.2	METODOLOGIAS ANALÍTICA PARA A IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ESPÉCIES VEGETAIS .....	32
<b>3.2.1</b>	<b>Espectrofotometria UV-vis</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Validação de metodologia analítica</b> .....	<b>34</b>
3.3	PLANEJAMENTO DE MISTURAS E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS	34
<b>3.3.1</b>	<b>Planejamento de Misturas</b> .....	<b>35</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Planejamento Fatorial</b> .....	<b>36</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Secagem por aspersão</b> .....	<b>37</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Adjuvantes farmacêuticos na preparação de extratos secos</b> .....	<b>38</b>
3.4	ATIVIDADE BIOLÓGICA EM ESPÉCIES VEGETAIS .....	40
<b>3.4.1</b>	<b>Atividade antifúngica em espécies vegetais</b> .....	<b>40</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Toxicidade frente a espécies vegetais</b> .....	<b>41</b>
3.5	HIDROGÉIS TERMOSENSÍVEIS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PARA COMPOSTOS FENÓLICOS .....	42
<b>3.5.1</b>	<b>Hidrogel</b> .....	<b>42</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Hidrogéis termossensíveis nasais</b> .....	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>MATERIAL VEGETAL</b> .....	<b>44</b>
4.2	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA .....	44
4.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE PARTES AÉREAS E RAÍZES DE <i>Acanthospermum hispidum</i> .....	45
<b>4.3.1</b>	<b>Matéria estranha</b> .....	<b>45</b>

4.3.2	<b>Perda por dessecação</b> .....	46
4.3.3	<b>Cinzas totais</b> .....	46
4.3.4	<b>Determinação de cinzas insolúveis em ácido</b> .....	47
4.3.5	<b>Determinação granulométrica</b> .....	47
4.3.6	<b>Determinação de substâncias extraíveis (Teor de extrativos)</b> .....	47
4.4	<b>DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS DAS PARTES AÉREAS E RAÍZES DE <i>A. hispidum</i></b> .....	48
4.4.2	<b>Avaliação do método para a quantificação de polifenóis totais</b> .....	48
4.4.3	<b>Validação</b> .....	50
4.4.3.1	Linearidade da amostra e do padrão .....	50
4.4.3.2	Limite de detecção e limite de quantificação .....	51
4.4.3.3	Efeito matriz.....	51
4.4.3.4	Precisão .....	51
4.4.3.5	Exatidão .....	51
4.4.3.6	Robustez.....	52
4.4.4	<b>Aplicação de metodologia simplex centroide para obtenção dos extratos</b> .....	52
4.4.4.1	Obtenção da solução extrativa.....	52
4.4.4.2	Caracterização da solução extrativa .....	53
	Resíduo seco.....	53
	Teor de flavonoides totais .....	53
	Teor de polifenóis totais .....	54
	Avaliação da eficiência de extração (EE) .....	54
4.4.4.3	Análise por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE)...	54
4.4.5	<b>Otimização das condições de secagem</b> .....	55
4.4.5.1	Caracterização do produto seco por aspensão de <i>A. hispidum</i> .....	56
	Rendimento do PSA-AH.....	56
	Teor de polifenóis totais do PSA-AH .....	56
	Determinação da umidade .....	57
4.4.6	<b>Otimização de adjuvantes de secagem por planejamento fatorial</b> .....	57
4.4.7	<b>Fracionamento e análise fitoquímica dos extratos</b> .....	58
4.4.8	<b>Atividade antifúngica</b> .....	59

<b>4.4.9</b>	<b>Ensaio de toxicidade frente a náuplios de <i>Artemia salina</i></b> .....	<b>60</b>
<b>4.4.10</b>	<b>Obtenção dos hidrogéis termossensíveis nasais</b> .....	<b>61</b>
4.4.10.1	Formulação 1 (Pluronic F127) .....	61
4.4.10.2	Formulação 2 (Pluronic F127+ carbopol) .....	61
<b>4.4.11</b>	<b>Caracterização dos hidrogéis termossensíveis nasais</b> .....	<b>62</b>
4.4.11.1	Avaliação das características macroscópicas .....	62
4.4.11.2	Teste de Centrifugação .....	62
4.4.11.3	Ciclo gelo/ degelo .....	62
4.4.11.4	Avaliação do pH .....	63
4.4.11.5	Determinação da viscosidade .....	63
4.4.11.6	Avaliação da transição de fases (Sol-Gel).....	63
<b>4.4.12</b>	<b>Estudo de estabilidade</b> .....	<b>64</b>
4.4.12.1	Estabilidade preliminar .....	64
4.4.12.2	Estudo de estabilidade acelerada e de longa duração .....	64
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
5.1	AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	66
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE PARTES AÉREAS E RAÍZES .67	
<b>5.2.1</b>	<b>Perda por dessecação</b> .....	<b>67</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Cinza totais</b> .....	<b>68</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Determinação de cinzas insolúveis em ácido</b> .....	<b>68</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Determinação da granulometria</b> .....	<b>69</b>
5.3	AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA DOSEAMENTO DE POLIFENOIS TOTAIS E RAÍZES E PARTES AÉREAS DE <i>A. hispidum</i> .....	71
<b>5.3.1</b>	<b>Avaliação do método</b> .....	<b>72</b>
5.3.1.1	Determinação da concentração do solvente .....	72
5.3.1.2	Determinação da quantidade de droga e comprimento de onda.....	73
5.3.1.3	Determinação da alíquota de folin-ciocalteu .....	75
5.3.1.4	Determinação da cinética reacional .....	76
<b>5.3.2</b>	<b>Validação do método</b> .....	<b>78</b>
5.3.2.1	Linearidade do padrão e das amostras .....	78
5.3.2.2	Limite de detecção e limite de quantificação .....	89
5.3.2.3	Efeito matriz.....	89

5.3.2.4	Precisão .....	91
5.3.2.5	Exatidão .....	93
5.3.2.6	Robustez.....	94
5.4	PLANEJAMENTO SIMPLEX CENTROIDE .....	97
<b>5.4.1</b>	<b>Resíduo seco .....</b>	<b>98</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Polifenóis totais.....</b>	<b>99</b>
<b>5.4.3</b>	<b>Eficiência de extração.....</b>	<b>101</b>
<b>5.4.4</b>	<b>Análise fitoquímica das soluções extrativas por CCD-AE .....</b>	<b>102</b>
5.5	OTIMIZAÇÃO DA SECAGEM POR ASPERSÃO .....	103
<b>5.5.1</b>	<b>Rendimento .....</b>	<b>103</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Umidade residual .....</b>	<b>104</b>
<b>5.5.3</b>	<b>Teor de polifenóis (TP) .....</b>	<b>105</b>
5.6	OTIMIZAÇÃO DE ADJUVANTE .....	106
<b>5.6.1</b>	<b>Umidade Residual .....</b>	<b>108</b>
<b>5.6.2</b>	<b>Teor de Polifenóis Totais .....</b>	<b>109</b>
<b>5.6.3</b>	<b>Análise fitoquímica dos extratos brutos e frações.....</b>	<b>110</b>
5.7	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	111
5.8	TOXICIDADE <i>IN VITRO</i> FRENTE A NÁUPLIOS DE <i>ARTEMIAS SALINA</i> .112	
5.9	AVALIAÇÃO PRELIMINAR DAS FORMULAÇÕES DOS HIDROGÉIS .....	114
<b>5.9.1</b>	<b>Avaliação do pH, viscosidade e características macroscópicas das formulações preliminares .....</b>	<b>114</b>
<b>5.9.2</b>	<b>Teste de centrifugação/ ciclo gelo – d’gelo.....</b>	<b>117</b>
<b>5.9.3</b>	<b>Estudo de estabilidade .....</b>	<b>118</b>
5.9.3.1	Avaliação das características macroscópicas .....	118
5.9.3.2	Avaliação da transição de fase (Sol-Gel) .....	120
5.9.3.3	Avaliação do pH.....	121
5.9.3.4	Determinação da viscosidade .....	125
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>129</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>130</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Acanthospermum hispidum* possui uma excelente disseminação no nordeste brasileiro, pelo fato desta espécie ser bastante adaptada às diferentes condições climáticas e solo (Alva *et al.*, 2012; Araújo; Xavier; Ferreira; Pimentel, 2013; Araújo; Xavier; Ferreira; Randau; *et al.*, 2013). Conhecida popularmente como “espinho de cigano” e “carrapicho de carneiro”, a espécie é comumente utilizada pela população principalmente para tratamento de distúrbios estomacais e respiratórios, tais como: tosse, bronquite e asma (Adepiti; C; Agbedahunsi, 2014; Araújo; Xavier; Ferreira; Pimentel, 2013). Além destas, *Acanthospermum hispidum* possuem outras atividades já relatadas na literatura, como: antifúngicas, antioxidante, antiparasitária, entre outras (Lima; Albuquerque; Guimarães, 2019; Mallmann *et al.*, 2018; Santos, 2019).

A utilização de plantas medicinais por algumas comunidades de diferentes culturas, muitas vezes representa o único recurso terapêutico para tratamento ou cura de enfermidades. A cultura da utilização das plantas medicinais é tão forte que sobrevive até hoje, e são facilmente encontradas em feiras livres e mercados populares das grandes cidades brasileiras (Dias *et al.*, 2019; Wagner *et al.*, 2011). A recomendação de uso e eficácia de plantas medicinais pela população, contribui de forma relevante para orientar as investigações terapêuticas. Despertando assim, a curiosidade do pesquisador no estudo mais aprofundado sobre a botânica, fitoquímica e farmacologia das espécies (Maciel, 2002). Com o intuito de promover o uso racional e seguro de plantas medicinais pela população (De Fátima Colet *et al.*, 2015).

Porém, a variabilidade química existente nos extratos de plantas medicinais tem sido um dos maiores desafios para a padronização e a manutenção da reprodutibilidade da qualidade de insumos farmacêuticos ativos vegetais e seus derivados, dificultando não só o controle de qualidade, mas também o desenvolvimento e manufatura de formas farmacêuticas. Considerando a multifatorialidade da variabilidade dessas matrizes biológicas, é fundamental que as abordagens envolvendo o desenvolvimento e inovação a partir de plantas medicinais, empreguem ferramentas de planejamento e análises para compreensão para identificação e quantificação da influência destes fatores. Assim, o desenvolvimento e manufatura de produtos oriundos de plantas medicinais não é uma tarefa trivial e exige a superação de diversos desafios, que vão desde a identificação e cultivo da espécie,

extração e análise das substâncias químicas, obtenção de extratos ou produtos secos até a forma farmacêuticas final (Klein *et al.*, 2009; Simões *et al.*, 2016; Zorzi *et al.*, 2015). Um outro desafio muito importante é assegurar a estabilidade das formulações, que possam resistir a diversas possibilidades de incompatibilidades físico-químicas decorrentes da complexibilidade química de derivados de espécies vegetais (Klein *et al.*, 2009; Zorzi *et al.*, 2015).

Tendo em vista a busca pelo desenvolvimento de novas formulações mais eficientes e que se adequem às necessidades da população, os hidrogéis vem sendo usados devido a propriedade e aplicações, como a entrega de ativos em curativos e implantes que tem a capacidade de liberar o ativo com o intuito de promover a cicatrização, além disso ele pode ser usado como matriz de crescimento celular e de tecido, com o intuito de regenerar órgãos e tecidos lesionados e também em sua forma simples para o tratamento de doenças tópicas (Abdulla *et al.*, 2021; Palozzi *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2020). Os hidrogéis são estruturas tridimensionais formadas por redes poliméricas que tem a capacidade de enclausurar grande quantidade de água. Os polímeros formadores da estrutura reticulada podem ser de origem natural ou sintética e alguns deles ainda possui a capacidade de ser responsivo a estímulos, como temperatura, pH, enzimas entre outros (Wang *et al.*, 2019; Xing; Zheng; Duan, 2015).

Neste contexto, o grupo dos hidrogéis termossensíveis, ou seja, que são sensíveis a variações de temperatura, ganhou notoriedade em razão de suas propriedades de adequabilidade aos locais de aplicação, adesividade e facilidade de aplicação; aliados aos efeitos da temperatura sobre as propriedades mecânicas e de liberação de ativos. A depender do tipo do hidrogel termossensível nasal ele poderá apresentar algumas vantagens, no que desrespeito a não eliminação do fármaco pela formação do muco e evitando o efeito de primeira passagem (Illum, 2003; Rao; Agrawal; Shirsath, 2017) Portanto, estes sistemas têm recebido especial atenção como alternativas por exemplo, para a aplicação nasal, sendo utilizadas no tratamento de doenças como sinusites, rinites alérgicas, ou ainda para como via de entrega de drogas para tratamento de doenças neurais (Cunha *et al.*, 2022; Illum, 2003; Moradi *et al.*; Rao; Agrawal; Shirsath, 2017; Salunke; Patil, 2016).

Tendo em vista a busca por novos compostos ativos e seus fins terapêuticos, levando a necessidade de desenvolvimento de produtos (seguras e eficazes) e garantir o acesso desse a população acometida por afecções do trato respiratório. Neste contexto, a incorporação de extratos e frações de *Acanthospermum hispidum*

em hidrogéis torna-se uma alternativa terapêutica para o tratamento de doenças respiratórias consideradas leves.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar um hidrogel contendo extrato e frações de *Acanthospermum hispidum* para tratamento de doenças respiratórias leves.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e caracterizar as raízes e partes aéreas do *A. hispidum*;
- Obter extrato bruto e frações enriquecidas do *A. hispidum*;
- Caracterizar extrato, frações e hidrogel obtido por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e espectrofotometria UV-vis;
- Obter hidrogel contendo extrato e frações de *A. hispidum*;
- Caracterizar as formulações obtidas quanto aos padrões físico-químicos;
- Realizar o estudo de estabilidade das formulações.

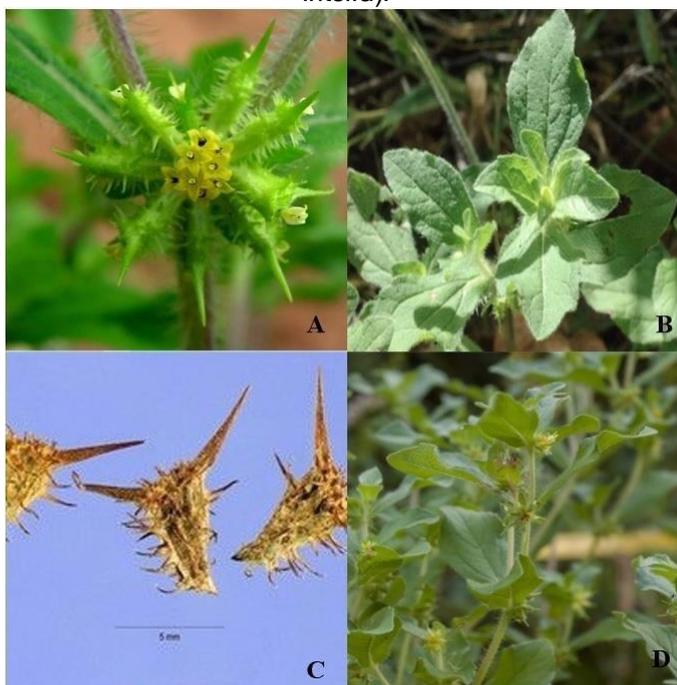
### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ASPECTOS GERAIS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *A. hispidum*

##### 3.1.1 Aspectos Botânicos e Históricos

*Acanthospermum hispidum* é uma espécie pertencente à família Asteraceae, originário do Grego “Acantha” que significa “espinho” e “esperma” que em outras palavras quer dizer semente e “hispidum” oriundo do latim que significa espinho ou áspero. *A. hispidum* é largamente distribuído na África, América, Austrália, Índia e Havaí. No Brasil, especificamente na região Nordeste *A. hispidum* é conhecido como “espinho de cigano”, “cabeça de cabra” e “carrapicho rasteiro” (Adepiti; C; Agbedahunsi, 2014; Alva *et al.*, 2012).

Figura 1 - Imagem de *Acanthospermum hispidum* (A- inflorescência; B- Folhas; C- Espinho; D- Erva inteira).



Fonte: [https://www.agrolink.com.br/problemas/carrapicho-de-carneiro\\_11.html](https://www.agrolink.com.br/problemas/carrapicho-de-carneiro_11.html)  
[http://www.westafricanplants.senckenberg.de/root/index.php?page\\_id=14&id=40#](http://www.westafricanplants.senckenberg.de/root/index.php?page_id=14&id=40#)

*Acanthospermum hispidum* é uma erva ramificada que pode chegar a 1 metro de altura, o seu caule é coberto por pelos (tricoma com formato cilíndrico). As folhas de *A. hispidum* são subsésseis, inteiro, simples, oposta e finamente serrilhada nas

margens. As inflorescências são tipicamente da família “Aster” e são formadas por capítulos solitários, com flores de coloração amarelo-claro. Os frutos são achatados e de formato triangular espinhoso, possuem de 6 a 8 mm de comprimento e 2 a 4 mm de largura, esses frutos estão cobertos de espinhos, que possuem um par reto ou curvo de espinhos no topo (Araújo; Xavier; Ferreira; Pimentel, 2013; Basile *et al.*, 2016; Yapi *et al.*, 2018). *A. hispidum* é uma planta bem adaptada a variações de solo e condições climáticas.

### **3.1.2 Composição Química**

Inúmeros estudos já relatados na literatura, tiveram como objetivo identificar as diferentes classes de metabólitos presentes na espécie. Os principais farmacógenos utilizado para análise foram as folhas, partes aéreas, raízes ou planta completa, os principais solventes utilizados para preparação dos extratos foram água, etanol e metanol e métodos extrativos mais empregados foram maceração, sob refluxo e soxhlet (Akah; Code, 2017; Attah *et al.*, 2016; Chika; Onyebueke; Bello, 2018; N’do, J. *et al.*, 2019). As classes de metabólitos mais pesquisados, presente no *A. hispidum*, encontra-se destacado no Quadro 1.

Quadro 1 - Metabólitos encontrados em *Acanthospermum hispidum*.

<b>Partes da planta</b>	<b>Método extrativo</b>	<b>Classe de metabólitos</b>	<b>Referência</b>
<b>Folhas</b>	Soxhlet	AÇU, ALC, D. ANT, EST, FLA, GLI, SAP, TAN e TER.	(Abubakar <i>et al.</i> , 2015; Chika; Onyebueke; Bello, 2018)
<b>Partes aéreas</b>	Percolação	AÇU, ALC, D. ANT, EST, FLA, GLI, SAP, TAN e TER.	(Attah <i>et al.</i> , 2016; Okoro; Okoro, 2019)
<b>Raízes</b>	Maceração	ALC, EST, FLA, OLE, SAP, TAN e TER.	(Onyeto; Akah; Okafor, 2017)
<b>Planta inteira</b>	Refluxo e Maceração	ALC, FLA, GLI, EST, TAN e TER.	(Basile <i>et al.</i> , 2016; N'do, J. <i>et al.</i> , 2019)

Onde: AÇU: Açúcares; ALC: Alcalóides; ANT: Antocianinas; D.ANT: Derivados antracênicos; EST: Esteroides; FLA: Flavonóides; GLI: Glicosídeos cardioativos; OLE: Óleos; SAP: Saponinas; TAN: Taninos hidrolisáveis/condensados; TER: Terpenos.

Fonte: A autora (2024).

Além disso, também foram estudados alguns compostos isoladamente, através do CLAE, CG-MS, Cromatografia em coluna, espectrofotometria infravermelho (IR), ressonância magnética nuclear (RMN). Todas essas análises foram provenientes das folhas, partes aéreas e raízes. Alguns desses compostos isolados foram: (E) - $\beta$ -cariofileno, Germacreno D e A, procianidina B2, Hexadecano, 2-metil-Dodecano, 2,7,10-trimetil-Dodecano, Hexadecano, 2-metil-Dodecano, 2-metil-Undecano, 2-metil-5- (1- metiletil) -Fenol, Ácido hexadecanóico, éster metílico, 15-acetoxi-8 - [(2-metilbutiriloxi)] - 14-oxo-4,5-cis-acantoespermolida, entre outros (Akah; Code, 2017; Alva *et al.*, 2012; Ganfon *et al.*, 2012; Mihigo *et al.*, 2015; Onyeto; Akah; Okafor, 2017).

### 3.1.3 Atividades Biológicas

No Brasil, as atividades biológicas de *A. hispidum* estão relacionadas principalmente ao tratamento de desordens gástricas e problemas respiratórios (N'do, J. Y.-P. *et al.*, 2019). Estudos conduzidos por outros pesquisadores, relataram o uso da espécie para o tratamento de febre amarela e malária (Adepiti; C; Agbedahunsi, 2014; Araújo *et al.*, 2008). Devido à variedade de usos terapêuticos, a espécie *A. hispidum* tem sido alvo de pesquisas, com o objetivo de validar muitos dos efeitos biológicos descritos. As propriedades mais relevantes já relatadas na literatura estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2 - Prospecções de publicações com atividades biológicas encontrada do *A. hispidum*.

<b>Referência</b>	<b>Indicação terapêutica</b>	<b>Farmacógeno/ extrato</b>	<b>Conclusão</b>
(Elufioye; Machie, 2017)	Atividade anticolinesterásica	A planta toda Maceração Extrato metanólico	O extrato apresentou inibição percentual média de 45,32% e 68,06% nas concentrações de 1mg/ mL e 5mg/mL respectivamente.
(Chika; Onyebueke; Bello, 2018)	Efeito hipoglicemiante	Folhas Extrato aquoso	Os ratos foram tratados por 28 dias, com doses de 70,210 e 700mg/kg. Foi observado redução da glicemia em jejum e uma melhora na tolerância oral a glicose. Demonstraram uma potente atividade diabética.
(N'do J <i>et al.</i> , 2018; N'do, J. Y.-P. <i>et al.</i> , 2019)	Atividade hepatoprotetora	Extrato etanólico	Os extratos apresentaram mais eficiência na proteção de células hepáticas de ratos. Revelaram a capacidade do extrato de bloquear as fibras hepáticas nos ratos tratados.
(Palози <i>et al.</i> , 2017)	Efeito anti-hipertensivo	Partes aéreas Extrato aquoso frações etanólica	Foi eficaz em reduzir os níveis de pressão arterial. Reduzindo também o estresse oxidativo e nitrosativo, sendo assim indicativo de um potencial mecanismo de ação para os efeitos cardiovasculares.
(N'do, J. Y.-P. <i>et al.</i> , 2019)	Atividade antioxidante	Extrato aquoso Extrato etanólico	Os extratos alcançaram bons resultados para os dois testes realizados (DPPH/ ABTS), demonstrando uma boa atividade oxidante.

(Koukouikila-Koussounda <i>et al.</i> , 2013)	Atividade antitumoral	Folhas Extrato metanólicos e etanólicos	Apresenta valores de concentração inibitório de 50% (CI <sub>50</sub> ) > 100µg/mL, revelando-se não tóxico.
(Onyeto; Akah; Okafor, 2017).	Atividade antitussígeno	Raízes Extratos metanólicos, frações N-hexano, acetato de etila e metanol	Os extratos e frações demonstraram efeito antitussígeno significativo em camundongos. Os autores atribuem esses efeitos a elevada concentração de saponinas e flavonoide.
(Mihigo <i>et al.</i> , 2015).	Atividade antimicrobiana	Folhas Extratos hexanicos e diclorometano	Os extratos diclorometano forma mais eficaz contra contra S. Aureus. (CIM > 100µg/mL. Ambos os extratos
(Koukouikila-Koussounda <i>et al.</i> , 2013)	Atividade antiparasitária	Folhas Extratos aquosos, etanólicos e metanólicos.	Os extratos foram avaliados contra duas cepas P. falciparum, o metanólico apresentou atividade inibitória forte contra P. falciparum resistente e moderada contra a sensível.

Fonte: A autora (2024).

Os ensaios toxicológicos realizados com extratos obtidos com diferentes solventes, frações e compostos isolados das folhas e das partes aéreas de *A. hispidum* foram avaliados, e segundo os autores nenhum deles apresentou toxicidade contra *Artemias salina* (Ganfon *et al.*, 2012).

Em relação aos testes de toxicidade aguda e subaguda em camundongo, de extratos aquosos das partes aéreas de *A. hispidum*, nas doses administradas, não houve mortes, alterações patológicas e mudanças de peso. Diversos extratos de *A. hispidum* também foram investigados no que se refere a sua citotoxicidade. Os extratos hidroalcoólicos proveniente das partes aéreas, mostraram um  $IC_{50} > 100$   $\mu\text{g/mL}$  constatando ausência de toxicidade para células WI38 (Houngbèmè *et al.*, 2015).

### 3.2 METODOLOGIAS ANALÍTICA PARA A IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ESPÉCIES VEGETAIS

Os compostos fenólicos vêm ganhando espaço e se tornando destaque em muitos estudos encontrados na literatura. Eles possuem uma grande multiplicidade de funções biológicas, sejam elas “in vitro” ou “in vivo”, destacando-se as atividades: antioxidante, anti-inflamatória, cicatrizante, antiviral antiparasitária, citotóxica e antitumoral, entre outras (Caban *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2008). A pesquisa, identificação e/ou quantificação desses compostos em espécies vegetais, são realizadas com o auxílio de diversos métodos e técnicas instrumentais.

Metodologias analíticas para a identificação de compostos fenólicos em espécies vegetais. Uma gama de metodologias é usada para a determinação e identificação da presença de compostos de espécies bioativas. A quantificação desses compostos dependerá de alguns parâmetros analisados, métodos de extração, substâncias interferentes e impurezas (Liu *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2017). Os compostos fenólicos que possuem em sua composição um ou mais anéis benzênicos, com grupamentos hidroxilas ligadas. Sendo assim, a identificação de compostos fenólicos em espécies vegetais requer métodos analíticos, que possam separar, detectar e quantificar essas moléculas em matrizes complexas.

As técnicas de identificação dos componentes fenólicos em espécies vegetais podem ser divididas em dois grandes grupos: cromatográficos e espectroscópicos. As técnicas cromatográficas se baseiam na separação de acordo com as propriedades

físico-químicas dos compostos podendo ser usado a cromatográfica líquida de alta eficiências e cromatografia em camada (CCD). As técnicas espectroscópicas se baseiam na emissão e adsorção e a mais usada é a espectrofotometria na região do ultravioleta visível (UV-vis) (Xu *et al.*, 2017).

### 3.2.1 Espectrofotometria UV-vis

Técnicas analíticas são empregadas para avaliação dos compostos analíticos, principalmente para a região do UV-vis, o qual desempenha um papel importante nas técnicas instrumentais. A espectrofotometria UV-vis é uma técnica analítica utilizada para avaliação quantitativa, empregadas para identificação de metabólitos, estudos de estabilidade de compostos, além de cinética e equilíbrio da reação. É uma técnica rápida, de baixo custo quando comparado com outras técnicas, sensível e com ótima precisão. Devido a multiplicidade de materiais e compostos que podem ser analisados por espectrofotometria UV-vis, ela pode ser utilizada em vários campos de atuação, tais como: pesquisa farmacêutica, em alimentos, para controle de qualidade de diversos componentes entre outros (Santos *et al.*, 2022; Simioni *et al.*, 2019).

Uma técnica bastante utilizada para a detecção e quantificação de compostos fenólicos por espectrofotometria (UV-vis) é através do emprego da reação colorimétrica devido a sua simplicidade e confiabilidade. Dentre as metodologias empregadas a oxido-redução e formação de compostos são as mais usuais (Blainski; Lopes; De Mello, 2013; Ramos *et al.*, 2017). Para o doseamento de polifenóis por espectrofotometria por UV- vis. Podem ser empregadas algumas metodologias a mais usualmente utilizada é o Folin-Ciocalteu. A reação para determinação de polifenóis totais dar-se em meio básico, pela adição de carbonato de cálcio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) fazendo com que o composto fenólico percam hidrogênio da função carboxílica e ocorra a formação do complexo do íon fenolato que ao misturasse com o reagente Folin-Ciocalteu forma um complexo de coloração azul com intensidade de cor proporcional a concentração de metabólitos (Cacique *et al.*, 2020; Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventós, 1999). Porém, não é um método tão seletivo, pois a presença de outros constituintes redutores podem reagir. Contudo é possível estimar a capacidade redutora dos compostos solúveis em meio aquoso através desse método (Garmus *et al.*, 2014; Granato *et al.*, 2016).

### 3.2.2 Validação de metodologia analítica

As aplicações de técnicas analíticas, tem um papel substancial, desde as etapas de desenvolvimento da droga até a pós comercialização, com o intuito de avaliar a estabilidade física e química da droga, avaliação das moléculas, quantificação e identificação, entre outros. A pesquisa de metabólitos ou do composto principal na qual é possível avaliar quantitativa e qualitativamente, empregados principalmente em estudos farmacocinéticos. As metodologias analíticas são de fundamental importância na área da pesquisa farmacêutica e são bastante utilizadas em monografias compendiais em que são aplicados esses métodos analíticos para doseamento (Siddiqui; Alothman; Rahman, 2017).

Segundo a RDC 166/2017 validação analítica é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para o seu uso pretendido são atendidos, a RDC aborda os parâmetros que são empregados em uma validação de método analítico classificado como: linearidade, seletividade, efeito matriz, precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção e robustez. Tais parâmetros devem ser aplicados, de acordo com as características do analito e a natureza do método utilizado.

No decorrer da validação do método analítico deve ser realizada uma análise estatística, com o objetivo de reunir um conjunto de dados e promover um melhor entendimento do método empregado. Para a interpretação primária dos resultados da validação do método analítico são calculadas: média, desvio padrão e desvio padrão relativo, análise de regressão, intervalo de confiança e teste F/ teste T, demandando um conhecimento indispensável em estatística.

### 3.3 PLANEJAMENTO DE MISTURAS E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

No âmbito analítico, com o intuito de garantir maior eficiência e confiabilidade dos resultados, faz-se necessário levantar questionamentos e avaliar diferentes problemas que estarão ligados ao estudo realizado, a fim de obter um procedimento ou produto com o máximo de qualidade. Os parâmetros analíticos utilizados para obter as melhores respostas, apresentam diversas variáveis que podem influenciá-las (Bezerra *et al.*, 2008; Neto; Scarminio; Bruns, 2010).

Um método estatístico que utilizar modelos matemáticos, com o intuito de otimizar as condições experimentais é o designer de experimentos (DoE). Durante a execução do DoE é necessário definir as variáveis das respostas, os níveis dos fatores utilizados, o tipo e o processamentos da análise (Jovanović *et al.*, 2021; N. Politis *et al.*, 2017). Essas técnicas estatísticas são instrumentos que possibilita a avaliação e o tratamento dos dados e proporciona a previsão das respostas através dos modelos matemáticos gerados (Neto; Scarminio; Bruns, 2010).

O planejamento fatorial e o planejamento de misturas são as ferramentas estatísticas mais utilizadas para a otimização de processos e experimentos e no desenvolvimento de formulações.

### **3.3.1 Planejamento de Misturas**

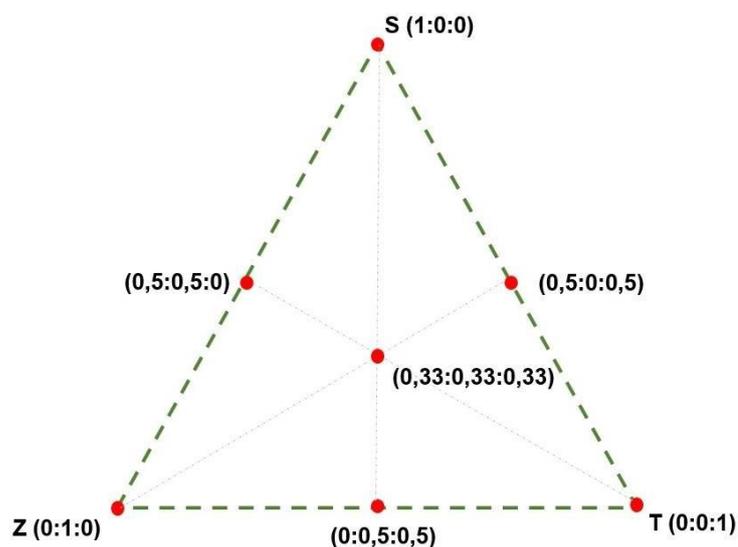
São consideradas ferramentas estatísticas que possibilita o estudo do efeito de diferentes proporções dos componentes de uma mistura sobre uma ou mais respostas de interesse. É uma técnica utilizada para potencializar a extração dos componentes de um produto. O planejamento de misturas consiste em correlacionar as variáveis independentes (proporção ou percentagem dos componentes de uma mistura) com as variáveis dependentes que são as respostas medidas (Montgomery, 2017; Neto; Scarminio; Bruns, 2010). Com isso, o planejamento de misturas visa avaliar os efeitos de cada componente, através dos aspectos definidos pelo analista.

Ainda dentro do planejamento de misturas podemos destacar o planejamento simplex, que consiste em uma técnica que utiliza um polígono regular como região experimental, em que cada vértice representa um componente puro e os pontos internos representa as misturas dos componentes. Nesses estudos é comum o estudo de misturas binárias e ternárias, nas quais são aplicados os modelos para explicar as ocorrências dos fenômenos (Montgomery, 2017).

Através desse estudo é possível averiguar um possível sinergismo, quando ocorre um aumento da resposta em associação aos efeitos individuais dos fatores, ou analogismo entre os solventes utilizados, por meio da observação dos seus efeitos (Dos Santos *et al.*, 2020). Linear, quadrática, cúbica ou cúbica especial, são as formas que podem ser delineados os modelos do planejamento de misturas. O experimento de mistura ternário, que será utilizado nesse estudo deverá ser analisado pelo modelo cúbico especial, pois exibem os melhores componentes significativos, sua

representação pode ser vista na Figura 2 (Chendynski *et al.*, 2020; Montgomery, 2017).

Figura 2 - Planejamento de mistura simplex centroide usado para *A. hispidum*.



Fonte: A autora (2024).

Após a aquisição das respostas estas serão avaliadas através da análise do gráfico de contorno, também denominado gráfico de *Pareto* e pela análise de variância (Anova) que irão auxiliar na determinação das melhores respostas (Eriksson *et al.*, 1998). Sabe-se que para a extração dos metabólitos secundário presente nas espécies vegetais, podem ser utilizados diferentes solventes, para isso será utilizado o planejamento de mistura, a fim de determinar qual solvente ou mistura de solvente é ideal para a extração dos metabólitos das partes aéreas de *A. hispidum*.

### 3.3.2 Planejamento Fatorial

O planejamento de operações, processos, recursos, condições e objetivos tem um papel fundamental no desenvolvimento de um produto. e a utilização de algumas ferramentas tecnológicas, estão sendo inseridas em processos industriais como o intuito de aperfeiçoar o produto acabado. A utilização de planejamentos experimentais tem se tornado uma estratégia muito importante nos processos produtivos, não só na melhora do processo mais com o intuito de verificar falhas na produção e ajustes do processo, que impactará diretamente no produto acabado (Bezerra *et al.*, 2008; Montgomery, 2017; Neto; Scarminio; Bruns, 2010)

Além de planejamento fatorial ser uma ferramenta de baixo custo e tempo de análise e quantidade de resultados obtidos. Seu emprego vai do mais simples  $2^k$  (K fatores em dois níveis) ou mais complexo  $3^k$  (fatores em três níveis), podendo ter ainda um ponto central (Gallo *et al.*, 2011; Gallo; Ramírez-Rigo; Piña; Bucalá; *et al.*, 2015; Yang; Li, 2018).

Como avaliação desse tipo de experimento também analisados através de gráficos de contorno ou *Pareto* e superfície de respostas, além das análises de variância (ANOVA). Através das superfícies de respostas é possível visualizar as respostas que obtiveram maior influência sobre as respostas analisadas (Gallo *et al.*, 2011; Hibbert, 2012).

### 3.3.3 Secagem por aspersão

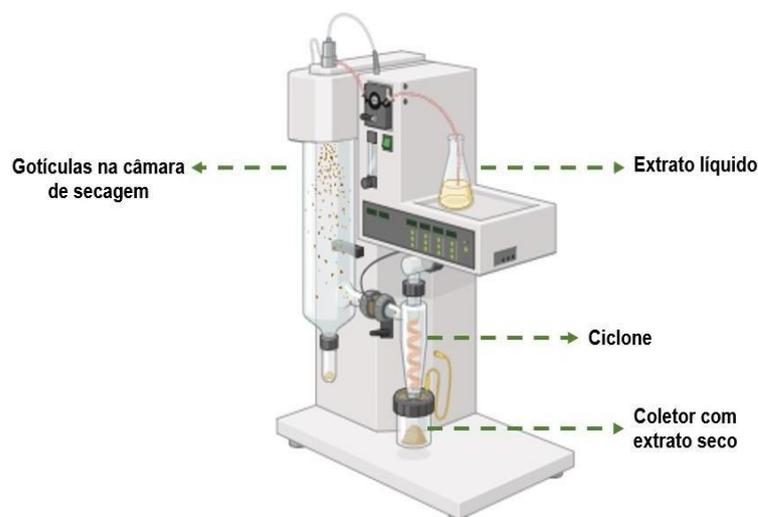
Com um crescente interesse na indústria de alimentos e farmacêutica, a secagem por aspersão tem se tornado um alvo de interesse. Essa metodologia além de ser uma técnica de baixo custo e bastante eficiente, ela ainda obtém um produto seco de boa qualidade e estabilidade, que são fatores essenciais na escolha de um bom material. A secagem por aspersão é bastante utilizada no desenvolvimento de fitoterápicos, para a encapsulação dos componentes presentes nos extratos, aprimorando as suas propriedades e/ou até preservando os seus componentes. Esses produtos secos resultantes, servirá para as diversas aplicações farmacêuticas, pois esses poderão ser usados no desenvolvimento de formulações sólidas, semissólidas ou líquidas (Cortés-Rojas *et al.*, 2015; Couto *et al.*, 2012; Ferro *et al.*, 2020; Jovanović *et al.*, 2021).

Uma técnica frequentemente utilizada, que permite a conservação de extratos líquidos em pó é a secagem por aspersão, atomização ou spray dryer. Ela é realizada através de três etapas: inicialmente ocorre a formação de gotículas, o que leva a uma maior área superficial de contato. Em seguida, uma corrente de ar quente seca rapidamente o solvente presente nas gotículas e por fim, a formação das partículas de tamanhos definidos (Klein *et al.*, 2015; Vidović *et al.*, 2014; Zanoni *et al.*, 2020).

Esse processo é recomendado para substâncias sensíveis a temperatura, pois devido a rápida velocidade de evaporação, esses processos mantem as gotículas abaixo da temperatura de aquecimento, preservando os compostos (O'sullivan *et al.*, 2019; Shishir; Chen; Technology, 2017). O spray dryer é composto por uma torre de

secagem, onde o extrato será aspergido através de um bico atomizador para a formação das gotículas dentro da câmara de secagem, o pó seco passará por um ciclone e recolhido em um coletor conforme mostrado na Figura 3 (Ostroschi *et al.*, 2018; Romano *et al.*, 2020).

Figura 3 - Esquema representativo do processo de secagem por aspersão.



Fonte: A autora (2024).

Os produtos secos poderão ser influenciados por diversos fatores, tais como: temperatura de entrada, velocidade de corrente de ar, tamanho das gotículas e fluxo de alimentação. Contudo, a secagem por aspersão, possui diversas vantagens, permitindo maior estabilidade química, microbiológica, além da redução do tamanho e uniformidade da partícula. Promovendo uma rápida secagem e em muitos casos um bom rendimento.

### 3.3.4 Adjuvantes farmacêuticos na preparação de extratos secos

Com o intuito de melhorar as propriedades físicas dos extratos secos obtidos durante a secagem, são adicionados adjuvantes de secagem, sendo assim, é importante a utilização desses adjuvantes como forma de agregar valor ao produto e evitar características indesejáveis, tais como elevada higroscopicidade ou que apresente um fluxo pobre (Klein *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2017).

Diversos adjuvantes podem ser utilizados com o intuito de melhorar as características do produto e se adequar aos parâmetros estabelecidos, como

exemplos de adjuvante de secagem temos: maltodextrinas, dióxido de silício coloidal (Aerosil), gelatina, celulose, lactose, entre outros. A escolha para cada um dos adjuvantes ou a misturas desses, vai depender da finalidade do produto que se deseja obter (Jovanović *et al.*, 2021; Sansone *et al.*, 2014).

O Dióxido de Silício coloidal (DSC), também conhecido como aerosil é uma substância largamente empregada no setor farmacêutico e cosméticos. Ele atua principalmente no melhoramento do fluxo do pó durante a compressão ou preenchimento das capsulas. Ele é aprovado pela agência regulatória como food and drug administration (FDA) como componente inativo, ou até como aditivos em alimentos (El-Gizawy *et al.*, 2015; Rowe; Sheskey; Quinn, 2009). Como excipiente o aerosil apresenta algumas funções, agente de viscosidade ou estabilizante térmico, tornando esse um adjuvante de secagem multifuncional. Um ponto importante é que ao adicionar esse adjuvante no processo de secagem ele torna o componente menos higroscópico (Oliveira; Petrovick, 2010b). Devido a todas essas características o dióxido de silício coloidal (DSC) é um dos adjuvantes comumente empregados na secagem de extratos vegetais, tendo um papel importante na estabilização e diminuição da sua higroscopicidade (Cortés-Rojas *et al.*, 2015; Majerová *et al.*, 2016).

Outro adjuvante de secagem que é a celulose microcristalina (CMC) que são polissacarídeos oriundos de diversas plantas, considerado um dos componentes mais numerosos (Yang; Li, 2018). No setor farmacêutico ela possui grandes aplicações, devido as suas propriedades diversas. Dentre as suas características podemos destacar a biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de bons atributos reológicos, térmicos e mecânicos. É também largamente utilizado na secagem de extratos vegetais, porém a utilização da celulose microcristalina pode levar ao aumento da higroscopicidade, levando a suscetibilidade a contaminação e degradação dos compostos (Nsor-Atindana *et al.*, 2017; Trache *et al.*, 2016; Yang; Li, 2018).

Ainda sobre os adjuvantes de secagem podemos destacar a gelatina pertence à classe dos polímeros naturais e é constituída de redes contínuas, formadas por hélices parcial. A utilização da gelatina, poderá influenciar em diversos parâmetros de secagem, como a temperatura, para evitar que ocorra o escurecimento pela reação de Maillard, pelo tamanho das partículas, pois essas ao utilizarem gelatina em sua composição apresenta tamanho de partícula maior. Influenciadas também em sua

viscosidade e na quantidade de sólidos finais, este último está associado também ao tamanho das partículas (Oliveira; Petrovick, 2010b).

Porém, uma desvantagem na utilização da gelatina como adjuvante de secagem é sua elevada higroscopicidade, ou seja, a gelatina tem uma alta capacidade de absorver grande quantidade de água. Por isso normalmente ela está associada a outros adjuvantes de secagem (De Souza *et al.*, 2000). Quando associadas a outros adjuvantes de secagem ela melhora ainda mais suas características. Vale salientar que neste trabalho a gelatina não foi apenas utilizada como adjuvante de secagem, com o intuito de obter um produto seco para a secagem por aspersão, mais também em melhorar as suas características no ato da elaboração dos hidrogéis, porém atualmente a gelatina é pouco empregada na elaboração dos hidrogéis termosensíveis, mais sempre que utilizada apresenta bons resultados.

### 3.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA EM ESPÉCIES VEGETAIS

#### 3.4.1 Atividade antifúngica em espécies vegetais

A utilização de forma banalizada e em larga escala de antifúngicos pela população e o fato de que as infecções fúngicas tem crescido de forma progressiva, podendo levar a ter um aumento na taxa de morbimortalidade tem chamado bastante atenção (Martins *et al.*, 2023). A utilização de espécies vegetais, que tem se tornado uma estratégia para o tratamento de algumas enfermidades, dentre elas, as espécies fúngicas.

Algumas espécies vegetais, possuem compostos bioativos que podem auxiliar no tratamento dessas doenças, para isso, é necessário a realização de testes para avaliação da atividade fúngica, que podem ser detectados quando a esses compostos bioativos, sejam eles extratos ou frações enriquecidas, são colocados em contato com o microrganismo a ser estudado e observado a inibição do crescimento (Ferreira, 2012).

Uma metodologia bastante utilizada para avaliação da atividade fúngica é o ensaio de microdiluição, esse é um método que avalia quantitativamente a concentração inibitória mínima (CIM), que detecta a quantidade mínima, ou seja, menor concentração de uma amostra, que é eficaz para inibir o crescimento de um microrganismo de forma visível (Ferreira, 2012). A microdiluição é realizada através

de uma placa de 96 poços. Com o intuito de solubilizar os componentes da amostra são utilizados alguns solventes, tais como: dimetilsulfóxido (DMSO) e tween (Ferreira, 2012; Saidana *et al.*, 2008).

Esses extratos brutos e frações enriquecidas normalmente são testados frente a algumas espécies fúngicas, tais como: *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Frequentemente encontrada em isolado de infecções *C. albicans* é a candidíase mais encontrada no mundo, e é considerada sensível a drogas existentes no mercado. Já *C. glabrata* não é patogênica, porém devido ao uso inadequado de antifúngicos e drogas imunossupressoras, esta tem se tornado um agente infeccioso, encontrado principalmente em ambiente hospitalares e ela apresenta baixa sensibilidade a alguns antifúngicos existentes (Ferreira, 2012; Li; Redding; Dongari-Bagtzoglou, 2007; Mcmanus *et al.*, 2008; Ray *et al.*, 2007). Ambas as espécies serão estudadas frente os extratos brutos e frações enriquecidas de *A. hispidum*.

### 3.4.2 Toxicidade frente a espécies vegetais

As plantas medicinais, que possuem em sua composição uma ampla variedade de compostos químicos e substâncias com possíveis atividades biológicas, são amplamente utilizadas pela população em geral. A utilização dessas plantas medicinais tornou-se um recurso barato e de fácil acesso para a população, mas, apesar disso, a utilização inadequada e seu consumo de forma banalizada podem gerar riscos, principalmente tóxicos, à saúde da população (Tovar; Petzel, 2009).

Os riscos da utilização de plantas, não estão associadas apenas à toxicidade de seus compostos, mas também, pode estar relacionado à presença de pesticidas no habitat, ou até mesmo à presença de fungos que não foram removidos no ato da coleta, sendo importante destacar o controle de qualidade do manuseio e armazenamento dos materiais vegetais. Problemas gastrointestinais, alergias, problemas respiratórios são alguns dos efeitos tóxicos que podem ser gerados pela má utilização das plantas medicinais (Hudson *et al.*, 2018).

A utilização das plantas medicinais seja elas consumidas por um curto ou longo período, deve ser avaliada acerca da sua toxicidade. Através desses estudos é possível inferir a quantidade ideal de substâncias que poderá ser consumida e que não seja tóxica. Neste caso avaliado a dose letal e mínima (AMZADHOSSAIN 2020, PORT 2013).

Os estudos de avaliação toxicológicas em espécies vegetais podem envolver estudos *in vivo*, com a utilização da experimentação animal ou *in vitro* (NE, KOICK, YONG 2021, PORTO 2013). Uma metodologia que tem tido uma boa aceitabilidade, devido ao seu custo e boa sensibilidade é o teste frente a artêmias salinas, as artêmias, são microcrustáceos, encontrado em água salgada, é utilizado como alimento para peixes e são facilmente encontradas em lojas de aquários (Barros, 2021).

Essas espécies são largamente utilizadas em ensaios laboratoriais como um biomarcador, pois apresentam respostas claras frente a pequenas mudanças. A letalidade dessas espécies tem sido estudada como forma de avaliar as respostas biológicas (Meyer 1982). O ensaio de toxicidade utilizando artêmias salinas, é empregado para avaliar a toxicidade aguda de extratos vegetais, utilizado principalmente como bioensaio preliminar com o intuito de investigar o potencial toxicológico dessa espécie.

### 3.5 HIDROGÉIS TERMOSENSÍVEIS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PARA COMPOSTOS FENÓLICOS

#### 3.5.1 Hidrogel

Os hidrogéis são materiais poliméricos tridimensionais que podem absorver uma grande quantidade de água em sua rede polimérica, devido às forças intermoleculares (Soares, 2015). Existem hidrogéis que respondem a diferentes estímulos, como alteração de temperatura, pH ou luminosidade. Esses hidrogéis têm sido pesquisados para diversas aplicações, como terapia celular, engenharia de tecidos e liberação de fármacos (Xing; Zheng; Duan, 2015). Um exemplo de hidrogel que responde a estímulo é o termossensível ou termoresponsivo, que pode ser formado por homopolímeros hidrofílicos ou copolímeros em blocos. Esses hidrogéis mudam de estado físico (Sol-Gel) de acordo com a variação de temperatura, o que os torna relevantes para diversas áreas.

Os hidrogéis termossensíveis podem ser originados de polímeros naturais, como quitosana, gelatina e derivados da celulose, ou de polímeros sintéticos, como os copolímeros em blocos poli(óxido de etileno)-b-poli(óxido de propileno)-b-poli(óxido de etileno), PEO-PPO-PEO e os poli -N- isopropilacrilamida (pNipAAm). Uma das

características dos hidrogéis termossensíveis é a capacidade de liberar fármacos de forma controlada e direcionada, o que permite um sistema de administração mais prático e com menos efeitos colaterais do que pela via sistêmica (Fan *et al.*, 2022).

### 3.5.2 Hidrogéis termossensíveis nasais

A via intranasal é uma forma de liberação de fármacos que tem sido estudada. A mucosa nasal tem uma grande área superficial e uma alta vascularização, o que facilita a absorção de muitas drogas e evita o metabolismo de primeira passagem (Gholizadeh *et al.*, 2019; Pozzoli *et al.*, 2016). Os hidrogéis termossensíveis nasais são uma estratégia vantajosa, pois são líquidos em temperatura ambiente e se transformam em gel ao entrar em contato com a temperatura corporal, o que possibilita a liberação prolongada e controlada da droga, aumentando a biodisponibilidade do medicamento (Gholizadeh *et al.*, 2019; Illum, 2003; Nazar *et al.*, 2011). No entanto, a via intranasal também tem alguns desafios que precisam ser superados para se tornar um método preferencial para o tratamento de muitas doenças.

A mucosa nasal tem uma barreira natural que impede a entrada de microrganismos e macromoléculas. Além disso, há uma remoção do muco pelos cílios, que ocorre a cada 30 min. Por isso, os hidrogéis termossensíveis nasais têm algumas vantagens, devido às suas características (Illum, 2002; Nazar *et al.*, 2011). Eles podem ser produzidos com vários polímeros, naturais ou sintéticos, que têm a propriedade de termossensibilidade. A estrutura desses polímeros permite carregar diferentes tipos de moléculas, além de ter propriedades como a mucoadesão, que favorece a permanência dessas moléculas no local de ação (Alami-Milani *et al.*, 2021; Qi *et al.*, 2021).

Os hidrogéis termossensíveis nasais têm diversas aplicações. A maioria das formulações visa a liberação de fármacos do nariz para o cérebro, para o tratamento de doenças como Parkinson, epilepsia, transtornos psicóticos, Alzheimer, entre outras (Abdulla *et al.*, 2021; Adnet *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2022; Qi *et al.*, 2021; Tan *et al.*, 2021). Além disso, os hidrogéis termossensíveis também são usados para o tratamento de doenças do sistema respiratório, como rinosinusite e rinite alérgica (Moradi *et al.*; Su *et al.*, 2020). Outras aplicações dos hidrogéis termossensíveis são a entrega de insulina e a possibilidade de vacinas nasais (Bahmanpour *et al.*, 2021; Pastor *et al.*, 2020).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

As amostras foram coletadas em Limoeiro (Pernambuco - Brasil), no mês de junho/ 2022. Após a coleta, o material vegetal foi levado para identificação no Herbário Dárdano de Andrade Lima, localizado no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) onde foi depositada uma exsicata sob número de tombamento de (94086). Por fim, depois de identificar os materiais vegetais, foram submetidos a secagem em estufa de circulação de ar, a temperatura de 45°C durante 72 horas, em seguida, o material vegetal foi separado em partes aéreas e raízes. Posteriormente esse material foi pulverizado em uma tritador forrageira (TRF 400 2CV), logo após foi passado moinho de facas (Willey TE – 680, Tecnal) para uniformização do tamanho.

### 4.2 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Para a realização da prospecção fitoquímica, cerca de 1g da droga vegetal seca e moída foi transferida para um balão de fundo redondo e adicionado 10 mL da solução de etanol 70% foi mantida sob refluxo por 15 min a 85°C em seguida resfriada e filtrada. Do filtrado, alíquotas de 10 microlitro foram aplicados na placa de sílica em gel (Merck®). As cromatoplasmas foram desenvolvidas utilizando metodologias propostas por (Wagner *et al.*, 2011). Os sistemas utilizados e os seus respectivos padrões estão descritos no Quadro 3:

Quadro 3 - Sistemas cromatográficos, reveladores e padrões utilizados para obtenção do perfil fitoquímico das partes aéreas e raízes da *Acanthospermum hispidum*.

<b>Metabólito</b>	<b>Fase móvel</b>	<b>Reveladores</b>	<b>Padrão</b>
<b>Flavonoides</b>	Acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5)	Cloreto de alumínio 5%	Rutina/ Quercetina
<b>Derivados Cinâmicos</b>			Ac. Gálico
<b>Taninos hidrolisáveis</b>		Cloreto férrico	Ac. Caféico e clorogênico
<b>Taninos condensados</b>		Vanilina clorídrica	Catequina

<b>Saponinas</b>	Clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água (64: 32:12: 8)	Lieberman-burchard + $\Delta$	Escina
<b>Terpenos e esteroides</b>	Tolueno: acetato de etila (90:10)		B-sitosterol
<b>Açúcares redutores</b>	Clorofórmio: ácido acético glacial: ácido fórmico: água (100: 11:11:26)	Timol + $H_2SO_4 + \Delta$	Glicose
<b>Cumarinas</b>	Tolueno: éter: ácido acético glacial (50: 50: 50)	KOH 10%	Cumarina

KOH: Hidróxido de Potássio,  $H_2SO_4$ : Ácido Sulfúrico,  $\Delta$ : Aquecimento.  
Fonte: A autora (2024).

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE PARTES AÉREAS E RAÍZES DE *Acanthospermum hispidum*

Para a caracterização físico-química foram empregados os métodos gerais em farmacognosia presentes na farmacopeia brasileira 6ª edição (Brasil, 2019). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

##### 4.3.1 Matéria estranha

Para a realização do ensaio foi utilizado a técnica de quarteamento descrito na farmacopeia 5ª edição. Em que cerca de 50 gramas das amostras foram coletadas tanto das partes aéreas quanto das raízes, em seguida essas amostras foram espalhadas uniformemente em uma camada delgada sob um papel de filtro. Logo após as matérias estranhas encontradas nas amostras foram separadas manualmente, inicialmente fora realizado a olho nu, posteriormente com o auxílio de uma lente de aumento (5x). por fim, o material vegetal coletado foi pesado e com base no peso da amostra submetida ao ensaio foi calculada a percentagem de matéria estranha em porcentagem de massa.

### 4.3.2 Perda por dessecação

Em um pesa-filtro previamente limpo e dessecados, foram pesadas cerca de 1g de amostra, sem seguida, foram submetidos a aquecimento de 105°C em estufa por 5 horas. Os pesa-filtros foram resfriados a temperatura ambiente em dessecador e pesados. Logo após eles são recolocados na estufa por mais 1 hora, resfriando e pesando. Esse procedimento deve ser repetido, até peso constate. Em seguida, a percentagem da perda por dessecação foi calculada segundo a equação abaixo:

$$PD = \frac{Pu - Ps}{Pa} \times 100$$

Em que: PD = perda por dessecação; Pa = peso da amostra; Pu = peso do pesa filtro com a amostra; Ps = peso do pesa filtro após amostra seca.

### 4.3.3 Cinzas totais

Para análise de determinação de cinzas totais das partes aéreas e raízes de *A. hispidum*, foram pesados cerca de 3 g da amostra em um cadinho de porcelana previamente dessecado, em seguida, foram levados a mufla (Lucadema®) e submetidos a um gradiente de temperatura: 200°C ± 25°C durante 30 minutos, posteriormente 400°C ± 25°C durante 60 minutos e pôr fim a 600°C ± 25°C durante 90 minutos. Após este processo, os cadinhos foram retirados da mufla e resfriados em dessecadores a temperatura ambiente, em seguida foram pesados e colocados de volta ao aquecimento de 600°C ± 25°C até peso constante. A análise foi realizada em triplicada e calculado o teor de cinzas totais segundo a equação:

$$CT = \frac{C2 - C1}{Ca} \times 100$$

Onde: CT: cinzas totais; C2: peso do cadinho após incineração; C1: peso do cadinho vazio; Ca: peso da amostra.

#### 4.3.4 Determinação de cinzas insolúveis em ácido

A determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico é realizada com o intuito de detectar sílica e constituintes silicosos, para indicar se as quantidades encontradas para a droga vegetal estão acima do determinado, podendo estar contaminado por excesso de terra ou areia. Devido as raízes de *A. hispidum* estarem em maior contato com o solo, foi necessário realizar o teste de cinzas insolúveis em ácido.

Através das cinzas obtidas segundo o método de cinzas totais, este deve ser aquecido até ebulição, com 25 mL de ácido clorídrico 2 M durante cinco minutos em um cadinho coberto por um vidro de relógio. Em seguida, lavar o vidro de relógio com 5 mL de água quente, juntando a água de lavagem ao cadinho. Posteriormente deve ser recolhido o material insolúvel em ácido em um papel de filtro com teor de cinzas conhecidas, lavado com água quente até que o filtrado se mostre neutro. Posteriormente o papel de filtro será transferido contendo o resíduo para o cadinho original, secar sobre chapa e incinerar a cerca de 500°C até peso constante. Calcular a porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca.

#### 4.3.5 Determinação granulométrica

Para a realização do experimento foram utilizados tamises de abertura: 850, 600, 500, 250, 150, 125  $\mu\text{m}$  e a base. Os tamises foram empilhados de forma crescente e colocado no aparelho de agitação mecânica (Bertel®). Cerca de 25 g da amostra de *A. hispidum*, foram pesados (Partes Aéreas/ Raízes). Em seguida, foi transferido a amostra para o tamis superior, distribuindo o material uniformemente. Após tampar o conjunto, o aparelho foi acionado, por cerca de 15 minutos, com vibração adequada. Após o término deste tempo, utilizando um pincel adequado. Ao término, pesou-se cada tamis e seguida calculado o diâmetro médio das partes aéreas e raízes de *A. hispidum*.

#### 4.3.6 Determinação de substâncias extraíveis (Teor de extrativos)

Foram transferidos 2 g de droga da droga vegetal para um balão de fundo redondo de 250 ml e adicionado 100 mL de água destilada, deixar sobre refluxo por

1h. Em seguida, resfriar em temperatura ambiente e filtrar em papel de filtro. Posteriormente, 25 mL do filtrado foram adicionados em um pesa filtro previamente dessecado por 30 min a 105°C. O pesa filtro foi colocado para secar previamente a amostra no banho Maria. Após todo o extrato seco, o pesa-filtro foi colocado na estufa. A amostra foi submetida a secagem em estufa a 105°C durante 6 horas e esfriada em dessecador por 30 min. Os resultados foram expressos em porcentagem de materiais extraídos em mg/ g de droga vegetal seca.

#### 4.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS DAS PARTES AÉREAS E RAÍZES DE *A. hispidum*

##### 4.4.2 Avaliação do método para a quantificação de polifenóis totais

###### Preparação da solução extrativa

Para as análises por espectrofotometria por UV-vis as soluções extrativas foram preparadas através da extração sob refluxo. Foi adicionada 0,5 g do material vegetal e como solvente uma solução hidroalcolica de etanol (60%, v/v). o material vegetal foi adicionado a um balão de fundo redondo de 250 mL, adicionado 15 mL de solvente e levado ao banho maria por 30 minutos sob a temperatura de 85 °C. o extrato foi resfriado a temperatura ambiente e filtrado em algodão para um balão volumétrico de 50 mL. O algodão contendo os resíduos foi transferido novamente para o balão de fundo redondo, adicionado mais 15 mL de solvente e levado novamente ao banho maria, por mais 15 minutos e o mesmo processo repetido por mais uma vez. Em seguida, o volume do balão foi ajustado com o solvente extrator, obtendo assim a solução estoque.

###### Determinação da concentração do solvente

Foram utilizadas três proporções 20% (v/v), 40% (v/v) e 60% (v/v) de etanol, com o intuito de avaliar a influência sobre o método sobre o teor de polifenóis nas partes aéreas e nas raízes de *A. hispidum*. A quantidade 0,5 g foram escolhidas para determinar o teor de flavonoides. O solvente utilizado para a realização da análise foi

o etanol, por ser um solvente comum e de menor toxicidade. Posteriormente, foi avaliado a influência do teor de polifenóis totais em relação a proporção do solvente.

#### Determinação da quantidade de droga e comprimento de onda

Foram avaliadas quatro quantidades de droga, 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 g, a fim de avaliar sua influência sobre o método e sobre o teor de flavonoides. A proporção de etanol utilizada foi de 60 % pois apresentou os melhores resultados tanto nas partes aéreas quanto nas raízes de *A. hispidum*. Após os resultados foram avaliados a influência na quantidade de droga utilizada em relação ao teor de polifenóis totais. Na determinação do comprimento de onda será determinado o valor da absorbância mais adequado para o método, as amostras foram submetidas a varredura de 200 – 900 nm em espectrofotômetro, após 30 minutos da solução de carbonato de sódio à 10%.

#### Determinação da alíquota do folin-ciocalteu

Após determinar a alíquota da amostra, obtida nas condições ideais de droga/solvente, foram testadas diferentes alíquotas de folin 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mL, mantendo o tempo de reação em 30 minutos e procedendo com a varredura por espectrofotômetro.

#### Determinação da cinética reacional

Esta análise foi realizada com o intuito de avaliar o efeito do tempo de reação e da concentração de carbonato de sódio sobre a resposta ao método aplicado. A partir da solução extrativa obtida no item 4.3.4.1.1, foram realizadas diluições pré-determinadas, empregando diferentes concentrações de carbonato: 5; 7.5 e 10% (m/v), seguido de leitura nos intervalos específicos de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 minutos após adição do carbonato de sódio.

O desenvolvimento do método foi validado de acordo com as condições espectrofotométricas durante o estudo. Os parâmetros de validação aqui empregados seguiram o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, disponível na RDC 166 (Brasil, 2017). O padrão utilizado para a realização dos ensaios foi o pirogalol (98%, sigma).

### Preparo da solução para análise por UV-vis

Uma alíquota de 1 mL foi adicionada ao balão volumétrico de 10 mL e adicionado 1mL de Folin Ciocalteu e 10 mL de água destilada. O volume do balão foi aferido com carbonato de sódio a 7,5% (m/v). Após 30 min de complexação na ausência de luz, em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro uma varredura (400 – 900 nm). A solução de compensação utilizada como branco, foi água destilada.

#### **4.4.3 Validação**

##### 4.4.3.1 Linearidade da amostra e do padrão

Pesou-se 25,0 mg de pirogalol (98%, sigma) e transferir para balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com água destilada. Transferir volumetricamente 5 mL desta solução para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água destilada. Transferir as alíquotas da solução estoque (descritas na tabela 1), 1,0 mL do reagente fosfomolibdotúngstico (Folin Ciocalteu) e 4,0 mL de água destilada para balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com solução de carbonato de sódio anidro a 29% (p/v). Após 30 minutos, no escuro, medir a absorvância em 780 nm, usando água como solução de compensação. Ao final as curvas de concentração *versus* absorvância foram plotadas e analisadas por regressão linear. Os resultados foram tratados estatisticamente com auxílio do Microsoft Excel (2022).

Para análise da linearidade, foi empregado o cálculo de regressão linear pelo método de mínimo quadrado, com base na curva de calibração em que foi utilizado cinco concentrações da amostra partes aéreas (2, 3, 4, 5 e 6 mg/ml), raízes (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/ml) e do padrão (0,013; 0,025; 0,038; 0,050 e 0,063 mg/ml). Os resultados obtidos possibilitaram estabelecer o coeficiente de determinação, tornando  $R^2 > 0,99$  com valor mínimo aceitável, o desvio padrão relativo (DPR%) e a equação da reta.

#### 4.4.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação

A partir dos dados de regressão das curvas analíticas médias do padrão foram obtidos os limites de detecção e quantificação. As equações abaixo foram utilizadas para calcular os parâmetros:

$$LD = 3,3 \left(\frac{S}{l}\right) \quad LQ = 10 \left(\frac{S}{l}\right)$$

Onde: S: desvio padrão do interceptor com o eixo X e l: inclinação da curva.

#### 4.4.3.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi obtido a partir da curva de calibração dos ensaios de linearidade dos padrões. Foram utilizadas as cinco concentrações dos padrões nos ensaios de linearidade e contaminados com uma alíquota fixa de 0,4 mL para as partes aéreas e 0,6 para as raízes da amostra (solução extrativa) de *A. hispidum* para as concentrações do padrão pirogalol. A partir destas soluções, foram obtidas novas curvas de calibração e o resultado foi estabelecido pelo paralelismo entre as curvas de calibração do ensaio da linearidade do padrão, e avaliação do coeficiente angular.

#### 4.4.3.4 Precisão

O método de precisão intracorrida foi avaliado pela análise de repetibilidade. A repetibilidade foi estabelecida em um único dia, por um único analista, o qual realizou a leitura de 6 amostras da solução extrativa a 100%, após adição do carbonato e 30 minutos de complexação. Os resultados foram expressos em % de pirogalol. Para a análise intercorrida foi realizada a leitura das amostras, definida em dois dias consecutivos por dois analistas diferentes.

#### 4.4.3.5 Exatidão

Os ensaios de exatidão foram avaliados em quantidades conhecidas do padrão pirogalol (1,3; 3,8 e 6,8 mg/mL) foram adicionados de forma crescente nas soluções

das amostras de concentração de 100%. Após a leitura foi possível calcular o valor da recuperação expressos em porcentagem. Sabendo-se que para o método ser considerado exato, ele precisa apresentar um percentual de recuperação entre 85 à 115%.

#### 4.4.3.6 Robustez

A avaliação da robustez do método foi verificada através de alterações intencionais nos procedimentos experimentais: sendo elas: variações de luminosidade (presença ou ausência de luz), estabilidade da solução extrativa (após 48 horas da sua preparação) e diferentes espectrofotômetros (Micronal® e Themo Scientific®). Os resultados foram avaliados quanto a média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

#### 4.4.4 Aplicação de metodologia simplex centroide para obtenção dos extratos

##### 4.4.4.1 Obtenção da solução extrativa

Para o preparo das soluções extrativas utilizou-se a metodologia de turbo-extração, com liquidificador de alta rotação (Fisatom®). Para isso, foi utilizada uma proporção de droga :solvente de 5%(p/v). esse processo de extração já é descrito pelo grupo de pesquisa (Ramos *et al.*, 2017). Após o preparo das soluções extrativas todas as amostras foram filtradas a vácuo e armazenadas em fraco âmbar e sob refrigeração para posteriormente caracterizá-las.

Para avaliar o sistema de solvente pela metodologia simplex centroide para o planejamento de misturas por três membros. Foram utilizados três líquidos extratores: água, etanol e metanol, em suas formas pura, como também em suas formas binárias e terciárias. Todos os experimentos com a descrição detalhadas de cada solvente ou proporção destes estão descritos na Tabela 1. Ao total foram realizados 7 experimentos, ou seja, sete soluções extrativas, como diferentes sistemas de mistura, os quais foram avaliadas as variáveis de respostas (resíduo seco, teor de flavonoides totais, teor de polifenóis totais e eficiência de extração) para a construção do modelo matemático.

Tabela 1- Proporção de solvente utilizado para cada experimento.

<b>Experimento</b>	<b>Solvente</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>MeOH</b>	<b>EtOH</b>
<b>1</b>	Água	1	0	0
<b>2</b>	Metanol	0	1	0
<b>3</b>	Etanol	0	0	1
<b>4</b>	Água: Metanol	0,5	0,5	0
<b>5</b>	Água: Etanol	0,5	0	0,5
<b>6</b>	Metanol: Etanol	0	0,5	0,5
<b>7</b>	Água: Metanol: Etanol	0,33	0,33	0,33

Fonte: A autora (2024).

#### 4.4.4.2 Caracterização da solução extrativa

##### Resíduo seco

A determinação do resíduo seco foi realizada através da balança de infravermelho (Serie ID – V. 18 Marte), na qual uma alíquota de 3 ml da solução extrativa, foram expostas a uma temperatura de 130°C com variações de  $\pm 2^\circ\text{C}$  por 30 segundos. Todos as análises foram realizaram em triplicata e os seus resultados expressos em percentual pela média e desvio padrão.

##### Teor de flavonoides totais

Para análise do teor de flavonoides totais partindo da solução extrativas (SE) foi tomada uma alíquota de 1 mL e transferida para um balão volumétrico de 10 mL. Em seguida foi adicionado uma alíquota de 1 mL do agente complexante cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$  2,5% p/v) e o volume aferido com as diferentes soluções hidroalcólicas referente a extração utilizada. Após 20min de complexação foi realizado a leitura em espectrofotômetro (Evolution 60S, Termo Scientific®), no comprimento de onda de 395nm. O teor de flavonoides totais foi calculado de acordo com a equação abaixo, em g% de rutina. A solução compensadora foi realizada conforme anteriormente sem adição da solução compensadora.

### Teor de polifenóis totais

Para a realização do teor de polifenóis totais 150 µl das partes aéreas e 300µl das raízes foram retiradas da solução extrativa e transferida para um balão volumétrico de 10 mL, adicionados 5mL de água e 1,0 mL do reagente Folin-Ciocalteu e seu volume aferido com uma solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) na concentração de (5% p/v). Após 30 minutos de complexação foi realizado a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 780nm. Para a solução compensadora, foi utilizada água destilada. O teor de polifenóis totais foi calculado de acordo com a equação abaixo em g% de pirogalol.

### Avaliação da eficiência de extração (EE)

A eficiência de extração foi expressa pela razão entre os teores de sólidos (resíduo seco) e os teores de sólidos (resíduo seco) e os teores de flavonoides totais e teor de polifenóis totais de acordo com as equações abaixo (Cunha et al; 2009):

$$EE1 = \frac{TFT}{RS} \quad EE2 = \frac{TPT}{RS}$$

Onde: EE: Eficiência de Extração, TFT: Teor de Flavonoides, TPT: Teor de polifenóis totais, RS: Resíduo seco.

#### 4.4.4.3 Análise por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE)

Todas as soluções extrativas foram caracterizadas por CCD-AE, para as substâncias de interesse comumente detectada na espécie. Em uma placa de sílica gel 60-F<sub>254</sub> com partículas de 5-6 µm (Merck®), foram usadas para esta análise. As amostras foram aplicadas através de um equipamento semiautomático (Mod. Linomat V, Camag®) controlado pelo software Wincats® (Camag®) foram aplicados 30 µL das amostras em bandas com largura de 8mm e espaço entre as bandas de 5mm. Os cromatogramas foram desenvolvidos em cubas de vidro (20cm x 10cm, Camag®), após saturação por 30 min da fase móvel 90:5:5 (acetato de etila: ácido fórmico: água; v/v/v). Ao final as placas foram derivatizadas com o reagente cloreto de alumínio e avaliados sob luz UV em 254nm. A aquisição da imagem foi realizada utilizando

multiDoc-It Imagem System® (model 125, UVP) com câmera Canon (Mod. Rebel T3 ESO 1100D, Canon) acoplada e através do software UVP®.

#### 4.4.5 Otimização das condições de secagem

Para elaboração do experimento das condições de secagem foi executado em Mini Spray dryer (MSD 1.0 Labmaq®). Para obtenção do produto seco por aspersão foi obtido partindo-se da solução extrativa de *A. hispidum* que foi determinado anteriormente pelo planejamento de misturas, utilizando o método extrativo de turboextração com 5% da droga vegetal e a proporção de solvente de etanol 50% (v/v), devido a capacidade do equipamento em secar solvente orgânicos em menores proporções não foi necessário a retirada desse para a realização do processo. Para a secagem foi utilizado como adjuvante o dióxido de silício coloidal (Aerosil®) na proporção de 10%, sua proporção foi calculada com base no resíduo seco da SE-AH. As condições avaliadas para esse experimento foram a variação da temperatura de entrada (°C) e ao fluxo de alimentação (L/h) as quais estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições de secagem por aspersão de *A. hispidum*.

Experimento	Temperatura de entrada (°C)	Fluxo de alimentação (L/h)
1	110±1	0,6
2	110±1	0,8
3	110±1	1,0
4	130±1	0,6
5	130±1	0,8
6	130±1	1,0
7	150±1	0,6
8	150±1	0,8
9	150±1	1,0

Fonte: A autora (2024).

É importante ressaltar que a incorporação dos adjuvantes de secagem foi realizada com 30 min de precedência do procedimento de secagem, sob agitação constante, a fim de obter um produto com características homogêneas. Na Tabela 3 segue as condições operacionais de secagem. Após a secagem o produto seco por

aspersão (PSA) foi adicionado em frasco para proteger da umidade (Souza, 2004; Spaniol, 2007).

Tabela 3 - Parâmetros da operação de secagem de *A. hispidum*.

Parâmetros	Valores
Abertura do bico aspersor	1,2 mm
Vazão de ar	1,65 m <sup>3</sup> /min
Soprador	3,0 l/min
Proporção de adjuvante	10%

Fonte: A autora (2024).

#### 4.4.5.1 Caracterização do produto seco por aspersão de *A. hispidum*

Após a realização dos experimentos de secagem os PSAs foram caracterizados quanto ao teor de polifenóis por espectrofotometria UV-vis, rendimento do processo e umidade residual da amostra.

##### Rendimento do PSA-AH

Com o intuito de avaliar o rendimento bruto das operações de secagem realizadas, foram determinados como sendo, a massa teórica de sólidos totais presente na suspensão de alimentação e a massa do PSA-AH, obtido ao final do experimento (Loch-Neckel *et al.*, 2018; Vasconcelos *et al.*, 2005). A massa teórica de sólidos totais foi calculada com base no resíduo seco e o volume de extrato submetido a secagem somado a massa de adjuvante que foi adicionada.

$$Rend(\%): \frac{MPSA}{MTST} \times 100$$

Onde: Rend (%): rendimento em porcentagem; MPSA: massa do produto seco por aspersão; MTST: massa teórica de sólidos totais.

##### Teor de polifenóis totais do PSA-AH

A quantificação espectrofotométrica de polifenóis do PSA-AH foram obtidas através do método de Folin-Ciocalteu (Brasil, 2010). Para essa análise 25 mg de PSA-

AH foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL e o seu volume aferido com água destilada. Em seguida a análise foi realizada conforme o descrito anteriormente para a solução, utilizando para o experimento uma alíquota de 0,5 mL. As análises foram realizadas em triplicata.

#### Determinação da umidade

A determinação da umidade foi realizada através da balança de infravermelho (Serie ID – V. 18 Marte), na qual uma alíquota de 1 g do PSA, foram expostas a uma temperatura de 130°C com variações de  $\pm 2^\circ\text{C}$  por 30 segundos. Todos as análises foram realizaram em triplicata e os seus resultados expressos em percentual pela média e desvio padrão.

#### **4.4.6 Otimização de adjuvantes de secagem por planejamento fatorial**

Para avaliação da performance do adjuvante de secagem adicionados a solução extrativa da *A. hispidum*, que foi previamente padronizado, foram combinados os seguintes adjuvantes: dióxido de silício coloidal (Aerosil®), celulose monocristalina (CM) (Microcel®) e gelatina (Sigma - Aldrich®) e mistura desses, na qual foi adicionada uma proporção de adjuvantes de 10% em relação ao resíduo seco da SE-AH (Gallo; Ramírez-Rigo; Piña; Bucalá, 2015). Para essa análise foi realizada um total de sete experimentos de secagem descritos no Quadro 4 abaixo:

Quadro 4 - Experimento de secagem da *A. hispidum* com diferentes adjuvantes.

<b>Experimento</b>	<b>Adjuvante de secagem</b>
1	Dióxido de silício coloidal (Aerosil)
2	Celulose monocristalina
3	Gelatina
4	Aerosil + Celulose
5	Aerosil + gelatina
6	Celulose + gelatina
7	Aerosil + Celulose + gelatina

Fonte: A autora (2024).

Para a operação de secagem que foi realizada em mini spray dryer (MSD 1.0, Labmaq®) e sob condições anteriormente determinadas na qual ficou definido a utilização dos seguintes parâmetros: temperatura de entrada de 110°C, com fluxo de alimentação de 1L/h. Além disso, foi utilizado uma vazão de ar de 1,65 m<sup>3</sup>/min. E soprador de 3,0 L/min. É importante salientar que os adjuvantes de secagem foram adicionados sob agitação por 30 min de antecedência da operação e mantido nessas condições durante toda a operação.

Posteriormente a realização dos experimentos de secagem utilizando diferentes adjuvantes, foram avaliadas as suas condições, mediante a análise de teor de polifenóis já descrita, além disso foram avaliados a umidade residual e o rendimento do PSA-AH, também já descritos anteriormente. As respostas obtidas dessa análise foram avaliadas através da análise estatística realizada no programa STATISTIC® 8.0 e Software Excel®.

#### **4.4.7 Fracionamento e análise fitoquímica dos extratos**

Após a obtenção e caracterização dos extratos brutos, foram realizados os fracionamentos das partes aéreas e raízes de *A. hispidum*, com o intuito de aumentar a concentração de substância de interesse. Seca de 2 g de extrato bruto foram reconstituídos em 20 mL de água destilada. Em seguida a solução aquosa foi particionada com 20 mL de hexano. A operação foi repetida até a saturação, o que totalizou um total de 8 lavagens para as partes aéreas e 4 vezes para as raízes. Em seguida, a mesma fração aquosa foi particionada com 20 mL de acetato de etila, também até saturação do solvente, esta etapa teve um total de 10 lavagens para as partes aéreas e 6 lavagens para as raízes. As frações orgânicas foram reunidas e concentrada através de um evaporador rotativo (Fisatom®) para a eliminação do solvente, em seguida congelados e então liofilizados (Mod L101 Liotop). Ao final do procedimento foi possível obter as seguintes frações: Fração Hexano (FHPA; FHR), fração Acetato de Etila (FactPA; FactR), fração aquosa residual (FaqPA; FaqR).

O extrato bruto (EB), fração hexano (FH), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa residual, tanto das partes aéreas quanto das raízes foram caracterizadas por CCD-AE, para as substâncias de interesse comumente detectada na espécie. Em uma placa de sílica gel 60-F<sub>254</sub> com partículas de 5-6 µm (Merck®), foram usadas para esta análise. As amostras foram aplicadas através de um equipamento

semiautomático (Mod. Linomat V, Camag®) controlado pelo software Wincats® (Camag®) foram aplicados 30 µL das amostras em bandas com largura de 8mm e espaço entre as bandas de 5mm. Os cromatogramas foram desenvolvidos em cubas de vidro (20cm x 10cm, Camag®), após saturação por 30 min da fase móvel 90:5:5 (acetato de etila: ácido fórmico: água; v/v/v). Ao final as placas foram derivatizadas com NEU a 1% em metanol seguido de PEG a 5% em etanol e avaliados sob luz UV em 254nm. A aquisição da imagem foi realizada utilizando multiDoc-It Imagem System® (model 125, UVP) com câmera Canon (Mod. Rebel T3 ESO 1100D, Canon) acoplada e através do software UVP®.

#### 4.4.8 Atividade antifúngica

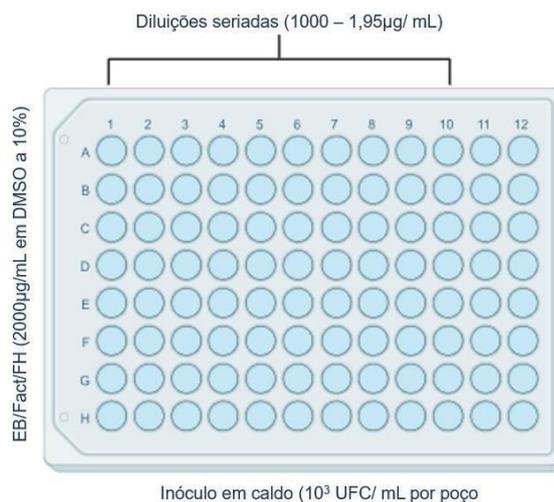
Para avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos e frações de *A. hispidum* foram utilizadas duas cepas de American Type Culture Collection (ATCC) de leveduras, *Candida glabrata* (9001) e *Candida auris* (CDCB11903). Os extratos e frações foram preparados utilizando uma solução de concentração 2mg/mL adicionando 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) em água ultrapura (PureLab®) para solubilizar as amostras. Em seguida, filtrado em membrana (Milipore®) estéreo com porosidade de 0,22µm.

Para todos os testes de atividade antifúngica as cepas de leveduras manipularam sob condições estéreis e cultivada em Agar Sabouraud (Sigma®), incubado em estufa em 48 h a 37 °C. As suspensões fúngicas foram calibradas em soluções salinas de 0,9% (v/v) ajustando-se turbidimetricamente a 0,5 na escala de McFarlan em espectrofotômetro (AJX – 1900 Micronal®) a 530 nm.

Após a calibração do inóculo foram realizadas duas diluições: em solução salina 0,9% (1:50) e (1:20) em meio de cultura, com a finalidade de obter uma concentração final de 10<sup>3</sup> UFC/mL. Em uma microplaca de 96 poços, 100 µL do meio preparado foram adicionados em todos os poços. Nas colunas 1 e 2 foram colocados 100 µL (EB/Fact/FH) do *A. hispidum*. Diluições seriadas foram realizadas nos poços seguintes descartando 100 µL do poço da coluna 10. Ao final foi possível obter concentrações de 1000 a 1,95 µg/mL. Em seguida, foi adicionado 100 µL do inóculo nos poços da coluna 1 a 11 configurando como controle positivo a coluna 11 sem a amostra e o controle negativo foi inserido na última coluna com 200 µL do meio de

cultura (Figura 4). As placas foram incubadas a uma temperatura de 30 a 37 °C por 48 h e posteriormente observada quanto a presença ou ausência do crescimento.

Figura 4 - Representação do ensaio de determinação da CIM dos extratos brutos/frações de *A. hispidum*.



Fonte: A autora (2024).

A CIM foi avaliada pela menor concentração que os extratos brutos e frações conseguiram inibir o crescimento dos fúngicos, comparado com o controle positivo. Para avaliar a CFM, utilizou-se uma alíquota de 5 µL de cada poço do teste da CIM onde foram transferidos para uma placa de Petri contendo Ágar Sabouraud e incubado por 48 horas a 37 °C. A CFM foi avaliada na menor concentração dos extratos brutos e frações de *A. hispidum* que foi capaz de impedir o crescimento dos fungos visivelmente (Ferreira *et al.*, 2013).

#### 4.4.9 Ensaio de toxicidade frente a náuplios de *Artemia salina*

A avaliação da toxicidade de espécies vegetais, principalmente aquelas que serão incorporadas em formulações torna-se algo crucial, sendo assim, uma baixa toxicidade pode ser observada como um atributo promissor, para a utilização desses extratos proveniente da espécie em questão estudada. Os ensaios frente aos náuplios de *Artemia salina*, mostrou-se ser um método simples de fácil manuseio e rápido, além de apresentar baixo custo o que favorece a sua utilização como uma análise preliminar de toxicidade de forma geral (De *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 2009).

Para essas análises foi usada a metodologia de (Meyer *et al.*, 1982) com modificações. Pesou-se 0,5 g de ovos de náuplios (cistos de *Artemia salina*) foram colocados para incubar na água do mar (pH 8-9) após filtrada. O sistema foi deixado sob luz artificial (100W) por 48 h para a eclosão dos ovos, em temperatura ambiente. Para o preparo das soluções a serem testadas foi necessário pesar 200 mg do extrato e posteriormente foi adicionado 200 µL de DMSO, formando as soluções estoques de concentrações: 1000, 750, 500, 250, 100, 50 e 25 mg/mL. O procedimento foi realizado para os extratos brutos de *A. hispidum*. além do extrato foi realizado um controle positivo com dicromato de potássio  $K_2Cr_2O_7$  e o teste do controle negativo foi utilizado água do mar e DMSO a 10%. Aos tubos de ensaio foram adicionados 9 mL de água do mar e com o auxílio de uma pipeta de Pasteur 10 náuplios de *Artemia salina*. Em seguida adicionou-se 10 µL das soluções preparadas anteriormente ficando com as seguintes concentrações finais: 1000, 750, 500, 250, 100, 75, 50 e 25 µg/mL. Os tubos foram deixados em repouso por 24h, após esse período os náuplios foram contados novamente, com o intuito de estimar a concentração letal média (CL50) e percentual de mortalidade.

#### **4.4.10 Obtenção dos hidrogéis termossensíveis nasais**

##### **4.4.10.1 Formulação 1 (Pluronic F127)**

Em um recipiente com capacidade de 50mL foi adicionado 0,02g de extrato bruto e dissolvido em 19 mL de água destilada previamente resfriada, em seguida adicionou-se 0,1g do conservante (sprectrastat) e homogeneizou-se. A essa solução foi adicionado 3,6 g de Pluronic F127 e homogeneizar novamente até obter uma solução límpida. Ao final do processo essa foi armazenada em frasco de vidro, sobre refrigeração, após 24h procedeu-se com suas análises.

##### **4.4.10.2 Formulação 2 (Pluronic F127+ carbopol)**

Em um recipiente com capacidade de 50 mL foi adicionado 0,02 g de extrato bruto e dissolvido em 19 mL de água destilada previamente resfriada, em seguida adicionou-se 0,1 g do conservante (sprectrastat) e homogeneizou-se. A essa solução foi adicionado 3,6 g de Pluronic F127 e homogeneizar novamente até obter uma

solução límpida. Em um outro recipiente, foi pesado 0,02 gramas de carbopol 940 e este dissolvido em 1mL de solução de hidróxido de sódio (5% p/v). em seguidas ambas as soluções foram misturadas, até sua completa homogeneização. Ao final do processo essa foi armazenada em frasco de vidro, sobre refrigeração, após 24h procedeu-se com suas análises.

#### **4.4.11 Caracterização dos hidrogéis termossensíveis nasais**

##### **4.4.11.1 Avaliação das características macroscópicas**

As formulações dos hidrogéis termossensível nasal desenvolvidos serão caracterizados macroscopicamente quanto a sua coloração e aparência após 24h de preparação. As formulações serão avaliadas nas seguintes temperaturas: (-4°C à -8°C); (25°C à 30°C); (35°C à 45°C). Utilizando sempre a mesma embalagem de armazenamento que no caso será uma embalagem de vidro. Elas serão classificadas em: Normal, sem alteração (1); Levemente modificada (2); Modificada (3); Intensamente modificada (4).

##### **4.4.11.2 Teste de Centrifugação**

O teste foi realizado em centrífuga (EEQ9004A-2, EDUTECH), na qual foi utilizado 10g de amostras do hidrogel termossensível em uma rotação de 800 RPM por 30 min, à temperatura ambiente. Posteriormente, avaliou-se a presença ou ausência de alterações, mediante a aspectos visuais obtidos da formulação (Brasil, 2004).

##### **4.4.11.3 Ciclo gelo/ degelo**

Para a realização do ciclo gelo degelo dos hidrogéis, 2 mL de cada formulação foram transferidos para um tubo Falcon de 15 mL, em seguida as amostras foram submetidas a 3 ciclos de 24 h em temperatura ambiente e 24 h à  $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ , totalizando 6 dias de análises. Após essa etapa as amostras foram avaliadas quanto as suas características macroscópicas conforme descrito anteriormente (Anvisa, 2019).

#### 4.4.11.4 Avaliação do pH

Para avaliação do pH das formulações de hidrogel termossensível nasal, todas elas foram deixadas a temperatura ambiente para que todas fossem avaliadas na mesma temperatura. Em seguida foi medido o seu pH em pHmetro (pH21, Hanna), e o valor do pH foi registrado após a estabilização do valor no equipamento. Além disso todas as análises foram realizadas em triplicata (Piana *et al.*, 2013; Santos, 2018).

#### 4.4.11.5 Determinação da viscosidade

A determinação da viscosidade dos hidrogéis termossensíveis, serão avaliadas na temperatura de 35 °C, através do viscosímetro (Ika®, Rotovisc Io-vi). Durante o experimento foram determinadas a velocidade de rotação para cada formulação e o tamanho da agulha a ser usada. O tempo de estabilização foi determinado em 60s e realizado a leitura em 12 pontos, anotando sempre o valor da viscosidade e do torque de cada amostra. Foram realizadas as leituras em triplicata e os resultados expressos em médias  $\pm$  desvio padrão (Moreno *et al.*, 2014; Neves, 2019; Pereira *et al.*, 2013).

#### 4.4.11.6 Avaliação da transição de fases (Sol-Gel)

Para avaliação da temperatura de transição da fase líquida (Sol) para a fase gel (Gel) de cada formulação do sistema de géis termossensíveis foram verificadas. Em baixas temperaturas as formulações permanecem líquidas e em temperaturas mais elevadas as formulações permanecem semissólidas. Para realização desse teste com o intuito de obter resultados mais precisos serão aplicadas duas metodologias.

##### a) Teste da inversão de tubo

Cada formulação do sistema de hidrogéis termossensíveis serão verificadas em baixas temperaturas segundo a metodologia de inversão de fluxo obtida por (Sharma; Bhatia, 2004). Uma quantidade de 2 mL de cada formulação foi colocada em um tubo de vidro, previamente identificado, foram mantidas em um banho controlável (Quimis®). A temperatura foi elevada a cada 2 °C por minuto e cada

formulação foi avaliada visualmente quanto a temperatura de transição sol-gel e a tempo para a formação desta. Este foi considerado quanto o líquido presente no tubo fica imóvel por 30s. verificar o tempo até a perda de estabilidade a temperatura ambiente.

#### b) Técnica com agitação magnética

Para a determinação do estado de transição Sol-Gel uma quantidade de 3 mL do hidrogel foi transferida para um recipiente de vidro e dentro dele colocado uma barra magnética. Em seguida foi levado para um agitador magnético de temperatura controlada (Ika®). A barra magnética foi colocada sob uma agitação de 100 RPM e a temperatura foi aumentada 1 °C/min. O ponto de gelificação será observado quando a barra magnética parar de girar. Neste momento também será registrado a temperatura (Adnet *et al.*, 2020; Ahmed *et al.*, 2019).

### 4.4.12 Estudo de estabilidade

#### 4.4.12.1 Estabilidade preliminar

Após a determinação das formulações que seriam utilizadas, as escolhas foram submetidas para estabilidade. Inicialmente, elas foram submetidas a condições extremas com o objetivo de acelera possíveis reações de degradação. Das duas formulações escolhidas foram levadas para a estabilidade, as formulações base com e sem conservante e as incorporadas com o extrato bruto. Para estas foram realizados o ciclo gelo-degelo e o teste de centrifugação que estão descritos anteriormente, após aprovação foram levados para estabilidade acelerada.

#### 4.4.12.2 Estudo de estabilidade acelerada e de longa duração

Para esta análise foram realizadas as preparações dos hidrogéis em triplicata e está foram submetidas a avaliação por 90 dias, sendo avaliada nos tempos 24h, 7dias, 15 dias, 30 dias, 60 dias e 90 dias, em seguida elas foram avaliadas mensalmente até completar 1 anos. Para esse estudo foi dado seguimento as seguintes condições de temperatura 25, 40 e -4 °C. Durante o período do estudo as

formulações foram avaliadas pelos seguintes parâmetros: pH, viscosidade e características macroscópicas, descrita nos itens 6.3.2.1; 6.3.2.5 e 6.3.2.5, respectivamente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A caracterização inicial da droga vegetal foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD), empregando sistemas de eluição e reveladores preconizados por Wagner e Bladt (2001). Os resultados da prospecção fitoquímica encontra-se na Tabela 4, incluindo os fatores de retenção da amostra e padrão de cada metabólito realizado.

Tabela 4 - Resultados da prospecção fitoquímica das partes aéreas e raízes de *A. hispidum*.

Classe de metabólitos	Resultado	Rf da amostra	Rf do padrão
Flavonoides	+	0,34	0,34 (Rutina)
		0,91	0,91 (Quercetina)
Derivados cinâmicos	+	0,38	0,38 (Cafeico)
		0,82	0,82 (Clorogênico)
Taninos hidrolisáveis	+	0,72	0,73 (Ác. Gálico)
Taninos condensados	-	-	0,77 (Catequina)
Terpenos	+	0,52	0,52 ( $\beta$ -sitosterol)
Açúcares redutores	+	0,54	0,55 (Glicose)
Cumarinas	-	-	0,76 (Cumarina)
Saponinas	+	-	0,47 ( $\beta$ -Escina)

Fonte: A autora (2024).

Os resultados considerados positivos (+), representam a observação de bandas de mesma coloração e com fatores de retenção semelhantes ao padrão. Como foi possível observar através dos resultados obtidos por CCD a presença de alguns metabólitos secundários, tais como: flavonoides, taninos hidrolisáveis, derivados cinâmicos, açúcares redutores, terpenos e saponinas, no entanto não foi possível evidenciar a presença de antraquinonas, alcaloides, taninos condensados ou cumarinas. Porém, existem alguns resultados na literatura, também utilizando as partes aéreas, que reportaram a presença de alcaloides e saponinas (Abubakar *et al.*, 2015; Chika; Onyebueke; Bello, 2018; Kakpo *et al.*, 2019). No entanto, os resultados

desses estudos podem estar relacionados as condições experimentais diferentes ou a características intrínsecas das amostras.

Embora qualitativos, os diversos estudos de triagem fitoquímicas tem papel importante no auxílio à identificação e confirmação da presença de compostos e grupos de compostos do metabolismo secundário em materiais vegetais. Com o auxílio do perfil fitoquímico é possível fazer diversas inferências acerca da autenticidade e da qualidade do material vegetal, além de servir de referência para estudos de otimização de operações de extração e estudos de fracionamento bioguiados (Akah; Code, 2017; Basile *et al.*, 2016; N'do, J. *et al.*, 2019; Onyeto; Akah; Okafor, 2017).

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE PARTES AÉREAS E RAÍZES

O controle de qualidade físico-químico foi realizado através dos métodos empregados pela Farmacopeia Brasileira 6ª edição. Dando início aos resultados das análises, a determinação da matéria estranha para drogas vegetais é um parâmetro muito importante, pois é uma etapa que visa a pesquisa e identificação de elementos não desejáveis na matéria vegetal, tais como, insetos, fungos, materiais orgânicos e inorgânicos, ou até mesmo partes ou tecidos de outros vegetais, que podem comprometer a qualidade sanitária ou influenciar o rendimento final da droga vegetal (Brasil, 2019). Diante disso, os resultados obtidos no ensaio de determinação de matéria estranha, cumprem com as exigências legais, com resultados de valores inferiores a 2% m/m de matéria estranha. Nas partes aéreas foi possível observar um teor de  $0,13\% \pm 0,0064$  e para as raízes  $0,15\% \pm 0,0049$ .

### 5.2.1 Perda por dessecação

A umidade residual que avalia a presença de água em extratos provenientes de espécies vegetais, após sua secagem parcial ou completa, é um critério importante para ser analisado pois, está associado a garantia da conservação do produto final (De Gois *et al.*, 2022).

Os resultados obtidos para as partes aéreas e raízes na análise de determinação de perda por dessecação de *A. hispidum* estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Perda por dessecação das amostras de *Acanthospermum hispidum*

Amostras	Amostra (g)	PD (%)	Média ± DP	DPR%
AHPAMP1	2,011	12,36	12,13 ± 0,184	1,60
	2,004	12,10		
	2,001	11,95		
AHRMP1	2,032	9,69	9,82 ± 0,184	1,87
	2,025	9,95		
	2,019	9,62		

PD: Perda por Dessecação, DP: Desvio Padrão, DPR%: Desvio Padrão Relativo.  
Fonte: A autora (2024).

Segundo a Farmacopeia Brasileira, os limites de umidade residual preconizados para drogas vegetais é de 8 a 12%. Os resultados encontrados para as amostras empregadas neste estudo apresentam teor máximo de 9,82% (m/m) para as raízes e as partes aéreas demonstrou um teor máximo de 12,13% (m/m), assegurando assim, maior estabilidade microbiológica e química para o material vegetal.

### 5.2.2 Cinza totais

Na avaliação do teor de cinzas totais, a qual determina a quantidade de materiais inorgânicos presentes no material vegetal, os teores encontrados foram de  $10,29 \pm 1,86\%$  para as partes aéreas e  $24,10 \pm 4,67\%$  para as raízes de *A. hispidum*. De acordo com os limites preconizados pela farmacopeia, o teor máximo aceitável é de 14%, porém para valor superior à 8%, é necessário a realização de ensaio complementar para a determinação de cinzas insolúveis em ácido, que permite a avaliação de materiais silicosos, tais como terra ou areia, no material vegetal (Brasil, 2019).

### 5.2.3 Determinação de cinzas insolúveis em ácido

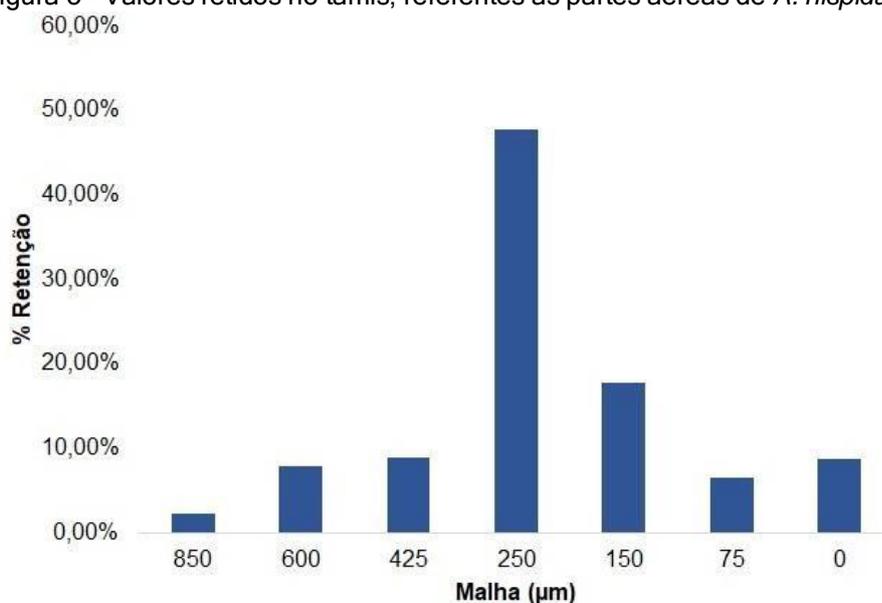
Na avaliação do teor de cinzas insolúveis em ácido, a qual determina a quantidade de materiais silicosos presentes no material vegetal, os teores encontrados foram de  $2,36 \pm 4,04\%$  para as partes aéreas e  $13,14 \pm 3,33\%$  para as raízes de *A. hispidum*. De acordo com os limites preconizados pela farmacopeia, o

teor máximo aceitável é de 14%, ao final do processo foi possível evidenciar que a presença de terra ou areia, isso demonstrou deve ser tomado um cuidado maior durante a coleta e o processamento do material vegetal (Brasil, 2019).

#### 5.2.4 Determinação da granulometria

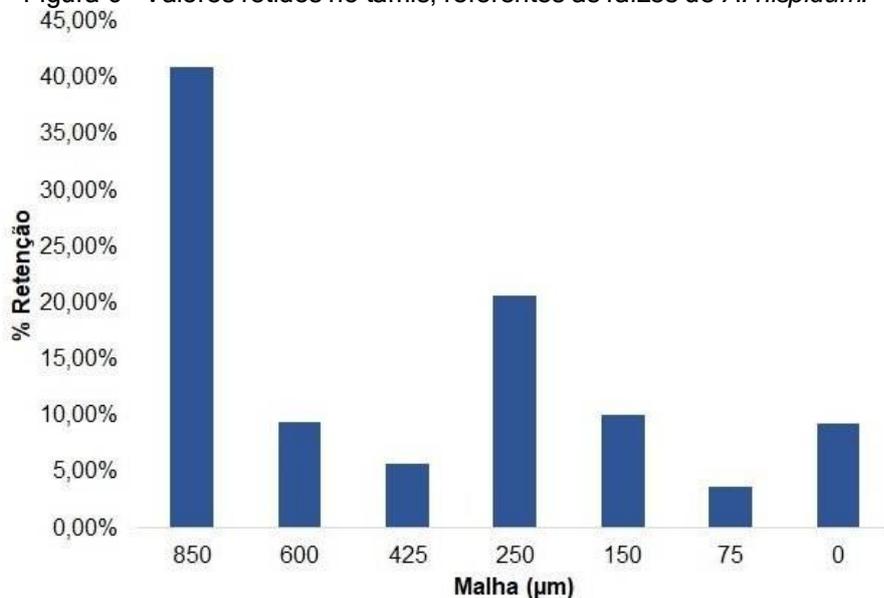
Os resultados alcançados pela análise do histograma de distribuição granulométrica das partes aéreas e raízes de *A. hispidum*, verificou que as partículas retidas, majoritariamente no tamis de 250  $\mu\text{m}$  para as partes aéreas representando  $47,74 \pm 11,94$  % de todo o material e as raízes de 850  $\mu\text{m}$  representando  $40,97 \pm 10,26$  % do material utilizado (Figura 5 e 6).

Figura 5 - Valores retidos no tamis, referentes as partes aéreas de *A. hispidum*.



Fonte: A autora (2024).

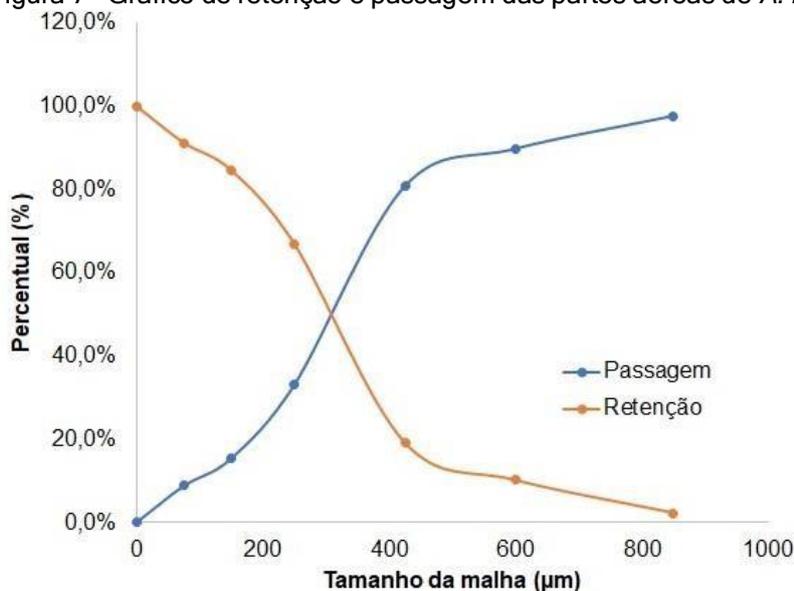
Figura 6 - Valores retidos no tamis, referentes as raízes de *A. hispidum*.



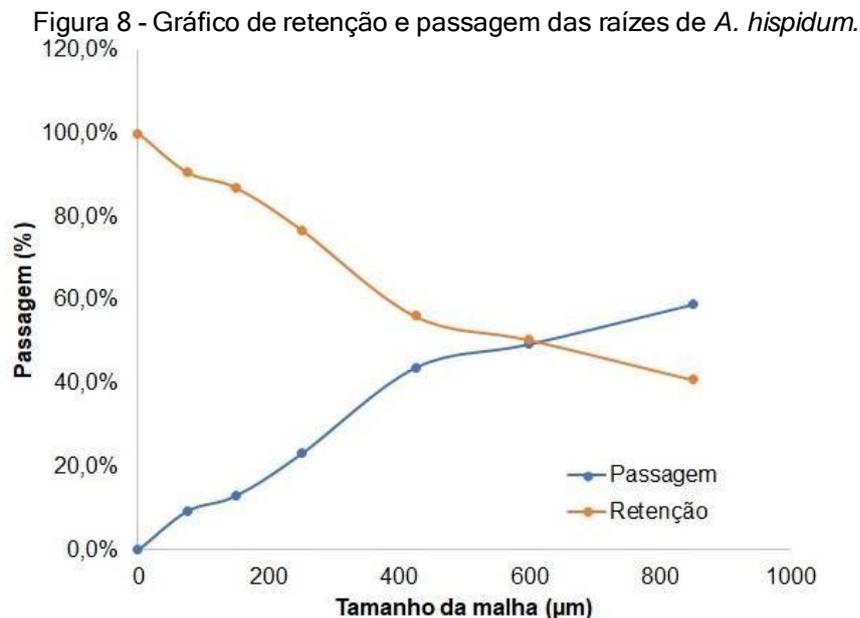
Fonte: A autora (2024).

Para determinar o tamanho médio das partículas foi obtido através de uma interseção das curvas de retenção e passagem. Para as partes aéreas, o tamanho da partícula obtido foi de 310  $\mu\text{m}$  e para as raízes de 600  $\mu\text{m}$  (Figuras 7 e 8). Sendo assim, de acordo com a classificação farmacopeica as partes aéreas foi considerado um pó moderadamente grosso e as raízes um pó grosso.

Figura 7 - Gráfico de retenção e passagem das partes aéreas de *A. hispidum*.



Fonte: A autora (2024).



Fonte: A autora (2024).

### 5.2.5 Teor de substâncias extraíveis

Na avaliação do teor de substâncias extraíveis, a qual determina a quantidade de compostos hidrossolúveis tais como: açúcares, flavonoides glicosilados, mucilagem, entre outros compostos presente no material vegetal. Esses compostos possuem diversas funções biológicas e para a espécie estudada foi observado um rendimento de  $4,59 \pm 1,01$  g% para as partes aéreas e  $3,54 \pm 1,50$  g% para as raízes de *A. hispidum*. O teor de substâncias extraíveis em espécies vegetais, pode variar de acordo com alguns fatores como: o estágio do desenvolvimento, as condições ambientais e forma de cultivo etc. sendo assim, essa metodologia é importante para garantir uma padronização, segurança e qualidade da espécie em questão estudada.

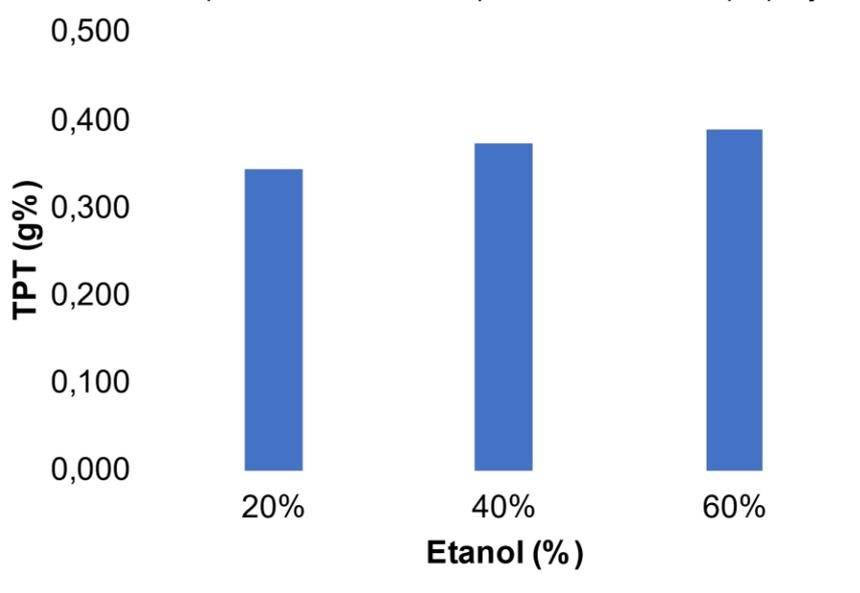
### 5.3 AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS TOTAIS E RAÍZES E PARTES AÉREAS DE *A. hispidum*

### 5.3.1 Avaliação do método

#### 5.3.1.1 Determinação da concentração do solvente

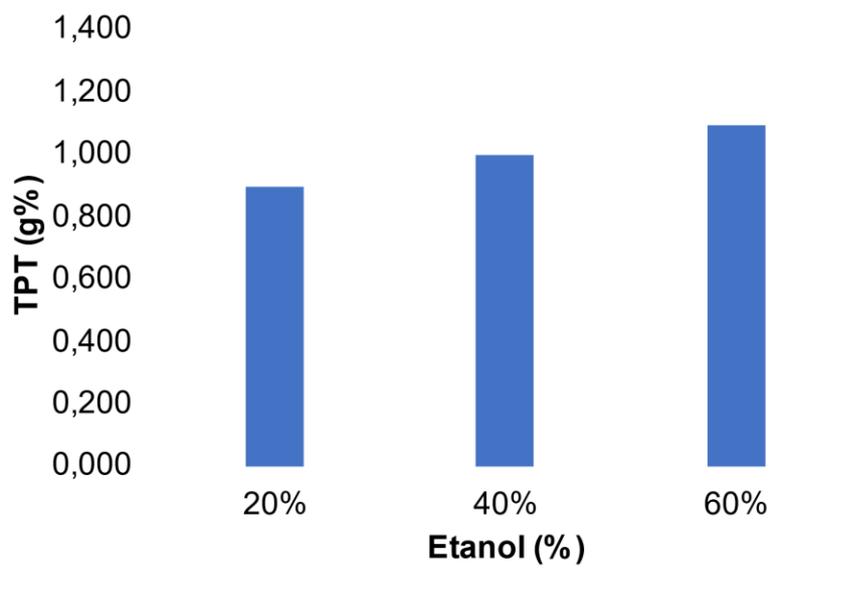
Com o intuito de determinar a melhor concentração do solvente, foi realizado a extração com diferentes soluções hidroalcolica utilizando algumas proporções de etanol, os quais foram realizados tanto para as partes aéreas quando para as raízes. Sendo assim, a proporção do etanol 60% para ambos os farmacógenos, resultando em teores médios de polifenóis de  $1,603 \pm 0,0086\%$  (0,53%) para as partes aéreas,  $1,092 \pm 0,0156\%$  (1,43%) para as raízes ambos expressos em g% de pirogalol (Figuras 9 e 10).

Figura 9 -Polifenóis totais nas partes aéreas de *A. hispidum* em diferentes proporções de solvente.



Fonte: A autora (2024).

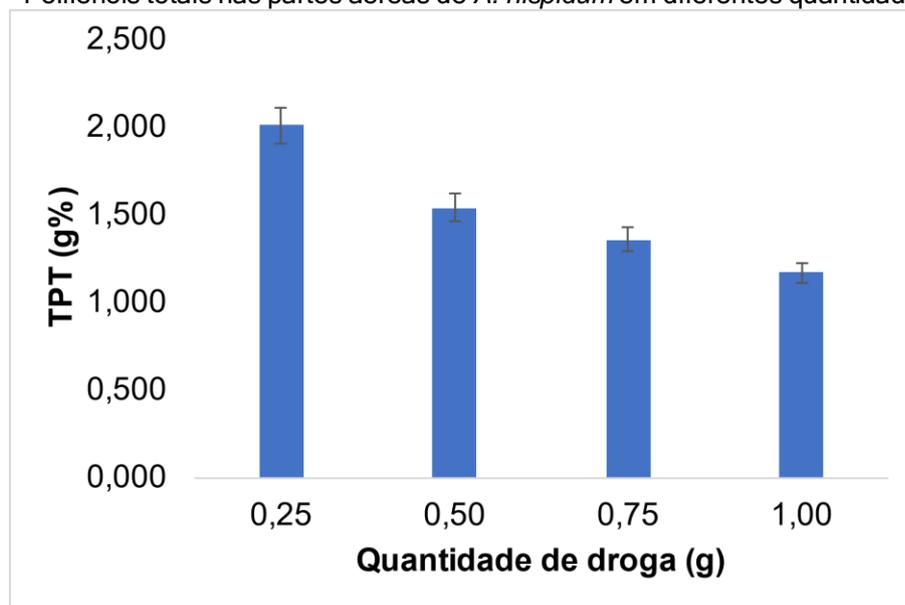
Figura 10 - Polifenóis totais nas raízes de *A. hispidum* em diferentes proporções de solvente.



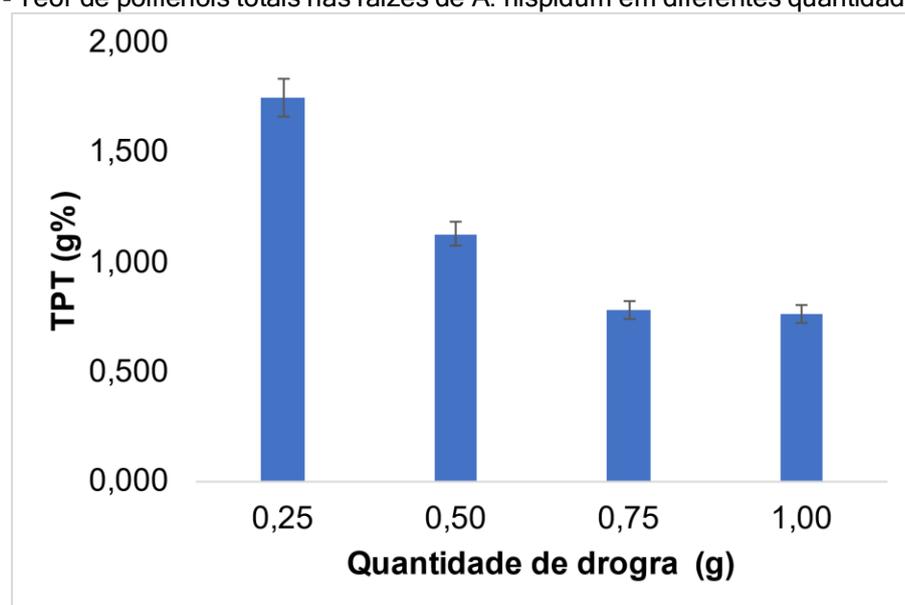
Fonte: A autora (2024).

#### 5.3.1.2 Determinação da quantidade de droga e comprimento de onda

Para a determinação da quantidade de droga a ser utilizada foram pesadas variações de amostras (0,25 – 1,00 g), para as partes aéreas e as raízes de *A. hispidum*. Após análise, o resultado que apresentou o melhor desempenho analítico foi quando utilizada a quantidade de 0,25 g. O resultado dos teores de polifenóis totais encontrada para as partes aéreas foi de  $2,016 \pm 0,0150$  g% (0,75%) e para as raízes  $1,752 \pm 0,0247$  g% (1,41%), ambos expressos em g% de pirogalol (Figura 11 e 12).

Figura 11 - Polifenóis totais nas partes aéreas de *A. hispidum* em diferentes quantidades de droga

Fonte: A autora (2024).

Figura 12 - Teor de polifenóis totais nas raízes de *A. hispidum* em diferentes quantidades de droga.

Fonte: A autora (2024).

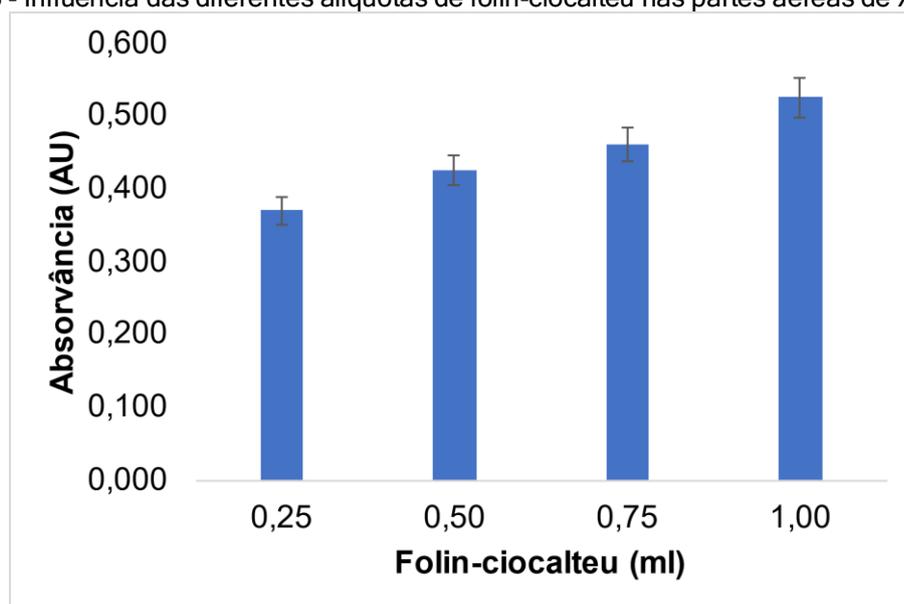
A eficiência de extração de compostos fenólicos a partir de um produto natural depende diretamente das condições de extração. Como as matrizes de origem vegetal possuem sua composição e estruturas variadas, é difícil definir métodos que a maior quantidade desses compostos seja extraída em um menor tempo. Com o intuito de melhorar a extração desses compostos podemos alterar alguns parâmetros, tais como: solvente utilizado, volume, tempo e temperatura de extração e quantidade de

droga utilizada, que neste caso foi de extrema importância para realizar a validação (Garde-Cerdan; Gonzalo-Diago; Pérez-Álvarez, 2017).

### 5.3.1.3 Determinação da alíquota de folin-ciocalteu

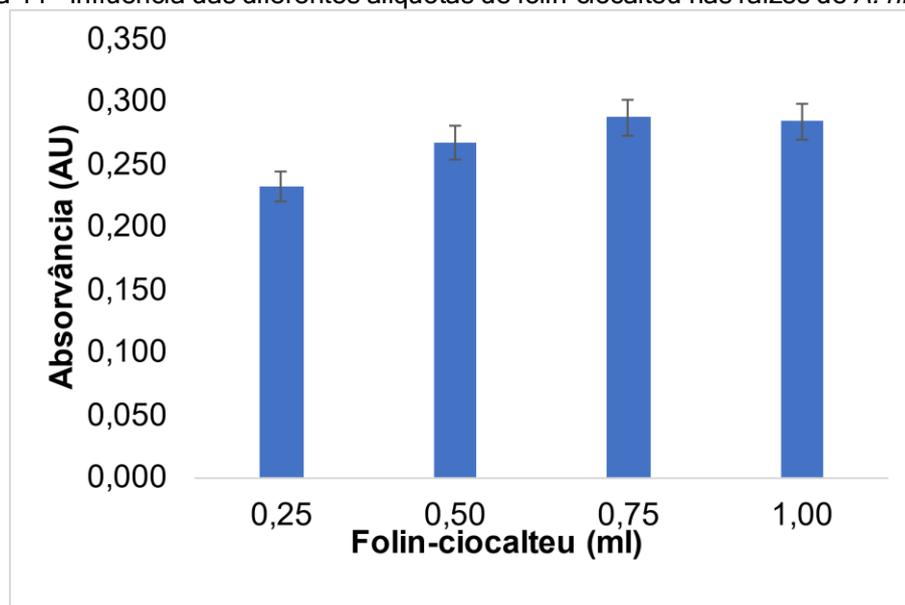
Para a determinação da quantidade de reagente de folin-ciocalteu foram testadas alíquotas entre 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 mL. No método de folin-ciocalteu é fundamental para a reação pois promove a formação de um complexo com coloração azulada, resultante da reação de redução entre as hidroxilas presente nos polifenóis e o ácido fosfotungstico (Ferreira, 2016; Folin; Ciocalteu, 1927). Neste sentido, os resultados do ensaio revelaram que a alíquota de 1mL para as partes aéreas com valores  $0,525 \pm 0,0047$  g% (0,90%) apresentou o melhor desempenho (Figura 13).

Figura 13 - Influência das diferentes alíquotas de folin-ciocalteu nas partes aéreas de *A. hispidum*.



Fonte: A autora (2024).

Para as raízes, as duas últimas alíquotas testadas apresentaram valores muito semelhantes de média  $\pm$  DP (DPR%), onde a alíquota de 0,75 mL mostrou valores de  $0,288 \pm 0,0031$  g% (1,06%) e de 1 mL  $0,285 \pm 0,0026$  g% (0,93%) (Figura 14). Como os resultados encontrados não tiveram grandes variações, em relação as alíquotas de folin-ciocalteu testadas para análise nas raízes, ficou determinado a utilização da alíquota de 1 mL também para as raízes.

Figura 14 - Influência das diferentes alíquotas de folin-ciocalteu nas raízes de *A. hispidum*.

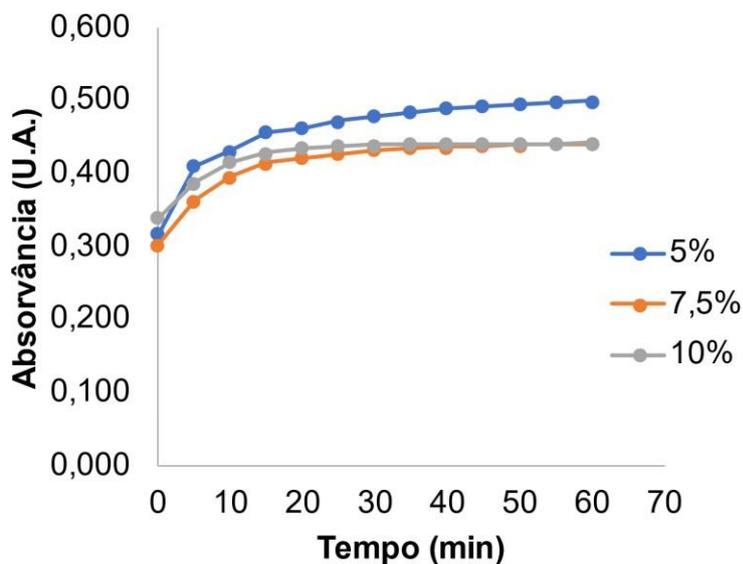
Fonte: A autora (2024).

Sendo assim determinando a alíquota de 1 mL do reagente folin-ciocalteu para a realização das reações indicando que está alíquota é capaz de satisfazer a formação do complexo das hidroxilas com o ácido na determinação dos polifenóis.

#### 5.3.1.4 Determinação da cinética reacional

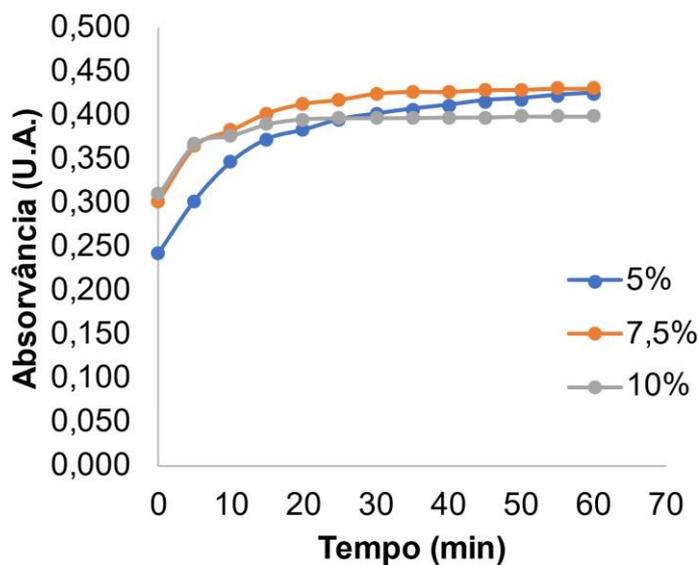
Para a quantificação dos polifenóis totais, utilizado o método de folin-ciocalteu, alguns fatores são importantes e esses podem influenciar diretamente no resultado. Alguns parâmetros podem ser modificados como por exemplo, a quantidade do reagente de folin-ciocalteu e a concentração de carbonato de sódio. Sendo assim, a cinética da reação foi realizada com o intuito de definir o tempo de reação necessário para a formação do complexo. É relevante destacar que o perfil de formação do complexo é diferente quando utilizamos uma substância pura de uma amostra. Desta maneira é importante estabelecer o tempo de reação, evitando erros subsequentes.

A cinética de complexação da amostra proveniente do extrato de *A. hispidum* em diferentes concentrações de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) durante o tempo de 60 minutos estão expostos nas Figuras 15 e 16. A absorção máxima foi atingida no tempo máximo de 30 min tanto para as partes aéreas quanto para as raízes, após esse tempo o produto reacional permaneceu estável até o final da reação.

Figura 15 - Cinética da reação para as partes aéreas de *A. hispidum*.

Fonte: A autora (2024).

Quando avaliado a influência da concentração de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), tiveram pequenas variações entre as concentrações e diferenças entre os farmacógenos. Para as partes aéreas de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  que obteve melhor resposta foi 5% (p/v), já as raízes o melhor resultado foi obtido quando utilizado  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 7,5% (p/v).

Figura 16 - Cinética da reação para as raízes de *A. hispidum*

Fonte: A autora (2024).

### 5.3.2 Validação do método

#### 5.3.2.1 Linearidade do padrão e das amostras

A curva de linearidade do pirogalol foi elaborada de acordo com os valores apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores utilizados na curva de linearidade do pirogalol.

Concentração (mg/mL)	Vol da solução de pirogalol (mL)	Vol de Folin Ciocalteu (mL)	Vol de água (mL)	Vol final de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mL)
0,0013	0,50	1,00	4,00	4,50
0,0025	1,00	1,00	4,00	4,00
0,0038	1,50	1,00	4,00	3,50
0,0050	2,00	1,00	4,00	3,00
0,0063	2,50	1,00	4,00	2,50

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: carbonato de sódio anidro a 5% (p/v).

Fonte: A autora (2024).

Através da elaboração da curva analítica do pirogalol foi possível observar a linearidade do método por meio da curva de calibração na faixa de concentração de 0,0013 a 0,0063 mg/mL. Na Tabela 7 é possível evidenciar os resultados das absorvâncias das amostras obtidas nas diferentes concentrações do padrão.

A Figura 17 exibe as curvas de linearidade obtidas para o pirogalol, as curvas foram obtidas através do método dos mínimos quadrados, os coeficientes de determinação foram 0,994, 0,9943 e 0,9932. A Figura 18 apresenta a curva de linearidade média, obtida da mesma forma, o coeficiente de determinação foi de 0,9941, certificando a alta correlação linear entre as variáveis y e x.

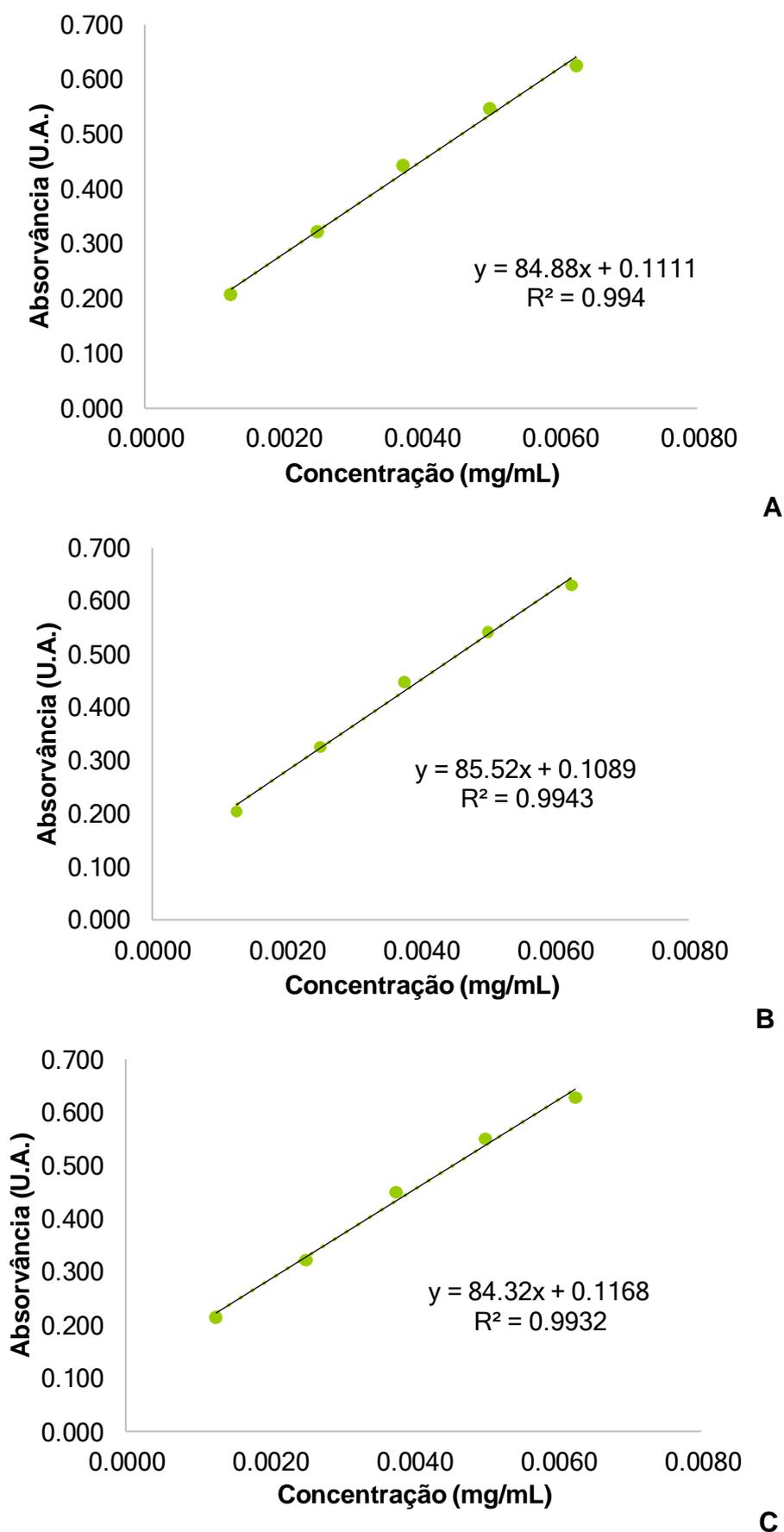
Tabela 7 - Absorbâncias obtidas para a curva de linearidade do pirogalol, com seus respectivos valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Conc (mg/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média	DP	DPR%
0,0013	0,208	0,204	0,215	0,209	0,0056	2,66
0,0025	0,322	0,325	0,322	0,323	0,0017	0,54
0,0038	0,444	0,447	0,450	0,447	0,0030	0,67
0,0050	0,547	0,542	0,550	0,546	0,0040	0,74
0,0063	0,626	0,630	0,628	0,628	0,0020	0,32

Abs: Absorbância; DP: desvio padrão, DPR%: desvio padrão relativo.

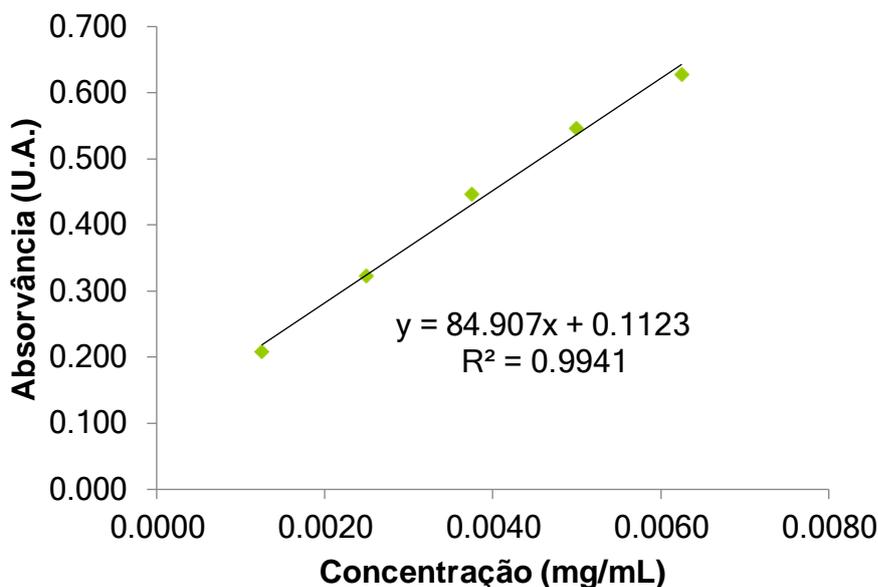
Fonte: A autora (2024).

Figura 17 - Curvas analíticas do pirogalol obtidas para a verificação da linearidade do método.



Fonte: A autora (2024).

Figura 18 - Curva analítica média do pirogalol obtida para a verificação da linearidade do método.



Fonte: A autora (2024).

A análise estatística por ANOVA (Análise de Variância) da curva de calibração está resumida na Tabela 8.

Tabela 8 - Análise de Variância (ANOVA) realizada para a curva analítica média do pirogalol.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
<b>Regressão</b>	1	0,284935041	0,284935041	1699,086437	2,69201E-14
<b>Resíduo</b>	12	0,002012388	0,000167699		
<b>Total</b>	13	0,286947429			

*gl*: graus de liberdade, *SQ*: soma quadrática, *MQ*: média quadrática.

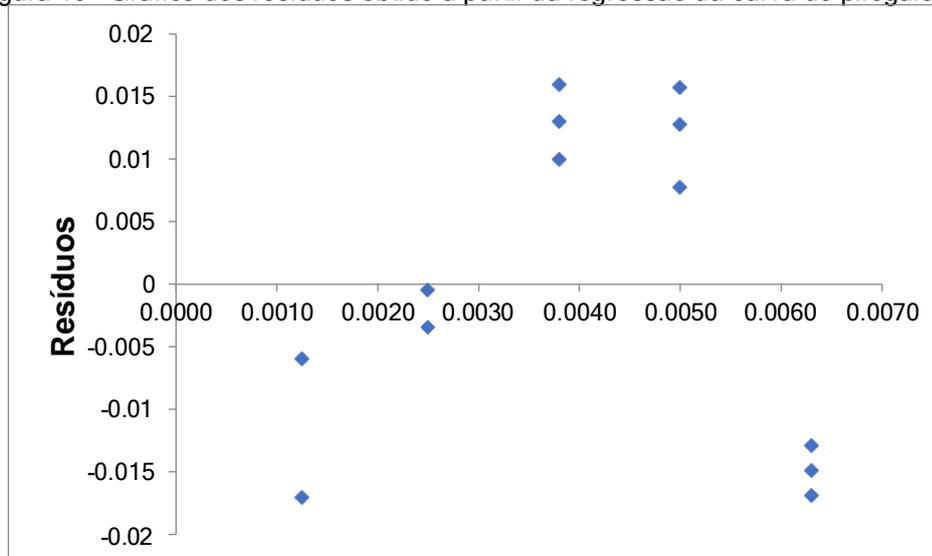
Fonte: A autora (2024).

Para avaliação da significância do coeficiente angular foi analisada a partir do teste F da ANOVA, o F calculado foi superior ao F de significação, assim, rejeita-se a hipótese que o coeficiente angular é igual a zero, aceitando a hipótese que este coeficiente é diferente de zero, e que y efetivamente varia em função de x, assim, o método pode ser considerado linear.

A Tabela 9 descreve os resíduos calculados a partir da curva analítica obtida. A análise destes resíduos foi executada com a finalidade avaliar sua normalidade e homoscedasticidade. A normalidade foi avaliada a partir de análise visual do gráfico de distribuição dos resíduos em função da concentração e da resposta (Figura 19), a distribuição aleatória dos resíduos em torno de zero indica normalidade na distribuição.

Para avaliação da homoscedasticidade dos resíduos aplicou-se o teste de Cochran. Inicialmente foi calculada a variância do valor de  $y$  em cada nível de concentração, e testou-se a hipótese de que as variâncias são todas iguais. Para isso, calculou-se o valor de  $C$  que foi comparado com o valor de  $C_{\text{crítico}}$ . Como o valor de  $C$  foi de 0,063, inferior ao valor de  $C_{\text{crítico}}$  (0,684), aceita-se a hipótese, as variâncias de  $y$  são iguais, os resíduos são homocedásticos.

Figura 19 - Gráfico dos resíduos obtido a partir da regressão da curva do pirogalol.



Fonte: A autora (2024).

Tabela 9 - Análise dos resíduos de acordo com a regressão.

<b>Observação</b>	<b>Y previsto</b>	<b>Resíduos</b>
1	0,325441561	-0,00344156
2	0,434040753	0,009959247
3	0,53428616	0,01271384
4	0,642885352	-0,01688535
5	0,221019261	-0,01701926
6	0,325441561	-0,00044156
7	0,434040753	0,012959247
8	0,53428616	0,00771384
9	0,642885352	-0,01288535
10	0,221019261	-0,00601926
11	0,325441561	-0,00344156
12	0,434040753	0,015959247
13	0,53428616	0,01571384
14	0,642885352	-0,01488535
15	0,00610	0,00020

Fonte: A autora (2024).

**Curva analítica para matéria prima de *A. hispidum*:** A curva de linearidade das partes aéreas e raízes de *A. hispidum* foi elaborada de acordo com os valores apresentados nas Tabelas 10 e 11.

A linearidade foi verificada por meio da elaboração da curva analítica da matéria prima na faixa de concentração de 0,10 a 0,30 mg/mL para as partes aéreas e de concentração de 0,20 a 1,00 mg/mL para as raízes. Na Tabela 7 e 8 estão expressos os resultados encontrados para as absorvâncias obtidas nas diferentes concentrações da curva, em relação ao teor polifenóis.

Tabela 10 - Valores de absorvância obtidos para as amostras das partes aéreas para o teor de polifenóis.

<b>Concentração (mg/mL)</b>	<b>Abs 1</b>	<b>Abs 2</b>	<b>Abs 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>DPR%</b>
0,10	0,263	0,259	0,270	0,264	0,0056	2,11
0,15	0,352	0,352	0,361	0,355	0,0052	1,46
0,20	0,449	0,450	0,452	0,450	0,0015	0,34
0,25	0,535	0,532	0,541	0,536	0,0046	0,85
0,30	0,624	0,618	0,627	0,623	0,0046	0,74

Abs: Absorvância; DP: desvio padrão, DPR%: desvio padrão relativo.

Fonte: A autora (2024).

Tabela 11 - Valores de absorvância obtidos para as amostras das raízes para o teor de polifenóis.

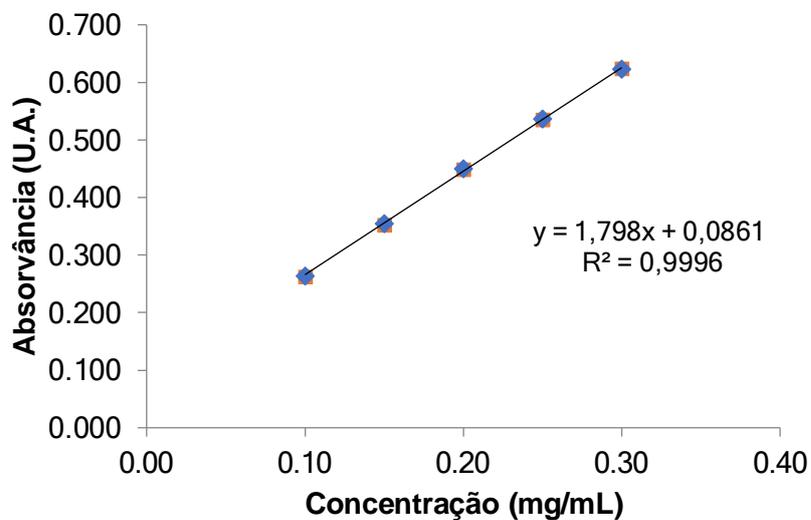
<b>Concentração (mg/mL)</b>	<b>Abs 1</b>	<b>Abs 2</b>	<b>Abs 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>DPR%</b>
0,20	0,244	0,251	0,241	0,245	0,0051	2,09
0,40	0,361	0,357	0,358	0,359	0,0021	0,58
0,60	0,424	0,429	0,429	0,427	0,0029	0,68
0,80	0,510	0,525	0,519	0,518	0,0075	1,46
1,00	0,646	0,631	0,636	0,638	0,0076	1,20

Abs: Absorvância; DP: desvio padrão, DPR%: desvio padrão relativo.

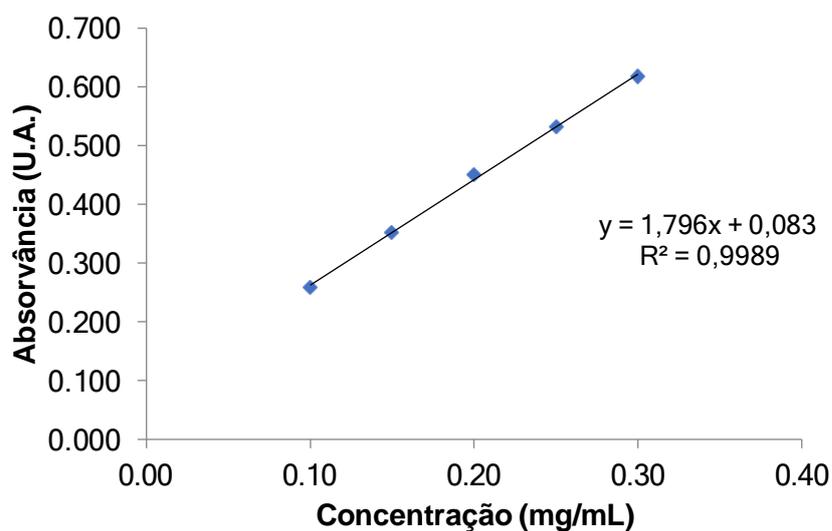
Fonte: A autora (2024).

A Figura 20 mostra as curvas de linearidade obtidas para polifenóis totais, em que os coeficientes de determinação referente as partes aéreas foram 0,9996, 0,9989 e 0,9999. A Figura 21 mostra a curva de linearidade média de polifenóis totais obtida, com o valor de equação da reta obtida pela regressão linear e o coeficiente de determinação de 0,9998, demonstrando alta correlação linear entre as variáveis y e x.

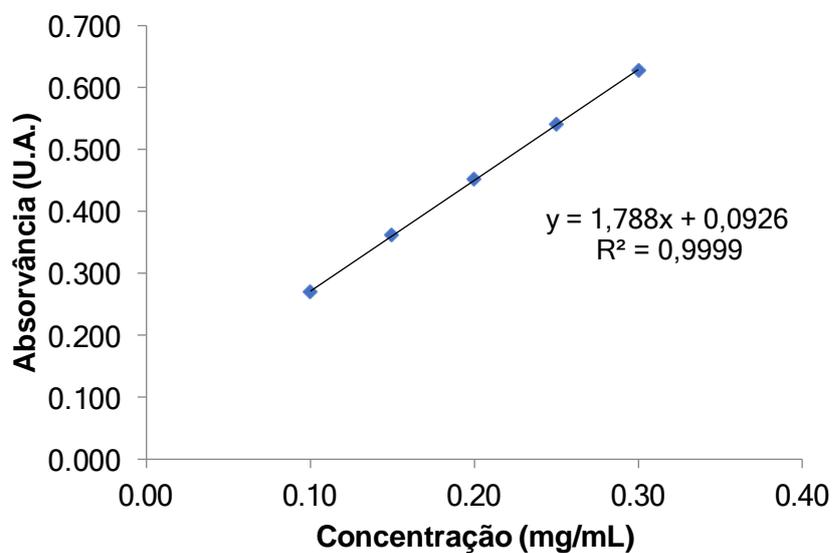
Figura 20 - Curvas analíticas para a verificação da linearidade do método a partir da solução extrativa das partes aéreas de *A. hispidum*.



A



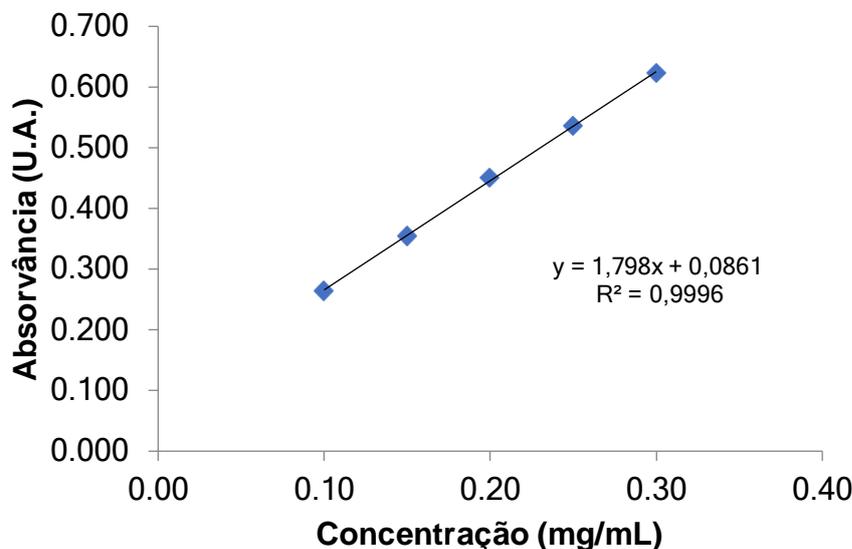
B



C

Fonte: A autora (2024).

Figura 21 - Curva analítica média obtida para a verificação da linearidade do método a partir da solução obtida das partes aéreas de *A. hispidum*.



Fonte: A autora (2024).

Os resultados da análise de regressão linear, obtidos por meio da aplicação de Análise de Variância (ANOVA), encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 - Análise de Variância (ANOVA) realizada para a curva analítica média da solução extrativa das partes aéreas de *A. hispidum*.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
<b>Regressão</b>	1	0,243180033	0,243180033	13990,3	4,23579E-21
<b>Resíduo</b>	13	0,000225967	0,00001738		
<b>Total</b>	14	0,243406			

*gl*: graus de liberdade, *SQ*: soma quadrática, *MQ*: média quadrática.

Fonte: A autora (2024).

A significância do coeficiente angular foi avaliada a partir do teste F da ANOVA, o F calculado foi superior ao F de significação, assim, rejeita-se a hipótese que o coeficiente angular é igual a zero, aceitando a hipótese que este coeficiente é diferente de zero, e que y efetivamente varia em função de x, assim, o método pode ser considerado linear.

A Tabela 13 descreve os resíduos calculados a partir da curva analítica obtida. A análise destes resíduos foi realizada a fim de avaliar sua normalidade e homoscedasticidade. A normalidade foi avaliada a partir de análise visual do gráfico de distribuição dos resíduos em função da concentração e da resposta (Figura 22), a distribuição aleatória dos resíduos em torno de zero indica normalidade na distribuição.

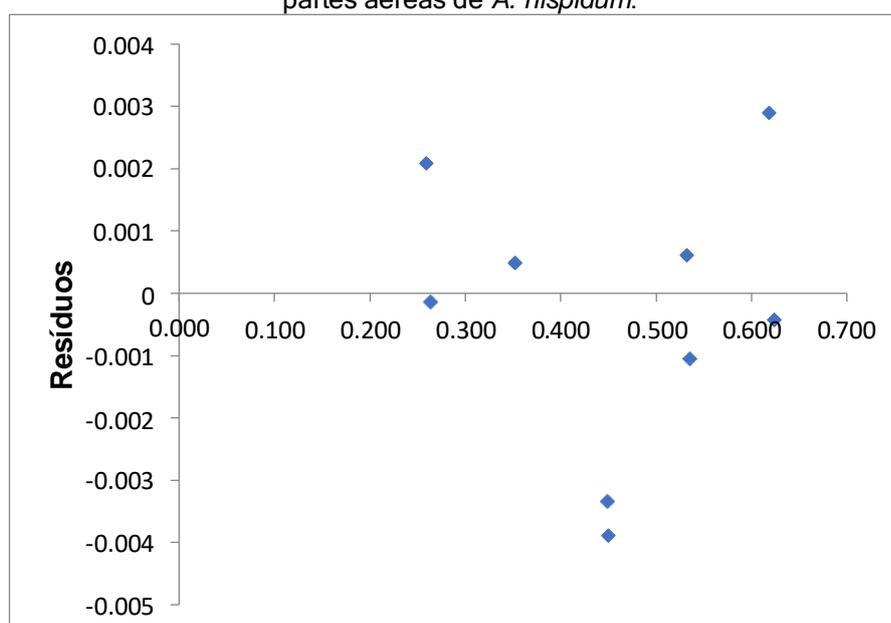
Para avaliação da homoscedasticidade dos resíduos aplicou-se o teste de Cochran. Inicialmente foi calculada a variância do valor de  $y$  em cada nível de concentração, e testou-se a hipótese de que as variâncias são todas iguais. Para isso, calculou-se o valor de  $C$  que foi comparado com o valor de  $C_{\text{crítico}}$ . Como o valor de  $C$  foi de 0,581, inferior ao valor de  $C_{\text{crítico}}$  (0,684), aceita-se a hipótese, as variâncias de  $y$  são iguais e os resíduos são homoscedásticos.

Tabela 13 - Análise dos resíduos de acordo com a regressão (Amostra).

<b>Observação</b>	<b>Y previsto</b>	<b>Resíduos</b>
1	0,100129824	-0,000129824
2	0,149510078	0,000489922
3	0,203329006	-0,003329006
4	0,251044756	-0,001044756
5	0,30042501	-0,00042501
6	0,097910487	0,002089513
7	0,149510078	0,000489922
8	0,20388384	-0,00388384
9	0,249380254	0,000619746
10	0,297096004	0,002903996
11	0,097910487	0,002089513
12	0,149510078	0,000489922
13	0,20388384	-0,00388384
14	0,249380254	0,000619746
15	0,297096004	0,002903996

Fonte: A autora (2024).

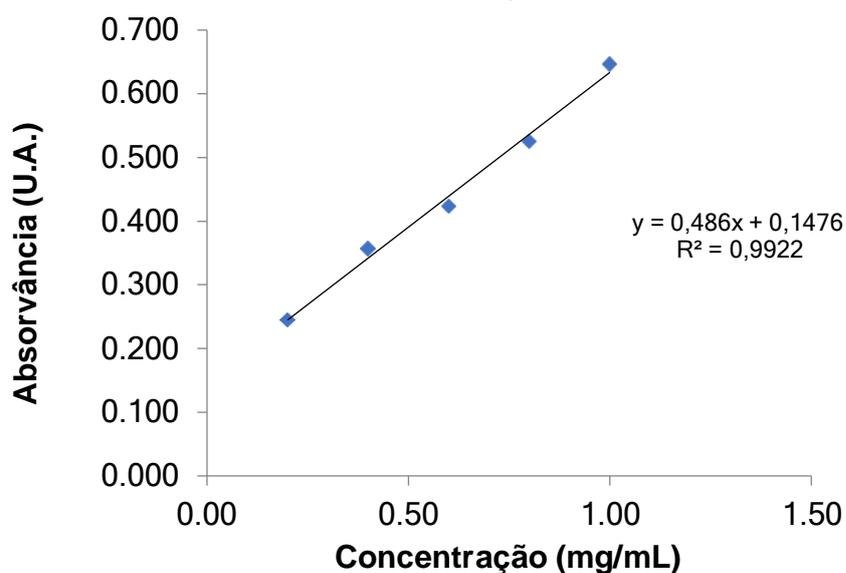
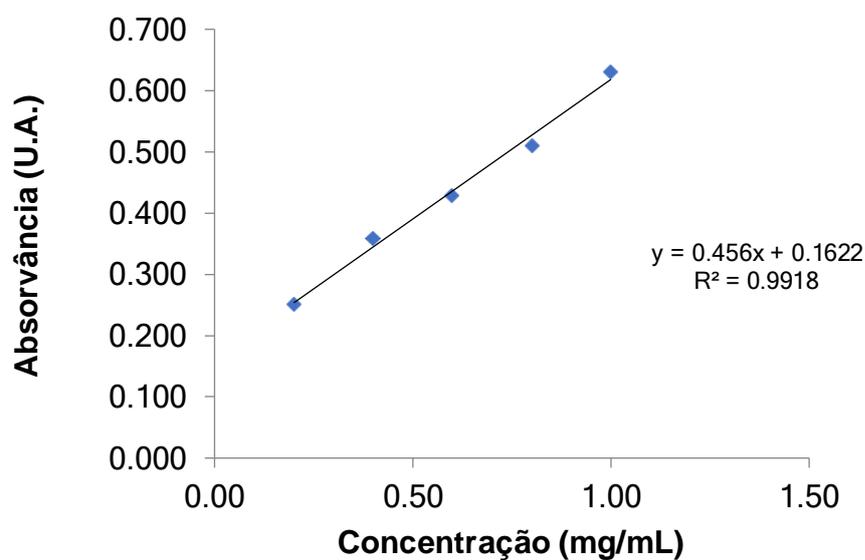
Figura 22 - Gráfico dos resíduos obtido a partir da regressão da curva da solução obtida a partir das partes aéreas de *A. hispidum*.

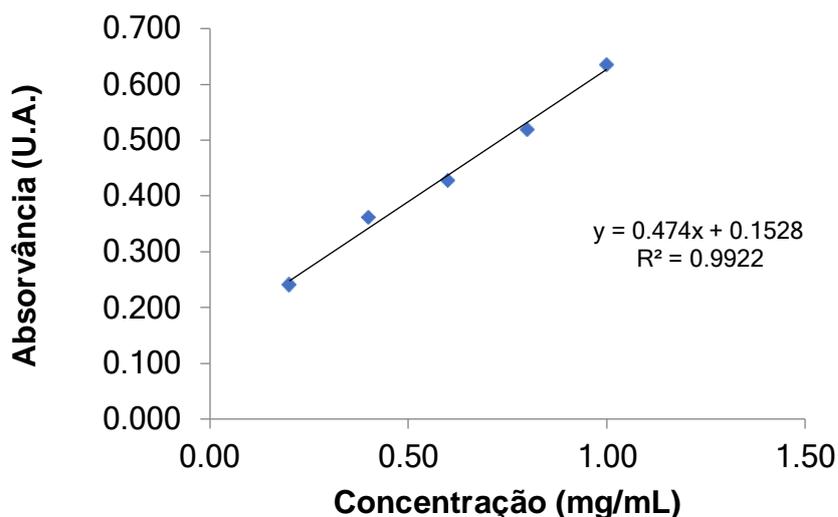


Fonte: A autora (2024).

A Figura 23 mostra as curvas de linearidade obtidas para polifenóis totais, em que os coeficientes de determinação referente as raízes foram 0,9922, 0,9918 e 0,9922. A Figura 24 mostra a curva de linearidade média de polifenóis totais obtida, com o valor de equação da reta obtida pela regressão linear e o coeficiente de determinação de 0,9924, demonstrando alta correlação linear entre as variáveis y e x.

Figura 23 - Curvas analíticas para a verificação da linearidade do método a partir da solução obtida das raízes de *A. hispidum*.

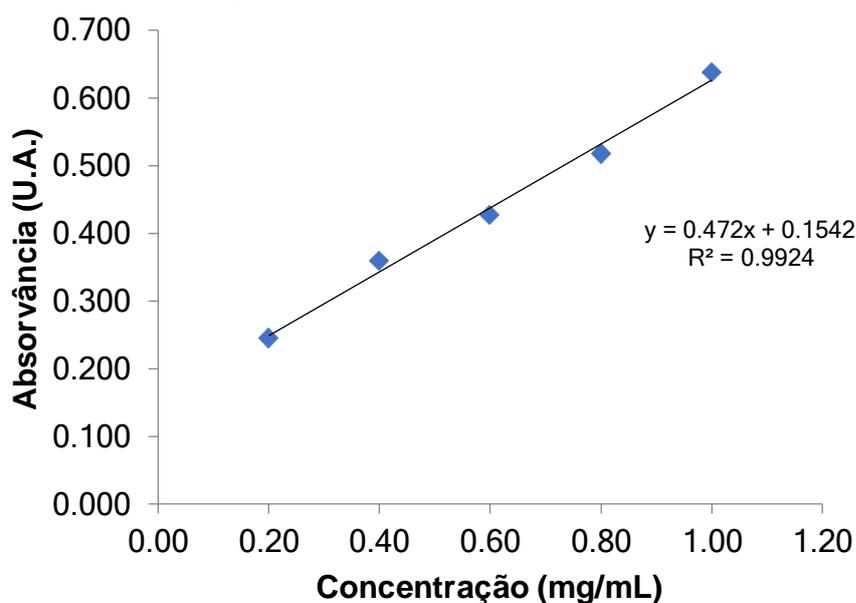
**A****B**



C

Fonte: A autora (2024).

Figura 24 - Curva analítica média obtida para a verificação da linearidade do método a partir da solução obtida das raízes de *A. hispidum*.



Fonte: A autora (2024).

Os resultados da análise de regressão linear, obtidos por meio da aplicação de Análise de Variância (ANOVA), encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14 - Análise de Variância (ANOVA) realizada para a curva analítica média da solução extrativa das raízes de *A. hispidum*.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
<b>Regressão</b>	1	0,2673408	0,267341	1480,923	8,82606E-15
<b>Resíduo</b>	13	0,0023468	0,000181		
<b>Total</b>	14	0,2696876			

*gl*: graus de liberdade, *SQ*: soma quadrática, *MQ*: média quadrática.

Fonte: A autora (2024).

A significância do coeficiente angular foi avaliada a partir do teste F da ANOVA, o F calculado foi superior ao F de significação, assim, rejeita-se a hipótese que o coeficiente angular é igual a zero, aceitando a hipótese que este coeficiente é diferente de zero, e que y efetivamente varia em função de x, assim, o método pode ser considerado linear.

A Tabela 15 descreve os resíduos calculados a partir da curva analítica obtida. A análise destes resíduos foi realizada a fim de avaliar sua normalidade e homoscedasticidade. A normalidade foi avaliada a partir de análise visual do gráfico de distribuição dos resíduos em função da concentração e da resposta (Figura 25), a distribuição aleatória dos resíduos em torno de zero indica normalidade na distribuição.

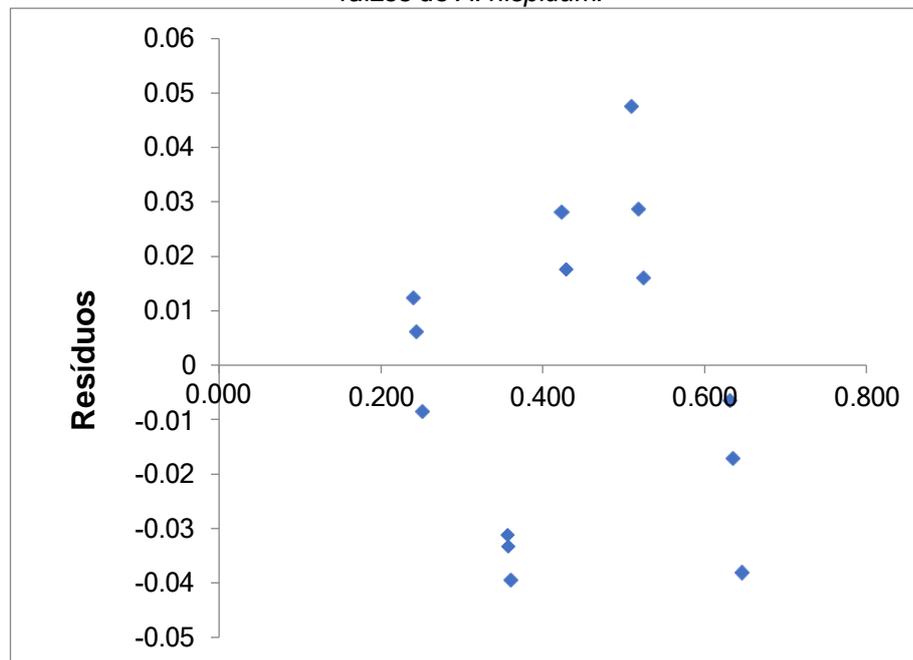
Para avaliação da homoscedasticidade dos resíduos aplicou-se o teste de Cochran. Inicialmente foi calculada a variância do valor de y em cada nível de concentração, e testou-se a hipótese de que as variâncias são todas iguais. Para isso, calculou-se o valor de C que foi comparado com o valor de  $C_{\text{crítico}}$ . Como o valor de C foi de 0,378, inferior ao valor de  $C_{\text{crítico}}$  (0,684), aceita-se a hipótese, as variâncias de y são iguais e os resíduos são homoscedásticos.

Tabela 15 - Análise dos resíduos de acordo com a regressão (Amostra).

<b>Observação</b>	<b>Y previsto</b>	<b>Resíduos</b>
1	0,193819812	0,00618
2	0,431143293	-0,03114
3	0,571857216	0,028143
4	0,783978203	0,016022
5	1,038103346	-0,0381
6	0,208521267	-0,00852
7	0,433243501	-0,03324
8	0,582358255	0,017642
9	0,752475086	0,047525
10	1,006600229	-0,0066
11	0,187519189	0,012481
12	0,439544124	-0,03954
13	0,582358255	0,017642
14	0,771376956	0,028623
15	1,017101268	-0,0171

Fonte: A autora (2024).

Figura 25 - Gráfico dos resíduos obtido a partir da regressão da curva da solução obtida a partir das raízes de *A. hispidum*.



Fonte: A autora (2024).

### 5.3.2.2 Limite de detecção e limite de quantificação

A Tabela 16 mostra os resultados obtidos com a análise de regressão da curva analítica do pirogalol, dados estes utilizados no cálculo dos limites de quantificação e detecção, obtidos com o auxílio do Microsoft Excel® (2022).

Tabela 16 - Resultados da análise de regressão da curva do pirogalol.

	<b>Coeff.</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Stat t</b>	<b>valor-P</b>	<b>LC (95%) inferiores</b>	<b>LC (95%) superiores</b>
Interseção (a)	0,1166	0,008721344	13,369	1,438E-08	0,0976	0,1356
Inclinação (b)	83,5378	2,02663484	41,219	2,692E-14	79,1222	87,9535

Fonte: A autora (2024).

Os resultados dos limites de detecção e quantificação calculados conforme normas consultadas foram LD = 0,00034452 mg/mL e LQ = 0,001043999 mg/mL indicando que o método analítico para o doseamento de taninos totais em matéria prima das partes aéreas e raízes de *A. hispidum* exibe boa sensibilidade.

### 5.3.2.3 Efeito matriz

Devido à complexidade das matrizes vegetais, incluindo a em questão utilizada, e seus possíveis interferente. Foi avaliado o efeito matriz das partes aéreas de *A.*

*hispidum* frente as substâncias de interesse, que neste caso foi o pirogalol (Ferreira, 2016). Os resultados de absorvância obtidos estão descritos na Tabela 17. Para comprovação da ausência de efeito matriz é preciso comprovar que as retas da curva analítica do padrão e da curva de amostra fortificada com padrão são paralelas. Para isso, realizou-se um teste de hipóteses entre os coeficientes angulares das duas curvas, a fim de demonstrar que eles são estatisticamente diferentes.

Tabela 17 - Resultados de efeito matriz obtidos na análise de partes aéreas e raízes de *A. hispidum*.

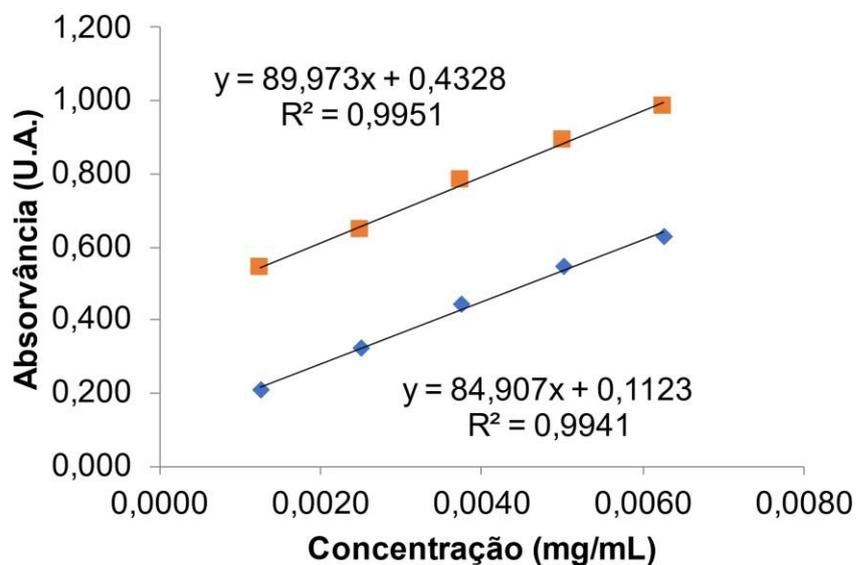
<b>Padrão</b>						
<b>Concentração</b>	<b>Abs 1</b>	<b>Abs 2</b>	<b>Abs 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>DPR%</b>
0,0013	0,208	0,204	0,215	0,209	0,0056	2,66
0,0025	0,322	0,325	0,322	0,323	0,0017	0,54
0,0038	0,444	0,447	0,450	0,447	0,0030	0,67
0,0050	0,547	0,542	0,550	0,546	0,0040	0,74
0,0063	0,626	0,630	0,628	0,628	0,0020	0,32
<b>Amostra (partes aéreas) fortificada com padrão</b>						
<b>Concentração</b>	<b>Abs 1</b>	<b>Abs 2</b>	<b>Abs 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>DPR%</b>
0,10	0,544	0,545	0,545	0,545	0,0006	0,11
0,15	0,649	0,640	0,647	0,645	0,0047	0,73
0,20	0,709	0,712	0,707	0,709	0,0025	0,35
0,25	0,770	0,768	0,765	0,768	0,0025	0,33
0,30	0,849	0,847	0,845	0,847	0,0020	0,24
<b>Amostra (Raízes) fortificada com padrão</b>						
<b>Concentração</b>	<b>Abs 1</b>	<b>Abs 2</b>	<b>Abs 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>DPR%</b>
0,20	0,531	0,530	0,539	0,533	0,0049	0,92
0,40	0,618	0,616	0,612	0,615	0,0031	0,50
0,60	0,677	0,685	0,682	0,681	0,0040	0,59
0,80	0,723	0,729	0,728	0,727	0,0032	0,44
1,00	0,793	0,794	0,795	0,794	0,0010	0,13

Abs: absorvância, DP: desvio padrão, DPR%: desvio padrão relativo.

Fonte: A autora (2024).

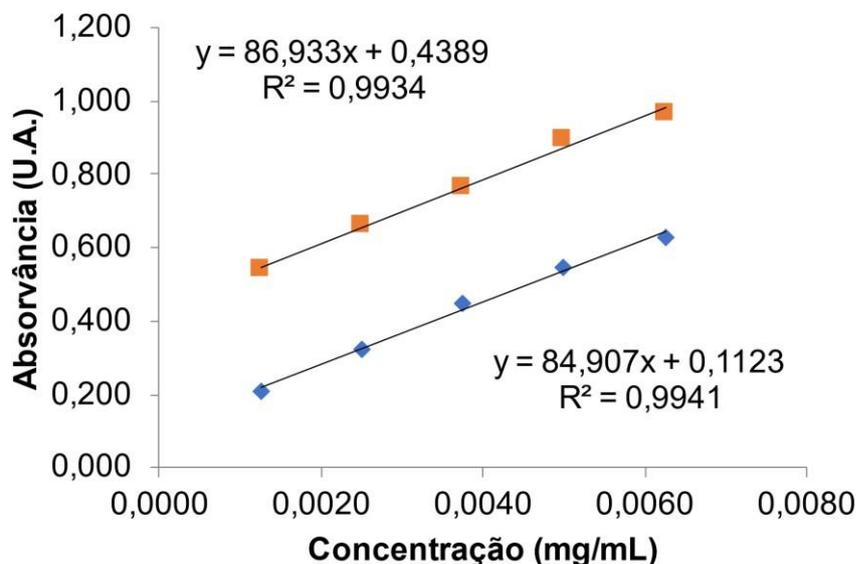
Após obter os resultados foi possível evidenciar o paralelismo entre as retas da linearidade e especificidade, demonstrando assim, a capacidade do método em detectar a presença de impurezas nas substâncias de interesse. Os resultados encontrados tanto para as raízes quanto as partes aéreas, podem ser visualizados nas Figuras 26 e 27, nela é possível observar a semelhança entre seus coeficientes angulares, comprovando a eficiência da metodologia em obter respostas para a substâncias de interesse.

Figura 26 - Curva de especificidade e linearidade das partes aéreas de *A. hispidum*.



Fonte: A autora (2024).

Figura 27 - Curva de especificidade e linearidade das raízes de *A. hispidum*.



Fonte: A autora (2024).

#### 5.3.2.4 Precisão

A precisão, que mede o grau de concordância entre os resultados em condições iguais ou diferentes, foi verificada em dois níveis distintos: a repetibilidade, que examina as amostras nas mesmas condições de operação, com o mesmo analista

e instrumento em uma única corrida analítica, e a precisão intermediária, que usa a mesma amostra por analistas e dias diferentes. Os valores estabelecidos pela legislação do DPR para esta análise, é determinado que está seja abaixo de 5%. Sendo assim, os resultados obtidos afirmam que os métodos propostos para a quantificação de polifenóis totais podem ser considerados precisos e atender aos requisitos definidos pela RDC 166. Os resultados obtidos para a precisão intercorrida das partes aéreas e das raízes estão reunidos e podem ser visto na tabela.

As Tabelas 18 e 19 apresenta os resultados obtidos no ensaio de repetibilidade, valores de absorvância e teor, para o método de doseamento de polifenóis totais nas partes aéreas e raízes de *A. hispidum* por UV-VIS. Os ensaios foram realizados em sextuplicata, no mesmo dia e pelo mesmo operador. A precisão foi avaliada em dois níveis distintos: repetibilidade, também chamada de precisão intracorrída e a precisão que pode ser chamada de intercorrida. Considerando os dados da repetibilidade, seja para as partes aéreas ou para as raízes de *A. hispidum*, os teores taninos totais foram de  $4,108 \pm 0,0691$  g% (1,51%) e  $2,664 \pm 0,0126$  g% (0,47%), para as partes aéreas para as raízes, respectivamente. As variabilidades observadas para os desvios padrão relativos (DPR%) se encontram dentro dos limites exigidos pela legislação (DPR máximo de 5%).

Tabela 18 - Repetibilidade do doseamento de polifenóis totais nas partes aéreas de *A. hispidum*.

<b>Amostras</b>	<b>Amostra</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Padrão</b>	<b>Absorvância</b>	<b>PT (%)</b>
1		0,477		0,447	4,1662
2		0,477		0,447	4,1662
3		0,478		0,450	4,1471
4		0,465		0,447	4,0614
5		0,468		0,447	4,0876
6		0,463		0,450	4,0170
<b>Média</b>		0,471		0,448	4,108
<b>DP</b>		0,0068		0,0015	0,0619
<b>DPR%</b>		1,44		0,35	1,51

DP: desvio padrão, DPR: Desvio padrão relativo (%), PFT: polifenóis totais.

Fonte: A autora (2024).

Tabela 19 - Repetibilidade do doseamento de polifenóis totais nas raízes de *A. hispidum*.

<b>Amostras</b>	<b>Amostra</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Padrão</b>	<b>Absorvância</b>	<b>TP (%)</b>
1		0,461		0,447	2,6836
2		0,459		0,447	2,6719
3		0,458		0,450	2,6661
4		0,455		0,447	2,6487
5		0,457		0,447	2,6603
6		0,456		0,450	2,6545

<b>Média</b>	0,458	0,448	2,664
<b>DP</b>	0,0022	0,0015	0,0126
<b>DPR%</b>	0,47	0,35	0,47

DP: desvio padrão, DPR: Desvio padrão relativo (%), PFT: polifenóis totais.  
Fonte: A autora (2024).

A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos no ensaio de precisão intermediária (valores de absorbância e teor), no primeiro dia de análise quanto aos operadores 1 e 2 respectivamente, com relação ao método de doseamento de totais polifenóis totais nas partes aéreas de *A. hispidum*. por UV-VIS realizado em triplicata.

Tabela 20 - Precisão intermediária do doseamento de polifenóis totais nas partes aéreas de *A. hispidum*.

<b>Amostras</b>	<b>Dia 1 - TPT</b>	<b>Dia 2 - TPT</b>
<b>OP1</b>	4,169 ± 0,005 (0,12)	4,064 ± 0,022 (0,54)
<b>OP2</b>	3,989 ± 0,050 (1,25)	4,058 ± 0,005 (0,12)

OP1: Operador 1, OP2: Operador 2.  
Fonte: A autora (2024).

A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos no ensaio de precisão intermediária (valores de absorbância e teor), no segundo dia de análise quanto aos operadores 1 e 2 respectivamente, com relação ao método de doseamento de polifenóis totais nas raízes de *A. hispidum* por UV-VIS realizado em triplicata.

Tabela 21 - Precisão intermediária do doseamento de polifenóis totais nas raízes de *A. hispidum*.

<b>Amostras</b>	<b>Dia 1 - TPT</b>	<b>Dia 2 - TPT</b>
<b>OP1</b>	2,497 ± 0,000 (0,00)	2,495 ± 0,018 (0,71)
<b>OP2</b>	2,453 ± 0,012 (0,49)	2,427 ± 0,000 (0,00)

OP1: Operador 1, OP2: Operador 2  
Fonte: A autora (2024).

### 5.3.2.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação, no qual a solução amostra na concentração 100% foi fortificada com as soluções padrão (Pirogalol) em três níveis de concentração (baixo – 80%, médio – 100%, alto – 120%), sendo obtido o percentual de recuperação do marcador, no qual o valor aceitável deve permanecer na faixa de concentração de trabalho. Nos três níveis, as amostras foram preparadas em triplicata e a recuperação calculada, sendo obtidas recuperações de 75,77 a 87,88% e em média de 82,29% para as partes aéreas e 82,96 a 90,88% e em média de 86,56%, demonstrando que o método desenvolvido apresenta exatidão satisfatória,

pois, estão dentro dos limites de 80% a 120% indicados pela RCD 166/2017 (BRASIL, 2017).

Tabela 22 - Ensaio de recuperação para as partes aéreas de *A. hispidum*.

Amostras	Absorbâncias			Concentração (mg/mL)			Exatidão (%)		
	80	100	120	80	100	120	80	100	120
1	80	100	120	80	100	120	80	100	120
2	0,544	0,784	0,979	0,0050	0,0079	0,0102	75,60	82,62	87,07
3	0,545	0,787	0,983	0,0050	0,0079	0,0102	75,77	82,99	87,48
Média	0,545	0,789	0,987	0,0050	0,0079	0,0103	75,77	83,23	87,88
DP	0,545	0,787	0,983	0,005	0,008	0,010	75,717	82,945	87,475
DPR %	0,0006	0,0025	0,0040	0,0000	0,0000	0,0000	0,1011	0,3095	0,4019

DP: desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%).

Fonte: A autora (2024).

Tabela 23 - Ensaio de recuperação para as raízes de *A. hispidum*.

Amostras	Absorbâncias			Concentração (mg/mL)			Exatidão (%)		
	80	100	120	80	100	120	80	100	120
1	0,537	0,763	0,960	0,0050019	0,0076637	0,0099839	82,38	85,95	90,24
2	0,540	0,765	0,966	0,0050373	0,0076872	0,0100545	82,96	86,22	90,88
3	0,541	0,766	0,966	0,0050491	0,0076990	0,0100545	83,16	86,35	90,88
Média	0,539	0,765	0,964	0,005	0,008	0,010	82,833	86,174	90,667
DP	0,0021	0,0015	0,0035	0,0000	0,0000	0,0000	0,4038	0,2018	0,3688
DPR %	0,39	0,20	0,36	0,49	0,23	0,41	0,49	0,23	0,41

DP: desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%).

Fonte: A autora (2024).

### 5.3.2.6 Robustez

A robustez do método foi determinada ao realizar pequenas alterações na metodologia. As variações realizadas avaliaram os seguintes parâmetros: leitura das amostras executada em diferentes equipamentos, reação realizada com presença e ausência de luminosidade, avaliação da estabilidade dos extratos de *A. hispidum* no dia 1 e no dia 3. Os resultados obtidos demonstraram que as alterações realizadas não influenciaram significativamente os teores encontrados.

O método proposto foi capaz de resistir as diferentes condições experimentais propostas, tanto para as raízes quanto para as partes aéreas, ambos apresentaram coeficiente de variação menor que 5%. As maiores alterações foram observadas no ensaio com presença ou ausência de luminosidade para as análises das raízes ressaltar a importância na padronização da metodologia aplicada.

Os valores de desvio padrão relativo calculado entre as diferenças nos parâmetros avaliados para as partes aéreas permaneceram abaixo do preconizado em resolução, sendo igual a 1,95%, 1,67% e 2,12%, respectivamente em relação a luminosidade e equipamento de leitura da amostra e a estabilidade da solução.

Tabela 24 - Robustez, parâmetro luminosidade para as partes aéreas de *A. hispidum*.

	<b>Sem luz</b>	<b>Padrão</b>	<b>PT (%)</b>
<b>Média</b>	0,437	0,448	3,808
<b>DP</b>	0,0026	0,0017	0,0345
<b>DPR%</b>	0,61	0,39	0,91
	<b>Com luz</b>	<b>Padrão</b>	<b>PT (%)</b>
<b>Média</b>	0,423	0,448	3,683
<b>DP</b>	0,0012	0,0017	0,0211
<b>DPR%</b>	0,27	0,39	0,57

DP: desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%); PT: polifenóis totais.  
Fonte: A autora (2024).

Tabela 25 - Robustez, parâmetro estabilidade da solução das partes aéreas de *A. hispidum*.

	<b>Estabilidade D1</b>	<b>Padrão</b>	<b>PT (%)</b>
<b>Média</b>	0,453	0,448	3,951
<b>DP</b>	0,0015	0,0017	0,0221
<b>DPR%</b>	0,34	0,39	0,56
	<b>Estabilidade D2</b>	<b>Padrão</b>	<b>PT (%)</b>
<b>Média</b>	0,437	0,448	3,808
<b>DP</b>	0,0026	0,0017	0,0345
<b>DPR%</b>	0,61	0,39	0,91

DP: desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%); PT: polifenóis totais.  
Fonte: A autora (2024).

Tabela 26 - Robustez, parâmetro equipamento diferente para as partes aéreas de *A. hispidum*.

	<b>Equipamento 1</b>	<b>Padrão</b>	<b>PT (%)</b>
<b>Média</b>	0,422	0,448	3,675
<b>DP</b>	0,0029	0,0017	0,0109
<b>DPR%</b>	0,68	0,39	0,30
	<b>Equipamento 2</b>	<b>Padrão</b>	<b>PT (%)</b>
<b>Média</b>	0,410	0,448	3,570
<b>DP</b>	0,0047	0,0017	0,0278
<b>DPR%</b>	1,15	0,39	0,78

DP: desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%); PT: polifenóis totais.  
Fonte: A autora (2024).

Os valores de desvio padrão relativo calculado entre as diferenças nos parâmetros avaliados para as raízes permaneceram abaixo do preconizado em resolução, sendo igual a 1,95%, 2,50% e 0,86%, respectivamente em relação a luminosidade e equipamento de leitura da amostra e a estabilidade da solução.

Tabela 27 - Robustez, parâmetro luminosidade nas raízes de *A. hispidum*.

	<b>Sem luz</b>	<b>Padrão</b>	<b>PT (%)</b>
<b>Média</b>	0,413	0,448	2,404
<b>DP</b>	0,0010	0,0017	0,0058
<b>DPR%</b>	0,24	0,39	0,24
	<b>Com luz</b>	<b>Padrão</b>	<b>PT (%)</b>
<b>Média</b>	0,369	0,448	2,150
<b>DP</b>	0,0032	0,0017	0,0187
<b>DPR%</b>	0,87	0,39	0,87

DP: desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%); PT: polifenóis totais.  
Fonte: A autora (2024).

Tabela 28 - Robustez, parâmetro estabilidade da solução nas raízes de *A. hispidum*.

	<b>Estabilidade D1</b>	<b>Padrão</b>	<b>PT (%)</b>
<b>Média</b>	0,407	0,448	2,367
<b>DP</b>	0,0006	0,0017	0,0034
<b>DPR%</b>	0,14	0,39	0,14
	<b>Estabilidade D2</b>	<b>Padrão</b>	<b>TT (%)</b>
<b>Média</b>	0,413	0,448	2,404
<b>DP</b>	0,0010	0,0017	0,0058
<b>DPR%</b>	0,24	0,39	0,24

DP: desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%); PT: polifenóis totais.  
Fonte: A autora (2024).

Tabela 29 - Robustez, parâmetro equipamento diferente nas raízes de *A. hispidum*.

	<b>Equipamento 1</b>	<b>Padrão</b>	<b>PT (%)</b>
<b>Média</b>	0,381	0,448	2,216
<b>DP</b>	0,0012	0,0017	0,0067
<b>DPR%</b>	0,30	0,39	0,30
	<b>Equipamento 2</b>	<b>Padrão</b>	<b>PT (%)</b>
<b>Média</b>	0,398	0,448	2,319
<b>DP</b>	0,0015	0,0017	0,0089
<b>DPR%</b>	0,38	0,39	0,38

DP: desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%); PT: polifenóis totais.  
Fonte: A autora (2024).

É importante destacar que os planejamentos foram realizados usando somente as partes aéreas, pois eles exigem uma grande quantidade de material vegetal. Como o material é de difícil acesso e limitado a uma determinada época do ano, esse foi um dos principais motivos para continuar apenas com as partes aéreas. Além disso, as partes aéreas possuem mais metabólitos do que as raízes. Assim, decidiu-se que o estudo prosseguiria apenas com as partes aéreas.

## 5.4 PLANEJAMENTO SIMPLEX CENTROIDE

Modelos matemáticos foram ajustados e avaliados através de ANOVA e coeficiente de determinação ( $R^2$ ), com o auxílio do programa computacional Satastatistica10 (Statsoft®, 2010). Foram testados os modelos linear, quadrático e especial cúbico. O modelo linear foi descartado, devido aos seus baixos valores de  $R^2$ , o que de certa forma é explicado, devido à natureza multifatorial que envolve os fenômenos da extração. Dentre os demais modelos, o especial cúbico foi o que apresentou os melhores ajustes aos dados experimentais, com  $R^2$  próximos a 0,9.

Tabela 30 - Resultados obtidos no planejamento simplex centroide para as partes aéreas de *A. hispidum*.

Exp	Solventes (%)			Variáveis Respostas		
	H <sub>2</sub> O	MeOH	EtOH	RS (%)	PT (%)	E.E (PT/RS)
1	1	0	0	0,64 (0,046)	8,51 (0,020)	12,85 (0,946)
2	0	1	0	0,42(0,006)	6,75 (0,026)	15,51 (0,069)
3	0	0	1	0,09(0,015)	0,66 (0,000)	44,87 (3,230)
4	0,50	0,50	0	0,78(0,030)	3,95 (0,057)	14,92 (0,631)
5	0,50	0	0,50	0,76 (0,021)	12,28 (0,035)	16,12 (0,412)
6	0	0,50	0,50	0,17 (0,038)	5,26 (0,040)	27,17 (2,130)
7	0,33	0,33	0,33	0,62 (0,006)	0,80 (0,006)	15,93 (0,778)

H<sub>2</sub>O: água; MeOH: metanol; EtOH: Etanol; RS: Resíduo Seco; PT: Teor de polifenóis totais; E.E: Eficiência de extração pelo teor de polifenóis.

Fonte: A autora (2024).

Tabela 31 - Modelos obtidos no planejamento simplex centroide para as partes aéreas de *A. hispidum*.

Respostas	Modelos	Cúbico especial		
		F	p	( $R^2$ )
Resíduo seco	$V=0,64x+0,41y+0,09z+1,00xy+1,56xz-0,33yz-0,33xyz$	15,71	0,00011	0,9913
Polifenóis	$v=8,19x+6,5y+3,8067z+17,12xy+24,76xz-0,2534yz-25,07xyz$	5,84	0,01111	0,9998
E.E.	$v=12,84x+15,51y+41,54z+2,96xy-44,30xz+7,9yz-98,55xyz$	20,73	0,00021	0,9603)

E.E: Eficiência de extração pelo teor de polifenóis.

Fonte: A autora (2024).

#### 5.4.1 Resíduo seco

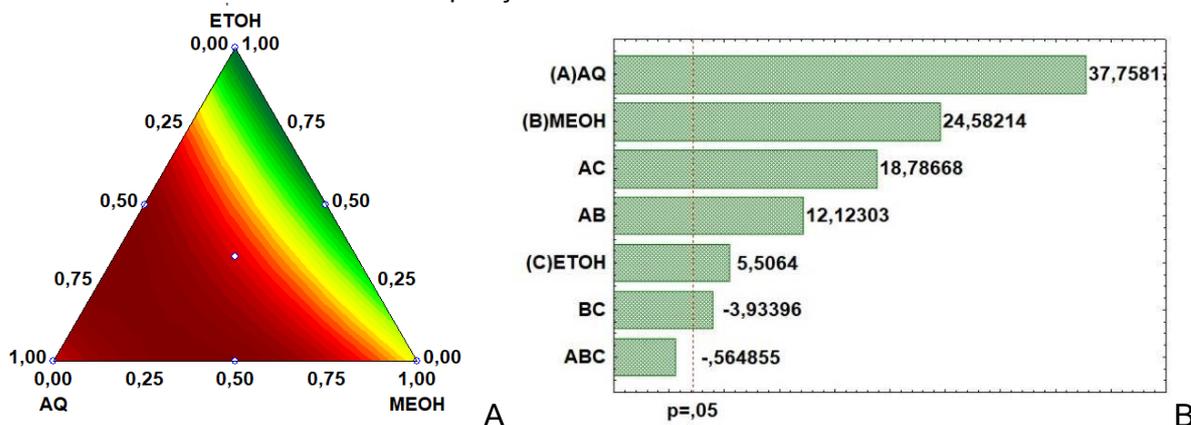
É possível observar nos resultados que a utilização de solventes orgânicos puros proporcionou os menores rendimentos em sólidos. Conforme as misturas foram sendo formadas, os sistemas apresentaram maior eficiência extrativa resultando no aumento do teor de substâncias extraíveis. Portanto, os dados revelam que as misturas binárias, compostas por água: metanol e água: etanol 50% (v/v) foram encarregadas pelos maiores rendimentos dos sólidos, visto que essas soluções são compostas por solventes polares e apolares, indicando que essas misturas de solventes possuem uma capacidade de extrair as substâncias orgânicas e hidrofílicas presentes nas partes aéreas de *A. hispidum*. Com isso, a extração utilizando as misturas hidroalcoólicas tiveram uma maior capacidade de extração, pois através destas foi possível extrair compostos polares ou hidrofílicos da fase orgânica para a fase aquosa, ou vice-versa, dependendo da solubilidade desses compostos para cada soluto.

Nas circunstâncias apresentadas, os RS obtidos foram  $0,78 \pm 0,030\%$  (3,8%) e  $0,76 \pm 0,0208\%$  (2,8%) para as misturas binárias água: metanol e água: etanol, respectivamente. Essas misturas não apresentam diferenças estatísticas significativas em relação os valores de resíduo seco realizado através do teste t. Vale ressaltar que o emprego dos solventes orgânicos puros, metanol e etanol; resultaram na redução da capacidade extrativa do sistema com piora no rendimento de sólidos, cujos valores foram de  $0,42 \pm 0,0058\%$  (1,4%) para o metanol e  $0,09 \pm 0,0153\%$  (16,4%) para o etanol. Isso demonstra que a utilização desses solventes isoladamente possui uma baixa seletividade para a extração dos componentes dessa matriz, visto que estes solventes isoladamente teriam apenas a capacidade de extrair compostos orgânicos ou hidrofílicos quando utilizado solventes de maior ou menor polaridade.

Para a avaliação do comportamento do resíduo seco, os modelos matemáticos foram empregados na geração do gráfico de contornos (Figura 28A). A dependência do RS de diversos termos do modelo foi comprovada pelo gráfico de efeitos padronizados ou de Pareto (Figura 29B). Nele é possível observar que os fatores lineares: água (+37,75) e metanol (+24,78) foram os termos que exerceram maior influência, ambos contribuindo para o aumento do teor de RS nos extratos. Além disso, também apresentaram interação positiva as misturas água: etanol (+18,78) e água: metanol (+12,12). Ainda de acordo com a superfície do gráfico de contorno, destaca-

se região de coloração mais avermelhadas que corresponde às condições mais apropriadas para maximizar o rendimento do RS.

Figura 28 - Gráficos de contorno (A) e de Pareto (B) para os teores de resíduo seco nas diferentes composições de misturas testadas.



Fonte: A autora (2024).

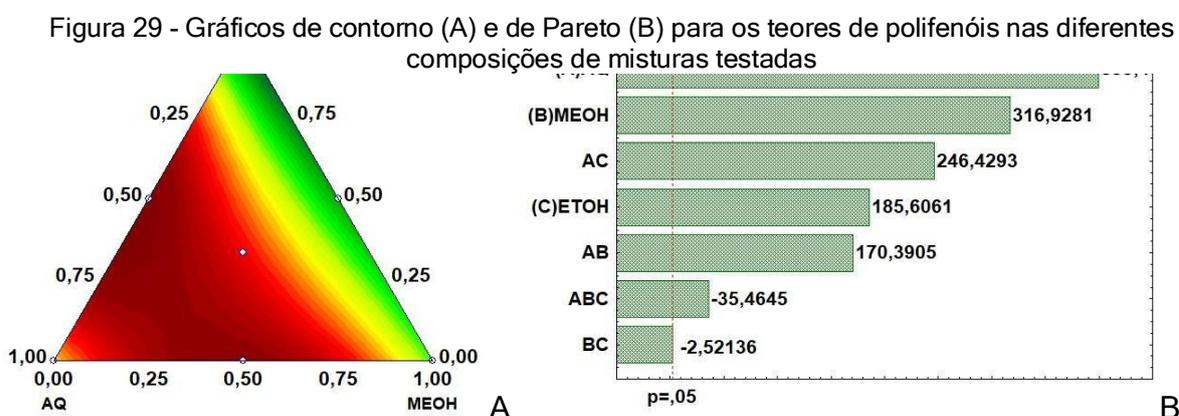
Para o desenvolvimento tecnológico de uma formulação, sobretudo formas sólidas faz-se necessário estudos acerca de operações de secagem a qual o resíduo seco está diretamente relacionado. Sendo assim, o RS tem papel importante para o sucesso da viabilidade de produtos e está relacionado a capacidade extrativa dos componentes naquele solvente a partir da matriz. Porém, o resíduo seco não demonstrou uma correlação direta com os componentes químicos extraídos da amostra, pois uma determinada substância pode ter maior afinidade por um solvente, não sendo necessariamente aquele que resulta em maior teor de sólidos (Cunha *et al.*, 2009).

#### 5.4.2 Polifenóis totais

Considerando a relevância do teor de marcadores para a manutenção das propriedades biológicas e para garantia da reprodutibilidade da qualidade dos derivados da matéria-prima vegetal, a investigação do teor de fitoquímicos é fundamental durante o processo de desenvolvimento e avaliação das operações e condições de preparação de extratos vegetais. De acordo com os resultados encontrados, o teor de polifenóis foi menos sensível a utilização dos solventes orgânicos puros, em comparação com as combinações de solventes. Considerando

as misturas binárias, a combinação de água: etanol  $12,28 \pm 0,3500$  g% (2,85%) foi responsável pelo maior rendimento em teor de polifenóis totais. É possível evidenciar através dos dados contidos na tabela 32 que a presença da água nas misturas binárias exibiu uma maior relevância, para a extração dos compostos pertencente a classe dos polifenóis.

Como também foi destacado para o resíduo seco, a análise estatística do modelo matemático e o gráfico de Pareto, mostrou a importância de diversos fatores sobre o teor de polifenóis (Figura 29B). Neste contexto, os termos lineares: água (+386,13), metanol (+306,27) etanol (+179,37), apresentaram influência positiva. Além disso, os fatores de interação das misturas binárias etanol: água (+238,03) e metanol: água (+164,61) também se destacaram positivamente. Com isso, foi possível inferir que as misturas também impactam favoravelmente sob a resposta do teor de polifenóis. A avaliação do gráfico de contorno denota a destacada contribuição das misturas dos solventes (água :etanol e água: metanol) sobre a resposta (Figura 30A), conforme demonstrado pela análise estatística através do gráfico de Pareto (Figura 30B).



Fonte: A autora (2024).

É notória a contribuição da água para o aumento do rendimento de polifenóis totais nos extratos. Merece destaque, ainda, o efeito sinérgico das misturas binárias, ou seja, o efeito positivo da combinação de água com os outros solventes sobre a extração de polifenóis. Os resultados podem ser explicados pela natureza das principais classes de compostos relatados para espécie, apresentando caráter de

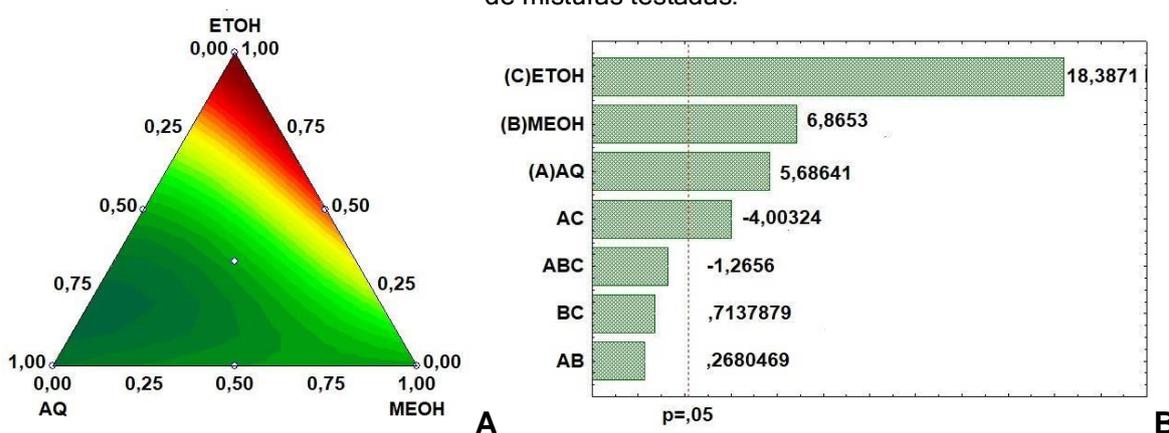
hidrofílico a polaridade intermediária, decorrente do seu elevado número de hidroxilas que apresentam em suas estruturas (Bezerra *et al.*, 2018; Quideau *et al.*, 2011; Simões, 2001; Simões *et al.*, 2016).

### 5.4.3 Eficiência de extração

A eficiência de extração é uma medida que relaciona o teor de marcadores com o teor de sólidos de cada extrato. Essa medida permite avaliar a quantidade e a composição das substâncias extraídas que formam os resíduos sólidos de cada extrato (Cunha *et al.*, 2009). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 30, observa-se que o uso do solvente orgânico etanol puro proporcionou uma maior eficiência de extração de polifenóis, ou seja, o emprego de etanol permitiu que a proporção dos compostos de interesse nos sólidos resultantes do processo extrativo.

A análise do gráfico de contorno demonstra o comportamento inverso ao observado para os dados de resíduo seco e teor de marcadores. O aumento do rendimento de sólidos não correspondeu ao aumento proporcional de compostos de interesse, ao mesmo tempo que, a melhor resposta do teor de marcadores não se traduziu em maior enriquecimento (m/m) dos sólidos extraíveis.

Figura 30 - Gráficos de contorno e de Pareto para eficiência de extração nas diferentes composições de misturas testadas.



Fonte: A autora (2024).

A principal contribuição da eficiência de extração é avaliar a presença de proporcionalidade entre a extração de sólidos e de compostos, com o intuito de otimizar condições de extração (métodos, solventes, concentrações, etc.), que

assegurem o maior grau de enriquecimento dos extratos finais, sem que outras características tecnologicamente relevantes sejam desconsideradas.

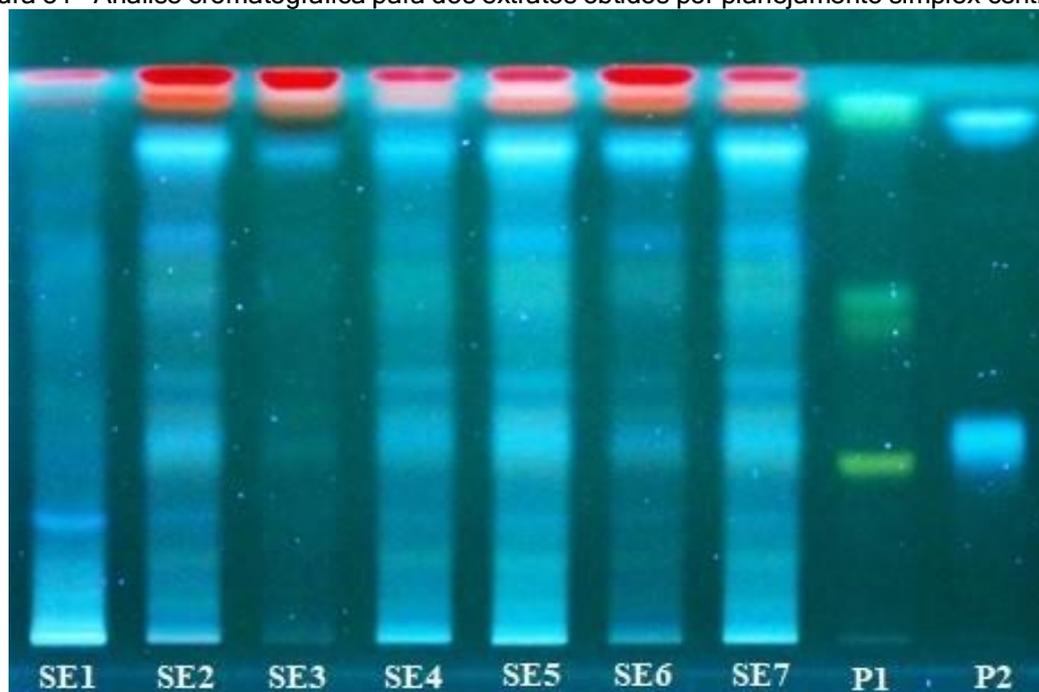
#### **5.4.4 Análise fitoquímica das soluções extrativas por CCD-AE**

Com a finalidade de determinar qualitativamente as amostras obtidas pelo planejamento de misturas, foi realizada uma análise por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), sendo possível identificar variações do perfil químico das diferentes soluções extrativas. Como a espécie em questão estudada ainda não possui um marcador específico, para essa pesquisa foram utilizados padrões das classes de flavonoides (rutina e quercetina) e derivados cinâmicos (ácido cafeico e clorogênico).

A maioria das soluções extrativas obtiveram perfis similares contendo as mesmas bandas, porém de intensidade diferente em cada uma das soluções aplicadas. As soluções extrativas 1 e 3 apresentaram um perfil um pouco diferente das demais amostras (Figura 31).

Observando as bandas encontradas nas amostras e comparando com as bandas encontradas para os padrões avaliados, podemos observar que o perfil das bandas correspondentes à rutina e ao ácido cafeico podem ser evidenciadas em algumas das soluções extrativas e com intensidades diferentes. Com isso é possível constatar a seletividade nos diferentes sistemas de extração utilizado.

Figura 31 - Análise cromatográfica para dos extratos obtidos por planejamento simplex centroide.



Fonte: A autora (2024).

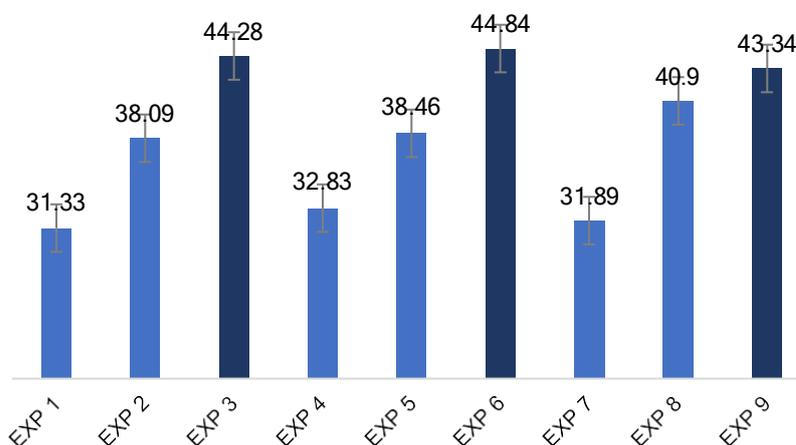
## 5.5 OTIMIZAÇÃO DA SECAGEM POR ASPERSÃO

A otimização do processo foi realizada com a finalidade de selecionar as melhores condições de secagem na qual foram empregados diferentes fluxos de alimentação (0,6, 0,8 e 1,0 L/h) e diferentes temperaturas de entrada (110, 130 e 150 °C).

### 5.5.1 Rendimento

Ao avaliar o rendimento nos experimentos realizados foi possível observar que as diferentes temperaturas utilizadas não apresentaram grandes impactos ao rendimento do processo. Porém, é possível observar que nos experimentos 3, 6 e 9 (Figura 32) apresentaram um maior rendimento e estes experimentos possuíam o mesmo fluxo de alimentação equivalente a 1 L/h. Isso implica dizer que quanto maior o fluxo de alimentação maior o rendimento independente da temperatura utilizada.

Figura 32 - Rendimento das análises das condições de secagem por spray dryer.



Fonte: A autora (2024).

Geralmente, os rendimentos podem ser considerados proveitosos quando obtiverem valores próximos a 50%. No caso desse estudo, o teor de sólidos obtido após a elaboração do extrato das partes aéreas de *A. hispidum* foi muito baixo, não sendo considerado eficiente. Nesse aspecto, alguns fatores podem ser modificados, com o intuito de aumentar o rendimento do processo de secagem por spray dryer e entre os parâmetros relatados na literatura podemos destacar a adição de adjuvantes de secagem, onde pode-se variar o tipo e a proporção utilizada (Martins *et al.*, 2013; Oliveira; Petrovick, 2010a; Soares, 2002).

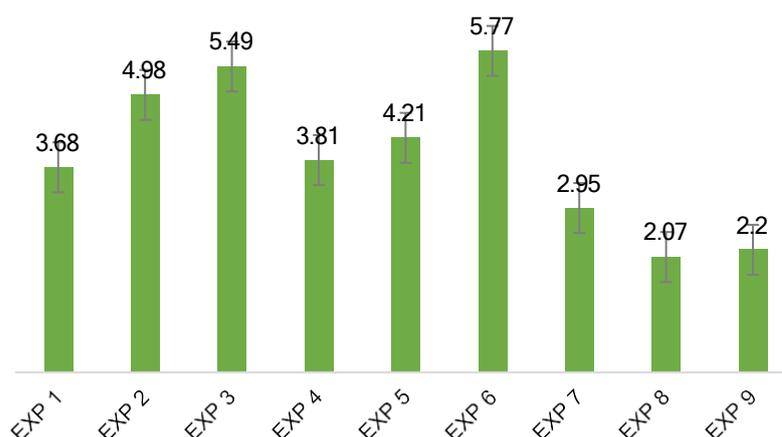
### 5.5.2 Umidade residual

Além de obter produtos intermediários, tais como: pós para incorporação em líquidos, semissólidos e sólidos, o processo de secagem tem como propósito conferir uma maior estabilidade, seja ela microbiológica ou físico-química ou ainda em facilitar manuseio e acondicionamento dos ativos. Desse modo, a umidade residual é um fator indispensável a ser avaliado pois o elevado teor de água no produto seco por aspensão pode indicar que o processo de secagem não foi satisfatório e isso pode levar por exemplo: à proliferação de microrganismos ou a degradação química de alguns compostos presentes na amostra. A umidade residual também pode influenciar nas condições de secagem, como a temperatura de entrada e de saída. Quando a temperatura de entrada é menor, a remoção do solvente é prejudicada, o que faz com

que a umidade residual se mantenha (Arpagaus *et al.*, 2018; Couto *et al.*, 2011; Klein *et al.*, 2015).

Os extratos secos são preparações sólidas que, segundo os compêndios oficiais, devem ter no máximo 5% de umidade residual (Couto *et al.*, 2012; Peixoto; Freitas, 2013). Neste trabalho, avaliou-se a umidade residual do produto seco por aspersão a partir das partes aéreas de *A. hispidum*, utilizando 10% de adjuvante (Aerosil®) em todos os experimentos de secagem, para além de auxiliar no processo, facilitar a retirada da umidade. A umidade residual do produto variou entre 2,07 e 5,77%, ficando próxima ao limite de 5% (Figura 33), e esses valores indicam uma boa estabilidade do produto seco por aspersão e sugerem que o processo foi eficiente na remoção do solvente.

Figura 33 - Umidade residual das condições de secagem por spray dryer

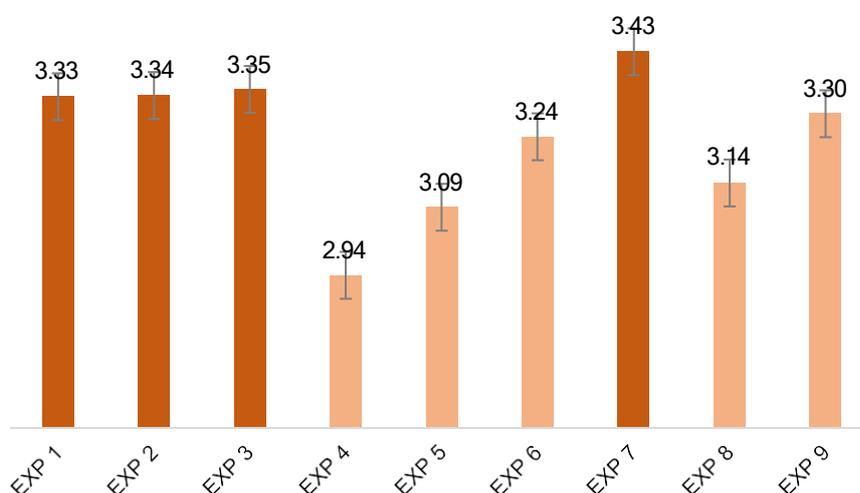


Fonte: A autora (2024).

### 5.5.3 Teor de polifenóis (TP)

Além do rendimento e umidade residual, os teores das substâncias marcadoras também foram quantificados com o intuito de avaliar qualquer tipo de variação que possa interferir na qualidade do extrato seco das partes aéreas de *A. hispidum*. A quantificação desses compostos, foi realizada por espectrofotometria UV-VIS, seguindo as metodologias usadas para avaliar as soluções extrativas (Figura 34).

Figura 34 - Teor de polifenóis das análises das condições de secagem por spray dryer.



Fonte: Da autora (2024).

O experimento de secagem 7 obteve o maior teor de polifenóis entre os testados, mas os experimentos 1, 2 e 3 também apresentaram bons resultados. Esses três experimentos tiveram em comum a temperatura de entrada de 110 °C, o que pode ter influenciado na preservação dos compostos fenólicos. No entanto, os experimentos 3 e 6, que apresentaram fluxo de alimentação de 1 L/H, também não mostraram diferença no teor de polifenóis. Além disso, eles apresentaram rendimentos e valores de umidade residual semelhantes, indicando que o fluxo de alimentação foi um fator determinante para o desempenho da secagem, corroborando com os valores encontrados para o rendimento de secagem.

Após a finalização das análises, que possibilitou verificar as condições ideais para a secagem dos extratos das partes aéreas do *A. hispidum* determinou-se a utilização da temperatura de entrada de 110°C e o fluxo de alimentação de 1L/H.

## 5.6 OTIMIZAÇÃO DE ADJUVANTE

Os adjuvantes de secagem são substâncias que adicionadas à solução extrativa tem como finalidade melhorar o processo de secagem, e podem atuar no rendimento do processo, na estabilidade dos componentes ativos e em algumas propriedades físico-químicas. Alguns exemplos de adjuvante de secagem são: celulose microcristalina, dióxido de silício coloidal, amido, goma xantana, gelatina,

entre outros. Para a determinação do adjuvante foi realizado um novo planejamento de misturas (Tabela 32) e com base nesses dados foram construídos modelos matemáticos e realizada a avaliação por anova e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

Tabela 32 - Rendimento (%), umidade residual e teor de polifenóis por espectrofotometria UV-Vis das partes aéreas de *A. hispidum*.

Exp	Solventes (%)			Variáveis Respostas		
	Aerosil	celulose	gelatina	Rend (%)	UR (%)	PT (%)
1	1	0	0	44,30	3,28	7,42
2	0	1	0	44,88	3,16	8,44
3	0	0	1	31,17	4,58	8,58
4	0,50	0,50	0	51,80	3,34	8,04
5	0,50	0	0,50	45,45	3,01	8,56
6	0	0,50	0,50	42,71	4,47	8,36
7	0,33	0,33	0,33	42,71	2,80	8,04

UR: Umidade Residual; PT: Teor de polifenóis totais; Rend.:Rendimento.  
Fonte: A autora (2024).

Os extratos secos das partes aéreas de *A. hispidum* foram obtidos com diferentes adjuvantes de secagem e caracterizados quanto à umidade residual e ao teor de polifenóis. A tabela 32 mostra o rendimento de secagem dos extratos após o processo, em que maiores rendimentos foram observados nos experimentos 4 (51,80%) e 5 (45,45%), que utilizaram dióxido de silício coloidal como adjuvante. Esse adjuvante pode ter favorecido a formação de partículas mais secas e estáveis (Figura 35), e os baixos rendimentos podem estar relacionados aos equipamentos de bancada utilizados na preparação dos extratos, que apresentaram baixo teor de sólidos na extração. A adição de adjuvantes de secagem não foi suficiente para aumentar significativamente o rendimento dos extratos.

Figura 35 - Extrato seco por aspensão nos diferentes experimentos de secagem.



Fonte:A autora (2024).

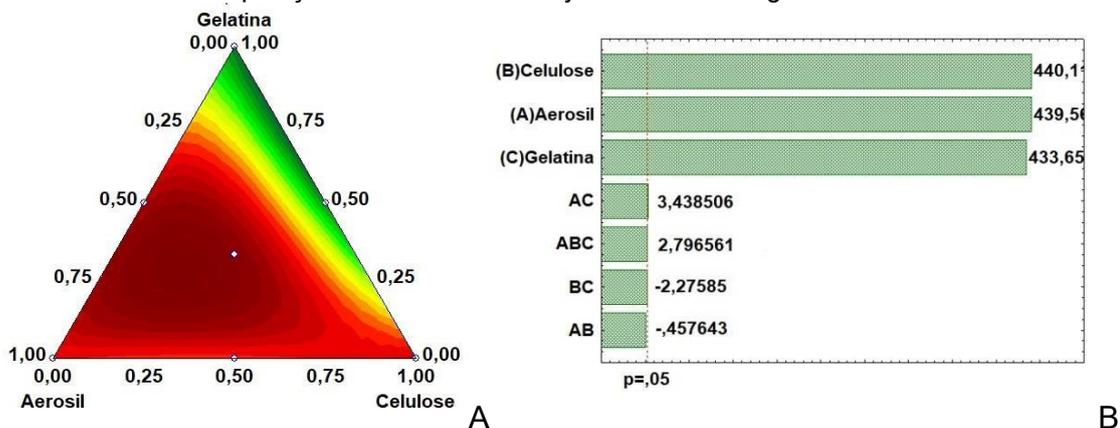
### 5.6.1 Umidade Residual

Ao avaliar o efeito dos fatores da umidade residual, do experimento de secagem com os três adjuvantes apenas as respostas lineares ultrapassaram a linha de significância no gráfico de efeitos padronizado (Figura 36B). Os efeitos que ultrapassaram a linha de significância foram os lineares de cada adjuvante: celulose (+440,1), Aerosil (+439,5) e gelatina (+433,65), indicando que esses adjuvantes atuaram de forma isolada na retirada da umidade final do produto. Entre as misturas binárias e ternária, apenas a combinação de Aerosil e gelatina (+3,43) e a mistura dos três adjuvantes (+2,79) apresentaram efeitos positivos, mas com valores muito baixos. As misturas binárias que continham celulose tiveram efeitos negativos: celulose e gelatina (-2,27) e Aerosil e celulose (-0,45). Esses resultados sugerem que a celulose não foi um bom adjuvante de secagem para os extratos de *A. hispidum*.

Apesar dos valores elevados dos fatores lineares, a resposta da mistura binária apresentou maior impacto, que pode ser confirmada pelo gráfico de contorno (Figura 36A), onde a região mais avermelhada corresponde à mistura composta por gelatina: Aerosil. A gelatina é um polímero natural que pode ser usado como adjuvante de secagem, pois apresentou bons resultados na redução da umidade residual dos extratos. Além disso, a gelatina pode ser combinada com o DSC, um adjuvante de secagem muito utilizado por seu alto poder dessecante e sua capacidade de manter a estabilidade do produto seco final. Essa combinação pode ser ideal para a

elaboração das formulações contendo extratos secos das partes aéreas de *A. hispidum*.

Figura 36 - Gráfico de contorno (A) e gráfico de Pareto (B) para a umidade residual nas diferentes composições de misturas de adjuvantes de secagem testadas.

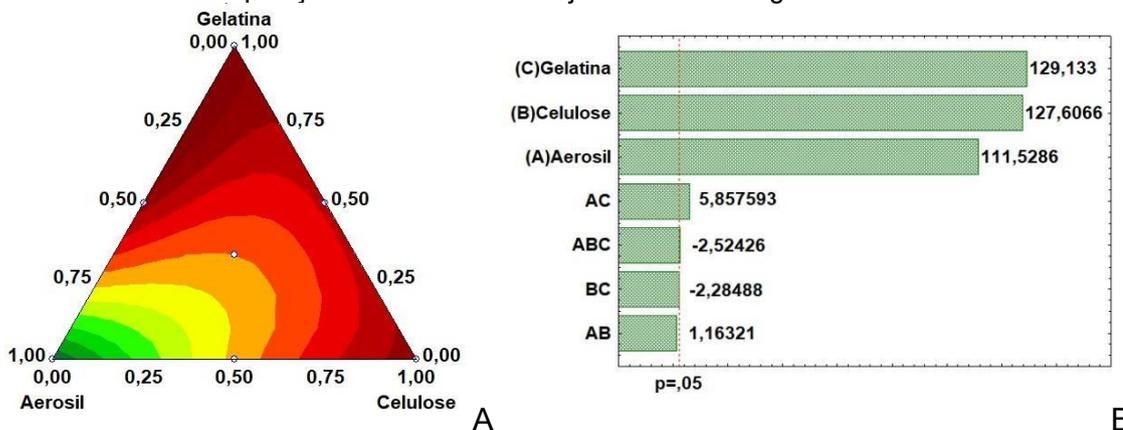


Fonte: A autora (2024).

### 5.6.2 Teor de Polifenóis Totais

Os resultados mostraram que os fatores lineares tiveram influência positiva no teor de polifenóis, o que está de acordo com os resultados encontrados para a umidade residual, indicando que os adjuvantes ajudaram a preservar os compostos fenólicos dos extratos. A gelatina apresentou o maior valor (+129,13) e a mistura binária composta por gelatina: Aerosil (+5,85), também apresentou resposta positiva, embora o valor não tenha ultrapassado a linha de significância do gráfico de efeitos padronizados (*Pareto*).

Figura 37 - Gráfico de contorno (A) e gráfico de Pareto (B) para o teor de polifenóis nas diferentes composições de misturas de adjuvantes de secagem testadas.



Fonte: A autora (2024).

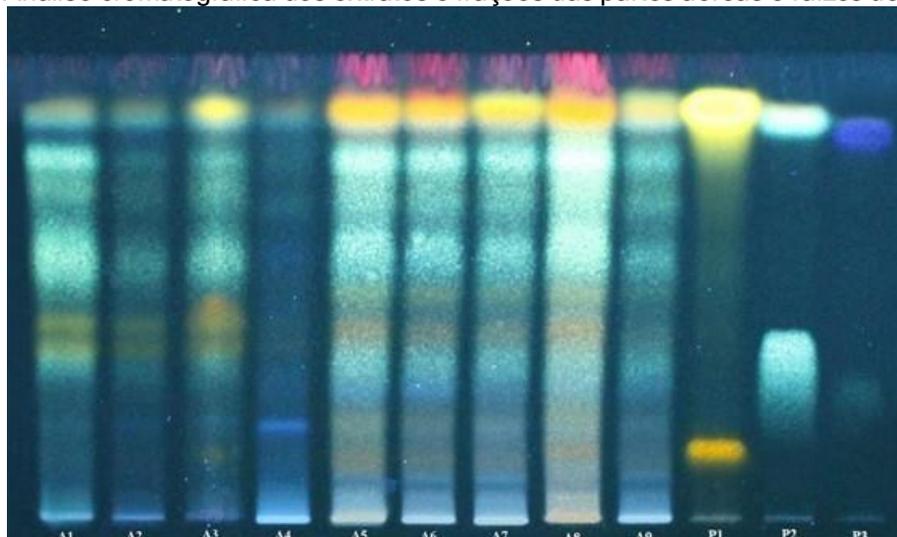
As misturas binárias contendo celulose e a ternária apresentaram respostas negativas (-2,28) e (-2,52), respectivamente. Isso implica dizer que esses adjuvantes quando combinados causam uma diminuição no teor de polifenóis. Através da superfície de resposta foi possível evidenciar que a mistura de Aerosil: gelatina e a gelatina sozinha, apresenta as melhores respostas (Figura 37B). Isso pode ser observado pela região avermelhada de maior intensidade no gráfico de contorno (Figura 37A), que indica um maior teor de polifenóis nos extratos secos. Essa mistura pode ter favorecido a proteção dos compostos fenólicos durante o processo de secagem.

Após a realização das análises para a escolha dos adjuvantes de secagem, ficou definida a utilização de uma mistura binária composta por aerosil: gelatina, pois apresentou os melhores rendimentos de secagem, mostrou valores satisfatórios para a umidade residual e para o teor de marcadores. Tais processos levaram a obter um extrato seco por aspersão (ESA) com características ideais e que garantam a qualidade do produto.

### **5.6.3 Análise fitoquímica dos extratos brutos e frações**

Através da cromatografia em camada delgada de alta eficiência, foi possível realizar a análise qualitativa dos extratos e frações partes aéreas e raízes do *A. hispidum*. No extrato das partes aéreas, verificou-se a presença de flavonoides, taninos hidrolisáveis e derivados cinâmicos. A Figura 38 mostra a placa obtida para a análise do extrato bruto e fração das partes aéreas de *A. hispidum*. A coloração mais intensa da fração acetato de etila indica uma possível maior concentração de compostos fenólicos, como flavonoides, taninos hidrolisáveis e derivados cinâmicos nesse derivado, evidenciando o enriquecimento na fração acetato de etila por meio de uma extração seletiva, que separou os compostos mais polares do extrato bruto.

Figura 38 - Análise cromatográfica dos extratos e frações das partes aéreas e raízes de *A. hispidum*.



A1: Extrato bruto raízes, A2: Fração hexano Raízes; A3: Fração acetato de etila; A4: Fração aquosa residual raízes; A5: Extrato bruto partes aéreas, A6: Extrato seco por aspensão partes aéreas; A7: Fração hexano partes aéreas; A8: Fração acetato de etila; A9: Fração aquosa residual partes aéreas; P1: Rutina e quercetina; P2: ácido cafeico e ácido clorogênico; P3: ácido gálico.

Fonte: A autora (2024).

As bandas que correspondem as raízes de *A. hispidum* não evidenciaram um enriquecimento dos compostos fenólicos na fração obtida, indicando possivelmente que os compostos marcadores da espécie estão distribuídos de forma homogênea no extrato bruto das raízes.

## 5.7 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Dentre as leveduras mais colonizadas no corpo humano, podemos destacar a espécie de *Candida*, que pode causar infecções oportunistas ou sistêmicas (Kobayashi-Sakamoto *et al.*, 2018). O potencial antifúngico dos extratos e frações de *A. hispidum* foi averiguado frente a duas espécies de *Candida* e os valores das CIM/CFM estão descritos na Tabela 33.

Tabela 33 - Concentração Inibitória Mínima e Concentração fungicida Mínima para extratos brutos/frações de *A. hispidum*.

Cepas	CIM/CFM		
	EB	Fact	FH
<i>C. auris</i>	500	250	125
<i>C. glabrata</i>	500	250	125

EB: Extrato bruto; Fact: fração acetato de etila; FH: fração hexano.

Fonte: A autora (2024).

Para a atividade antifúngica, o extrato bruto de *A. hispidum* apresentou uma CIM e CFM de 500 µg/mL para as duas cepas testadas *C. auris* e *C. glabrata*. Já as frações acetato de etila (Fact) e a fração hexano (FH) apresentaram concentrações de CIM e CFM de 250 µg/mL e 125 µg/mL respectivamente.

Devido a presença dos compostos fenólicos na espécie estudada, estes podem estar relacionados a atividade antifúngica, pois tais substâncias são descritas como sendo inibidoras do crescimento das leveduras (Coker; Oaikhena; Ajayi, 2021; Ogundele *et al.*, 2021).

Alguns estudos com a espécie *A. hispidum* são relatadas na literatura demonstrando bons resultados frente a outras espécies de *Candida*. Vale salientar que as frações apresentaram resultados mais promissores do que os extratos, indicando que o enriquecimento favoreceu a ação (Basile *et al.*, 2016; Houngbèmè *et al.*, 2015).

## 5.8 TOXICIDADE *IN VITRO* FRENTE A NÁUPLIOS DE *ARTEMIAS SALINA*

A utilização de plantas medicinais está entre as causas mais frequentes de intoxicação, que por muitas vezes estão associadas a identificação equivocada, mistura de espécies ou ainda produtos à base de plantas medicinais que não foram testados quanto a sua toxicidade (Mezzasalma *et al.*, 2017).

Apesar de existirem relatos do uso de *A. hispidum* pela população, há poucos estudos acerca da toxicidade dessa espécie. O efeito tóxico avaliado neste bioensaio, consiste na morte ou perda da capacidade de movimentação das larvas após 24 horas de incubação. Os resultados obtidos do teste de toxicidade frente aos náuplios de *Artemia salina* estão descritos na Tabela 34.

Tabela 34 - Toxicidade frente a *Artemia salina* nos extratos brutos de *A. hispidum*.

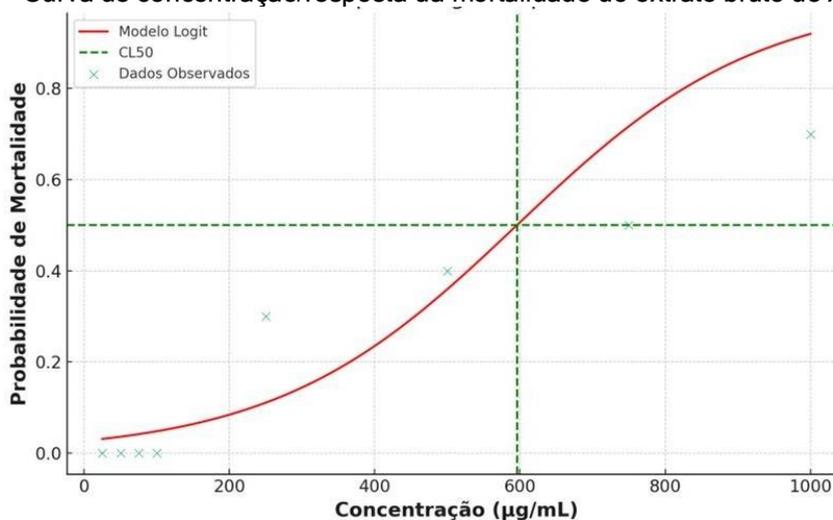
Concentração (µg/mL)	Nº inicial de artêmias	Nº de artêmias mortas	Mortalidade
1000	10	7	0,7
750	10	5	0,5
500	10	4	0,4
250	10	3	0,3
100	10	0	0
75	10	0	0
50	10	0	0
25	10	0	0
10	10	0	0
5	10	0	0

Fonte: A autora (2024).

Ao final desse teste foi possível observar que não houve mortes dos náuplios de *A. salina* no controle negativo, após 24 h, indicando que o solvente utilizado é inativo a esse microcrustáceo e as mortes observadas foram resultado apenas do extrato bruto das partes aéreas do *A. hispidum*.

Para análise dos dados obtidos foi utilizado o modelo logit, sendo possível obter um gráfico para avaliar a toxicidade dos extratos brutos de *A. hispidum* (Figura 39), em que os dados representados por (x) mostram a proporção da mortalidade em cada concentração e que a linha vermelha indica a previsão do modelo logit para a probabilidade da mortalidade em função da concentração. A linha pontilhada indica a concentração estimada da CL<sub>50</sub> igual a 595,88 µg/mL, esse valor demonstra que os extratos apresentam uma baixa toxicidade.

Figura 39 - Curva de concentração/resposta da mortalidade do extrato bruto de *A. hispidum*



Fonte: A autora (2024).

Segundo o estudo da toxicidade em partes aéreas de *A. hispidum* descritos por (Ganfon *et al.*, 2012; Houngbèmè *et al.*, 2015) os extratos não apresentaram toxicidade em camundongos em dose de 2.000 mg/kg.

## 5.9 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DAS FORMULAÇÕES DOS HIDROGÉIS

### 5.9.1 Avaliação do pH, viscosidade e características macroscópicas das formulações preliminares

Cada tipo de polímero utilizado possuía uma finalidade específica para a finalidade desejada, ou seja, para aplicação nasal. Os Pluronic de forma geral foram escolhidos devido a sua característica de termossensibilidade, ou seja, a sua capacidade de transição sol-gel, sendo líquido em temperatura ambiente, facilitando o processo de aplicação, pulverização do hidrogel e ao chegar na cavidade nasal, ele torna-se gel devido a temperatura corporal. A quitosana de peso molecular intermediário, foi escolhida devido a sua capacidade de mucoadesão, pois devido ao movimento dos cílios presentes na região nasal para a remoção do muco, a característica de mucoadesão se torna algo importante no processo.

Ao total foram elaboradas 19 formulações de hidrogel termossensível que estão descritas no Quadro 5. Ao serem analisadas após 24h, alguma dessas formulações não apresentaram a formação do estado de transição sol-gel e isso pode ter se dado devido a proporção do polímero utilizada para a elaboração das formulações.

Quadro 5 - Formulações prévias para um mapeamento dos hidrogéis termossensíveis

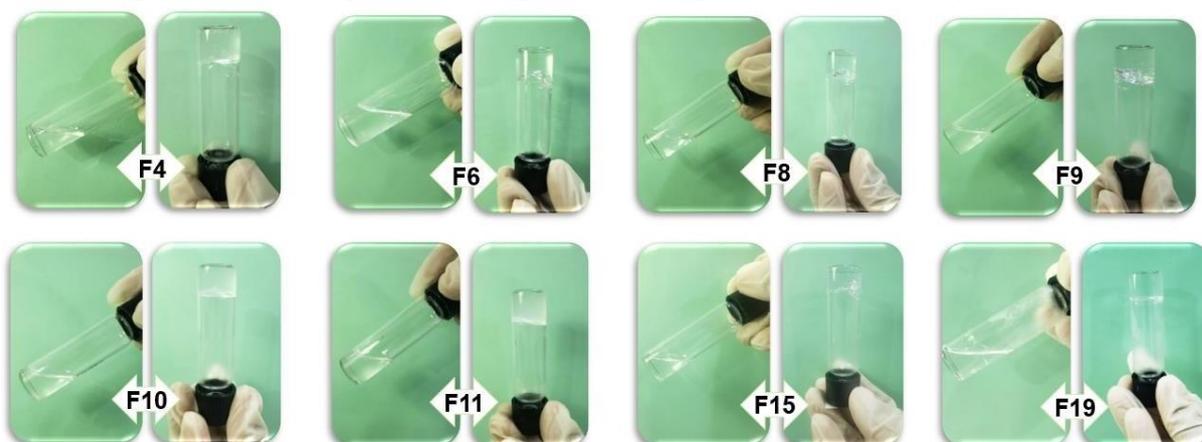
Formulação	Polímeros	Formulação	Polímero
1	Pluronic F127 + Quitosana (50/50)	11	Pluronic F127+F68+ Carbopol 940 (75/25)
2	Pluronic F127+F68+ Quitosana	12	Pluronic F127+F68
3	Pluronic F127+Carbopol 940	13	Pluronic F127+F68(18:2) + Quitosana
4	Pluronic F127+F68+ Carbopol 940	14	Pluronic F127+F68 (18:2) + Carbopol 940

5	Pluronic F127+F68+ Quitosana (50/50)	15	Pluronic F127+F68 (14:6) + Quitosana
6	Pluronic F127+F68+ Quitosana (75/50)	16	Pluronic F127+F68 (16:4) + Carbopol 940
7	Pluronic F68 + Carbopol 940	17	Pluronic F127+F68 (14:6) + Carbopol 940(0,1%)
8	Pluronic F127	18	Pluronic F127+F68 (14:6) + Carbopol 940 (0,5%)
9	Pluronic F127+ Quitosana (75/25)	19	Pluronic F127+F68 (14:6) + Carbopol 940 (0,75%)
10	Pluronic F127+Carbopol 940 (75/25)	--	--

Fonte: A autora (2024).

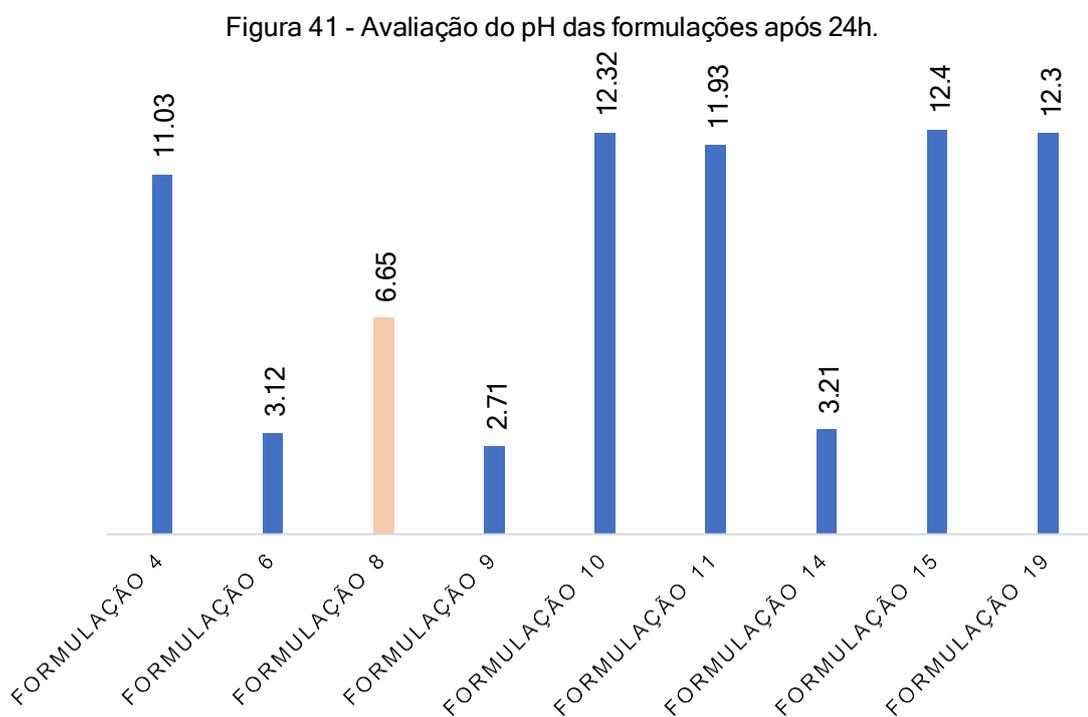
Das 19 formulações obtidas apenas 9 delas foram avaliadas, pois essas apresentaram bons resultados em relação a seu estado de transição sol-gel, tais formulações, que conseguiram realizar a transição do estado solução para a estado gel, estão reunidas na Figura 40.

Figura 40 - Formulações dos hidrogéis que conseguiram formar a transição Sol-Gel.



Fonte: A autora (2024).

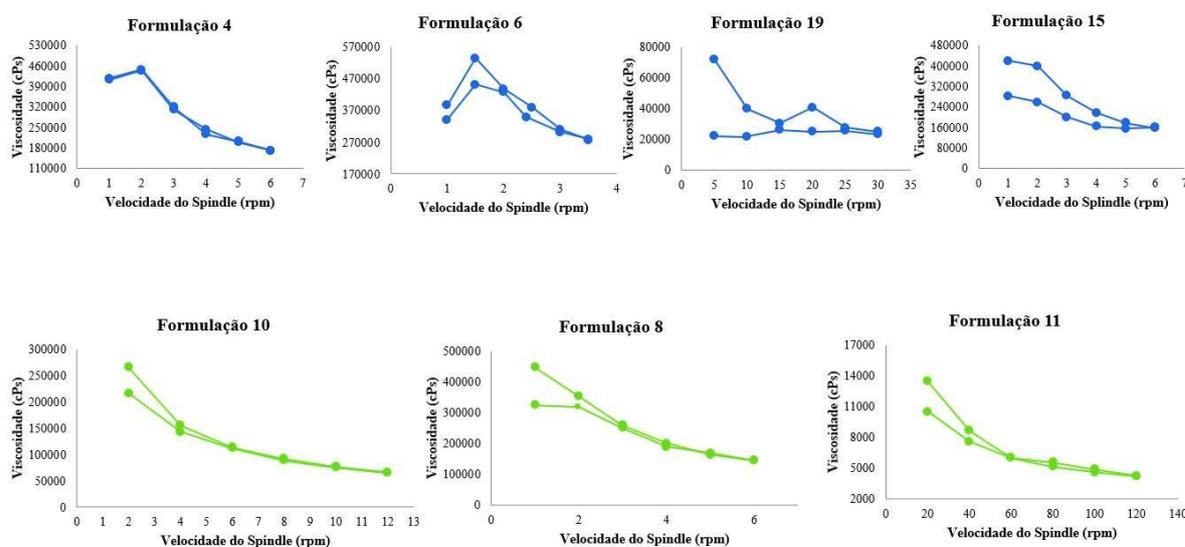
O pH das formulações foi obtido com o intuito de verificar algum tipo de alteração após a preparação e se essas estariam de acordo com a pH ideal aplicado na região nasal. Os resultados dos valores de pH estão apresentados na Figura 41. Merece destaque a formulação 8, composta apenas por Pluronic F 127, que apresentou o melhor valor de pH para aplicação nasal, que deve estar entre 5,5 e 6,5. Formulações com valores próximos a este apresentarão boa aceitabilidade pela região nasal, mantendo constante a formação da malha do gel, e não causando irritação.



Fonte: A autora (2024).

Em relação a análise da viscosidade das 9 formulações, apenas em 7 delas foi possível realizar a viscosidade, seus gráficos estão expostos na Figura 42. As formulações apresentaram um comportamento pseudoplástico, característico de hidrogéis.

Figura 42 - Gráfico dos de viscosidade dos hidrogeis obtidos da avaliação preliminar.



Fonte: A autora (2024).

As formulações 8, 10 e 11 foram as que apresentaram o melhor perfil em relação ao gráfico de viscosidade, todas possuem o Pluronic F127 em sua composição e as formulações 10 e 11 eram compostas também por Carbopol 940.

Ressalta-se que as formulações que possuem quitosana em sua composição apresentaram grumos e não tiveram uma boa homogeneidade dos seus constituintes, além da necessidade de ajuste de pH para poder realizar aplicação nasal. As formulações contendo F68 apresentaram a formação do precipitado, conforme já descrito na literatura, sendo assim, as formulações que possuem quitosana e F68 em sua composição foram descartadas. Ao final, deu-se seguimento com as formulações 8 e 10 que foram renomeadas de formulação 1 e 2.

### 5.9.2 Teste de centrifugação/ ciclo gelo – d'gelo

A estabilidade das formulações frente ao ciclo gelo/degelo é influenciada por alguns fatores, tais como a composição da formulação bem como as condições de congelamento e descongelamento (McClements; Jafari, 2018). Ambas as formulações apresentaram estabilidade após a realização do ensaio de ciclo/degelo, sendo evidenciada a manutenção de cor e homogeneidade durante o período testado.

O ensaio de resistência a centrifugação nos mostra informações rápidas acerca da estabilidade, e, que através do aumento da força da gravidade, possibilita a movimentação das partículas, que podem ocasionar uma precipitação, separação de

fases, sedimentação ou até coalescência (Roland *et al.*, 2003; Samrudhi; Ravikumar, 2016). Ambas as formulações não apresentaram nenhuma instabilidade nesse ensaio, indicando boa estabilidade em condições de estresse.

### 5.9.3 Estudo de estabilidade

#### 5.9.3.1 Avaliação das características macroscópicas

Durante o estudo de estabilidade acelerada, as formulações desenvolvidas foram avaliadas macroscopicamente e foi observado o comportamento em diferentes temperaturas. Todas as formulações apresentaram aspecto líquido ou pouco viscoso nas temperaturas de 4 °C, e, ao aquecer a formulação a 37 °C, todas transformaram-se em gel e apresentaram caráter viscoso, assim as formulações são consideradas termosensíveis, pois possuem a capacidade de sofrer a transição solução-gel, com o aumento da temperatura. Isso se dá devido a presença do Pluronic F127 em sua composição.

Ao adicionar à formulação 2 o extrato bruto (F2EB), houve a formação do precipitado já evidenciado nos primeiros dias, o que pode indicar alguma incompatibilidade da formulação 2 com o extrato bruto. O precipitado apareceu em pouca quantidade e permaneceu com a mesma quantidade até os últimos dias de análise. Vale ressaltar que o aparecimento do precipitado da formulação F2EB que foi armazenada na geladeira, demorou um pouco mais a aparecer o precipitado, indicando que o armazenamento a temperatura de 4 °C foi mais eficiente. Nas demais formulações não houve evidência de formação de precipitado.

É importante destacar que as formulações F1EB e F2EB armazenadas a temperatura ambiente e exposta a luz, apresentaram uma mudança sutil quanto a sua coloração. Sendo essas as únicas formulações que ficaram expostas a luz, podemos inferir que a exposição a luz pode causar algum tipo de oxidação dos compostos, mesmo que pequenas. Dessa forma, é ideal que as formulações sejam armazenadas em frascos de vidro âmbar, com o intuito de evitar qualquer tipo de degradação ou oxidação dos compostos. As formulações F2 que contêm Carbopol 940 apresentaram aspectos mais viscosos que as formulações apenas com Pluronic F127.

Os resultados das características macroscópicas estão sumarizados na Tabela 35.

Tabela 35 - Avaliação das características macroscópicas do hidrogéis termossensíveis contendo extratos de *A. hispidum*.

Temperatura	Formulação	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180
AMBIENTE (25 °C)	<b>F1CC</b>	TP	TP	TP						
	<b>F1SC</b>	TP	TP	TP						
	<b>F2CC</b>	TL	TL	TL						
	<b>F2SC</b>	TL	TL	TL						
	<b>F1EB</b>	TP, A	TP, A	TP, A						
	<b>F2EB</b>	TL, A*	TL, A*	TL, A*						
ESTUFA (35 °C)	<b>F1CC</b>	TP	TP	TP						
	<b>F1SC</b>	TP	TP	TP						
	<b>F2CC</b>	TL	TL	TL						
	<b>F2SC</b>	TL	TL	TL						
	<b>F1EB</b>	TP. A	TP. A	TP. A						
	<b>F2EB</b>	TL, A*	TL, A*	TL, A*						
GELADEIRA (4 °C)	<b>F1CC</b>	TP	TP	TP						
	<b>F1SC</b>	TP	TP	TP						
	<b>F2CC</b>	TL	TL	TL						
	<b>F2SC</b>	TL	TL	TL						
	<b>F1EB</b>	TP, A	TP, A	TP, A						
	<b>F2EB</b>	TL, A	TL, A	TL, A*	TL, A*	TL, A*				

F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; EB: Extrato Bruto; CC: Com conservante; SC: Sem conservante; TL: Translucido; TP: Transparente; A: amarelo;

\*Precipitação.

Fonte: A autora (2024).

### 5.9.3.2 Avaliação da transição de fase (Sol-Gel)

Todas as formulações conseguiram realizar a transição do estado solução para o estado gel, em ambas as metodologias testadas, tanto a inversão de tubo quando a da barra magnética, demonstrando que são termossensíveis (Tabela 36).

Tabela 36 - Avaliação do estado de transição sol-gel das formulações de *A. hispidum*.

Formulação	Temperatura	Tempo
<b>F1CC</b>	30,2°C	6 a 3 min
<b>F1SC</b>	31,7°C	
<b>F2CC</b>	28,4°C	
<b>F2SC</b>	25,9°C	4 min
<b>F1EB</b>	28,8°C	
<b>F2EB</b>	25,2°C	

F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; EB: Extrato Bruto; CC: Com conservante; SC: Sem conservante.

Fonte: A autora (2024).

É possível observar que as formulações F1 formaram o gel em tempo maior e uma temperatura menor, a uma temperatura de 37 °C e retornaram rapidamente ao seu estado de solução; já as formulações do grupo F2, formaram o gel em uma temperatura de 38 a 39 °C, também demonstraram uma maior estabilidade, necessitando de um tempo maior para retornar para o seu estado de solução. Isso implica dizer que o Carbopol 940 presente nas formulações do grupo 2 conferiram uma maior estabilidade.

Em relação as características de transição sol-gel, ela se dá principalmente pela presença de copolímero em bloco, o Pluronic F127, uma vez que em baixas concentrações ele apresenta esse efeito, de em baixas temperatura apresenta-se em forma de solução e em temperaturas superiores a 35 °C promove a formação do gel; e, mesmo ao incorporar a formulação o extrato bruto, manteve as características de transição.

O estado de transição sol-gel dos hidrogéis termossensíveis nasais é importante pois ao serem aplicados na região nasal devem conferir seu estado gel para a liberação controlada do ativo. Normalmente a cavidade nasal apresenta uma temperatura de 35 a 37 °C, temperatura corporal, que poderá ser alterada quando

estiver sobre alguma enfermidade, podendo chegar a temperaturas superiores a temperatura corporal, sendo ideal para a formação do gel e entrega controlada do ativo.

### 5.9.3.3 Avaliação do pH

Em relação a avaliação do pH das formulações durante a estabilidade, tanto as formulações base quanto as incorporadas com extrato bruto, mantiveram seu pH entre 5,0 e 6,5, como é possível visualizar na Tabela 37. Vale salientar que mesmo com variações ao longo dos 360 dias de avaliação, as preparações se mantiveram dentro da faixa ácida desejável para a região nasal (Illum, 2002).

O pH das formulações do grupo 2, que durante o seu preparo tiveram a adição de hidróxido de sódio 5% (p/v), não apresentaram grandes alterações em seu pH ao longo dos dias da avaliação, mantendo o valor dentro da faixa esperada, compatível com a região nasal. Tanto as formulações F1 quanto as F2 ao serem incorporadas do extrato bruto apresentaram uma redução nos valores de pH, indicando que a incorporação contribuiu para a variação do pH da formulação, mas os valores se mantiveram dentro da faixa esperada.

Em relação as formas de armazenamento, as formulações que foram mantidas em estufa e geladeira, sendo essas sempre protegidas da luminosidade, diferentemente das formulações armazenadas a temperatura ambiente, expostas a radiação luminosa. As formulações armazenadas em estufa e geladeira, mantiveram um grau de organização melhor, quanto observamos o pH, quando comparado com o armazenamento em temperatura ambiente (Figuras 43 e 44), fato que pode estar associado a presença da luminosidade, e conseqüentemente gerado algum tipo de oxidação dos compostos presentes na formulação, promovendo essa desorganização.

Por fim, mesmo com as pequenas alterações dos valores de pH apresentadas durante a estabilidade, todas as formulações se mantiveram estáveis e com os valores de pH ideais para a aplicação nasal, não correndo nenhum risco de dano à lesão ao local da região a ser aplicada.

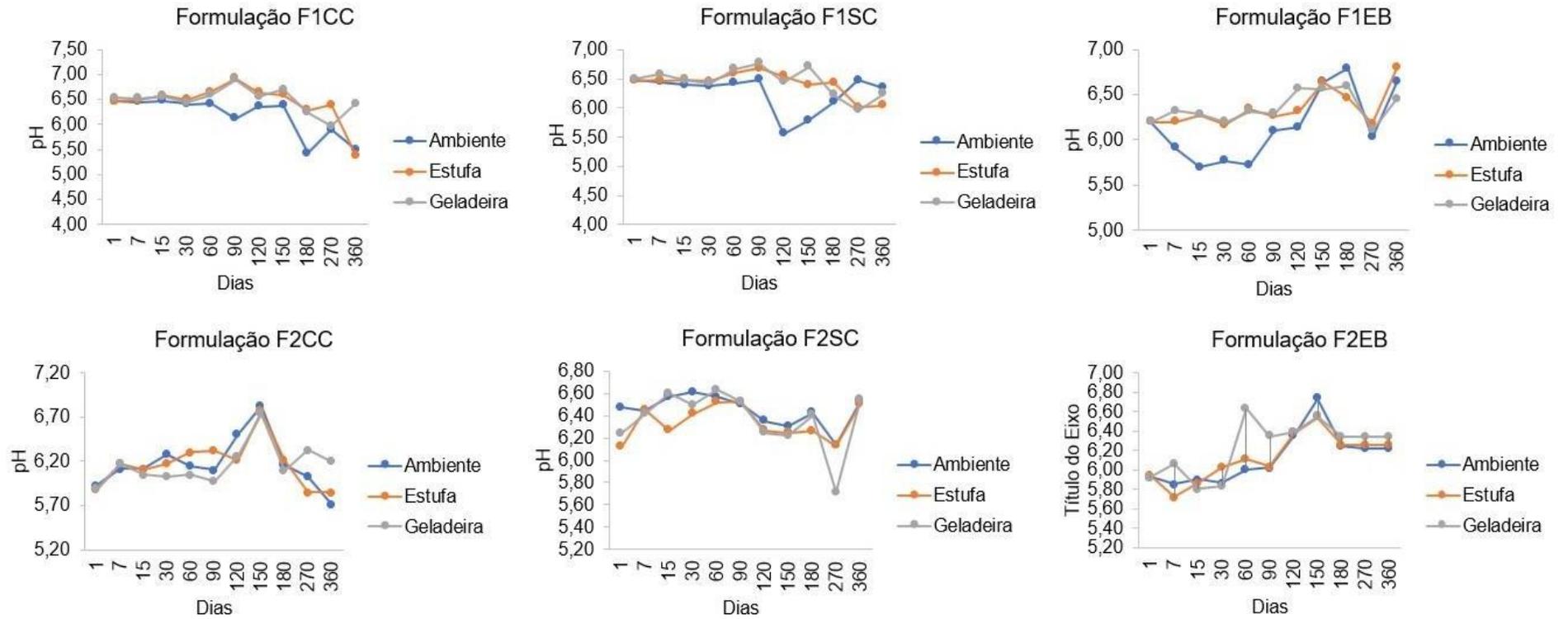
Tabela 37 - Avaliação do pH das formulações do hidrogéis termossensíveis contendo extratos de *A. hispidum*.

Temperatura	Formulação	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180	Dia 270	Dia 360
AMBIENTE (25 °C)	<b>F1CC</b>	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46
	<b>F1SC</b>	6,48	6,48	6,48	6,48	6,48	6,48	6,48	6,48	6,48	6,48	6,48
	<b>F2CC</b>	5,93	6,11	6,11	6,28	6,15	6,10	6,50	6,82	6,16	6,03	5,72
	<b>F2SC</b>	6,47	6,44	6,57	6,61	6,57	6,51	6,35	6,30	6,43	6,14	6,53
	<b>F1EB</b>	6,19	5,91	5,69	5,76	5,72	6,10	6,14	6,64	6,79	6,03	6,64
	<b>F2EB</b>	5,93	5,85	5,90	5,87	6,01	6,02	6,35	6,73	6,25	6,23	6,23
ESTUFA (35 °C)	<b>F1CC</b>	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46
	<b>F1SC</b>	6,47	6,48	6,49	6,46	6,60	6,69	6,55	6,40	6,44	6,01	6,04
	<b>F2CC</b>	5,88	6,18	6,11	6,18	6,30	6,32	6,21	6,76	6,22	5,85	5,85
	<b>F2SC</b>	6,12	6,45	6,27	6,42	6,52	6,53	6,27	6,25	6,26	6,13	6,50
	<b>F1EB</b>	6,20	6,20	6,27	6,17	6,34	6,26	6,31	6,63	6,46	6,18	6,80
	<b>F2EB</b>	5,95	5,72	5,87	6,03	6,12	6,04	6,38	6,54	6,26	6,26	6,26
GELADEIRA (4 °C)	<b>F1CC</b>	6,53	6,52	6,55	6,44	6,58	6,89	6,55	6,70	6,24	5,96	6,41
	<b>F1SC</b>	6,50	6,58	6,48	6,43	6,68	6,77	6,45	6,71	6,23	5,96	6,25
	<b>F2CC</b>	5,89	6,18	6,05	6,03	6,05	5,98	6,26	6,73	6,09	6,33	6,20
	<b>F2SC</b>	6,24	6,41	6,60	6,50	6,63	6,53	6,25	6,22	6,41	5,71	6,55
	<b>F1EB</b>	6,20	6,32	6,28	6,20	6,31	6,29	6,57	6,56	6,59	6,10	6,45
	<b>F2EB</b>	5,93	6,07	5,81	5,84	6,63	6,35	6,39	6,55	6,34	6,34	6,34

F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; EB: Extrato Bruto; CC: Com conservante; SC: Sem conservante.

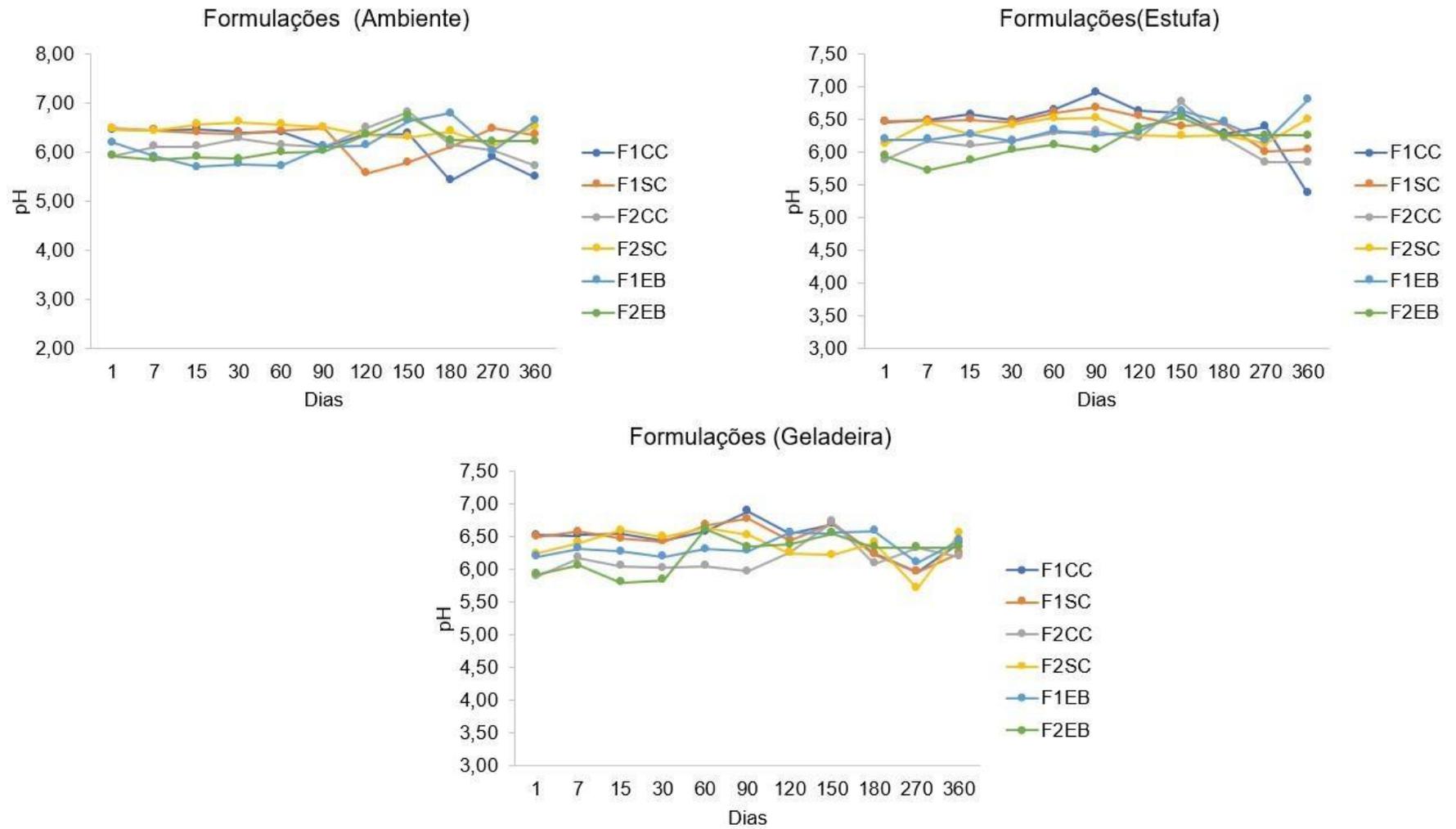
Fonte A autora (2024).

Figura 43 - Avaliação do pH por formulações de hidrogel termossensível durante a estabilidade em diferentes temperaturas.



F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; EB: Extrato Bruto; CC: Com conservante; SC: Sem conservante.  
Fonte: A autora (2024).

Figura 44 - Avaliação do pH das formulações de hidrogel termossensível em diferentes condições de armazenamento.



F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; EB: Extrato Bruto; CC: Com conservante; SC: Sem conservante.

Fonte: A autora (2024).

#### 5.9.3.4 Determinação da viscosidade

Ao avaliar os resultados encontrados, é possível observar que as formulações F2 apresentaram um valor de viscosidade maior que as formulações F1, devido a presença do Carbopol 940, e devido ao armazenamento da água pelo Carbopol, promovendo um aumento das micelas formadas pelo Pluronic F127, aumentando a viscosidade. Porém, ao comparar as formulações incorporadas com o extrato bruto, a variação entre a viscosidade das formulações F1 e F2 é mínima.

Quando comparamos os resultados das formulações obtidas com e sem conservantes, a utilização do conservante promoveu um aumento da viscosidade. Isso se deve ao fato que o próprio conservante apresenta característica de co-emulsionante, auxiliando na formação das micelas juntamente com o pluronic F127.

No que diz respeito as diferentes formas de armazenamento (Figuras 45 e 46), após os primeiros 90 dias de avaliação da estabilidade é possível observar uma maior instabilidade, sendo que as formulações mantidas sob refrigeração apresentaram resultados satisfatórios. O armazenamento em temperatura ambiente, levou a uma maior variação da viscosidade, que pode estar relacionada também a variação do valor de pH, levando a uma instabilidade na formação do gel.

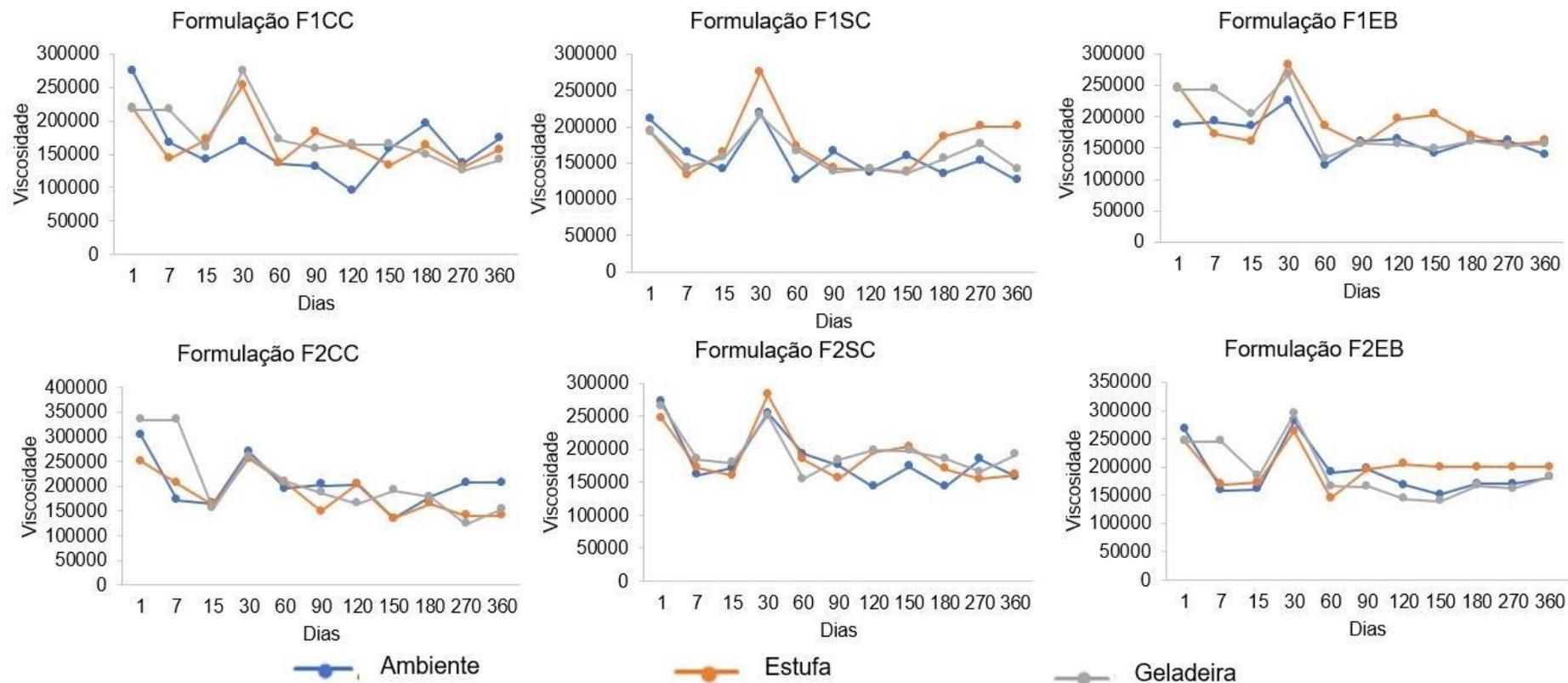
Tabela 38 - Avaliação da viscosidade das formulações do hidrogeis termossensíveis contendo extratos de *A. hispidum*.

Temperatura	Formulação	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180	Dia 270	Dia 360
AMBIENTE (25 °C)	F1CC	275231	167316	141318	168980	136250	131717	94788	158248	195976	136117	174246
	F1SC	210374	164313	141316	218174	127185	165438	136917	159847	134917	153315	126518
	F2CC	304363	172179	165313	270967	195177	203975	204109	135184	178512	207708	207708
	F2SC	271967	161714	171046	254569	192777	175979	143049	174112	143051	184911	158914
	F1EB	187376	192177	184245	225773	122919	160914	164180	141183	161980	161980	140117
	F2EB	266568	159181	160647	281766	190110	197043	167580	151315	169713	169713	181578
ESTUFA (35 °C)	F1CC	219374	143183	172379	252770	137050	183178	161181	133455	163181	130651	156915
	F1SC	193775	133317	164114	275767	172579	142782	141983	137983	185977	200109	200109
	F2CC	251436	206509	162109	255969	207308	149449	204642	134517	165447	140116	140116
	F2SC	246970	172379	160381	282766	184778	155715	195843	203709	170646	154781	161714
	F1EB	241771	180378	241771	180378	127317	167046	137450	127317	167046	137450	132918
	F2EB	245970	168778	172646	263768	144849	195443	204909	199709	199709	199709	199709
GELADEIRA (4 °C)	F1CC	216974	216974	160781	274767	172113	158114	165180	165180	149582	125451	141583
	F1SC	192777	143449	157448	215637	166980	137850	141583	136250	155515	176645	141982
	F2CC	335160	335160	155850	260569	210375	186644	165180	191310	177712	123515	153582
	F2SC	265568	185043	179712	251572	154515	184111	198643	197709	185977	165713	192377
	F1EB	243771	243771	203589	267235	134384	156581	155848	149316	161181	152715	156648
	F2EB	245971	245971	184254	293964	165980	165713	143449	139183	167180	161317	182778

F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; EB: Extrato Bruto; CC: Com conservante; SC: Sem conservante.

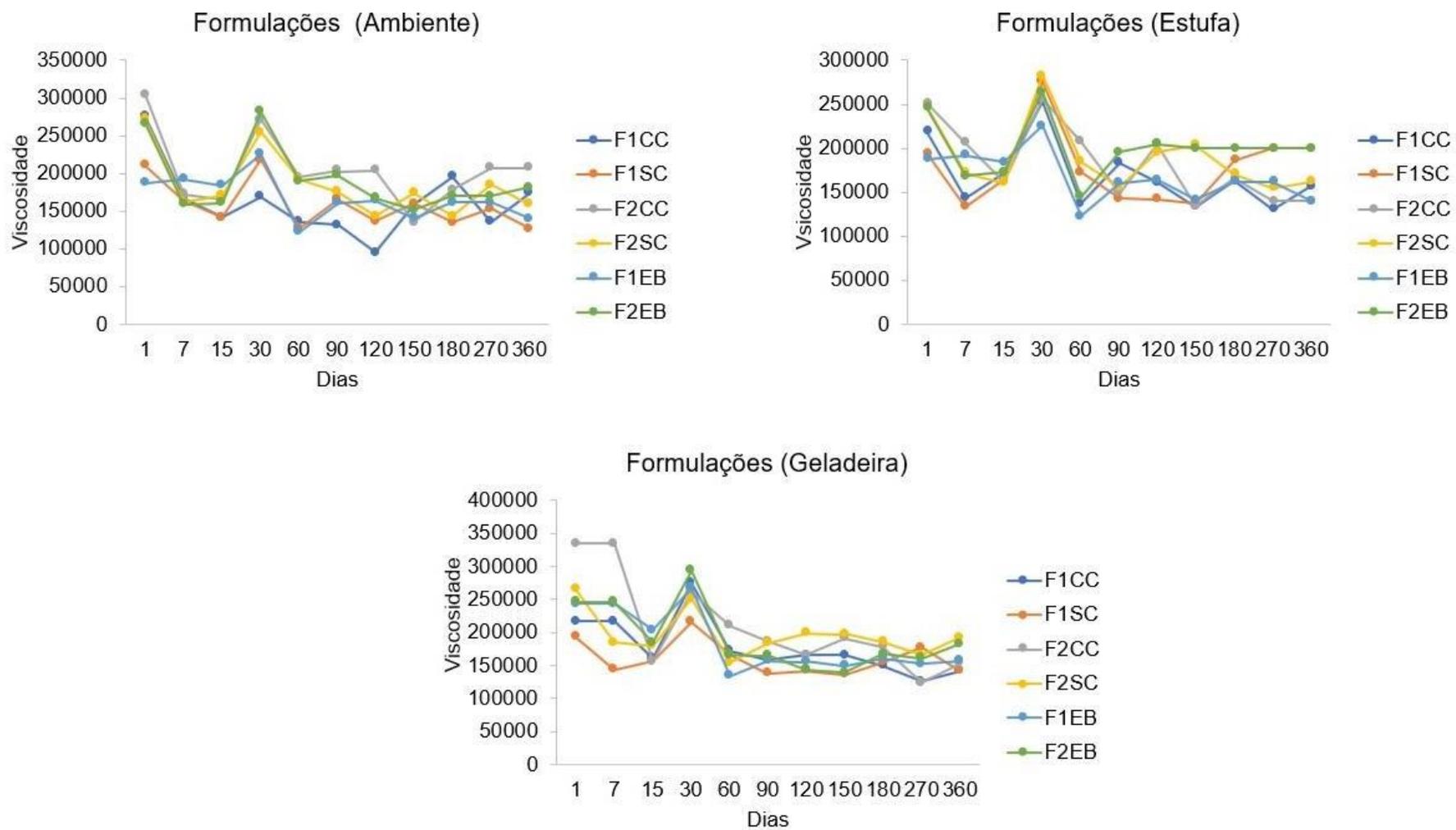
Fonte: A autora (2024).

Figura 45 - Viscosidade por formulação de hidrogel termossensível durante a estabilidade.



F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; EB: Extrato Bruto; CC: Com conservante; SC: Sem conservante.  
 Fonte: A autora (2024).

Figura 46 - Viscosidade das formulações de hidrogel termossensível em diferentes condições de armazenamento.



F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; EB: Extrato Bruto; CC: Com conservante; SC: Sem conservante.  
 Fonte: A autora (2024).

## 6 CONCLUSÃO

Como foi possível observar, a caracterização físico-química das partes aéreas e das raízes de *A. hispidum*, demonstrou que as amostras apresentam qualidade requerida pela Farmacopeia Brasileira 6ª edição, garantido dessa maneira os requisitos necessários para serem utilizadas nas demais etapas do presente estudo.

O método espectrofotométrico proposto para quantificação de polifenóis totais nas partes aéreas e raízes de *A. hispidum*, foi otimizado quanto as respostas analíticas e apresentou a adequabilidade necessária para ser utilizado como uma ferramenta de controle de qualidade, demonstrando confiabilidade segundo as exigências para uso analítico.

Considerando as demais etapas realizadas com as partes aéreas de *A. hispidum*, o extrato obtido com etanol 50% por turbóliso, seco com 10% de Aerosil: Gelatina (8:2), à temperatura de entrada de 110 °C e fluxo de alimentação de 1 L/H, permitiram obter um extrato seco aspensão (ESA) com características ideais e com qualidade. Somado as características tecnológicas, os extratos obtidos apresentaram atividade frente às cepas de *Candida auris* e *C. glabrata*, com ausência de toxicidade frente à *Artemia salina*.

Por fim, considerando os aspectos tecnológicos do hidrogéis termossensíveis, a avaliação preliminar permitiu selecionar formulações contendo como polímeros Pluronic F127 e/ou Carbopol 940 na composição e como conservante o spectrastat. Durante a avaliação da estabilidade não foram verificadas alterações expressivas em relação ao pH e viscosidade, em diferentes condições de armazenamento. Entretanto, salienta-se que as formulações mantidas sob refrigeração e ao abrigo de luz apresentaram melhor estabilidade.

Diante do exposto, as formulações de hidrogéis termossensíveis contendo extrato bruto das partes aéreas de *A. hispidum* apresentaram-se estáveis, com atividade biológica evidenciada e armazenadas sob refrigeração, sendo necessário realizar estudos adicionais na formulação para utilização como alternativa terapêutica para o tratamento de doenças respiratórias leves.

## REFERÊNCIAS

Abdulla, N. A. *et al.* Intranasal delivery of Clozapine using nanoemulsion-based in-situ gels: An approach for bioavailability enhancement. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 29, n. 12, p. 1466-1485, 2021/12/01/ 2021.

Abubakar, A. *et al.* Phytochemical Screening and in-Vitro Antimicrobial Activities of the Leaf Extract of *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae). **Journal of Plant Studies**, 4, 07/15 2015.

Adepiti, A.; C, O.; Agbedahunsi, J. Antitrichomonal activity of *Acanthospermum hispidum* D. C. (Asteraceae). **African Journal of Biotechnology**, 13, p. 1303-1307, 03/12 2014.

Adnet, T. *et al.* Pharmacotechnical Development of a Nasal Drug Delivery Composite Nanosystem Intended for Alzheimer's Disease Treatment. **Pharmaceutics**, 12, n. 3, Mar 11 2020.

Ahmed, S. *et al.* Poloxamer-407 thickened lipid colloidal system of agomelatine for brain targeting: Characterization, brain pharmacokinetic study and behavioral study on Wistar rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 181, p. 426-436, 2019/09/01/ 2019.

Alami-Milani, M. *et al.* Preparation and in vitro evaluation of thermosensitive and mucoadhesive hydrogels for intranasal delivery of phenobarbital sodium. **Ther Deliv**, 12, n. 6, p. 461-475, Jun 2021.

Alva, M. *et al.* Bioactivity of the Essential Oil of an Argentine Collection of *Acanthospermum hispidum* (Asteraceae). **Natural product communications**, 7, p. 245-248, 02/01 2012.

Araújo, E. d. L. *et al.* *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae): perspectives for a phytotherapeutic product. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18, 2008.

Araújo, E. d. L. *et al.* Macro and microscopical identification of two *Acanthospermum* medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**. 4, n. 35, p. 2606-2615, 2013.

Arpagaus, C. *et al.* Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, 546, n. 1, p. 194-214, 2018/07/30/ 2018.

Attah, C. O. *et al.* Preliminary Phytochemical and Antibacterial Screening of *Acanthospermum hispidum*. **International Journal For Research In Applied And Natural Science**, 2, n. 1, p. 101-112, 01/31 2016.

Bahmanpour, A. *et al.* Synthesis and characterization of thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan for intranasal delivery of insulin. **Biotechnol Appl Biochem**, 68, n. 2, p. 247-256, Apr 2021.

Barros, A. L. C. d. **Cloração de agrotóxicos: remoção, identificação de "novos" subprodutos de desinfecção e avaliação de toxicidade.** 2021.

Basile, Y. A. *et al.* Botanical study, comparison of antifungal activity leaves of *Aspilia africana* (Pers.) CD Adams var. *africana* and *Acanthospermum hispidum* DC. on the in vitro growth of *Cryptococcus neoformans* and study of their toxicity on human cells HFF. **International Journal of Innovation and Applied Studies**, v. 17, n. 3, p. 980, 2016.

Bezerra, I. C. F. *et al.* Chromatographic profiles of extractives from leaves of *Eugenia uniflora*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 28, 2018.

Bezerra, M. A. *et al.* Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 2, p. 652-664, 2008.

Blainski, A.; Lopes, G. C.; De Mello, J. C. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. **Molecules**, 18, n. 6, p. 6852-6865, Jun 10 2013.

Caban, M. *et al.* Overview of polyphenols and polyphenol-rich extracts as modulators of IGF-1, IGF-1R, and IGFBP expression in cancer diseases. **Journal of Functional Foods**, 52, p. 389-407, 2019/01/01/ 2019.

Cacique, A. P. *et al.* Maceration extraction conditions for determining the phenolic compounds and the antioxidant activity of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 44, p. e017420, 2020.

Chen, Y.-B. *et al.* Hydrogen bond-enhanced nanogel delivery system for potential intranasal therapy of Parkinson's disease. **Materials & Design**, 219, p. 110741, 2022.

Chendynski, L. *et al.* Evaluation and application of extracts of rosemary leaves, araçá pulp and peel of bacuri in the inhibition of the oxidation reaction of biodiesel. **Fuel**, v. 261, p. 116379, 2020.

Chika, A.; Onyebueke, D. C.; Bello, S. O. J. A. J. o. B. R. Phytochemical analysis and evaluation of antidiabetic effects in alloxan-induced diabetic rats treated with aqueous leaf extract of *Acanthospermum hispidum*. **African Journal of Biomedical Research**, v. 21, n. 1, p. 81-85, 2018.

Coker, M. E.; Oaikhena, A. O.; Ajayi, T. O. J. S. J. o. B. S. Antimicrobial activity of extracts and fractions of *Euphorbia lateriflora* (Schum. and Thonn) on microbial isolates of the urinary tract. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 8, p. 4723-4731, 2021.

Cortés-Rojas, D. F. *et al.* Optimization of spray drying conditions for production of *Bidens pilosa* L. dried extract. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 93, p. 366-376, 2015.

Couto, R. O. *et al.* Development of a Phytopharmaceutical Intermediate Product via Spray Drying. **Drying Technology**, 29, n. 6, p. 709-718, 2011/04/29 2011.

Couto, R. O. *et al.* Spray-dried rosemary extracts: Physicochemical and antioxidant properties. **Food Chemistry**, 131, n. 1, p. 99-105, 2012/03/01/ 2012.

Cunha, F. P. d. *et al.* Development and optimization of extractives from *Astronium urundeuva* (allemão) Engl. by factorial design. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52, 2009.

Cunha, S. *et al.* Thermosensitive in situ hydrogels of rivastigmine-loaded lipid-based nanosystems for nose-to-brain delivery: characterisation, biocompatibility, and drug deposition studies. **Int J Pharm**, 620, p. 121720, May 25 2022.

De Fátima Colet, C. *et al.* Uso de plantas medicinais por usuários do serviço público de saúde do município de Ijuí/RS. **Revista brasileira de medicina de família e comunidade**, v. 10, n. 36, 2015.

De Gois, C. M. D. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante do extrato de *Hibiscus Sabdariffa* in vitro para a formulação de sérum antiaging. **E-Acadêmica**, v. 3, n. 3, p. e2933317-e2933317, 2022 3, n. 3, p. e2933317-e2933317, 2022.

De, S. L. J. *et al.* A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **J Ethnopharmacol**, 97, n. 2, p. 199-206, Feb 28 2005.

De Souza, K. *et al.* The adjuvants Aerosil 200 and Gelita-Sol-P influence on the technological characteristics of spray-dried powders from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 331-336, 2000.

Dias, J. *et al.* Extraction of umbu (*Spondias tuberosa*) seed oil using CO<sub>2</sub>, ultrasound and conventional methods: Evaluations of composition profiles and antioxidant activities. **Journal of Supercritical Fluids The**, 145, p. 10-18, 03/01 2019.

Dos Santos, C. *et al.* Optimization of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC leaf extraction using a simplex centroid design focused on extracting phenolics with antioxidant and antiproliferative activities. **BMC chemistry**, v. 14, p. 1-13, 2020.

El-Gizawy, S. A. *et al.* Aerosil as a novel co-crystal co-former for improving the dissolution rate of hydrochlorothiazide. **International journal of pharmaceuticals**, v. 478, n. 2, p. 773-778, 2015.

Elufioye, T.; Machie, S. C. Anticholinesterase activities of methanol extract and partitioned fractions of *Acanthospermum hispidum* DC. **Nigerian Journal of Natural Products and Medicine**, 20, p. 67, 03/09 2017.

Eriksson, L. *et al.* Mixture design—design generation, PLS analysis, and model usage. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 43, n. 1-2, p. 1-24, 1998.

Fan, R. *et al.* Thermosensitive Hydrogels and Advances in Their Application in Disease Therapy. **Polymers (Basel)**, 14, n. 12, Jun 12 2022.

Ferreira, M. R. A. **Triagem antifúngica de extratos obtidos de espécies vegetais do nordeste brasileiro**. 2012. -, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Ferreira, M. R. A. Metodologias analíticas e quimiométricas para a avaliação de impressões digitais da droga vegetal e produtos derivados dos frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) LP Queiroz. 2016.

Ferreira, M. R. A. *et al.* Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. **J Med Plants Res**, v. 7, n. 40, p. 3008-13, 2013.

Ferro, D. M. *et al.* Photostability and characterization of spray-dried maltodextrin powders loaded with *Sida rhombifolia* extract. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, p. 101716, 2020.

Folin, O.; Ciocalteu, V. J. J. b. C. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **J. biol. Chem**, v. 73, n. 2, p. 627-650, 1927.

Gallo, L. *et al.* Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. **Powder Technology**, v. 208, n. 1, p. 205-214, 2011.

Gallo, L. *et al.* A comparative study of spray-dried medicinal plant aqueous extracts. Drying performance and product quality. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 104, p. 681-694, 2015.

Ganfou, H. *et al.* Antiparasitic activities of two sesquiterpenic lactones isolated from *Acanthospermum hispidum* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, 141, n. 1, p. 411-417, 2012/05/07/ 2012.

Garde-Cerdan, T.; Gonzalo-Diago, A.; Pérez-Álvarez, E. **Phenolic compounds: Types, effects and research**. 2017. 1-245 p.

Garmus, T. *et al.* 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. **The Journal of Supercritical Fluids**, 86, p. 4-14, 02/01 2014.

Gholizadeh, H. *et al.* Smart thermosensitive chitosan hydrogel for nasal delivery of ibuprofen to treat neurological disorders. **Expert Opin Drug Deliv**, 16, n. 4, p. 453-466, Apr 2019.

Granato, D. *et al.* Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 80, p. 266-279, 2016/06/01/ 2016.

Hibbert, D. B. J. J. o. c. B. Experimental design in chromatography: a tutorial review. **Journal of chromatography B**, v. 910, p. 2-13, 2012.

Houngbèmè, A. G. *et al.* Antimicrobial activity of compounds from *Acanthospermum hispidum* DC and *Caesalpinia bonduc* (L.) ROXB: Beninese plants used by healers against HIV-associated microbial infections. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 8, p. 073-081, 2015.

Hudson, A. *et al.* A review of the toxicity of compounds found in herbal dietary supplements. **Planta medica**, v. 84, n. 09/10, p. 613-626, 2018.

Illum, L. Nasal drug delivery: new developments and strategies. **Drug Discov Today**, 7, n. 23, p. 1184-1189, Dec 1 2002.

Illum, L. Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions. **J Control Release**, 87, n. 1-3, p. 187-198, Feb 21 2003.

Jovanović, M. *et al.* Spray drying of *Gentiana asclepiadea* L. root extract: Successful encapsulation into powders with preserved stability of bioactive compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 172, p. 114044, 2021.

Kakpo, A. *et al.* Phytochemistry and anti-bacterial activity of thirteen plants used in traditional medicine to treat typhoid fever in Benin. **International Journal of Innovation and Applied Studies**, v. 25, n. 3, p. 1034-1047, 2019.

Klein, T. *et al.* Microparticles containing guaraná extract obtained by spray-drying technique: development and characterization. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 25, 2015.

Klein, T. *et al.* Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, 2009.

Kobayashi-Sakamoto, M. *et al.* Gastrointestinal colonisation and systemic spread of *Candida albicans* in mice treated with antibiotics and prednisolone. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 191-199, 2018.

Koukouikila-Koussounda, F. *et al.* In vitro evaluation of antiplasmodial activity of extracts of *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae) and *Ficus thonningii* Blume (Moraceae), two plants used in traditional medicine in the Republic of Congo. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, 10, n. 2, p. 270-276, 2013.

Li, L.; Redding, S.; Dongari-Bagtzoglou, A. J. J. o. d. r. *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. **Journal of dental research**, v. 86, n. 3, p. 204-215, 2007.

Lima, M. B. M. d.; Albuquerque, A. N. d.; Guimarães, A. B. P. d. Análise comparativa da eficácia antibacteriana de conservantes naturais em formulações caseiras de xarope à base de *Acanthospermum hispidum* DC, Asteraceae. 2019.

Liu, E. H. *et al.* Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids. **Molecules**, 13, n. 10, p. 2521-2544, 2008.

Loch-Neckel, G. *et al.* Obtenção de extratos secos de carotenoides a partir da biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* por secagem em torre de aspersão (spray-drying). **Matéria (Rio de Janeiro)**, 23, 2018.

Majerová, D. *et al.* Effect of colloidal silica on rheological properties of common pharmaceutical excipients. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 106, p. 2-8, 2016.

Mallmann, R. *et al.* Effectiveness of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze against diarrhea-inducing bacteria. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 04, p. 619-624, 2018.

Martins, L. d. P. S. *et al.* ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA ESPÉCIE VEGETAL *LIBIDIBIA FERREA* FRENTE A *CANDIDA PARAPSILOSIS*: UMA ABORDAGEM IN VITRO. **REVISTA FOCO**, v. 16, n. 6, p. e2131-e2131, 2023.

Martins, R. *et al.* Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. **Food Research International**, 50, 03/02 2013.

McClements, D. J.; Jafari, S. M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. **Adv Colloid Interface Sci**, 251, p. 55-79, Jan 2018.

Mcmanus, B. A. *et al.* Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 2, p. 652-664, 2008.

Meyer, B. N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, 45, n. 5, p. 31-34, May 1982.

Mezzasalma, V. *et al.* Poisonous or non-poisonous plants? DNA-based tools and applications for accurate identification. **Int J Legal Med**, 131, n. 1, p. 1-19, Jan 2017.

Mihigo, D. S. *et al.* Preliminary GC-MS Profiling and Anti-bacterial activity Investigation of *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae). **International Journal of Chemistry and Aquatic Sciences**, 1111, p. 1-10, 06/01 2015.

Montgomery, D. C. **Design and analysis of experiments**. John Wiley & sons, 2017. 1119113474.

Moradi, S. *et al.* A TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 Poloxamer-based micelle/hydrogel composite: A promising novel candidate for the treatment of anosmia. **Biotechnology Progress**, v. 38, n. 6, p. e3294, 2022.

Moreno, E. *et al.* Thermosensitive hydrogels of poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) - Pluronic(®) F127 copolymers for controlled protein release. **Int J Pharm**, v.459, n. 1-2, p. 1-9, Jan 1 2014.

N'do J, Y. *et al.* Phytochemistry, Antioxidant, and Hepatoprotective Potential of *Acanthospermum hispidum* DC Extracts against Diethylnitrosamine-Induced Hepatotoxicity in Rats. **Medicines (Basel)**, v.5, n. 2, May 7 2018.

N. Politis, S. *et al.* Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 43, n. 6, 43, p. 889-901, 2017.

N'do, J. Y.-p. *et al.* Ethnobotany and Pharmacognosic Characterization of *Acanthospermum hispidum* (Asteraceae), A Medicinal Plant widely used in Traditional Medicine in the Central West Region (Burkina Faso). **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 8, n. 9,, p. 97-108, 2019.

Nascimento, J. *et al.* Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 29, 02/01 2009.

Nazar, H. *et al.* Thermosensitive hydrogels for nasal drug delivery: the formulation and characterisation of systems based on N-trimethyl chitosan chloride. **Eur J Pharm Biopharm**, 77, n. 2, p. 225-232, Feb 2011.

Neto, B. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. **Como Fazer Experimentos-: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Bookman Editora, 2010. 8577807134.

Neves, A. B. d. Geles termorreversíveis na veiculação de fármacos. 2019.

Nsor-Atindana, J. *et al.* Functionality and nutritional aspects of microcrystalline cellulose in food. **Carbohydrate polymers**, v.172, p. 159-174, 2017.

O'sullivan, J. J. *et al.* Atomisation technologies used in spray drying in the dairy industry: A review. **Journal of food engineering**, v. 243, p. 57-69, 2019.

Ogundele, A. V. *et al.* Antimicrobial activities of extract, fractions and isolated compounds from the fruits of *Elaeocarpus floribundus* growing in North-East India. **Journal of Herbal Medicine**, v.30, p. 100511, 2021.

Okoro, I.; Okoro, Phytochemical screening and antibacterial activity of different solvent extracts of *Acanthospermum hispidum* Dc. Aerial parts. **Niger Ann Nat Sci**, v. 16, p. 43-7, 2017.

Oliveira, O. W.; Petrovick, P. R. J. R. B. d. F. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 20, n. 4, p. 641-650, 2010a.

Oliveira, O. W.; Petrovick, P. R. J. R. B. d. F. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 641-650, 2010b.

Onyeto, C. A.; Akah, P. A.; Okafor, A. Antitussive properties of the root extract and fractions of *Acanthospermum hispidum* (L). **International Journal of Pharmacological Research**, 7, n. 1, p. 12-16, 01/30 2017.

Ostroschi, L. C. *et al.* Production of spray-dried proanthocyanidin-rich cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) extract as a potential functional ingredient: Improvement of stability, sensory aspects and technological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 343-351, 2018.

Palozi, R. A. C. *et al.* Roles of Nitric Oxide and Prostaglandins in the Sustained Antihypertensive Effects of *Acanthospermum hispidum* DC. on Ovariectomized Rats with Renovascular Hypertension. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2017, p. 2492483, 2017/09/20 2017.

Pastor, Y. *et al.* Intranasal delivery system of bacterial antigen using thermosensitive hydrogels based on a Pluronic-Gantrez conjugate. **Int J Pharm**, 579, p. 119154, Apr 15 2020.

Peixoto, M. P. G.; Freitas, L. A. P. Spray-dried extracts from *Syzygium cumini* seeds: Physicochemical and biological evaluation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 23, n. 1, p. 145-152, 2013/01/01/ 2013.

Pereira, G. G. *et al.* Formulation and characterization of poloxamer 407®: thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. **Química Nova**, 36, 2013.

Piana, M. *et al.* Antiinflammatory effects of *Viola tricolor* gel in a model of sunburn in rats and the gel stability study. **J Ethnopharmacol**, 150, n. 2, p. 458-465, Nov 25 2013.

Pozzoli, M. *et al.* Application of RPMI 2650 nasal cell model to a 3D printed apparatus for the testing of drug deposition and permeation of nasal products. **Eur J Pharm Biopharm**, 107, p. 223-233, Oct 2016.

Qi, X.-J. *et al.* Thermosensitive hydrogel designed for improving the antidepressant activities of genipin via intranasal delivery. **Materials & Design**, 206, p. 109816, 2021/08/01/ 2021.

Quideau, S. *et al.* Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angew Chem Int Ed Engl**, 50, n. 3, p. 586-621, Jan 17 2011.

Ramos, R. T. M. *et al.* Spectrophotometric Quantification of Flavonoids in Herbal Material, Crude Extract, and Fractions from Leaves of *Eugenia uniflora* Linn. **Pharmacognosy Res**, 9, n. 3, p. 253-260, Jul-Sep 2017.

Rao, M.; Agrawal, D. K.; Shirsath, C. Thermoreversible mucoadhesive in situ nasal gel for treatment of Parkinson's disease. **Drug Dev Ind Pharm**, 43, n. 1, p. 142-150, Jan 2017.

Ray, D. *et al.* Prevalence of *Candida glabrata* and its response to boric acid vaginal suppositories in comparison with oral fluconazole in patients with diabetes and vulvovaginal candidiasis. **Diabetes care**, v. 30, n. 2, p. 312-317, 2007.

Reis, R. *et al.* Recent developments on drying of extracts. *In: Recent developments in phytomedicine technology*: Nova Science Publisher Inc New York, 2017.

Roland, I. *et al.* Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **Int J Pharm**, 263, n. 1-2, p. 85-94, Sep 16 2003.

Romano, N. *et al.* Nutritional and technological properties of a quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) spray-dried powdered extract. **Food Research International**, v. 129, p. 108884, 2020.

Rowe, R. C.; Sheskey, P.; Quinn, M. **Handbook of pharmaceutical excipients**. Libros Digitales-Pharmaceutical Press, 2009. 1582121354.

Saidana, D. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of *Tamarix boveana* (Tamaricaceae). **Microbiological research**, v. 163, n. 4, p. 445-455, 2008.

Salunke, S. R.; Patil, S. B. Ion activated in situ gel of gellan gum containing salbutamol sulphate for nasal administration. **International Journal of Biological Macromolecules**, 87, p. 41-47, 2016/06/01/ 2016.

Samrudhi, P.; Ravikumar, P. HONEY BASED CLOTRIMAZOLE MICROEMULSION FOR TOPICAL DELIVERY. **Indo American Journal of pharmaceutical Research**, 6, p. 6908-6925, 01/01 2016.

Sansone, F. *et al.* Technological properties and enhancement of antifungal activity of a *Paeonia rockii* extract encapsulated in a chitosan-based matrix. **Journal of Food Engineering**, v. 120, p. 260-267, 2014.

Santos, E. R. S. L. d. **Perfil fitoquímico e atividade biológica de *Acanthospermum hispidum* L., *Boerhavia diffusa* Le *Eleutherine bulbosa* (Mill) Urb.** 2019. -, Universidade Federal de Pernambuco.

SANTOS, Grazielle R. *et al.* Avanços Analíticos Baseados em Modelos de Calibração de Primeira Ordem e Espectroscopia Uv-Vis para Avaliação da Qualidade da Água: Uma Revisão-Parte 1. **Química Nova**, v. 45, p. 314-323, 2022.

Santos, J. B. X. d. **Avaliação da atividade anti-inflamatória de géis a base de extratos vegetais de plantas do nordeste brasileiro: *Jatropha gossypifolia* e *Ipomoea pes-caprae***. 2018. -, Brasil.

Sharma, P. K.; Bhatia, S. R. Effect of anti-inflammatories on Pluronic® F127: micellar assembly, gelation and partitioning. **International Journal of Pharmaceutics**, 278, n. 2, p. 361-377, 2004/07/08/ 2004.

Shishir, M. R. I.; Chen, W. J. T. i. f. s.; Technology. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in food science & technology**, v. 65, p. 49-67, 2017.

Siddiqui, M. R.; Alothman, Z. A.; Rahman, N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, 10, p. S1409-S1421, 2017/02/01/ 2017.

Simioni, A. R. *et al.* Obtenção e caracterização de extrato bruto de cavalinha para fins medicinais. **Revista Tecnologia e Tendências**, v. 10, n. 2, p. 75-92, 2019.

Simões, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

Simões, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016. 8582713657.

Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *In: Methods in enzymology*: Elsevier, 1999. v. 299, p. 152-178.

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.

Soares, P. A. G. **Obtenção, caracterização e aplicação de hidrogéis a base de polissacarídeos**. 2015.

Souza, T. P. d. **Desenvolvimento tecnológico e otimização de formas farmacêuticas sólidas contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L.(Euphorbiaceae)**. 2004.

Spaniol, B. **Comparação do comportamento compressional de granulado contendo produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. entre máquinas de comprimir alternativa e rotativa**. 2007.

Su, Y. *et al.* Chitosan Hydrogel Doped with PEG-PLA Nanoparticles for the Local Delivery of miRNA-146a to Treat Allergic Rhinitis. **Pharmaceutics**, 12, n. 10, Sep 23 2020.

Tan, Y. *et al.* Rational Design of Thermosensitive Hydrogel to Deliver Nanocrystals with Intranasal Administration for Brain Targeting in Parkinson's Disease. **Research (Wash D C)**, 2021, p. 9812523, 2021.

Tovar, R. T.; Petzel, R. M. J. D.-a.-m. Herbal toxicity. **Disease-a-month**. v.55, n. 10, p. 592-641, 2009.

Trache, D. *et al.* Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and bio-composites application—A review. **International Journal of Biological Macromolecules**.v.93, p. 789-804, 2016.

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**, 15, 2005.

Vidović, S. S. *et al.* Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. **Powder technology**. 258, p. 209-215, 2014.

Wagner, H. *et al.* **Chromatographic fingerprint analysis of herbal medicines**. Springer, 2011. 3709107636.

Wang, Q. *et al.* Updates on thermosensitive hydrogel for nasal, ocular and cutaneous delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 559, p. 86-101, 2019/03/25/ 2019.

Xing, J.-F.; Zheng, M.-L.; Duan, X.-M. Two-photon polymerization microfabrication of hydrogels: an advanced 3D printing technology for tissue engineering and drug delivery. **Chemical Society Reviews**, 44, n. 15, p. 5031-5039, 2015. 10.1039/C5CS00278H.

Xu, C.-C. *et al.* Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 15, n. 10, p. 721-731, 2017/10/01/ 2017.

Yang, J.; Li, J. Self-assembled cellulose materials for biomedicine: A review. **Carbohydr Polym**, 181, p. 264-274, Feb 1 2018.

Yapi, A. B. *et al.* ETHNOBOTANICAL STUDY AND COMPARISON OF ANTITRICHOPHYTIC ACTIVITY LEAVES OF *ASPILIA AFRICANA* (PERS.) CD ADAMS VAR. *AFRICANA*, *AGERATUM CONYZOIDES* L. AND *ACANTHOSPERMUM HISPIDUM* DC. ON THE IN VITRO GROWTH OF TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES. **INDO AMERICAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**. 5, n. 5, p. 4766-4773, 2018.

Zanoni, F. *et al.* Microencapsulation by spray-drying of polyphenols extracted from red chicory and red cabbage: Effects on stability and color properties. **Food Chemistry**. 307, p. 125535, 2020.

Zorzi, G. K. *et al.* On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 25, 2015.