



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JOSÉ CLAUDIO KLIER MONTEIRO FILHO

ESTUDO DA ESTABILIDADE E LIBERAÇÃO DE ATIVOS DE GRÂNULOS E
MICROPARTÍCULAS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE VARRONIA
VERBENACEA E ACHYROCLINE SATUREOIDES

CAMPINAS

2019

JOSÉ CLAUDIO KLIER MONTEIRO FILHO

ESTUDO DA ESTABILIDADE E LIBERAÇÃO DE ATIVOS DE GRÂNULOS E
MICROPARTÍCULAS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE VARRONIA
VERBENACEA E ACHYROCLINE SATUREOIDES

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de
concentração – Clínica Médica

ORIENTADOR: PROF DR RODNEY ALEXANDRE FERREIRA RODRIGUES

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO JOSÉ CLAUDIO KLIER MONTEIRO FILHO, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. RODNEY ALEXANDRE FERREIRA RODRIGUES.

CAMPINAS

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 3370/2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M764e Monteiro Filho, José Claudio Klier, 1994-
Estudo da estabilidade e liberação de ativos de grânulos e micropartículas contendo óleo essencial de *Varronia verbenacea* e *Achyrocline satureoides* / José Claudio Klier Monteiro Filho. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Plantas medicinais. 2. Composição de medicamentos. 3. Lactose. 4. Celulose. 5. Polissorbatos. 6. Técnicas *in vitro*. I. Rodrigues, Rodney Alexandre Ferreira, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Stability and *in vitro* release studies using granules and microparticles from essential oils of *Varronia verbenacea* with *Achyrocline satureoides*

Palavras-chave em inglês:

Plants, Medicinal

Drug compounding

Lactose

Cellulose

Polysorbates

In vitro techniques

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues [Orientador]

Carmen Silvia Fávaro Trindade

Rafael Augustus de Oliveira

Data de defesa: 30-01-2019

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

JOSÉ CLAUDIO KLIER MONTEIRO FILHO

ORIENTADOR: RODNEY ALEXANDRE FERREIRA RODRIGUES

MEMBROS:

1. PROF. DR. RODNEY ALEXANDRE FERREIRA RODRIGUES

2. PROFA. DRA. CARMEN SILVIA FÁVARO TRINDADE

3. PROF. DR. RAFAEL AUGUSTUS DE OLIVEIRA

Programa de Pós-Graduação em CLÍNICA MÉDICA da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 30/01/2019

“Se o futuro parece obscuro
Cabe a nós, brilhar
Se não há ninguém no controle
Cabe a nós, direcionar
Embora vivamos em tempos difíceis
Cabe a nós, tentar
Embora saibamos que o tempo tem asas
Cabe a nós, voar”

Neil Elwood Peart, Gary Lee Weinrib, Alex Zivojinovich

AGRADECIMENTOS

A meus pais, José Claudio e Áurea, meus irmãos, Alice e Mauro, meu cunhado Carlos Alberto e meus sobrinhos José Francisco e Fúlvia, por todo suporte e valiosos conselhos, pela motivação, assim como pelas risadas e o carinho presente. Foram parte importante deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodney, pela incrível oportunidade concedida - ainda que eu não tivesse experiência-, pela tranquilidade em momentos de apreensão, pela atenção a detalhes e críticas construtivas, pelo conhecimento compartilhado, pelas risadas e todo o respeito.

A banca, composta pela Profa. Dra. Carmen Silvia Fávaro-Trindade e pelo Prof. Dr. Rafael Augustus de Oliveira, pelas valiosas críticas e observações frente a este trabalho.

A Carol, por me guiar em diversos momentos, me ensinar muito além do que eu havia perguntado, pelas horas a mais no laboratório para que tudo ocorresse perfeitamente (ou simplesmente para lavar excessos de vidraria), pela grande companhia, a mão amiga nos momentos difíceis, pela imensa amizade e por todo carinho e atenção.

A Verônica, por todo conhecimento e auxílio compartilhado, pela amizade e todos os conselhos, e ao seu marido Felipe, pelas brincadeiras e inúmeras risadas provenientes dos mais simples encontros.

A todos os amigos da DQOF: Sinésio, Adilson, Marili, Adriana, Vera, Gabriela e Fábio pelos cafés e por todo auxílio no trabalho com conselhos e ensinamentos.

A todos os meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins.

A todos os estagiários que ajudaram neste processo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 3370/2017.

Resumo

O Brasil é um país com grande variedade de espécies vegetais, o que permite a promoção de novos medicamentos à base de plantas medicinais (fito medicamentos), as quais podem conter múltiplas substâncias de interesse terapêutico. Dentre estas substâncias existem os óleos essenciais: compostos voláteis e de ampla aplicação farmacêutica, alimentícia e cosmética, porém que apresentam instabilidade. No meio farmacêutico, entretanto, existem estratégias para contornar estes fatores como a viabilização destes óleos em micropartículas ou em granulados. Para a produção de micropartículas pode-se utilizar a técnica de *spray-drying*, a qual atomiza e seca uma emulsão a temperaturas entre 110 e 300°C, e para a granulação, o processo de adição de um agente aglutinante para gerar uma aglomeração dos componentes da formulação, seguido de secagem, propicia partículas com funcionalidade de proteção. Neste trabalho dois excipientes muito comuns na indústria farmacêutica (Lactose e Celulose microcristalina) foram utilizados para a produção de partículas contendo o óleo essencial de duas espécies brasileiras, a Erva-baleeira (*Cordia verbenacea* sinonímia *Varronia verbenacea*) e a Macela (*Achyrocline satureioides*) – ambas com atividade anti-inflamatória e antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi produzir micropartículas e grânulos que auxiliassem na estabilidade de tais óleos, avaliando assim o óleo interno retido, a consistência dos grânulos produzidos, a umidade relativa e liberação *in vitro* destas formulações, assim como a análise dos principais compostos químicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de Massas no decorrer de sua estocagem por 30 e 60 dias. Os granulados apresentaram retenção de 45% dos óleos empregados e maior liberação *in vitro* quando comparados às micropartículas, que retiveram 12%, porém as micropartículas demonstraram um perfil de liberação mais constante e umidade relativa menor (3% quando comparado a dos grânulos, que foi de 4 a 20%), tornando-as mais adequadas para sua veiculação em cápsulas duras. Ao final do teste, devido à baixa recuperação do óleo essencial, concluiu-se que, ainda que tenha existido uma retenção parcial dos óleos, ambas as partículas necessitam de otimização para que possam ser empregadas para manutenção da estabilidade dos óleos essenciais com o tempo.

Palavras-chave: Plantas Medicinais; Composição de Medicamentos; Lactose; Celulose; Polissorbatos; Técnicas In Vitro

Abstract

Brazil possess a large amount of plant species, of which can hold on a great variety of therapeutic compounds, including essential oils. These substances are volatile complexes with wide application in pharmaceutical, food and cosmetics industry, but present instability problems. However, there are some strategies on the pharmaceutical mean such as the granulation and the microparticulation that can be useful in the protection of these compounds. Spray-drying is a well-known technique that dries an atomized emulsion with temperatures ranging from 110-300 ° C generating microparticles or microspheres. Granulation can be considered an easy and low-cost technique, which consist of adding an agglutinating agent to a powder mixture, followed by its drying, resulting in granules that provide protection. In this work two common pharmaceutical excipients will be tested (Lactose and Microcrystalline cellulose) in order to create particles containing essential oils from two Brazilian plants: Erva-baleeira (*Cordia verbenacea* synonymic *Varronia verbenacea*) and Macela (*Achyrocline satureioides*) – both presenting antimicrobial and anti-inflammatory effects. The objective was to produce microparticles and granules that enhanced essential oil's stability by evaluating formulation's retention rate, granules integrity, relative humidity, *in vitro* release profile and chromatographic analysis during its storage for 30 and 60 days. The granules presented a higher retention rate (45%) and a higher amount of released oil when compared to the microparticles, which retained 12% of essential oil, however the microparticles showed a constant release of the oils and lower humidity values (3% compared to the granules, which varied from 4 to 20%), allowing its use on hard gelatine capsules. At the end of the test due to low essential oil concentrations it was concluded that, although the retention of oils was visible, both particles need optimization to enhance essential oil's stability.

Key-words: Plants, Medicinal; Drug Compounding; Lactose; Cellulose; Polysorbates; In Vitro Techniques

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração das flores da espécie <i>Achyrocline satureioides</i> (Fonte: Coleção de plantas medicinais e aromáticas do CPQBA - UNICAMP).....	23
Figura 2. Ilustração das flores e folhas da espécie <i>Varronia verbenacea</i> (Fonte: Coleção de plantas medicinais e aromáticas do CPQBA – Unicamp).....	24
Figura 3. Microcápsulas dos tipos mononuclear (A), protegido pelo polímero e do tipo matriz (B), com compartimentos distribuídos pelo polímero.....	26
Figura 4. Ilustração de um mini Spray Dryer marca Büchi®, modelo B-290 de bancada, com detalhes da câmara de secagem (A), do copo coletor (B) e sonda de saída (C)..	34
Figura 5. a) Aparelho de Clevenger para hidrodestilação, descrito pela Farmacopeia Brasileira, b) Adaptação, com condensador extra na saída “K”.....	36
Figura 6. Grânulos obtidos por granulação via úmida, secos em estufa (A) e dessecador (B).....	40
Figura 7. Aspecto dos grânulos observados em microscopia óptica em aumento de 40x.....	41
Figura 8. Micropartículas produzidas por <i>spray-drying</i>	41
Figura 9. Aspecto do pó seco por <i>spray-drying</i> em microscopia óptica em aumento de 40x.....	42
Figura 10. Liberação cumulativa <i>in vitro</i> do óleo essencial dos tratamentos Estufa versus Dessecador versus <i>Spray-Drying</i>	49
Figura 11. Liberação cumulativa <i>in vitro</i> do óleo essencial do tratamento em estufa..	49
Figura 12. Liberação cumulativa <i>in vitro</i> do óleo essencial do tratamento em dessecador.....	50
Figura 13. Liberação cumulativa <i>in vitro</i> do óleo essencial do tratamento por <i>spray-drying</i>	50
Figura 14. Porcentagem de óleo essencial recuperado em cada formulação com o decorrer dos meses.....	53

Figura 15. Curvas de calibração dos analitos α -pineno, trans-cariofileno e α -humuleno.....	55
Figura 16. Cápsulas gelatinosas duras após 60 dias. a) Secagem em estufa, b) Secagem em dessecador, c) Microencapsulação em <i>Spray-drying</i>	61
Figura 17. Resultado do teste de granulometria utilizando as diferentes formulações (A a E) baseadas em literatura, apresentando as porcentagens de distribuição em diferentes tamises.....	79

Lista de Tabelas

Tabela 1. Ingredientes para a produção de granulado por via úmida, contendo óleo essencial.....	31
Tabela 2. Ingredientes empregados na produção de micropartículas por <i>spray-drying</i> , contendo óleo essencial.....	33
Tabela 3. Parâmetros aplicados aos ensaios para produção de micropartículas e valores empregados.....	33
Tabela 4. Resultados tamanho médio de partículas por teste de granulação - tempo inicial	44
Tabela 5. Tamanho médio das partículas obtidos no teste granulométrico com o decorrer do tempo.....	45
Tabela 6. Média das densidades aparente e compactada, Índice de Carr e Fator de Hausner dos grânulos e pós.....	47
Tabela 7. Comparação das porcentagens de óleo essencial total extraído a partir dos diferentes tratamentos de secagem, no tempo inicial.....	52
Tabela 8. Porcentagens de óleos essenciais retidos pelos grânulos e micropartículas no decorrer dos meses.....	52
Tabela 9. Equações da reta e valores de R ² obtidos para cada curva analítica a partir dos padrões.....	55
Tabela 10. Quantificação dos analitos nos diferentes métodos de secagem em tempo inicial, 30 e 60 dias – Lote Cápsulas.....	56
Tabela 11. Quantificação dos analitos nos diferentes métodos de secagem em tempo inicial, 30 e 60 dias – Lote Granel.....	56
Tabela 12. Quantidade total dos analitos α -humuleno e trans-cariofileno inicial, após 30 e 60 dias em μg , estimada pelos testes por CG/EM, no teste de liberação in vitro.....	59

Tabela 13. Umidade residual nas formulações, divididas em dois lotes.....	60
Tabela 14. Diferentes formulações de grânulos encontrados em literatura para realização de teste granulométrico.....	78
Tabela 15. Testes de extração realizados de acordo com metodologia de extração por ultrassom e centrifugação.....	81
Tabela 16. Resultado dos procedimentos extrativos utilizando técnica de extração por ultrassom e centrifugação.....	81
Tabela 17. Perda de óleo essencial em função do tempo de utilização em evaporador rotativo a vácuo.....	82
Tabela 18. Rendimento da recuperação dos óleos essenciais a partir da mistura de pós para formulação.....	84

Sumário

1. Introdução.....	15
2. Objetivos.....	17
3. Revisão bibliográfica.....	18
3.1. Produtos naturais e plantas medicinais	18
3.2. Óleos essenciais	20
3.2.1. <i>Achyrocline satureioides</i>	22
3.2.2. <i>Varronia verbenacea</i>	23
3.3. Formas farmacêuticas e funções	25
3.3.1. Microencapsulação.....	26
3.3.2. Granulação via úmida.....	28
4. Material e métodos	30
4.1. Materiais.....	30
4.2. Métodos	30
4.2.1 Obtenção dos óleos essenciais.....	30
4.2.2. Preparo por granulação via úmida	30
4.2.3. Secagem em estufa.....	32
4.2.4. Secagem em dessecador	32
4.2.5. Preparo por <i>spray-drying</i>	32
4.2.6. Teste de Granulação.....	34
4.2.7. Densidade aparente e compactada.....	35
4.2.8. Liberação <i>in vitro</i>	35
4.2.9. Extração do óleo essencial a partir das formulações.....	36
4.2.10. Quantificação por cromatografia gasosa acoplada a detector de Massas (CG-EM).....	37
4.2.11. Determinação da umidade residual das formulações pelo método de Karl Fischer.....	37
4.2.12. Estudo de estabilidade acelerado	38
5. Resultados e discussão	39
5.1. Obtenção dos óleos essenciais a partir das espécies vegetais.....	39
5.2. Preparo por granulação via úmida	39
5.3. Secagem por <i>spray-drying</i> (microencapsulação)	41
5.4. Teste Granulométrico	43
5.5. Densidade aparente e compactada	46
5.6. Liberação <i>in vitro</i>	48
5.7. Extração do óleo essencial total a partir das formulações	52
5.8. Quantificação do α -pineno, trans-cariofileno e α -humuleno por CG-EM	55
5.9. Determinação da umidade residual das formulações pelo método de Karl Fischer ...	59
5. Conclusão.....	63
7. Bibliografia.....	64

9. Apêndices.....	78
9.1. Testes granulométricos para seleção de formulação.....	78
9.2. Metodologia de extração de óleo essencial por ultrassom e centrifugação.....	80
9.3. Resultados extração por ultrassom e centrifugação	81
9.4. Teste da constância de óleo essencial por rotaevaporação utilizando vácuo.	82
9.5. Extração de óleos essenciais a partir de formulação farmacêutica de granulado.....	83
9.6. Rendimento extrativo por hidrodestilação em aparelho de Clevenger.....	84
9.7. Cadastro de patrimônio genético	85

1. Introdução

Por séculos os produtos naturais, mais particularmente as plantas, têm sido utilizados para o tratamento e controle de diversas doenças. Estima-se que 65% dos produtos farmacêuticos hoje em dia tem origem natural ou são derivados de tais substâncias, tendo como alguns exemplos marcos importantes na história da medicina como a quinina (isolada da *Cinchona officinalis*), a morfina (*Papaver somniferum*), a teofilina (*Theobroma cacao*) e a digoxina (*Digitallis purpurea*).^{1,2} Este tipo de medicamento é classificado como “fitoterápico”, e contém compostos isolados ou até mesmo misturas de diversas substâncias encontradas em plantas.³

Entretanto, as plantas são organismos complexos que não produzem somente uma classe de compostos. Sendo assim, seus extratos e preparos devem ser realizados de acordo com a substância de interesse que se deseja isolar e, posteriormente, verificar sua propriedade medicinal. Estes compostos podem ser divididos em grupos metabólitos como taninos, alcaloides, quinonas, saponinas, flavonoides, dentre outros, incluindo os óleos essenciais.²

Os óleos essenciais vêm ganhando maior visibilidade em diferentes áreas de aplicação, uma vez que podem ser utilizados no meio farmacêutico como anti-inflamatórios, bactericidas, viricidas e fungicidas (incluindo ainda bactérias multirresistentes); como aditivos de sabor, aroma e conservantes na indústria alimentícia e paralelamente com importância também na perfumaria e cosmética.⁴

No Brasil este fator é significativo, pois dentro das 350.000 a 550.000 espécies vegetais descritas no mundo, 55.000 estão presentes na flora brasileira. Dentre estas, diversas são as que produzem óleos essenciais como metabólitos secundários (produtos não essenciais do metabolismo vegetal) cuja atividade biológica vem sendo pesquisada pela compreensão da ação tóxica e farmacológica do óleo essencial como um todo ou seus compostos isolados.⁵

Entretanto, a instabilidade é um dos fatores mais limitantes no uso dos óleos essenciais. Em muitos casos, grande parte de suas moléculas podem sofrer oxidação, degradação por luz e calor, além de apresentarem altas taxas de evaporação. E para que estas perdas possam ser evitadas a proteção dos compostos contra o ambiente externo é uma estratégia promissora.⁴

No meio farmacêutico uma maneira de realizar este tipo de proteção é a técnica de microencapsulação. Microencapsulação é um processo que aprisiona uma substância (agente ativo) utilizando um material de parede, produzindo partículas micrométricas. A substância encapsulada pode ser chamada de núcleo ou recheio, e a que encapsula o agente ativo é chamada de revestimento ou parede, a qual pode ser feita de proteínas, amidos, gomas ou carboidratos como as maltodextrinas.^{6,7} Esta técnica é muito utilizada nas indústrias farmacêutica e alimentícia, e é aplicada com diversos objetivos, tais como: reduzir a reatividade do material ativo, proteção do material encapsulado, facilitar manuseamento, armazenagem e aplicação, promover a liberação controlada e mascarar possíveis sabores desagradáveis.⁶

As técnicas para preparo de uma micropartícula podem ser diversas: atomização, leito fluidizado, liofilização, inclusão molecular, coacervação, envolvimento lipossômico, dentre outras.^{7,8} A técnica utilizada neste trabalho será a de atomização por *spray-drying*, na qual uma suspensão, emulsão ou solução a ser microencapsulada passa por um bico atomizador que, ao entrar em contato com um fluxo de ar ou outro gás a temperaturas que variam comumente de 100 a 300 °C, sofre evaporação do solvente.⁹

Já outra estratégia para que se crie uma proteção dos compostos de interesse é a granulação. Esta técnica pode ser preparada de duas maneiras: via úmida e via seca, envolvendo agregação ou desagregação dos pós utilizados como material de parede. Na desagregação, primeiramente, parte-se de um sólido aglomerado de pós, o qual é fracionado para gerar grânulos, enquanto na agregação adiciona-se um agente aglutinante ao pó para a formação direta dos grânulos. A diferenciação entre a via úmida e a seca envolve o tipo de agregador utilizado, e de sua dependência ou não de umidade para melhor incorporação durante o processo.¹⁰ A agregação por granulação pela via úmida foi empregada neste trabalho por ser uma metodologia muito utilizada na indústria farmacêutica e passível de comparação com as microcápsulas, além de ser a mais indicada para uso quando se trata de um princípio ativo líquido.

Como material de recheio das técnicas empregadas, utilizamos os óleos essenciais de duas espécies vegetais nativas do Brasil: Erva-baleeira (*Varronia verbenacea*) e Macela (*Achyrocline satureioides*).

A *Varronia verbenacea* é um arbusto ramificado que se propaga do estado do Ceará ao Rio Grande do Sul, em regiões litorâneas (cerca de 500 a 1000m da costa);

e apresenta efeitos anti-inflamatório, analgésico, antiulcerativo, antimicrobiano e antiofídico.¹¹

A *Achyrocline satureioides* é uma herbácea que se distribui por toda América tropical, utilizada tradicionalmente em forma de infusão como sedativa, antiespasmódica, anti-inflamatória e contra desordens intestinais; seu extrato apresenta propriedade antibacteriana.¹²

Ambos os óleos essenciais apresentam em sua composição os compostos α -pineno, trans-cariofileno e α -humuleno, dos quais o α -pineno se encontra como composto majoritário, sendo por isto, utilizado como marcador químico; já os demais, apresentam importância relevante à atividade biológica.¹³

2. Objetivos

- Produzir grânulos e micropartículas que contenham óleos essenciais e comparar suas características quanto a tamanho, densidade, umidade, teor e estabilidade em condições de armazenagem controladas;
- Determinar analiticamente por CG-EM os componentes α -pineno, trans-cariofileno e α -humuleno antes e depois de serem encapsulados por *spray-drying* ou incorporados por granulação via úmida;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* das micropartículas e dos granulados produzidos e compará-los.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Produtos naturais e plantas medicinais

Os produtos naturais fazem parte da vida do ser humano desde os primórdios como fonte de alimento, materiais para vestuário, habitação, defesa e ataque, como utensílios para manifestações artísticas, religiosas e culturais, e como meio restaurador da saúde.² No exercício de buscar plantas para seu sustento e sobrevivência diversas espécies com ação tóxica e medicinal foram descobertas¹⁴, as quais permitiram o tratamento e prevenção das doenças desde o período Paleolítico Médio, há cerca de 60 mil anos.^{15,16} A utilização destas plantas se embasou principalmente em sabedoria popular, sendo que suas propriedades e usos são transmitidos oralmente por gerações.^{17,18,19}

Neste aspecto o conhecimento etnomédico exerce importante contribuição para os grandes desenvolvimentos nos cuidados de saúde. São numerosas as informações encontradas em literatura, mas que ainda não foram compiladas de maneira utilizável. Tal fator desperta grande interesse por parte de pesquisadores em estudos multidisciplinares, exemplificando as áreas da botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre uma inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial.²⁰

Na área da saúde as plantas desenvolvem um importante papel, não só por serem uma fonte notável no tratamento de várias doenças, como também na descoberta de diversos ativos farmacêuticos que podem ser isolados de acordo com sua estrutura e funcionamento.^{1,18,19} Atualmente elas se encontram como foco da pesquisa moderna devido a sua vasta diversidade química e de substâncias biologicamente ativas promissoras, ainda que sua utilização terapêutica deva ser avaliada e comprovada, assim como a segurança de sua utilização.^{21,22}

Outro ponto importante a ser ressaltado está na quantidade de plantas existentes no planeta que, dentre as 500 mil espécies já descritas, somente cerca de 5% são propriamente estudadas sob visão da fitoquímica, e uma porcentagem menor é avaliada quanto a aspectos biológicos. Neste quesito o Brasil, país detentor de uma flora de grande diversidade e uma ampla variedade de ecossistemas abrigados na região amazônica (a maior floresta tropical do mundo)^{23,24}, destaca-se por possuir pré-requisitos para o desenvolvimento de novos medicamentos por conter cerca de 22% de todas as espécies vegetais mundialmente (cerca de 55 mil espécies).^{25,26,27}

O uso de plantas medicinais tradicionais tem aumentado significativamente nos últimos anos e é reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), assim também como pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), sendo que, até o ano de 2007, a receita de fitoterápicos no Brasil faturou cerca de US\$ 160 milhões.²⁸

No Brasil, a quantidade de medicamentos fitoterápicos no âmbito nacional ainda é limitada, podendo ser citado como exemplo a existência de somente 12 fitoterápicos disponíveis pelo SUS em 2012, e a comparação da Relação Nacional de Medicamentos (RENAME) contendo 343 fármacos usualmente comercializados de forma isolada, contra apenas 71 plantas medicinais citadas na Relação Nacional de Plantas medicinais de interesse do SUS (RENISUS), contando ainda com o fato de fitoterápicos serem utilizados como terapias complementares na maioria dos casos.^{15,29,30}

A principal diferença entre um fitoterápico e um medicamento utilizado de forma isolada se dá pelo fato de o primeiro ter uma composição complexa e de componentes sinérgicos, além da concentração de ativos presentes em cada um.³¹ O uso de fitoterápicos pode aumentar as opções terapêuticas, apresentando medicamentos com espectro de ação mais abrangentes, além de serem alternativas de baixo custo, fácil acesso e com menor incidência de reações adversas.^{2,32,33}

Por estes contextos e pelo fato de inovações serem um fator movimentador da indústria farmacêutica, nota-se a importância do desenvolvimento de novos produtos fitoterápicos e sua inserção no mercado atual.¹⁵

Diversas substâncias com atividade biológica podem ser encontradas nas plantas e divididas em grupos, tais como: Alcaloides (com os subtipos quinolínicos, isoquinolínicos, tropânicos, indólicos e pirrolizidínicos), flavonoides, taninos, óleos essenciais, polissacarídeos, lignanas e neolignanas, quinonas, heterosídeos cardioativos, saponinas e metilxantinas.⁵ Essas substâncias são consideradas metabólitos secundários, sendo muitas delas envolvidas diretamente nos mecanismos que adequam o vegetal produtor a seu meio.² A presença de determinados grupos químicos tem importância na ação biológica e a metodologia utilizada para extração de uma espécie estudada dependerá destes grupos.⁵

Neste trabalho a classe química estudada foi a dos terpenos, os quais apresentam como fator marcante o fato de conterem odor característico e natureza volátil.⁵

3.2. Óleos essenciais

Ha milhares de anos os óleos essenciais vêm sendo utilizados pelo ser humano. Seus usos iniciais se davam especialmente na cultura egípcia a cerca de 6000 atrás no processo de mumificação, como óleos de massagem e também como protetores contra o ressecamento da pele em climas áridos. Na cultura persa os óleos de terebintina e mastique eram mais utilizados, sendo estes os primeiros óleos essenciais obtidos por destilação a seco. Durante a época das cruzadas os conhecimentos sobre estes óleos e perfumes se difundiram para o leste da Arábia, entrando em contato com o médico e filósofo Ibn Sina (Avicena), o qual aprimorou a extração do óleo de rosas utilizando uma serpentina refrigerada, obtendo assim um hidrolato. Entretanto, somente no século XIII é que se realizou a primeira descrição detalhada sobre óleos essenciais.³⁴

Desde então, diversos autores estudaram suas características, isolamento e sua classificação. Até que nos séculos XIX e XX químicos orgânicos passaram a se interessar por tais substâncias devido a suas propriedades medicinais, tóxicas, aromatizantes e aplicabilidade industrial.^{5, 34}

Os óleos essenciais são substâncias complexas, voláteis e de fragrância variável. Podem estar presentes em quaisquer partes da planta, em estruturas secretoras específicas como cavidades, canais, pelos glandulares e células parenquimáticas diferenciadas, sendo que em certas espécies o óleo essencial se concentra em um dos órgãos da planta, como exemplo comum as flores.³⁴

Estes compostos são produzidos como metabólitos secundários das plantas, ou seja, não essenciais para o vegetal, mas sim para finalidades adaptativas ao meio em que se encontra como afastar predadores, atrair animais polinizadores, controlar a transpiração e como inibidores de germinação. São principalmente constituídos de hidrocarbonetos como os monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos. Podem pertencer ainda ao grupo fenilpropanóide e dos compostos oxigenados como ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis entre outras substâncias de baixo peso molecular, cuja principal característica é a alta volatilidade. Estão presentes majoritariamente nas famílias *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Labiatae*, *Rutaceae* e *Umbeliferaceae*.^{5,34}

Sua utilização crescente nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica, o cultivo de espécies aromáticas e a obtenção de óleos essenciais constituem importantes atividades econômicas².

Os óleos essenciais têm grande importância no uso terapêutico. Diversas são suas aplicações, tais como anti-inflamatórios, antimicrobianos, antioxidantes, melhoradores de imunidade e de digestibilidade, além de estabilizarem a microbiota intestinal. Dentre os exemplos mais conhecidos nessa área temos o orégano, contendo timol em sua composição, com importante ação antimicrobiana³⁵; o eucalipto, com diversos usos, dentre eles como anti-histamínico e contra doenças respiratórias devido à presença do 1,8-cineol em sua composição³⁶; a lavanda com o linalol e o acetato de linalila, apresentando ação anti-inflamatória, antibacteriana e cicatrizante³⁷ e a canela-da-china, muito utilizada pela medicina *Ayurvedica* não só pela sua atividade anti-inflamatória, mas também pelo potencial antifúngico, antimicrobiano, antidiabético e anticâncer, tendo em seu óleo essencial o eugenol e o cinamaldeído.³⁸

Nota-se também o destaque conquistado pelas plantas medicinais em conjunto com os óleos essenciais na terapêutica por seu amplo uso como anti-inflamatório, e com menores incidências de efeitos adversos.³⁹

O processo inflamatório é uma resposta fisiológica a danos causados ao organismo que visa restaurar o tecido afetado por lesão ou infecção, se tornando evidente na progressão de diversas doenças.⁴⁰ É uma ferramenta de defesa controlada por vários mecanismos, os quais, quando estimulados de forma exacerbada, podem acarretar em distúrbios patológicos. Tendo isso em mente, o uso de drogas anti-inflamatórias trabalha na limitação de tais efeitos acentuados.⁴¹

Dentre as substâncias que apresentam atividade anti-inflamatória, existe uma classe que pode ser encontrada em uma grande variedade de plantas medicinais: os terpenóides. Sua atividade se dá principalmente pela inibição da síntese de PGE2 e óxido nítrico. Como estudado por Moraes *et al.*⁴² ao observarem a inibição de proteínas pró-inflamatórias importantes (IL-2, IFN- γ , TNF- α) causada pelo Lupeol, um triterpeno pentacíclico, e também em estudo por Santiago *et al.*⁴³ que avaliaram a atividade de diterpenos isolados de espécies de *Copaífera*, confirmando sua atividade anti-inflamatória pela maior abundância de ácido copálico em sua constituição. Para os sesquiterpenos notou-se grande propriedade anti-inflamatória através da inibição de IL-1 e TNF- α através de estudo executado por Moraes *et al.*⁴² ao avaliarem os

efeitos do Trans-cariofileno e α -humuleno. Ainda, Souza *et al.*⁴⁴ comprovaram a atividade anti-inflamatória de β -mirceno e limoneno (monoterpenos) isolados dos óleos essenciais de *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. (Asteraceae) e *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae).

Neste trabalho, os óleos essenciais de duas plantas da flora brasileira com ação comprovada e com finalidades terapêuticas semelhantes foram incorporados em forma de medicamento por via oral (cápsulas gelatinosas duras). Estas espécies são a *Varronia verbenacea* (Erva-baleeira) e *Achyrocline satureioides* (Macela).

3.2.1. *Achyrocline satureioides*

A *Achyrocline satureioides*, uma importante planta medicinal pertencente à família Asteraceae, também conhecida por Macela, Marcela-do-campo, Marcela, trata-se de uma planta herbácea, de cerca de um metro de altura; seu caule é coberto por pelos esbranquiçados, e suas folhas são lineares. As flores são reunidas em inflorescências do tipo capítulo, de coloração amarelo-clara, no ápice dos ramos. É uma planta invasora de terrenos baldios, pastos e terrenos agrícolas abandonados. Está presente na América tropical, amplamente distribuída na América do Sul, e floresce de julho a setembro. Suas inflorescências são muito utilizadas pelas populações locais como enchimento de travesseiro para combate às afecções respiratórias como asma, bronquite e infecções do trato respiratório superior e também por conter um aroma agradável. Popularmente é utilizada em forma de infusão como sedativa, anti-inflamatória, antiespasmódica e contra distúrbios intestinais. Como chá também é utilizada contra náuseas e dores epigástricas. Outras utilizações terapêuticas incluem sua atividade hepatoprotetora, antiparasitária, tripanocida e como amenizadora dos efeitos da quimioterapia.^{45,46}



Figura 1. Ilustração das flores da espécie *Achyrocline satureioides* (Fonte: Coleção de plantas medicinais e aromáticas do CPQBA – UNICAMP. Disponível em:< <https://webdrm.cpqba.unicamp.br/cpma/fotos/10.jpg>>)

Já estudos experimentais com seu extrato têm mostrado sua ação anti-inflamatória em colite induzida em camundongos⁴⁶, a qual apresenta comprovação por inibir adesão e o metabolismo oxidativo de neutrófilos⁴⁷, possui ação contra microrganismos patogênicos⁴⁸ e também apresenta efeito imunorregulatório⁴⁹, além de apresentar ação antioxidativa quando aplicado em tecidos hepático, renal e cardíaco em ratos infectados por tripanosoma⁵⁰, e ação antimicrobiana, principalmente contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.⁵¹ Segundo Stolz *et al.*⁵² esta espécie não apresenta elevada toxicidade, pois segundo Retta *et al.*⁵³ seus efeitos estão mais associados a atividades farmacológicas pronunciadas do que a um efeito tóxico.

3.2.2. *Varronia verbenacea*

Também conhecida como Erva-baleeira, Cordia, Camarinha, Catinga-de-barão ou Maria-preta é um arbusto muito ramificado, ereto e aromático, com hastes cobertas por casca fibrosa e com altura de 1,5-2,5 m. Apresenta folhas simples, alternadas, coriáceas, aromáticas. As flores são pequenas, brancas e dispostas em inflorescências racemosas, e os frutos quando maduros apresentam coloração vermelha. Suas folhas contêm tricomas glandulares globulares e reniformes, no qual o primeiro é responsável pela secreção de óleo essencial terpenóide, e o segundo pela secreção de flavonoides. Seu gênero está amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais do mundo, como Austrália, Nova Caledônia, Guiana, além do

Brasil. Foi utilizada inicialmente por indígenas, que faziam aplicação tópica do extrato bruto de suas partes aéreas, e é popularmente utilizada como antiulcerativa, analgésica e anti-inflamatória, em forma de infuso (chá) para via interna, e como compressa ou pomada para uso tópico.¹¹



Figura 2. Ilustração das flores e folhas da espécie *Varronia verbenacea* (Fonte: Coleção de plantas medicinais e aromáticas do CPQBA – Unicamp. Disponível em:< <https://webdrm.cpqba.unicamp.br/cpma/fotos/60.jpg>>)

Em 2005, foi desenvolvido o fito medicamento de nome fantasia Acheflân[®], do laboratório Aché, cujo princípio ativo é o óleo essencial de *Varronia verbenacea*, causando um impacto na indústria farmacêutica brasileira pelo incentivo ao uso dos produtos naturais como medicina alternativa a partir da vasta riqueza de espécies encontradas em nossa flora¹³ e tem sido um dos medicamentos fitoterápicos mais comercializados.⁵⁴

Os estudos experimentais feitos utilizando seus extratos demonstram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* sendo que também apresentou potencial ação antioxidante, avaliado *in vitro* pelos ensaios de radical livre utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), método utilizando 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) e pelo método de radical ânion superóxido.⁵⁵ O óleo essencial de *Varronia verbenacea* apresentou ação anti-inflamatória no teste de edema de pata em camundongos e ratos, indicando que seus componentes α -humuleno e trans-cariofileno exercem ação fundamental em tal efeito.⁵⁶

Tanto a *Varronia verbenacea* como a *Achyrocline satureioides* apresentam em seu óleo essencial alguns compostos em comum, como o α -pineno, trans-cariofileno e o α -humuleno. Dentre estes, os que mais apresentam relevância no quesito ação terapêutica são os dois últimos. O α -pineno toma papel como composto majoritário dos óleos, sendo sua presença e abundância um fator importante para que seja utilizado como marcador químico destes óleos essenciais e muitas vezes pelo papel de sinergismo dentre as moléculas.¹³

3.3. Formas farmacêuticas e funções

Observa-se então que os pontos terapêuticos referentes à utilização dos óleos essenciais são diversos. Porém estas substâncias raramente são administradas por humanos em sua forma pura, sendo mais frequente sua utilização em forma de formulações ou medicamentos, para que seu potencial seja bem aproveitado.

A administração necessita da sua incorporação em uma forma farmacêutica, constituída de componentes inertes ao óleo essencial.² Estes preparos podem variar desde soluções simples, até sistemas de liberação complexos, dependendo do uso adequado dos adjuvantes e da finalidade do medicamento. A partir disto, tem-se uma ampla visão sobre as muitas formas farmacêuticas existentes como soluções, suspensões, cápsulas, comprimidos, aerossóis, emulsões, dentre outras.⁵⁷ A escolha da forma farmacêutica mais apropriada deve considerar a eficácia e segurança do componente ativo e assegurar sua qualidade, facilitar a aplicação do medicamento (via de administração adequada), permitir a administração de dose efetiva do componente ativo, com precisão adequada ao seu emprego seguro e sua adequação a casos específicos, além de contornar problemas de estabilidade.²

Visando este último ponto podem-se citar duas técnicas muito utilizadas no meio farmacêutico. Uma delas é a microencapsulação, que consiste em aprisionar em escala microscópica um material de interesse em um material de parede, e a outra é a granulação, que além de melhorar o escoamento dos pós, também homogeneiza a distribuição do material de interesse em um grânulo macroscópico.^{10,58} Para uma substância tão instável e volátil como um óleo essencial, fator limitante para sua utilização como medicamento, tais técnicas podem providenciar o tipo de proteção adequada contra suas perdas ao ambiente em que se encontra.⁵⁸

3.3.1. Microencapsulação

As primeiras tentativas da utilização da técnica de microencapsulação datam a década de 1930. Porém sua primeira utilização foi realizada em 1954, pela empresa *National Cash Register*, a qual utilizou uma fina camada de microcápsulas de 1 a 10 μm contendo tinta, as quais eram rompidas pela pressão mecânica da escrita e assim geravam uma cópia na folha de baixo, do que havia sido escrito no papel superior; era conhecido como papel carbono sem carbono, porque ao contrário do anterior, não sujava as mãos.⁵⁹

A microencapsulação é uma técnica desenvolvida com objetivo principal de proteger compostos sólidos, líquidos ou gasosos por películas poliméricas gerando partículas que liberam seu conteúdo em condições controladas. O princípio envolve o isolamento da substância de interesse do meio externo, evitando interações físicas e/ou químicas, como oxidação, contato com luz e umidade.⁶⁰ O material que será encapsulado pode ser chamado de núcleo, preenchimento, material interno ou material de carga útil, já o material que protegerá o que o agente ativo é chamado de revestimento, membrana, casca, cápsula, material transportador, material de parede, fase externa, ou matriz.^{61,62}

Dependendo da técnica utilizada e dos materiais de núcleo e parede, uma microcápsula pode tomar duas formas: mononuclear e matriz (Figura 3); no primeiro caso o núcleo contendo o composto a ser protegido encontra-se envolvido pelo polímero formador de parede; já no segundo caso a substância a ser protegida fica dispersa na matriz polimérica em diversos compartimentos.⁵⁹

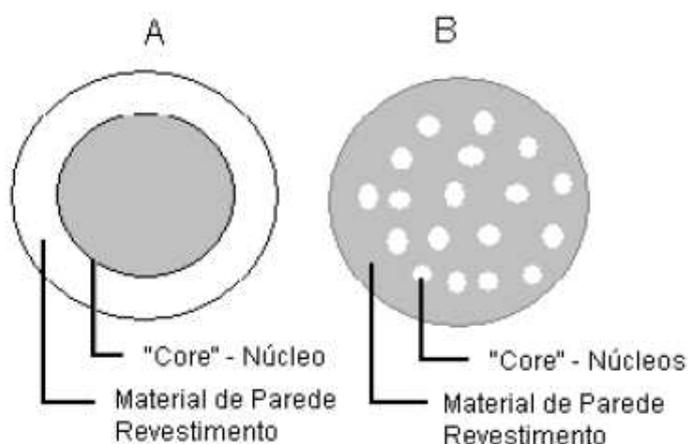


Figura 3. Microcápsulas dos tipos mononuclear (A), protegido pelo polímero e do tipo matriz (B), com compartimentos distribuídos pelo polímero.³³

São também classificadas através de seu tamanho de partícula, sendo de 1 a 1000 µm para micropartículas, e entre 1 e 100 nm para nanopartículas.^{63,64}

As vantagens da utilização da microencapsulação para produtos bioativos se dá principalmente por propiciar a conservação do material, assim como permitir o controle na liberação deste produto ativo em determinado meio^{65,66}, porém outros objetivos também podem ser alcançados como a redução da atividade do material ativo, facilitar o manuseamento, aplicação e armazenagem do componente microencapsulado e mascarar o sabor indesejável de certas substâncias.⁶⁷

Dentre as técnicas utilizadas para obtenção de tais partículas podemos incluir processos químicos (coacervação, co-cristalização, polimerização interfacial, gelificação iônica, incompatibilidade polimérica, aprisionamento em lipossomas e inclusão molecular) e processos físicos (atomização, congelamento e extrusão).⁶⁸ A escolha do método mais aplicável deve levar em consideração a sensibilidade do material a ser encapsulado à técnica, o tamanho de partícula desejado, as propriedades físico-químicas dos materiais de parede, suas possíveis aplicações e propriedades de liberação, assim como o valor econômico em todo o processamento.⁶⁹

A microencapsulação por *spray-drying* trata-se de um processo físico e apresenta vasta aplicabilidade, como nas indústrias de cerâmica, no qual seu uso auxilia na regularização do tamanho dentre as partículas⁷⁰, na eletrônica como ferramenta de revestimento de nano tubos para aumentar a potência de baterias⁷¹ e também na indústria alimentícia, sendo utilizada para microencapsulação de flavorizantes, lipídeos e carotenoides, além de diversas outras substâncias.⁷²

É uma técnica de destaque ao se tratar de óleos essenciais e outras substâncias voláteis pois soluciona problemas de estabilidade em condições adversas como a presença de luz, oxigênio, calor e pH extremos, além de mascarar odores e sabores desagradáveis e reduzir sua volatilidade. Isso se dá pelo revestimento realizado pelo material de parede empregado.¹³⁵ Em literatura pode-se encontrar diversos trabalhos utilizando desta técnica para aprisionamento de óleos essenciais, como o caso de Souza *et al.*¹³⁵ ao utilizarem complexos de ciclodextrina para óleo essencial de *Lippia sidoides*; Fernandes *et al.*¹¹³ envolvendo óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* em goma arábica, amido e maltodextrina e como realizado por Garcia⁸⁸, que envolveu óleo essencial de Manjerição utilizando como material de

parede goma arábica, isolado proteico de soja, isolado proteico de leite e maltodextrina.

No setor farmacêutico, a principal utilização da microencapsulação se dá para aumentar sua estabilidade, ou retardar e modificar sua liberação em locais específicos. Envolve a emulsificação de um material de núcleo (geralmente lipídico) com uma densa solução de material de parede (comumente amidos, proteínas, gomas e maltodextrinas, individualmente ou em conjunto) e sua posterior secagem por atomização, que consiste na aspersão desta emulsão sob um fluxo de ar quente que evapora o solvente presente na mistura.^{8,59}

3.3.2. Granulação via úmida

O processo de granulação tem por finalidade transformar partículas de pós cristalinos ou amorfos em agregados sólidos com resistência e porosidade variadas. Quando comparado a um pó não granulado, um grânulo apresenta maior homogeneidade de distribuição de seus componentes, maior densidade, facilidade de escoamento, reprodutibilidade em aferições volumétricas, melhor compressibilidade e resistência mecânica.⁷³

Um granulado apresenta sua cor e forma mais regular, limitado grau de distribuição granulométrica, fluidez, resistência mecânica e umidade acima de 3%. Todos estes fatores são influenciados pelo tipo de material usado na composição dos grânulos, assim como a metodologia utilizada para sua produção.¹⁰

As metodologias utilizadas se baseiam no agente aglutinante ou nos passos tecnológicos aplicados. Pode-se utilizar de uma etapa de agregação inicial, seguida de desagregação parcial deste pó; quando por via úmida, um agente aglutinante inicia o processo, quando por via seca, a simples compressão do pó dá início ao processo. Pode-se também partir de um pó fino, no qual será adicionado um agente aglutinante que virá a agregar as partículas resultando em um granulado. No presente trabalho este último método foi utilizado.

A granulação por via úmida de agregação convencional faz o uso de um líquido de umedecimento, podendo ser água ou solventes voláteis, apresentando ou não um agente aglutinante em sua composição. Este líquido é adicionado à mistura de pós, e então a mistura é submetida à agitação, o que deve promover a dissolução parcial dos componentes do pó. Esta massa úmida é então uniformizada através de sua

passagem por crivos de tamanho conhecido, recolhida e levada à secagem para que os grânulos adquiram resistência e umidade adequadas.¹⁰

A incorporação de matérias-primas vegetais líquidas, tais como os óleos essenciais, na granulação por via úmida, é uma alternativa metodológica na obtenção de granulados.²

Os grânulos e microcápsulas podem ser administrados da maneira como são produzidos, porém, na maioria das vezes, estes pós são viabilizados na forma de comprimidos e cápsulas pois isso permite um melhor controle na dose, apresenta praticidade de transporte e viabilização comercial, além de serem muito estáveis do ponto de vista químico e microbiológico, justificando a popularidade destes tipos de forma farmacêutica.^{2,74,75} Neste trabalho a viabilização destas micropartículas e grânulos foi feita utilizando-se cápsulas gelatinosas duras, e comparadas com o pó ou grânulo não encapsulado.

É válido ressaltar que a utilização destas técnicas para microencapsulação e granulação envolvendo estes dois óleos essenciais em mistura é uma abordagem ainda não encontrada em literatura, tornando-os comparáveis somente com trabalhos que utilizam outros óleos essenciais.

Tendo em vista que os materiais de parede utilizados para a técnica de *spray-drying* foram os mesmos da granulação, uma análise para que se comparar os dois produtos foi conduzida para a determinação do processo mais apropriado para a preservação dos constituintes presentes nos óleos essenciais, propiciando um perfil de liberação *in vitro* que cumprisse os requisitos de um fito medicamento para uso oral, geralmente de liberação imediata.

4. Material e métodos

4.1. Materiais

Óleos: óleo essencial de *Varronia verbenacea* e *Achyrocline satureioides*. Reagentes: D(+) Lactose (Dinâmica[®]), Celulose microcristalina (Labsynth[®]), Tween 80 (Labsynth[®]), água destilada, NaCl (Nuclear[®]), solução HCl 36% (Êxodo[®]), reagente de Karl-Fischer sem piridina (Vetec[®]), metanol (Tedia[®]). Todos os reagentes são P.A.

4.2. Métodos

4.2.1 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Varronia verbenacea* e *Achyrocline satureioides* foram obtidos das folhas frescas e inflorescências de macela, e das folhas secas de Erva-baleeira, cultivadas no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Unicamp (CPQBA), coordenadas geográficas: 22°47'53.8"S 47°06'47.2"W. As plantas foram identificadas sob os números de identificação UEC 1138 (*Achyrocline satureioides*) e UEC 112744 (*Varronia verbenacea*). Os óleos essenciais foram extraídos através da técnica de arraste a vapor em dornas de aço com capacidade para 1500 L. A separação do óleo e da água foi feita inicialmente em vaso separador de aço inox, e posteriormente com funil de separação e por fim, secos com adição de sulfato de sódio anidro.^{76,85}

Os óleos foram colocados em frascos âmbar e rotulados com o nome da espécie e período em que foram extraídos, e armazenados sob refrigeração a -18 °C.

4.2.2. Preparo por granulação via úmida

Empregou-se como base para esta etapa a formulação previamente testada (Apêndice 9.1.) Descrita por Koester & Thommes⁷⁷ (originalmente para produção de *pellets*) com adaptações. Nos componentes houve a adição de um agente surfactante (Tween 80) para melhor distribuição dos óleos essenciais utilizados neste projeto. Na secagem os autores utilizaram leito fluidizado a 65°C por 10 min, o que aqui também sofreu adaptações com a finalidade de avaliar os métodos de secagem utilizados para obtenção destes grânulos e, para isso, dois tipos de secagem diferentes foram empregados: secagem em estufa (descrito por Vanhoorne *et al.*⁷⁹) a 65°C e secagem em dessecador a temperatura ambiente (~25°C) como utilizado por Fung.⁷⁸

Os materiais empregados nas formulações foram: Celulose microcristalina P.A. (Labsynth[®], Diadema-SP), D(+) Lactose P.A. (Dinâmica[®], Diadema-SP), Tween 80 (Labsynth[®], Diadema-SP) e água destilada, além dos óleos essenciais, os quais foram empregados em mistura 1:1 por apresentarem os mesmos compostos de interesse, além de demonstrarem ação terapêutica semelhante.

Tabela 1. Ingredientes para a produção de granulados por via úmida, contendo óleo essencial.

Ingredientes	Proporção (em massa)
Celulose microcristalina P.A.	1,00
Lactose P.A.	1,00
Tween 80	0,10
Óleo essencial de erva-baleeira	0,08
Óleo essencial de macela	0,08
Água	1,30

Em um béquer, foram pesadas lactose e celulose microcristalina, os pós foram transferidos para um gral, misturados por 10 min para eliminação de grumos e homogeneização das partículas.

Em outro béquer pesou-se os óleos essenciais de macela e erva-baleeira em massas idênticas e o Tween 80, seguido da adição de água com mistura constante para homogeneização, formando-se uma emulsão. Essa emulsão foi vertida lentamente sobre a mistura de pós, sob agitação constante. Agitou-se a mistura final por mais 15 min.

A mistura então foi submetida ao processo de extrusão para padronização do tamanho de partículas. Para isso, utilizou-se um tamis com malha 0,71 mm, e pressionou-se a massa contra a malha utilizando uma espátula. O granulado resultante foi submetido à secagem por diferentes metodologias: secagem por estufa e secagem em dessecador.

Cinco outras maneiras de preparo testando-se componentes diferentes foram realizadas. Dentre os componentes testados estão o amido, polivinilpirrolidona, ácido ascórbico e carboximetilcelulose. Após produção, baseada em métodos de literatura, todas as formulações foram submetidas a uma avaliação por granulometria para que pudessem ser classificadas como granulados de tamanho padronizado e consistentes.⁸⁰ Dos métodos testados, dois foram os que apresentaram melhor

consistência, e um deles foi eleito como mais adequado para uso neste trabalho, pois além de apresentar melhor estabilidade como grânulo, foi o método mais reprodutível em relação à literatura (Apêndice 9.1.).

4.2.3. Secagem em estufa

Para a secagem dos grânulos empregou-se o método de secagem em estufa, o qual foi comparado a um método menos drástico em quesitos de temperatura, que é o método em dessecador, já que os óleos essenciais são sabidamente voláteis. Todos os ingredientes foram previamente misturados, resultando numa massa úmida produzida de acordo com a técnica descrita no item 4.3. Após a etapa de extrusão, os granulados gerados foram colocados em recipiente de alumínio sem tampa, sendo em seguida secos a 65 °C por 6 h em estufa marca Precision® *mechanical convection oven*, GCA Corporation, Chicago, USA.^{78,81,82}

4.2.4. Secagem em dessecador

O uso do dessecador geralmente está relacionado a testes de determinação de equilíbrio higroscópico estático, no qual o produto fica sob ambiente fechado com temperatura e umidade do ar controlados para que se observem suas perdas ou ganhos de água.⁸³ Neste trabalho a finalidade do uso da sílica gel no dessecador foi feita para a desidratação do produto, pois as condições moderadas de temperatura favoreceriam a manutenção da composição química original dos óleos essenciais em teoria.^{84,78}

Para a secagem em dessecador, todos os ingredientes foram previamente misturados, resultando numa massa úmida produzida de acordo com a técnica descrita em 4.3. Após a etapa de extrusão, os granulados gerados foram colocados em recipiente de alumínio sem tampa, sendo depois levado para secagem em dessecador a 25 °C ± 4, durante por 168 h, utilizando bomba de vácuo (700 mmHg), na presença de sílica gel tipo azul para secagem (Labsynth®, SP - Brasil).^{77,78,84}

4.2.5. Preparo por *spray-drying*

Para processamento por *spray-drying* foi utilizada a mesma formulação do processo de granulação⁸⁵, com alteração do volume de água para permitir uma suspensão adequada dos componentes, levando a uma porcentagem final de sólidos de 14%.

Tabela 2. Ingredientes empregados na produção de micropartículas por *spray-drying*, contendo óleo essencial.

Ingredientes	Proporção (em massa)
Celulose microcristalina P.A.	1,00
Lactose P.A.	1,00
Tween 80	0,10
Óleo essencial de erva-baleeira	0,08
Óleo essencial de macela	0,08
Água	13,60

Para produção das micropartículas o equipamento utilizado foi um mini Spray Dryer marca Büchi®, modelo B-290 (Figura 4), na Divisão de Química de Produtos Naturais do CPQBA/UNICAMP.

Os valores utilizados (Tabela 3) foram baseados em parâmetros de literatura^{85,86} e também nos parâmetros sugeridos pelo fabricante do equipamento, ajustados a partir da realização de ensaios preliminares (dados não apresentados). Para todos os processamentos foi utilizado ar comprimido.

Tabela 3. Parâmetros aplicados aos ensaios para produção de micropartículas e valores empregados.

Parâmetros	Valores
Temperatura de entrada do ar	120 °C
Temperatura de saída do ar	77 °C
Diâmetro do bico atomizador	1,5 mm
Taxa de aspiração	600 L/h
Bomba de alimentação (peristáltica)	360 mL/h
Batedor para limpeza do bico	Posição 3

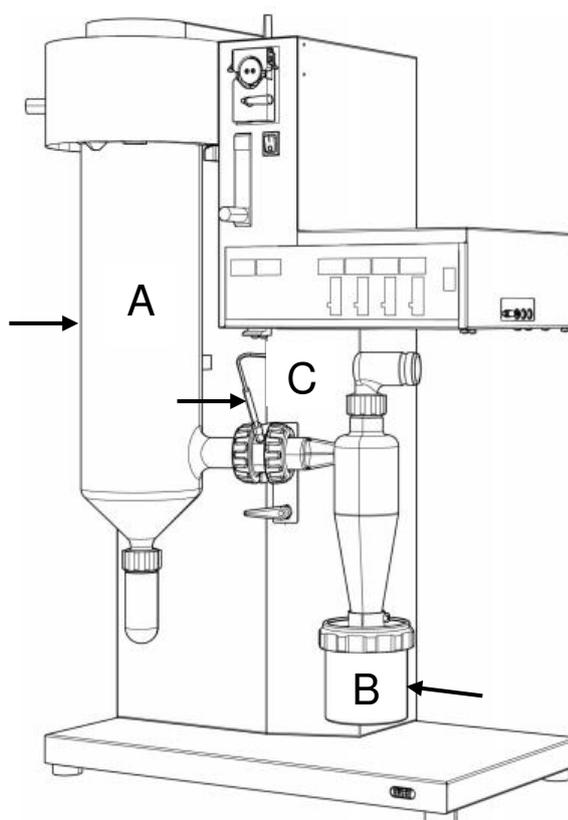


Figura 4. Ilustração de um mini *spray-dryer* marca Büchi®, modelo B-290 de bancada, com detalhes da câmara de secagem (A), do copo coletor (B) e sonda de saída (C). (Disponível em: <<https://www.buchi.com/br-pt/products/spray-drying-and-encapsulation/mini-spray-dryer-b-290>>).

Após o término do processamento, os pós obtidos foram divididos em “fração da câmara de secagem” e “fração do copo coletor”, devido ao fato de inferir-se previamente que a “fração da câmara de secagem” pudesse ter uma composição diferente da outra, tendo em vista que as partículas nela contida permanecem mais tempo expostas à temperatura de entrada (120 °C) do que a do copo coletor que fica posterior e é monitorada pela sonda de leitura (C) com temperatura de saída a 77 °C.⁴

4.2.6. Teste de Granulação

O tamanho de partícula dos grânulos e micropartículas foi determinado através da técnica de Granulometria por tamisação descrito pela farmacopeia Brasileira 5ªed. 10 g de amostra foram colocadas sobre um sistema de 4 tamises de malhas de mesh #20 (850 µm), 30 (600), 50 (300) e 60 (250) com um recipiente coletor inferior para pós <250 µm. O teste foi realizado em um agitador de tamis RX-30 Ro-tap *Sieve Shaker*®, Ohio, U.S.A. durante 15 min. Após final da agitação a massa de pó presente

em cada um dos tamises foi pesada para determinar a distribuição do tamanho de partícula.⁸⁰

4.2.7. Densidade aparente e compactada

Para determinação de densidade aparente, 2 g de amostra foram pesadas em uma proveta de 10 mL. O volume ocupado pelo pó ou grânulo foi então registrado. Para a determinação da densidade compactada esta mesma massa de amostra na proveta foi batida repetidamente sobre uma superfície plana provida de anteparo semirrígido a uma altura de 10 cm durante dois min. Ao final realizou-se a leitura do volume ocupado pelo pó compactado. O valor das densidades foi calculado dividindo-se a massa de pó pelo volume ocupado ao final de cada teste.^{87,88}

Para estes testes torna-se possível a aplicação do índice de Carr (1) e do fator de Hausner (2) para determinação de escoabilidade e coesividade, respectivamente. Tais equações são descritas abaixo.

$$\text{Índice de Carr} = \frac{(d_{compactada} - d_{aparente})}{d_{compactada}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Fator de Hausner} = \frac{d_{compactada}}{d_{aparente}} \quad (2)$$

4.2.8. Liberação *in vitro*

O teste de liberação *in vitro* foi conduzido de acordo com o método de Wang *et al.*⁸⁹ e a Farmacopeia Brasileira 5ª ed⁸⁰ com adaptações no volume de meio utilizado e na frequência de coletas. 600 mg de grânulos ou micropartículas foram colocados em 50 mL de meio 0,05M de NaCl, ajustado a pH 1,5 com HCl a 37°C sob agitação magnética constante (100 rpm) em uma placa de agitação e aquecimento IKA® C-mag HS7. Nos intervalos de 1, 3, 5, 10, 15, 30 e 60 min, 5 mL de material foram coletados e armazenados em tubo tipo Falcon, e 5 mL de meio foram repostos a cada coleta. As amostras coletadas foram centrifugadas a 3000 G durante 5 min para separação do material suspenso, e 0,5 mL do sobrenadante foram diluídos em 4,5 mL uma solução de branco para leitura em UV-vis a 214 nm. Uma curva analítica contendo uma mistura dos óleos essenciais em mistura 1:1 diluídos no branco analítico foi construída para sua quantificação.^{80,89,90,91,92}

4.2.9. Extração do óleo essencial a partir das formulações

Para avaliar a quantidade de óleo retida nas amostras, empregou-se a hidrodestilação em aparelho de Clevenger, baseado na metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5^a ed., com adaptações que estão mencionadas a seguir^{80,93,94}

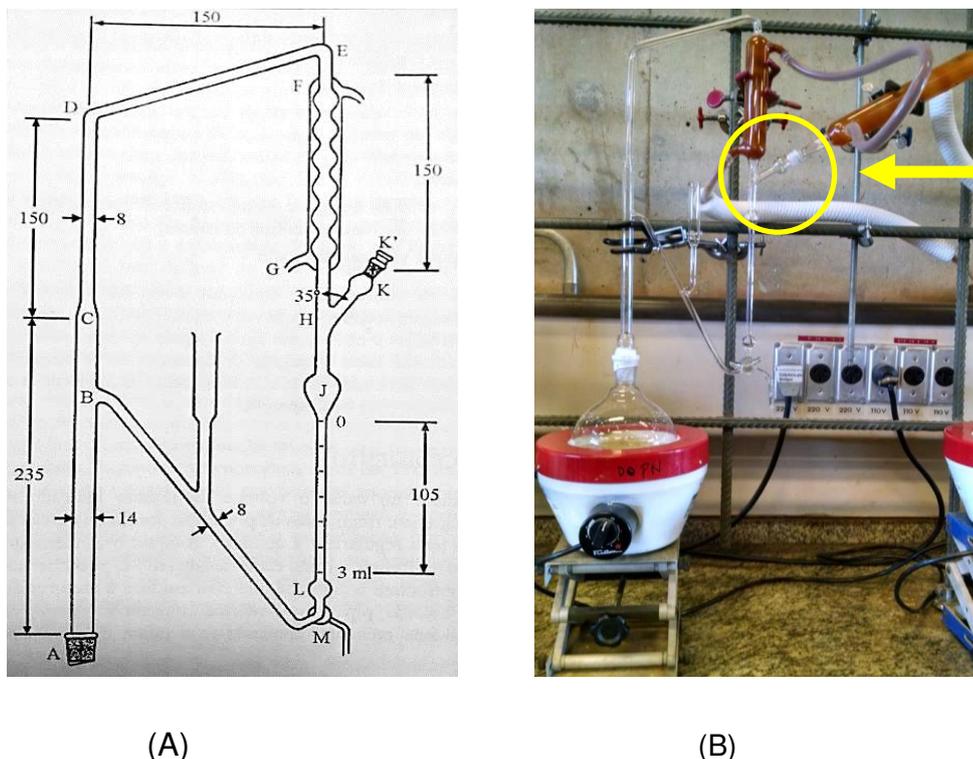


Figura 5. A) Aparelho de Clevenger para hidrodestilação, descrito pela Farmacopeia Brasileira⁸⁰, **B)** Adaptação, com condensador extra na saída “K”. (Fonte própria)

10 g de amostra oriunda dos processos de granulação ou *spray-drying*, foram colocadas em balão de fundo redondo, adicionou-se 400 mL de água destilada e pérolas de vidro para evitar ebulição tumultuosa. O balão foi colocado em manta de aquecimento (Fisatom, Mod.52, 200 W, SP - Brasil) e acoplado ao sistema de destilação. Para evitar a perda de óleo destilado, foi acoplado um condensador na saída superior do sistema (boca “K” da Figura 5). A extração foi padronizada em 3 h para todas as amostras, e o volume de óleo obtido em cada tratamento foi posteriormente reservado sob refrigeração a -18 °C até análise por Cromatografia à Gás.

Anteriormente à adoção do método de hidrodestilação, os outros métodos foram testados como tentativa para extração dos óleos essenciais, sendo eles: 1) extração com solvente orgânico, seguido de agitação por ultrassom, centrifugação e

filtragem e 2) extração com solvente orgânico em aparelho de Soxhlet. Em ambas as metodologias se utilizou como solvente extrator o diclorometano, um solvente excelente para óleos essenciais e de baixo ponto de ebulição. Entretanto, nenhuma das técnicas foi adotada, pois tendo como etapa final do processo a remoção do solvente por destilação à vácuo até peso constante, verificou-se que ambos métodos apresentavam problemas. Observou-se que na tentativa de retirar o solvente presente nas amostras, parte do óleo evaporava também (confirmado pelo balanço de massa por gravimetria) e, mesmo com a utilização de trietil citrato (um fixador utilizado em perfumaria^{95,96}) na tentativa de reter o óleo, isto não foi possível e assim o procedimento foi abandonado, uma vez que não condiziam com normativas para experimentos que envolvam determinações quantitativas e que exigem esta figura de mérito (repetitividade) com baixos desvios entre as amostras. Os dados brutos referentes a estes experimentos encontram-se nos Apêndices 9.2. a 9.4.

Após a realização destes ensaios preliminares, foi adotada a metodologia de extração por aparelho de Clevenger, utilizada na farmacopeia para dosagem de óleos essenciais de plantas pois com esta metodologia a recuperação dos óleos essenciais foi maior (83,64%), e este fator foi utilizado para calcular a quantidade teórica total de óleo presente nas amostras (Apêndice 9.6.).

4.2.10. Quantificação por cromatografia gasosa acoplada a detector de Massas (CG-EM)

O perfil cromatográfico dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação foi avaliado por cromatografia gasosa (Agilent HP 6890) e as condições operacionais foram: temperatura inicial 50 °C, temperatura final 220 °C, injeção modo *split*, coluna Agilent 19091J-433 HP-5 5% fenil metil polisiloxano (comprimento 30 m, diâmetro 0,25 mm, espessura de filme 250 µm), espectrômetro de Massas Agilent HP 5975, detector em modo SIM, utilizando como padrões analíticos os compostos α -pineno, trans-cariofileno e α -humuleno em metanol.

4.2.11. Determinação da umidade residual das formulações pelo método de Karl Fischer

Para avaliar a quantidade residual de água ao final do processamento por granulometria via úmida ou *spray-drying*, foi utilizado o método de Karl Fischer. Esta determinação permitiu uma comparação real entre as técnicas tendo em vista que todos os cálculos empregados envolvendo os grânulos e as micropartículas foram

realizados em base seca. Para cada determinação de água, três replicatas foram realizadas, contendo 200 mg de amostra.

A escolha do teste de Karl-Fischer para determinação de água no lugar do teste gravimétrico se deu em função da volatilidade dos compostos presentes nas formulações e o risco existente de perda destes durante a secagem na estufa, o que alteraria a massa e levaria a resultados pouco confiáveis.^{97,98,99,100}

4.2.12. Estudo de estabilidade acelerado

As amostras foram submetidas a um estudo de estabilidade acelerado a 40 °C e 75% de umidade relativa em sistema fechado, durante 6 meses e com coletas em 30, 60, 90 e 180 dias de acordo com a RE889 e foram divididas em duas categorias, denominados a partir de agora por “lotes tipo”:

- Lote tipo “Cápsulas” - micropartículas/ grânulos, acondicionados em cápsulas gelatinosas duras e posteriormente colocadas em frasco plástico com tampa.
- Lote tipo “Granel” - micropartículas/ grânulos, acondicionados em frasco plástico com tampa.

Os frascos foram armazenados em dessecador contendo solução saturada de NaCl para manter a umidade relativa de equilíbrio em 75%, e foram colocados em estufa a 40 °C. Nos períodos determinados as amostras foram coletadas e todos os testes realizados em ambos os tipos, com exceção do teste de liberação *in vitro* que só foi realizado com os “Lote Cápsulas”, uma vez que o objetivo deste teste é verificar a liberação dos óleos em um possível uso medicamentoso, o que não acomete o “Lote Granel”, que tem finalidade de reter tais óleos somente para armazenamento.^{101,102,103,104}

5. Resultados e discussão

5.1. Obtenção dos óleos essenciais a partir das espécies vegetais

Dentre os métodos clássicos de extração de óleos essenciais a partir de plantas os mais comumente utilizados são a hidrodestilação e a destilação por arraste de vapor. Sabe-se que, na primeira, existe a formação de artefatos provenientes do contato direto entre a água e o óleo essencial em questão, fato que induz tais óleos a reações hidrolíticas, e também o contato direto com o aquecimento empregado nas caldeiras resultando em degradação térmica. A vantagem da utilização da técnica de arraste a vapor encontra-se no contato da planta somente com o vapor da água empregada, o que reduz as degradações descritas anteriormente.^{2,4,105}

O procedimento extrativo descrito foi realizado como parte de um projeto anterior, e os óleos obtidos foram utilizados neste trabalho. O processo de arraste a vapor levou de 1,5 até 2 h para cada espécie. Os óleos foram recolhidos e separados em vaso florentino anexo à dorna e posteriormente em laboratório com sulfato de sódio anidro P.A para remoção de traços de água⁸⁵

Para a Erva-baleeira o rendimento foi de 0,34%, o que condiz com o rendimento obtido por Passos *et al.*⁵⁶ de 0,37% e de Carvalho Jr *et al.*¹³ de 0,42%. Para a Macela obteve-se rendimento de 0,05%, valor inferior ao observado em literatura, como exemplo em Gonçalves²⁸ de 0,60% e Amaral *et al.*⁶⁹ de 0,41%. O baixo rendimento se deu devido a uma colheita tardia que levou ao envelhecimento das flores e assim a uma queda da produção do óleo essencial, porém este ponto não será discutido neste trabalho.

5.2. Preparo por granulação via úmida

Em um processo de granulação, a avaliação da eficiência do processo utilizado se dá pela quantidade de partículas resultantes que estejam dentro das dimensões esperadas¹⁰⁶, que neste trabalho foram de 710 μm .

Sendo assim, para os grânulos secos em estufa a 65°C por 6h, obteve-se o equivalente a 95% de massa seca total utilizada inicialmente, dos quais cerca de 77% permaneceram com tamanho de partícula entre 600 e 800 μm . Para os grânulos secos em dessecador a 25°C por 168h os valores foram de 94,5% da massa seca inicial, e 74% desta mantendo seu tamanho de partícula entre 600 e 800 μm . Tais resultados se encontraram inferiores aos descritos por Suresh *et al.*¹⁰⁷ que observaram os rendimentos de processos de granulação entre 98 e 99%. As perdas em nosso

trabalho podem ter ocorrido pela maneira como o processo de granulação foi realizado: não foram utilizados granuladores automáticos como os de parafuso, peneira, cesto ou rolo comumente utilizados em indústrias farmacêuticas¹⁰⁸, mas sim de forma manual. O emprego da extrusão manual dos pós se deu pela indisponibilidade de equipamentos adequados para granulação e para a obtenção de *pellets* por extrusão-esferonização (sendo esta última a ideia inicial do trabalho).

Ainda, um importante comparativo está no tempo utilizado para a secagem dos grânulos em estufa, onde foi estabelecido o tempo de 6 h para a secagem, o que acarretou na eliminação de 80% da quantidade inicial de água (13% de água/h) sendo mais rápido que a secagem realizada por Tan *et al.*¹⁰⁹ que produziram grânulos de acetaminofeno e estufa a 40°C por 16 h (1% água/h) e a obtida por Keleb *et al.*¹¹⁰ com grânulos de lactose monohidratada secos em estufa a 25°C por 20h (5% de água/h) provavelmente mais rápido pela maior temperatura empregada. Ao passo que a secagem em dessecador a 25°C levou 168 h para retirada de 95% da água original (0,6% de água/hora), sendo mais lenta que a secagem realizada por Keleb *et al.* (previamente citado), ainda que a temperatura tenha sido a mesma deste autor. Provavelmente a perda mais lenta de água observada pela técnica do dessecador se deu pela presença da celulose microcristalina que apresenta propriedades higroscópicas, pois consegue reter uma quantidade maior de água devido a sua alta porosidade e superfície de contato.¹¹¹



Figura 6. Grânulos obtidos por granulação via umida, secos em estufa (A) e dessecador (B)

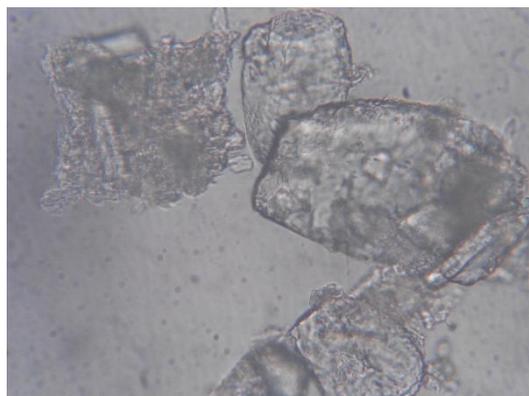


Figura 7. Aspecto dos grânulos observados em microscopia óptica em aumento de 40x

Observa-se através da microscopia óptica a presença dos cristais dos materiais de parede utilizados.

Na sequência, os grânulos obtidos por ambas as técnicas de secagem (Figura 6 A e B) foram divididos em dois lotes; um foi usado para preencher cápsulas de gelatina dura acondicionadas em frasco plástico com tampa e designada por Lote tipo “Cápsulas”, e outro armazenado em frasco plástico com tampa designado Lote tipo “Granel”. Ambos foram empregados no estudo de estabilidade.

5.3. Secagem por *spray-drying* (microencapsulação)

Para esta etapa foram usados 3,6 L da formulação (14% de sólidos totais), submetidas à atomização, em porções de 0,9 L. Cada processamento levou cerca de 3 h e o material de todas as porções foi reunido e misturado no final.



Figura 8. Micropartículas produzidas por *spray-drying*

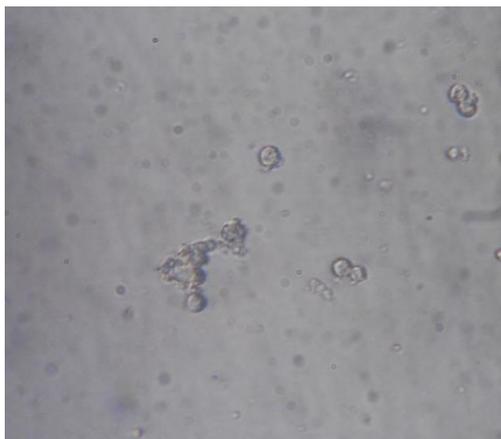


Figura 9. Aspecto do pó seco por *spray-drying* em microscopia óptica em aumento de 40x

O material produzido via *spray-drying* apresenta-se em formato circular e com tamanho inferior quando comparado com o material granulado na microscopia óptica.

O rendimento mássico global em *spray-drying* foi de 73% e condiz com resultados de Parris *et al.*⁹² (de 70%) que produziram microcápsulas com óleo essencial e zeína, sendo maior que o valor obtido por Asensio *et al.*⁵⁸ que obtiveram 56% de rendimento empregando óleo essencial de orégano e hidroximetilpropil celulose. Esta comparação entre resultados pode também ser realizada apenas com o pó recolhido no copo coletor e assim sendo o resultado aqui obtido seria mais similar ao de Asensio *et al.*⁵⁸ do que Parris *et al.*⁹² porém os autores não informam se segregaram ou não as partículas produzidas. Uma vez que o pó na câmara de secagem fica exposto por mais tempo à temperatura ajustada, justifica-se aqui a separação dos pós obtidos nas porções processadas, o que poderia prejudicar a retenção dos óleos essenciais pelas micropartículas devido a sua volatilidade.⁹

As micropartículas, recolhidas do copo coletor, foram então separadas em duas partes: uma foi usada para preenchimento de cápsulas de gelatina dura e acondicionadas em frasco plástico com tampa (Lote tipo “Cápsulas”), e outra armazenada em frasco plástico com tampa (Lote tipo “Granel”) para realização dos testes de estabilidade.

O pó obtido nesta etapa, assim como na produção por granulação via úmida, apresentou coloração branca e odor típico dos óleos empregados, porém se mostrou menos aglomerado (figura 8).

Comparando a produção de grânulos secos pelas técnicas de estufa e dessecador com o *spray-drying*, notou-se diferença de tempo para a remoção da água, visto que este último demorou 3 h por porção, e resultou em uma perda de 97%

da água presente inicialmente (8% de água/h). Vale ressaltar que esta última técnica se mostra mais interessante por ser facilmente passível de *scale up*^{74, 75} quando comparado a secagem em estufa, pois ao aumentarem-se as escalas dos testes preliminares para os testes finais (10 x mais), esta técnica foi a que menos apresentou desafios na mudança de escala, necessitando apenas de processamento em porções já que o volume não era compatível com um equipamento de bancada como o que foi utilizado.

5.4. Teste Granulométrico

O tamanho de partícula apresenta grande influência em diversos aspectos dos pós farmacêuticos como na escoabilidade, compressibilidade, densidade, porosidade, além de ter grande influência na etapa de liberação de insumos farmacêuticos ativos, principalmente quando referente aos de baixa solubilidade em meio aquoso o que faz com que a determinação do seu tamanho de partícula médio acabe sendo de grande importância para sua viabilização como medicamento. Sendo assim, os grânulos e micropartículas empregados neste trabalho foram sujeitos a uma análise branda de determinação de tamanho de partícula para comparar tal parâmetro.^{10,112}

Os grânulos obtidos por granulação por via úmida e secos por estufa e dessecador apresentaram no tempo inicial um tamanho médio entre 300 e 600 μm (77 e 74% de rendimento mássico, respectivamente). Este resultado condiz com o tamanho médio obtido por Keleb *et al.*¹¹⁰, que obtiveram a maioria de seus grânulos entre 250 e 1000 μm , e também está de acordo com métodos de granulação consolidados de *high shear wet granulation* e de leite fluidizado, que segundo Suresh *et al.*¹⁰⁷ variam de 100 a 800 μm .

As micropartículas produzidas por *spray-drying* apresentaram 92% de sua massa em tamanho menor que 250 μm , o que condiz com dados de Fernandes *et al.* que obtiveram valores de 13 μm ao encapsular óleo essencial de Alecrim¹¹³ de Garcia⁸⁸ ao obter tamanho médio de 30 μm para óleo essencial de manjerição utilizando como material de parede goma arábica, maltodextrina, proteína isolada de soja e concentrado proteico de leite, assim como de acordo com a faixa de valores apresentada por Favaro-Trindade *et al.*⁶⁷ de 5 a 150 μm para micropartículas provenientes do processo de *spray-drying*. É importante ressaltar que o teste granulométrico aqui empregado se trata de um método pouco específico, classificando o tamanho por faixas muito abrangentes. A escolha desta metodologia se deu pela

disponibilidade do equipamento de granulometria no CPQBA-UNICAMP, e pela impossibilidade de realização de um teste mais apropriado por meio terceirizado. Ainda assim este teste foi realizado por demonstrar a diferença resultante entre os processos de granulação por via úmida e *spray-drying*.

Os valores de tamanho médio de partículas estão expostos na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados tamanho médio de partículas por teste de granulação - tempo inicial

Tamanho do tamis (μm)	Estufa (%)	Dessecador (%)	<i>Spray-drying</i> (%)
850	0.28 ± 0.17	0.13 ± 0.01	4.67 ± 2.143
600	<u>60.74 ± 1.60</u>	<u>59.53 ± 1.36</u>	0.98 ± 0.41
300	17.64 ± 0.33	15.56 ± 0.52	1.42 ± 0.47
250	2.13 ± 0.12	1.24 ± 0.16	0.58 ± 0.10
<250	19.20 ± 2.09	23.55 ± 0.95	<u>92.35 ± 3.04</u>

Valores sublinhados indicam a maior porcentagem de tamanho de cada tratamento.

Ao se observar a distribuição de tamanho médio dos grânulos e pós obtidos por teste de granulometria, foi possível classifica-los de acordo com o conceito da Farmacopeia Brasileira, que divide as partículas em: pó grosso (passam pelo tamis de 1700 μm , e no máximo 40% pelo tamis 355 μm), pó moderadamente grosso (passam pelo tamis de malha 710 μm , e no máximo 40% pelo tamis de 250 μm), pó semi-fino (passam pelo tamis 355 μm , e no máximo 40% pelo tamis 180 μm), pó fino (passam pelo tamis de malha 180 μm) e pó finíssimo (passam pelo tamis 125 μm). Sendo assim os grânulos foram classificados como “pó moderadamente grosso”, e as partículas obtidas por *spray-drying*, devido a indisponibilidade de tamises com malhas mais finas que 250 μm apresenta classificação entre “pó semi-fino” e “pó finíssimo”.

Após estocagem dos pós denominados “Granel”, os granulados secos em estufa apresentaram 71% (30 dias) e 76% (60 dias) de sua distribuição de tamanho entre 300 e 600 μm e os granulados secos em dessecador 74% (30 dias) e 79% (60 dias) (Tabela 5). Nas micropartículas os valores de rendimento mássico e tamanho permaneceram abaixo de 250 μm com o decorrer do tempo.

Tabela 5. Tamanho médio das partículas obtidos no teste granulométrico com o decorrer do tempo

Método de secagem	Faixa granulométrica (μm)		
	Inicial	30 dias	60 dias
Estufa	300-600	300-600	300-600
Dessecador	300-600	300-600	300-600
<i>Spray-drying</i>	<250	<250	<250

A grande diferença de tamanho dos grânulos em relação as micropartículas foi propositalmente escolhida objetivando a comparação deste fator nos quesitos de estabilidade dos óleos essenciais empregados pois sabe-se que, por mais que a técnica de *spray-drying* seja bem consolidada no meio farmacêutico, suas partículas menores tendem a sofrer maior degradação quando comparadas a partículas maiores, devido à sua maior área superficial, o que expõe os óleos essenciais a maiores influências do meio externo, que nas condições utilizadas no teste de estabilidade apresenta temperatura relativamente maior (40°C) que a ambiente (~25°C), suscetibilizando-os a degradação térmica, e valores elevados de umidade relativa (75%), permitindo reações hidrolíticas.^{2,114,115}

Na Tabela 5, notou-se que os grânulos com 30 e 60 dias, tanto os secos em estufa como em dessecador, mantiveram seu tamanho inicial. O que demonstra parcialmente a resistência dos grânulos produzidos, uma vez que a granulometria por tamisação tem como desvantagem a erosão de partículas ao decorrer do teste por utilizar de agitação vigorosa, como observado por Silva *et al.*¹¹⁶ ao comparar diversas técnicas de determinação de tamanho de partícula. Tal fator afeta diretamente os grânulos maiores como os da secagem em estufa e dessecador, mas não prejudica as micropartículas uma vez que seu tamanho inicial já é o mínimo dentre os estudados.^{115,116,117,118}

Observou-se ainda que, a água exerceu importante função de aglutinante do sistema, já que cria pontes sólidas entre as partículas e conseqüentemente aumenta a força dos grânulos.¹¹⁹

Nesta parte do trabalho não se consideraram os grânulos e pós acondicionados em cápsulas gelatinosas duras, uma vez que para o preenchimento destas foi

requerido a prensagem mecânica dos ingredientes, implicando na diminuição do tamanho das partículas.

5.5. Densidade aparente e compactada

Inicialmente as densidades aparente e compactada dos diferentes tratamentos foram de 0,34 e 0,47 g/cm³ para os grânulos secos em estufa, 0,40 e 0,41 g/cm³ para os grânulos secos em dessecador e 0,28 e 0,54 g/cm³ para as micropartículas obtidas por *spray-drying*.

Notou-se uma maior variação estatística entre os resultados quando se tratando dos grânulos secos por ambos os métodos do que nos valores de densidade das micropartículas secas por *spray-drying*. Isso pode ocorrer pelo maior tamanho dos grânulos quando comparados às partículas, uma vez que um grande tamanho de partícula prejudica o empacotamento de um pó.^{10, 34}

Para finalidades mais específicas de escoamento e coesividade dos pós e grânulos, que são fatores importantes em escala industrial, optou-se por determinar o índice de Carr e o fator de Hausner. O índice de Carr determina valores de escoabilidade dos pós e grânulos através dos valores de densidade aparente e compactada das partículas, e os classifica como sendo “muito boa” (<15), “boa” (15-20), “aceitável” (20-35), “ruim” (35-45) e “muito ruim” (>45). Já o fator de Hausner determina a coesividade dos pós e grânulos utilizando estes mesmos dois parâmetros, e as classifica como sendo “baixa” (<1,2), “intermediária” (1,2-1,4) ou “alta” (>1,4). Os resultados estão expostos na Tabela 6.

Tabela 6. Média das densidades aparente e compactada, Índice de Carr e Fator de Hausner dos grânulos e pós

Tratamento	D _a	D _c	IC	FH
Estufa – Inicial	0,34 ^a	0,47 ^{b,d,f}	28	1,4
Estufa 30 dias – Granel	0,35 ^{b,c}	0,55 ^a	36	1,6
Estufa 60 dias – Granel	0,30 ^{b,d}	0,49 ^{b,d,f}	39	1,6
Estufa 30 dias – Cápsulas	0,35 ^a	0,53 ^{b,c}	34	1,5
Estufa 60 dias – Cápsulas	0,33 ^{a,b}	0,50 ^{b,d,e}	34	1,5
Dessecador – Inicial	0,40 ^a	0,41 ^{b,c}	2	1,0
Dessecador 30 dias – Granel	0,35 ^{b,d}	0,37 ^{b,d}	5	1,1
Dessecador 60 dias – Granel	0,38 ^{b,c}	0,40 ^{b,c}	5	1,1
Dessecador 30 dias - Cápsulas	0,39 ^a	0,48 ^a	19	1,2
Dessecador 60 dias - Cápsulas	0,37 ^a	0,49 ^a	24	1,3
<i>Spray-drying</i> – Inicial	0,28 ^a	0,54 ^a	48	1,9
<i>Spray-drying</i> 30 dias – Granel	0,25 ^{b,d}	0,51 ^b	51	2,0
<i>Spray-drying</i> 60 dias – Granel	0,26 ^{b,c}	0,53 ^a	51	2,0
<i>Spray-drying</i> 30 dias – Cápsulas	0,26 ^a	0,52 ^a	50	2,0
<i>Spray-drying</i> 60 dias - Cápsulas	0,26 ^a	0,53 ^a	51	2,0

D_a: Densidade aparente; D_c: Densidade compactada; IC: Índice de Carr; FH: Fator de Hausner. Liberação. Valores com a mesma letra na mesma coluna para cada tratamento indicam semelhança estatística entre as amostras baseadas em teste de Tukey

Observou-se que os valores de IC classificados como “muito bons” foram somente observados nos grânulos secos em dessecador, e no decorrer dos meses somente o tipo Granel manteve tais propriedades, tornando-o um grânulo de elevada escoabilidade o que indica que o formato dos grânulos obtidos em dessecador podem ter sido mais esféricos que os grânulos secos em estufa¹²⁰, além de indicar indiretamente a interferência da água presente nos grânulos¹²¹, sendo que valores elevados de água diminuem a escoabilidade. A vantagem na elevada escoabilidade de um pó ou grânulo está na facilidade de transporte e manejo, assim como melhor desempenho em equipamentos como compressores e enchedores de cápsulas¹²².

Os valores obtidos pela secagem em estufa permaneceram entre “aceitável” e “ruim”, já os secos em *spray-drying* foram todos classificados como “muito ruim”. Estes valores podem ser explicados também ao utilizar-se o fator de Hausner, pois, uma vez que este se encontra alto significa que o pó é altamente coesivo e menos apto a fluir

livremente, como observado no caso dos pós secos por *spray-drying*. Pós classificados desta maneira apresentarão dificuldade de aplicação em alimentadores e tubulações, porém, o fator de coesão elevado indica que tais partículas podem ser mais compactadas no enchimento de cápsulas (podendo inclusive alterar a dosagem de componente ativo empregado) ou também viabilizadas na produção de comprimidos com maior facilidade, ainda que sejam necessários ajustes para adquirir uma coesão e fluxos intermediários no caso das partículas secas por *spray-drying*. É válido ressaltar que a diferença de viabilização destas partículas em cápsulas duras ou comprimidos é um fator que alteraria significativamente os parâmetros de liberação *in vitro* e estabilidade dos produtos empregados^{120,121,122}.

Ao comparar os resultados entre os grânulos, pode-se justificar o aumento da coesividade dos secos em estufa pela alta umidade presente nestes, o que é um fator determinante na coesividade.^{121,123} Já os elevados valores de FH e IC do pó obtido por *spray-drying*, quando comparados com os valores obtidos nos grânulos secos em dessecador, podem ser explicados pelo seu inferior tamanho de partícula (< 250 μm), como pôde ser observado por Turchiuli *et al.*¹²⁴, que obtiveram valores decrescentes de IC ao comparar pós secos por *spray-drying* com tamanho de 32 μm (IC = 44) e 190 μm (IC = 27).

5.6. Liberação *in vitro*

O teste de liberação *in vitro* determina a quantidade de insumo farmacêutico ativo que permanece estável em condições fisiológicas e a quantificação deste em conhecido período de tempo⁹². Eles constituem significativo meio de caracterização da qualidade biofarmacêutica de uma forma farmacêutica sólida oral, e possibilitam o controle de qualidade farmacêutica e o estabelecimento de correlações com os dados obtidos *in vivo*.^{125,126,127,128}

Os perfis de liberação *in vitro* dos diferentes tratamentos em relação ao tempo estão apresentados a seguir na Figura 10. Os perfis de cada tratamento separadamente no decorrer dos meses estão apresentados nas figuras 11, 12 e 13. Cada coleta de amostra de 5 mL realizada foi repostada com 5 mL de meio, diluindo a concentração inicial a cada coleta. Sendo assim, os valores expostos na figura equivalem a somatória da concentração obtida em cada coleta com intuito de simular o processo fisiológico gástrico, onde cada quantidade liberada será cumulativa. Os eixos dizem respeito a

porcentagem liberada em relação a quantidade de óleo essencial presente em cada uma das formulações.

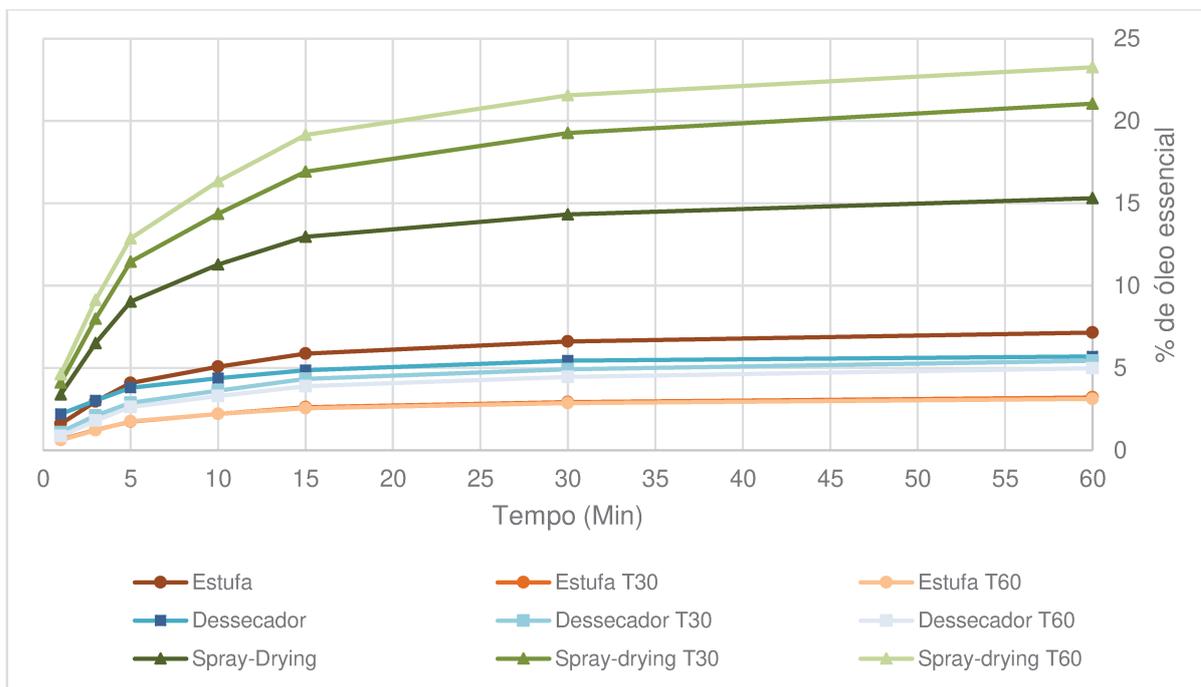


Figura 10. Liberação cumulativa *in vitro* do óleo essencial dos tratamentos Estufa versus Dessecador versus Spray Drying

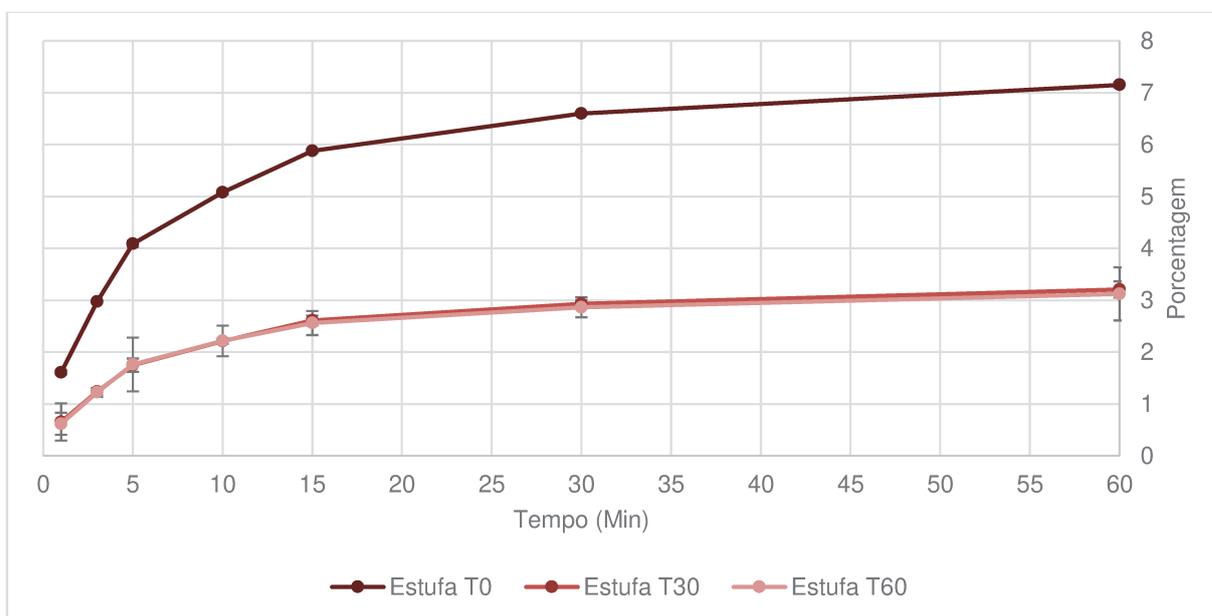


Figura 11. Liberação cumulativa *in vitro* do óleo essencial do tratamento em estufa.

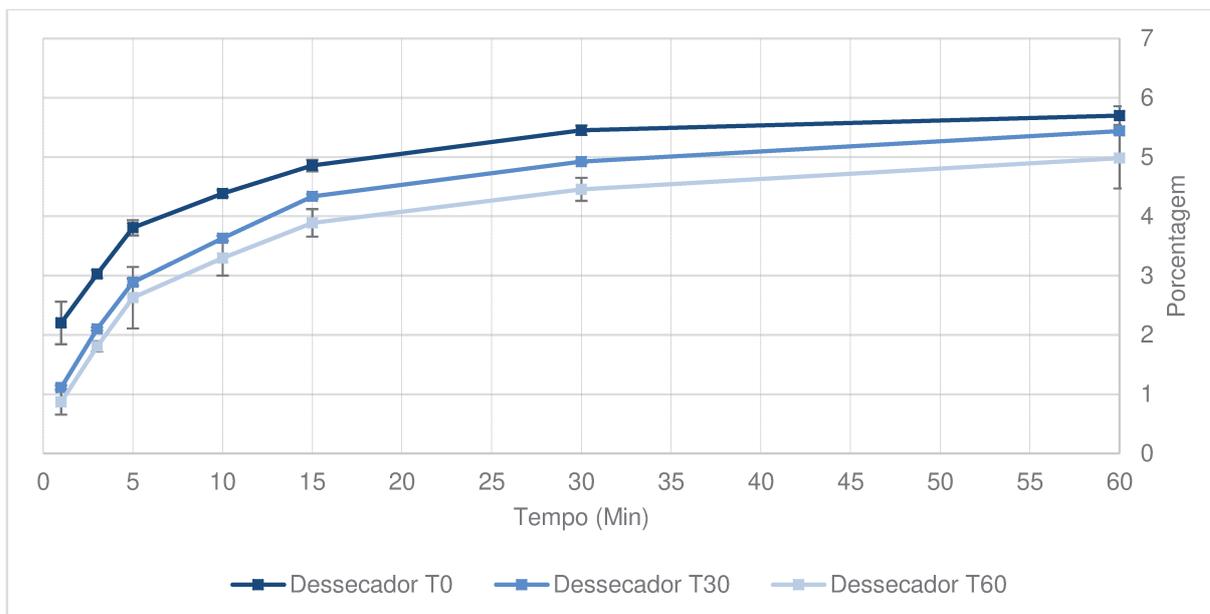


Figura 12. Liberação cumulativa *in vitro* do óleo essencial do tratamento em dessecador.

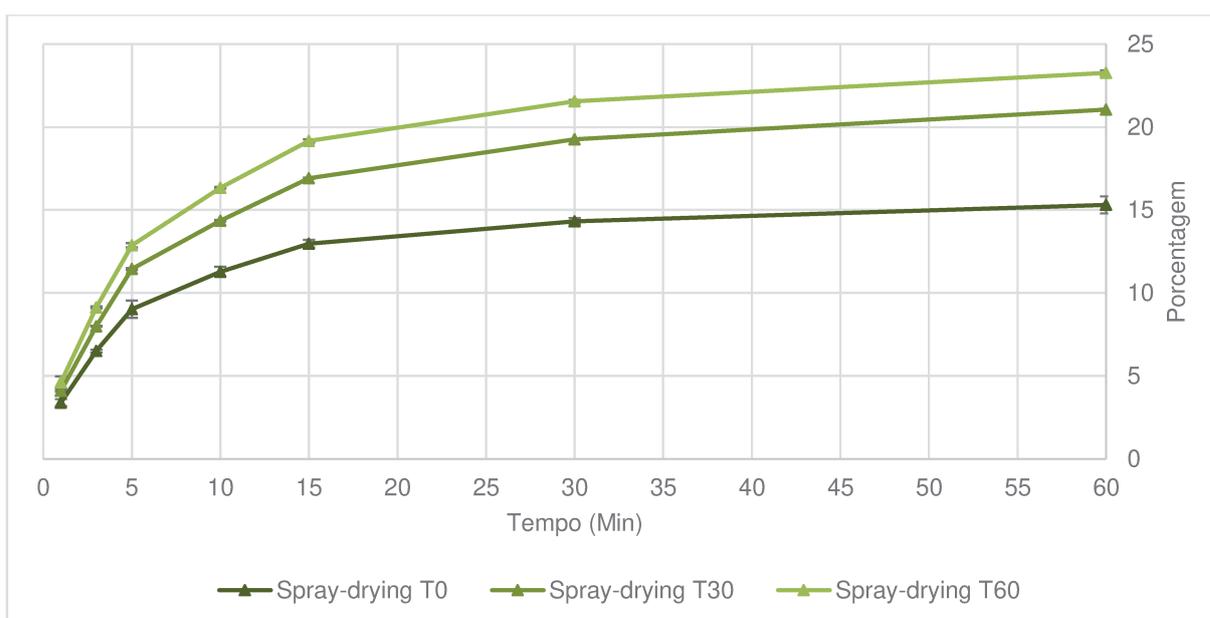


Figura 13. Liberação cumulativa *in vitro* do óleo essencial do tratamento por *spray-drying*.

Pode se observar que as partículas produzidas por *spray-drying* obtiveram maior taxa de liberação de óleo essencial quando comparadas aos grânulos. O tamanho das micropartículas foi menor que o dos grânulos, como evidenciado nos testes de granulometria, e tal fator afeta diretamente a liberação *in vitro* pois seu tamanho reduzido de partícula permite maior penetração do meio simulado empregado, disponibilizando assim uma maior taxa de liberação.^{31, 79}

Ainda com relação às amostras do *spray-dryer*, observou-se que a porcentagem liberada aumentou com os meses de estocagem. Isso ocorreu, pois, a quantidade total de óleo presente na formulação diminuiu a cada mês (como será visto

em Extração de óleo essencial a partir das formulações), mas a quantidade liberada permaneceu igual, fazendo com que a porcentagem de liberação em relação ao total aumentasse. Os resultados obtidos foram comparáveis aos de Dash *et al.*¹²⁹, que obteve cerca de 20% de liberação de aspirina em 1 h utilizando microcápsulas de etil celulose e acetato de celulose, e também comparáveis aos de Dima *et al.*¹³⁰ ao obterem liberação de óleo essencial de *Coriandrum sativum L* próxima a 20% para microcápsulas de Alginato e quitosana em meio ácido em 1h. Tais valores de liberação podem ainda ser indicativos de uma elevada quantidade de óleo superficial da formulação obtida por *spray-drying* no decorrer dos meses que, segundo Wang *et al.*⁸⁹, auxilia o aumento da porcentagem liberada.

Nos grânulos obtidos por ambas as técnicas de secagem observou-se a diminuição da quantidade liberada de acordo com a diminuição da quantidade de óleo total presente nestes no decorrer dos meses.

A elevada porcentagem de água presente nos grânulos secos em estufa podem explicar sua liberação mais acentuada quando comparada aos resultados com a secagem em dessecador, uma vez que a afinidade amostra-solvente (água presente dos grânulos - água no líquido do ensaio de liberação *in vitro*) é fator de influência em tal aspecto, como demonstrado por Loss *et al.*⁹¹

Estes testes foram realizados limitando-se o tempo final a 1h, pois levou-se em consideração o tempo de motilidade gástrica para liberação dos óleos essenciais.⁹² Na hipótese de uma aplicação como antiulcerativo, a formulação de *spray-drying* proposta neste estudo, seria a mais indicada por liberar maior porcentagem de óleo essencial no local de ação (estômago)¹³¹ em relação às demais. Porém, se o objetivo fosse ação terapêutica que necessite de absorção intestinal destes óleos, as mais adequadas seriam as formulações de grânulos, pois não liberam a maior parte de seu conteúdo em meio ácido, o que permite a passagem de maiores quantidades de óleo essencial para o intestino¹³². Entretanto vale ressaltar que diversos fatores influenciam na distribuição e absorção dos fármacos (pKa, solubilidade, efeitos de metabolismo)¹³³, e tais fatores não foram estudados para os óleos essenciais aqui empregados.

5.7. Extração do óleo essencial total a partir das formulações

As amostras oriundas dos processos produtivos (granulação e *spray-drying*) foram submetidas à hidrodestilação para a extração da mistura de óleos essenciais das espécies objetivando a quantificação do óleo total retido pelas formulações, e posterior análise cromatográfica por CG-EM para determinar se o processamento alterou o perfil cromatográfico destes óleos. As amostras incluem os granulados secos através da utilização de estufa a 65 °C por 6 h, granulados secos através da utilização de dessecador com sílica-gel a 25 °C por 168 h e o pó micro encapsulado através do processo de *spray-drying* a 120 °C por 12 h. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tratamento	(%)		
	Óleo teórico	Óleo recuperado	Rendimento
Estufa T0	7,0	3,2	45,5 ± 3,6
Dessecador T0	7,0	3,2	45,5 ± 0,9
<i>Spray-drying</i> T0	7,0	0,9	12,1 ± 0,6

Tabela 7. Comparação das porcentagens de óleo essencial total extraído a partir dos diferentes tratamentos de secagem, no tempo inicial.

Tratamento	Porcentagem de óleo essencial (%)*		
	Tempo inicial	30 dias	60 dias
Estufa	3,2 ^a	2,7 ^a	1,9 ^b
Cápsulas	Dessecador	3,2 ^a	2,6 ^b
	<i>Spray-drying</i>	0,9 ^a	0,4 ^b
Granel	Estufa	3,2 ^a	1,2 ^b
	Dessecador	3,2 ^a	1,2 ^{b,c}
	<i>Spray-drying</i>	0,9 ^a	0,1 ^b

Tabela 8. Porcentagens de óleos essenciais retidos pelos grânulos e micropartículas no decorrer dos meses. Valores com a mesma letra na mesma linha para cada tratamento indicam semelhança estatística entre as amostras baseadas em teste de Tukey.

*: Porcentagem de óleo em relação a massa de cada formulação

As cápsulas duras contendo os grânulos e micropartículas foram submetidas a extração após o período de 30 e 60 dias. As formulações secas por estufa e dessecador tiveram uma queda de 0,5% (estufa) e 0,6% (dessecador), e a formulação obtida por *spray-drying* teve uma queda de 0,5% para o período de 30 dias. Estes valores passaram para 1,3% nos grânulos secos em estufa, 0,8% para os grânulos secos em dessecador e se mantiveram constantes para as partículas obtidas por *spray-drying* em 60 dias.

As amostras acondicionadas sem o envoltório de cápsula dura denominadas “granel” resultaram em concentrações de óleo essencial inferiores aos acondicionados em cápsula, e tiveram perda de 2% nas formulações de estufa e dessecador, e uma perda de 0,7% nas obtidas por *spray-drying*, todas com relação a coleta 30 dias. Após 60 dias estes valores decaíram em mais 0,4% no tratamento em estufa, 0,5% no tratamento em dessecador e 0,06% no processamento por *spray-drying*. Estes dados estão expostos na Tabela 8 e representados na Figura 14.

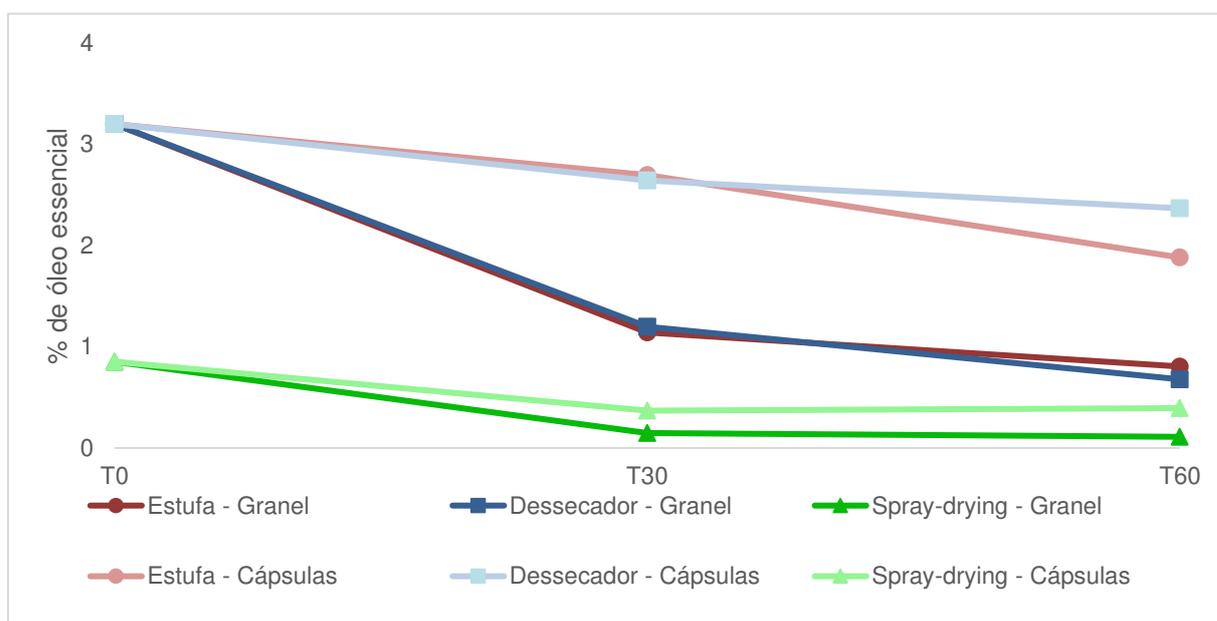


Figura 14. Porcentagem de óleo essencial recuperado em cada formulação com o decorrer dos meses

Os resultados obtidos da extração das amostras por hidrodestilação demonstraram que os processamentos empregados na produção dos granulados, bem como das micropartículas, permitiram a retenção parcial do óleo essencial empregado. A recuperação dos óleos a partir dos grânulos se mostrou satisfatória quando comparado aos resultados de Dairiki *et al.*¹³⁴ que propuseram a incorporação

de óleos essenciais em ração para peixes, e obtiveram uma recuperação máxima de 25% do óleo aplicado. Porém não foram encontrados mais dados em literatura para comparação dos resultados.

Também se observou que, por mais que os métodos de secagem tenham sido diferentes, as quantidades retidas permaneceram semelhantes no decorrer dos meses, mostrando a influência não só da temperatura, mas também do tempo de processamento necessário para trabalhar com este tipo de material volátil e delicado como um óleo essencial.²

Já no *spray-drying* notou-se grande perda de óleo essencial na produção das micropartículas, apresentando rendimento muito inferior ao encontrado em literatura como de Souza *et al.*¹³⁵ com recuperação de 60 a 80% de óleo essencial de *Lippia sidoides* em micropartículas de maltodextrina e de Garcia⁸⁸ com valores de retenção de 68 a 90% de óleo essencial de alecrim em microcápsulas de goma arábica e maltodextrina.

Esta ocorrência pode ser explicada pelo baixo valor de sólidos (14%) empregado neste trabalho, que de acordo com a literatura^{72,86} acarretam em perdas devido a carência de material de parede para reter os óleos essenciais presentes, resultando em expulsão do material de recheio. Outro fator indispensável está na composição da parede das micropartículas: a escolha dos excipientes se deu pela facilidade de aplicação para granulação, porém são dificilmente utilizados para a produção de micropartículas. Isso demonstra a complexidade de transposição dos métodos de secagem diferentes utilizando os mesmos materiais.¹³⁶

Percebe-se ainda que a quantidade de óleo retida nas formulações contidas em cápsulas gelatinosas duras foi maior. Tal ocorrência se deu pelo fato das cápsulas gelatinosa duras promoverem uma segunda barreira além da proteção ocasionada pela granulação e atomização, resultando em uma melhor proteção dos óleos essenciais e indicando a importância desta forma farmacêutica na proteção de compostos sensíveis.³¹ Nas formulações mantidas em lote "Granel" as perdas de óleo essencial possivelmente se deram pela maior superfície de contato entre os pós e o ar mantido nos frascos plásticos, permitindo maior evaporação e perdas do que as mantidas nas cápsulas gelatinosas, as quais apresentam menor volume de ar.¹¹⁵

5.8. Quantificação do α -pineno, trans-cariofileno e α -humuleno por CG-EM

Curvas analíticas obtidas com os padrões α -pineno, trans-cariofileno e α -humuleno foram construídas para a quantificação dos analitos presentes nas amostras. A curva de calibração está exposta na Figura 15, a fórmula obtida pela curva de calibração e valores de R^2 estão expostos na Tabela 9.

O óleo essencial de Erva-baleeira e de Macela misturados em partes iguais foi injetado como referência. As porcentagens dos analitos presentes nas amostras estão apresentadas na Tabela 10, para as partículas mantidas em lote tipo “Cápsulas”, e na Tabela 11 para as mantidas em lote tipo “Granel”.

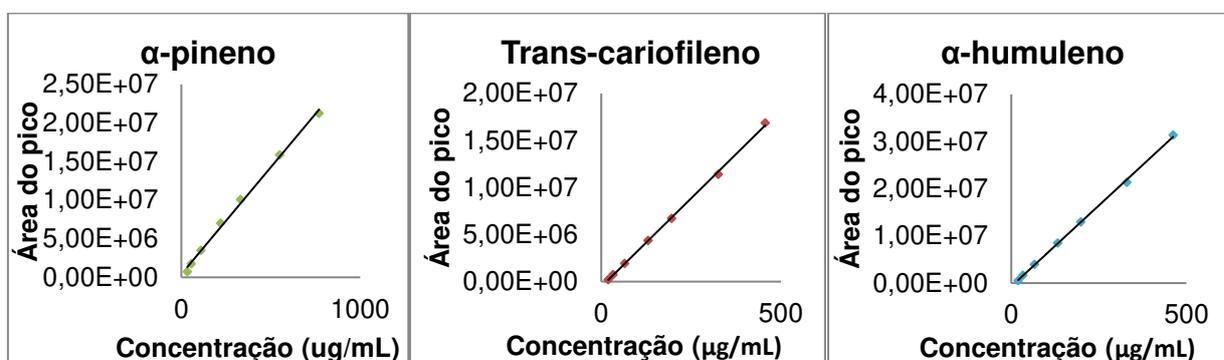


Figura 15. Curvas de calibração dos analitos α -pineno, trans-cariofileno e α -humuleno.

Tabela 9. Equações da reta e valores de R^2 obtidos para cada curva de calibração a partir dos padrões

Analito	Equação	R^2
α -pineno	$Y=27693x + 409510$	0,996
Trans-cariofileno	$Y=37636x - 556854$	0,999
α -humuleno	$Y=68599x - 701730$	0,999

Tabela 10. Quantificação dos analitos nos diferentes métodos de secagem em tempo inicial, 30 e 60 dias – Lote Cápsulas

Tratamentos	concentração %		
	α -pineno	trans-cariofileno	α -humuleno
Estufa T0	0.06 \pm 0.01	25.08 ^a \pm 1,90	11.81 ^b \pm 0.61
Estufa T30	< LD	8,6 ^b \pm 1,3	7,3 ^a \pm 0,9
Estufa T60	< LD	6,9 ^b \pm 0,6	3,2 ^b \pm 0,4
Dessecador T0	< LD	22.48 ^a \pm 0.90	10.69 ^a \pm 0.30
Dessecador T30	< LD	10,23 ^b \pm 0,2	9,74 ^a \pm 0,4
Dessecador T60	< LD	8,3 ^b \pm 3,9	5,2 ^b \pm 2,8
<i>Spray-drying</i> T0	1.31 \pm 0.04	20.65 ^a \pm 0.83	10.3 ^a \pm 0.54
<i>Spray-drying</i> T30	< LD	5,45 ^b \pm 0,9	4,25 ^b \pm 0,9
<i>Spray-drying</i> T60	< LD	5,8 ^b \pm 2,8	4,3 ^b \pm 2,7
Mistura de óleos essenciais (1:1).	71,82 \pm 10,20	20,39 ^a \pm 0,30	8,56 ^a \pm 0,1
LD	0.014	0.008	0.002

Valores com a mesma letra na mesma coluna indicam semelhança estatística entre as amostras abordadas com a mistura de óleos essenciais, através de teste de Dunnett.

Tabela 11. Quantificação dos analitos nos diferentes métodos de secagem em tempo inicial, 30 e 60 dias – Lote Granel

Tratamentos	concentração %		
	α -pineno	trans-cariofileno	α -humuleno
Estufa T0	0.06 \pm 0.01	25.08 ^a \pm 1,90	11.81 ^b \pm 0.61
Estufa T30	< LD	7,3 ^b \pm 1,1	7,8 ^a \pm 1,1
Estufa T60	< LD	5,6 ^b \pm 0,3	1,4 ^b \pm 0,6
Dessecador T0	< LD	22.48 ^a \pm 0.90	10.69 ^a \pm 0.30
Dessecador T30	< LD	4,6 ^b \pm 0,4	3,1 ^b \pm 0,3
Dessecador T60	< LD	4,1 ^b \pm 1,3	2,1 ^b \pm 0,1
<i>Spray-drying</i> T0	1.31 \pm 0.04	20.65 ^a \pm 0.83	10.3 ^a \pm 0.54
<i>Spray-drying</i> T30	< LD	2,2 ^b \pm 0,7	1,6 ^b \pm 0,4
<i>Spray-drying</i> T60	< LD	0,4 ^b \pm 0,1	0,2 ^b \pm 0,1
Mistura de óleos essenciais (1:1).	71,82 \pm 10,20	20,39 ^a \pm 0,30	8,56 ^a \pm 0,1
LD	0.014	0.008	0.002

Valores com a mesma letra na mesma coluna indicam semelhança estatística entre as amostras abordadas com a mistura de óleos essenciais, através de teste de Dunnett.

Ao se comparar o valor de α -pineno presente na mistura 1:1 dos óleos, observou-se que a porcentagem obtida de ~72% foi maior que os valores obtidos em literatura para ambas espécies, sendo 29%¹³ a 45%¹³⁷ para *Varronia verbenacea* e 26%¹³⁸ a 36%⁴⁶ para *Achyrocline satureoides*. Esta parte do trabalho não será aqui discutida pois faz parte de projeto anterior.

O α -pineno, pelo fato de ser um monoterpene, apresenta-se como o composto de menor tempo de retenção em ambos os óleos essenciais empregados e com volatilidade mais elevada em relação aos outros analitos, o que o suscetibiliza a maiores perdas quando exposto a temperaturas elevadas, a presença de oxigênio e luz^{2,139}. Devido a isso, observou-se nos resultados obtidos por cromatografia gasosa que uma quantidade muito pequena deste analito foi retida nas formulações empregadas, e ainda que tal quantia só pôde ser observada no tempo inicial das formulações secas em estufa e por *spray-drying*. A presença de calor nestes dois processos pode ter degradado tal molécula, e o elevado tempo de residência quando se referindo a secagem em dessecador pode ter sido o suficiente para que toda quantidade de α -pineno tenha se esgotado ao final do processo. Entretanto, o potencial terapêutico dos óleos essenciais empregados não reside somente no α -pineno, ressaltando a importância dos outros compostos estudados que puderam ser observados no decorrer do trabalho.

Os óleos essenciais em mistura injetados apresentaram valores de trans-cariofileno e α -humuleno condizentes com os compostos presentes na espécie *Achyrocline satureoides* obtidos por Baldissera *et al.*⁴⁶ de 25% de trans-cariofileno, e 3,27% de α -humuleno, pelos resultados de Amaral *et al.*¹³⁸ de 27% e 9%, respectivamente para os mesmos analitos. Já na caracterização da *Varronia verbenacea* tais valores foram de 3,4% em média para trans-cariofileno, e 1,6% em média para α -humuleno quando se utilizando de diversos métodos extrativos obtidos por Michielin *et al.*¹⁴⁰. Em trabalho realizado por Santos *et al.*¹³⁷ os valores destes analitos obtidos ao se estudar óleo essencial de *Varronia verbenacea* extraídos por arraste de vapor foram de 20% para o trans-cariofileno, e 4% para α -humuleno. Um ponto importante a ser lembrado na utilização de produtos de origem vegetal está em sua variação da composição dos extratos e óleos essenciais presentes nas espécies, os quais estão sujeitos a mudanças qualitativas e quantitativas, sendo influenciados por tipo de nutriente no solo, época de colheita, frequência pluviométrica do ambiente, temperatura e clima, tempo entre colheita e extração e a variabilidade genética de

cada espécie, tornando a comparação da composição dos óleos essenciais menos rígida quando se depara com misturas químicas de menor complexidade e assim sendo muitas vezes deparamos com extratos e óleos sem padronização.²

Referindo-se aos grânulos e micropartículas, notou-se que nos resultados obtidos inicialmente as quantidades presentes de trans-cariofileno se encontraram estatisticamente semelhantes em todas as formulações (segundo teste de Dunnett) e as quantidades de α -humuleno foram diferentes para a quantidade inicial da formulação seca em estufa.

Ainda que todo α -pineno dos óleos empregados tenha sido perdido nos processamentos, a atividade terapêutica destas formulações não ficou completamente comprometida, pois sabe-se do elevado potencial antinociceptivo do Trans-cariofileno, como estudado por Paula-Ferie *et al.*¹⁴¹, além de sua capacidade anti-inflamatória comprovada por Medeiros *et al.*¹⁴² utilizando este composto em análise de edema de pata induzido em camundongos. Ainda, vale ressaltar a importância do α -humuleno presente nas formulações, pois trata-se de um composto com reconhecida ação anti-inflamatória, como comprovada por Rogerio *et al.*¹⁴³ e por ser o marcador químico de um medicamento já consolidado no mercado, o Acheflan[®]. Além disso pode-se ressaltar a ação conjunta destes dois compostos contra células tumorais humanas e em animais, como estudado por el Hadri *et al.*¹⁴⁴, e pronunciada atividade anti-inflamatória, como estudado por Medeiros *et al.*¹⁴² o que sugere que tais compostos exerçam funções sinérgicas.

Referente as formulações empregadas para a retenção dos óleos, percebeu-se que, no decorrer dos meses, houve perda elevada dos valores de analito estudados. Diversos parâmetros podem afetar tal quesito, como a elevada quantidade de celulose microcristalina no sistema que, como explicado por Garcia *et al.*⁸⁸ ao abordar partículas compostas por moléculas altamente hidrofóbicas, resultou em expulsão dos compostos da formulação. Talvez a utilização de taxas mais elevadas de compostos hidrofílicos como a lactose pudesse resultar em uma maior taxa de retenção de óleos.

Comumente, em experimentos abordando o uso de *spray-drying*, pesquisadores utilizam outros materiais de parede, como a maltodextrina e a goma arábica, por apresentarem resultados ótimos para a aplicação em encapsulação de óleos essenciais.^{67,88} Neste trabalho, porém, optou-se por utilizar os excipientes lactose e celulose cristalina objetivando a comparação das técnicas de secagem. Neste ponto pode-se ressaltar a grande versatilidade de uso da técnica de *spray-*

drying, pois permitiu a aplicação uma mesma formulação usada para produção de grânulos sem grandes dificuldades. Porém observou-se que são necessários ajustes em todas as formulações para que as quantidades de analito, assim como a estabilidade das partículas como um todo (umidade, tamanho de partícula, coesividade e escoabilidade) se mantenham inalteradas com o decorrer do tempo.

Paralelamente, foi realizada uma estimativa dos analitos α -humuleno, trans-cariofileno e α -pineno para o teste de liberação *in vitro*, com a finalidade de compreender a liberação dos analitos nesta etapa.

Tabela 12. Quantidade total dos analitos α -humuleno e trans-cariofileno inicial, após 30 e 60 dias em μg , estimada pelos testes por CG/EM, no teste de liberação *in vitro*

Analito*	Secagem	Inicial	30 dias	60 dias	Decréscimo (%)**
Trans-cariofileno	Estufa	317	42	19	94
	Dessecador	246	88	29	88
	<i>Spray-drying</i>	163	25	2	99
α -humuleno	Estufa	133	45	36	66
	Dessecador	117	84	15	87
	<i>Spray-drying</i>	81	20	1	99

* o composto α -pineno foi avaliado, porém esteve abaixo do LD em todas as determinações

** decréscimo obtido apenas em relação ao tempo 60 dias (inicial/final)

Em relação à Tabela 12, ainda que a formulação de *spray-drying* tenha propiciado maior porcentagem de liberação de óleo essencial em relação à quantidade inicial de óleo, a quantidade de ativos liberada por ela não superou a porcentagem de liberação dos grânulos.

Notou-se também grande decaimento dos valores entre as coletas, que também foi drástico quando comparado ao valor inicial. Para a finalidade da clínica médica, este aspecto é insatisfatório, pois acometeria em grande erro na dosagem do medicamento, tornando indispensável novo estudo das formulações para que se elas se tornassem mais viáveis.⁸⁰

5.9. Determinação da umidade residual das formulações pelo método de Karl Fischer

A presença de água em formulações farmacêuticas está diretamente relacionada com seu nível de degradação: altos níveis podem acelerar gravemente a quantidade de reações de hidrólise, além de propiciar o produto a contaminações microbiológicas. Porém as quantidades de água não podem ser completamente

retiradas destes produtos, pois em níveis aceitáveis desempenham papel importante de coesão entre partículas e na friabilidade do produto.¹⁴⁵

A umidade residual média da formulação obtida por granulação por via úmida foi de 18,77% ± 0,17 (grânulos secos em estufa), 5,01% ± 0,09 (grânulos secos em dessecador), 3,92% ± 0,09 (*spray-drying*), inicialmente.

Para as partículas acondicionadas em “Cápsulas”, os valores de umidade dos grânulos e micropartículas foram de 6,51% para os grânulos secos em estufa, 5,7% para os secos em dessecador e 4,38% para os secos por *spray-drying* após 30 dias. No período de 60 dias estes valores foram para 5,35% para a estufa, 6,42% para o dessecador e 5,25% para o *spray-drying*.

Para as partículas armazenadas em lote “Granel”, a umidade residual dos grânulos e microcápsulas a granel armazenados foi de 22,7% para os grânulos secos por estufa, 4,78% para os secos em dessecador e 3,42% para os secos por *spray-drying* em 30 dias. Após 60 dias tais valores decaíram para 17,9% nas amostras secas em estufa, 5,7% nas secas em dessecador e 3,4% processadas por *spray-drying*. Os dados estão expostos na Tabela 13.

Para a maioria das partículas empregadas, excetuando-se a de estufa inicial e mantidas a granel, todas os valores de umidade foram condizentes com dados de literatura, como o obtido por De Simone *et al.*¹⁴⁶ na confecção de grânulos de vitamina B12 que se mantiveram entre 3-5%, com os valores obtidos por Keleb *et al.*¹¹⁰ cuja faixa de água residual manteve-se entre 6-10%, e para a comparação das microcápsulas os valores obtidos por Asensio *et al.*⁵⁸ ao microencapsularem óleo essencial de orégano, obtendo valores de umidade média de 4%, e condiz também com o resultado obtido por Cortéz-Camargo *et al.*¹⁴⁷ ao produzirem micropartículas de óleo essencial de limão, que obtiveram umidade residual em média de 6%.

Tabela 13. Umidade residual nas formulações, divididas em dois lotes

Lote	Tratamento	Umidade residual (%)		
		Inicial	30 dias	60 dias
Cápsulas	Estufa	18,8 ^a	6,5 ^{b, c}	5,3 ^{b, d}
	Dessecador	5,0 ^{b, d}	5,7 ^{b, c}	6,4 ^a
	<i>Spray-drying</i>	3,9 ^{b, d}	4,4 ^{b, c}	5,2 ^a
Granel	Estufa	18,8 ^{b, c}	22,7 ^a	17,9 ^{b, c}
	Dessecador	5,0 ^{b, c}	4,8 ^{b, c}	5,7 ^a
	<i>Spray-drying</i>	3,9 ^a	3,4 ^{b, c}	3,4 ^{b, c}

Valores com a mesma letra na mesma linha indicam semelhança estatística entre as amostras abordadas através de teste de Tukey.

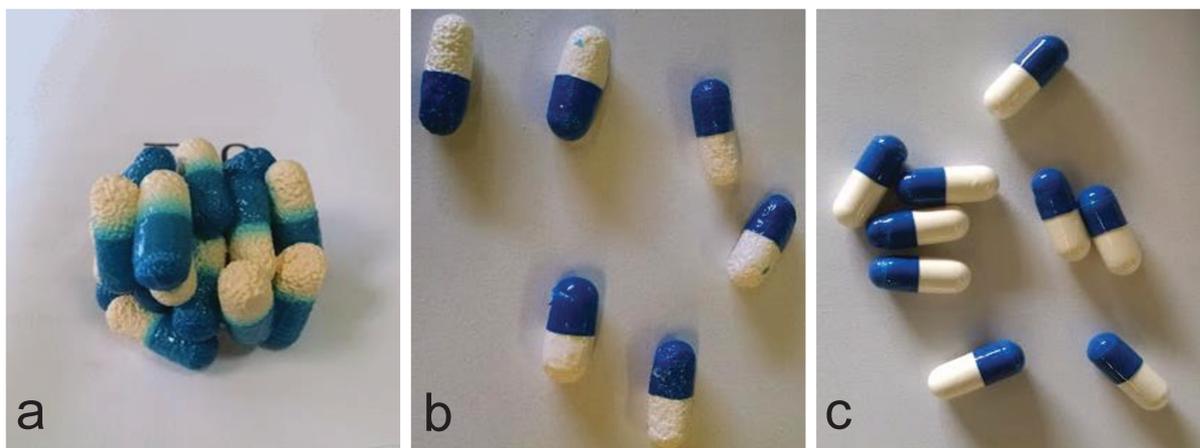


Figura 16. Cápsulas gelatinosas duras após 60 dias. a) Secagem em estufa, b) Secagem em dessecador, c) Microencapsulação em *Spray-drying*

Os resultados que mostraram valores mais elevados de água residual foram os apresentados pelos grânulos secos em estufa. Ainda que tenha sido o método cuja perda de água se deu em tempo mais curto, o tempo de residência para a secagem adequada dos grânulos pode ter sido insuficiente (6h), acarretando em maior acúmulo de água.

Ao se observar a diferença estatística determinada pelo teste de Tukey, notou-se que a umidade inicial não permaneceu constante com o decorrer dos meses, sendo diferente para cada uma das formulações. Os grânulos secos em estufa acondicionados em cápsulas sofreram perda de água, a qual provavelmente migrou para as cápsulas gelatinosas duras⁵⁷, o que pôde ser observado pelo aspecto desta na Figura 16 (a). Tal fator inviabiliza a utilização desta formulação para o preenchimento de cápsulas, pois acarreta em instabilidade elevada.¹⁴⁵ Os mantidos a granel mantiveram sua umidade semelhante pois não entraram em contato direto com nenhum material higroscópico.

Os grânulos secos em dessecador apresentaram baixo valor de água residual quando comparados com os da estufa, porém ainda assim foi observada alteração do aspecto da cápsula gelatinosa dura, podendo indicar o limite máximo de umidade suportada por este tipo de cápsulas, que fica entre 5,2 e 5,7%.

Já as micropartículas apresentaram o melhor comportamento em relação às cápsulas duras por não interagirem com esta, pois seus valores de umidade permaneceram inferiores a todos, e as cápsulas duras não sofreram reação com a água.

Outro fator importante influenciador deste teste pode estar na maneira como o estudo de estabilidade foi realizado. Devido a problemas técnicos não houve a possibilidade da utilização de uma câmara climática adequada, e, portanto, o teste foi realizado empregando-se uma solução salina saturada de NaCl em um dessecador, os quais foram colocados em estufa a 40°C. A solução salina promove uma umidade conhecida através do método de isoterma se sorção, que no caso do NaCl mantém a umidade em 75% quando a 40°C.^{102,148}

Observou-se através da Tabela 13 que a umidade dos grânulos secos por estufa e estocadas em cápsulas foi a mais variável dentre os tratamentos. A redução dos valores de 18,8% para 6,5% pode ter acontecido devido a migração da água presente na formulação para as cápsulas gelatinosas duras as quais absorvem água e amolecem quando expostas a altas umidades, o que pôde-se observar pelas imagens tanto pelo aparecimento de rugosidades, quanto pela aglomeração destas entre si (Figura 16, “a”).⁵⁷ Nos grânulos secos em dessecador também se observou rugosidades nas cápsulas duras, entretanto sua aglomeração não foi tão acentuada quanto os secos por estufa. Outro ponto significativo para as alterações nas cápsulas duras pode estar vinculado as quantidades utilizadas de Tween 80, que segundo De Lucca *et al.*¹⁴⁹ podem vir a remover água da estrutura proteica das cápsulas dependendo de sua concentração.

A formulação seca em *spray-drying* não alterou aparência e cor das cápsulas duras, o que pode ter ocorrido pela baixa umidade durante os meses (variando de 3,9% a 5,2%), uma vez que a gelatina que a compõe acaba tendo afinidade por este fator.

No lote Granel observou-se menor variação de umidade entre os meses, reforçando a influência das cápsulas duras neste quesito e também demonstrou que a formulação em si mantém a umidade em valores com baixa variação. É válido lembrar que estas amostras foram armazenadas em URE de 75%, o que suscitabiliza as amostras a ganhos de umidade no decorrer do teste.^{57, 81}

5. Conclusão

As formulações aqui abordadas mostraram capacidade de incorporação dos óleos essenciais envolvidos, sendo maior para os grânulos do que para a técnica de *spray-drying*. Entretanto, para a sua viabilização por meio de cápsulas gelatinosas duras a produção por *spray-drying* mostrou-se mais adequada, pelo fato de não alterar a estrutura desta forma farmacêutica.

Os métodos testados para produção de grânulos e micropartículas se mostraram ineficientes quando se tratando do quesito estabilidade, pois todas as formulações tiveram perdas significativas de óleo essencial no decorrer dos meses, tanto em quantidade total, quanto dos compostos biologicamente ativos (avaliados por cromatografia gasosa).

Na liberação *in vitro* observaram-se diferentes perfis que poderão ser aplicados dependendo da finalidade terapêutica pretendida, ou seja, as amostras processadas por *spray-drying* se adequariam melhor para uso contra afecções locais (neste caso, gástricas) já que sua entrega é mais efetiva enquanto que os grânulos seriam mais adequados para efeitos sistêmicos.

7. Bibliografia

1. Cheuka PM, Mayoka G, Mutai P, Chibale K. The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. *Molecules*. 2016, 22(1):1-41.
2. Simões CMO, Schenkel EP, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento*. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
3. Junior VEV, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*. 2005. 28(3):519-28.
4. El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Aït Addi EH, Casabianca H, et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. *Int J Pharm*. 2015;483(1-2):220-43.
5. Souza SAM, Meira MR, Figueiredo LS, Martins ER. Óleos essenciais: aspectos econômicos e sustentáveis. Goiânia: Enciclopédia biosfera. 2010, 6(10):1-11.
6. Favaro-Trindade CS, Pinho SC, Rocha GA. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of food technology*. 2008, 11(2):103-12.
7. Servat L, Spindola HM, Rodrigues RAF, Foglio MA. Microencapsulação: uma alternativa promissora para preservação de produtos naturais. *Revista fitos*. 2010, 5(2):52-7.
8. Cortés-Camargo S, et al. Microencapsulation by spray drying of lemon essential oil: evaluation of mixtures of mesquite gum-nopal mucilage as new wall materials. *Journal of microencapsulation* 2017, 34(4), 395-407.
9. Mujumdar AS, Molnár K, Pakowski Z, Marinos-Kouris D, Maroulis ZB, Saravacos GD et al. *Handbook of industrial drying*. 4 ed. Boca Raton: CRC Press. 2006.
10. Couto AG, Gonzáles OG, Petrovick PR. Granulação. *Caderno de farmácia*. 2000, 16(1):13-20.
11. Gilbert B, Favoreto R. *Cordia verbenacea DC Boraginaceae*. *Revista fitos*. 2012, 7(1):17-25.
12. Barata LES, Alencar AAJ, Tascone M, Tamashiro J. Plantas Medicinais Brasileiras. I. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Macela). *Revista fitos*. 2009, 4(1):120-5.
13. Carvalho Jr. PM, Rodrigues RFO, Sawaya ACHF, Marques MOM, Shimizu

MT. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenácea* D.C.: Journal of Ethnopharmacology. 2004, 95(2004):297-301.

14. Poser e Mentz in Simões CMO, Schenkel EP, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

15. Pathania, S., Ramakrishnan, SM, Bagler, G. Phytochemica: a platform to explore phytochemicals of medicinal plants. Oxford. 2015.

16. Solecki R. Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in northern Iraq. Science. 1975.190, 880–881

17. Oliveira, CJ; Araujo, TL. Plantas medicinais: uso e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. Revista Eletrônica de Enfermagem. 2007 v.9, n.1, p.93-105.

18. Kinghorn, A.D. The role of pharmacognosy in modern medicine. Expert OpinPharmacother. 2002.3, 77-9.

19. Samuelsson, G. Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy, Swedish Pharmaceutical Press. 2004, 5, 1-620.

20. Fabricant, D.S. & Farnsworth, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environ Health Perspect 109 Suppl 1, 69-75 (2001).

21. Yang R, Yuan BC, Ma YS, Zhou S, Liu Y. The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb. Pharm Biol. 2017.55:5–18.

22. Ayambo-Saavedra, LD. Optimización del proceso de extracción etanólica de *Lepidium peruvianum* Chacón, "maca". Tese para obter o título de profissional químico-farmacêutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 2006.

23. Newman DJ. The influence of Brazilian biodiversity on searching for human use pharmaceuticals. J Braz Chem Soc. 2017. 28:402–414.

24. Matheus MT, Rodrigues-Junio AG, Oliveira DMT, Garcia QS. Seed longevity and physical dormancy break of two endemic species of *Dimorphandra* from Brazilian biodiversity hotspots. Seed Sci Res. 2017. 27:199–205

25. Silva MR. Uma análise da inserção do segmento de fitoterápicos na indústria farmacêutica brasileira [monografia]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2016.

26. Ley, S.V. & Baxendale, I.R. New tools and concepts for modern organic synthesis. Nat Rev Drug Discov .1, 573-86.

27. Geysen, H.M., Schoenen, F., Wagner, D. & Wagner, R. Combinatorial

compound libraries for drug discovery: an ongoing challenge. *Nat Rev Drug Discov* 2003. 2, 222-30.

28. Rodrigues W. Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. *Interações*. 2016, 17(2): 267-277.

29. Ministério da Saúde. Formulário terapêutico nacional: Rename. 2ª ed. Brasília: Ministério da saúde; 2010.

30. Ministério da saúde. Portal do ministério da saúde [internet]. Brasília: Ministério da saúde; 2013-2018. [atualização em fevereiro de 2009, acesso em 23 de novembro de 2018]. Disponível em: <http://portals.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnmpf/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-renisus>.

31. Dias ECM, Trevisan DD, Nagai, SC, Ramos NA, Silva EM. Uso de fitoterápicos e potenciais riscos de interações medicamentosas - reflexões para prática segura. *Revista Baiana de Saúde Pública*. 2017, 41(2):297-307.

32. Phillipson, JD *Phytochemistry and Pharmacognosy*. *Phytochemistry*, 2007.68, 2960-2972

33. Bhattacharya S. Medicinal plants and natural products in amelioration of arsenic toxicity: a short review. *Pharm Biol*. 2017.55:349–354.

34. Brito AMG, Rodrigues SA, Brito RG, Xavier-Filho L. Aromaterapia. da gênese a atualidade. *Revista Brasileira de plantas medicinais*. 2013, 15(4):789-93.

35. Omonijo FA, Ni L, Gong J, Wang Q, Lahaye L, Yang C. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*. 2017, xxx(2017):1-11.

36. Dhakad AK, Pandey VV, Beg S, Rawat JM, Singh A. Biological, medicinal and toxicological significance of Eucalyptus leaf essential oil: a review. *J Sci Food Agric*. 2017, 2017:1-16.

37. Sienkiewicz M, Głowacka A, Kowalczyk E, Wiktorowska-Owczarek A, Józwiak-Bębenista M, Łysakowska M. The biological activities of cinnamon, geranium and lavender essential oils. *Molecules*. 2014,19(12):20929-40.

38. Han X, Parker TL. Antiinflammatory Activity of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) Bark Essential Oil in a Human Skin Disease Model. *Phytother Res*. 2017, 31(7):1034-8.

39. Lourenco AM, Ferreira LM, Branco PS. Molecules of natural origin, semi-synthesis and synthesis with anti-inflammatory and anticancer utilities. *Curr Pharm*

Des. 2012. 18:3979–4046

40. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008. 454:428–435.

41. Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 2012.43:385–406

42. Moraes WF, Galdino PM, Nascimento MVM, Vanderlinde FA, Bara MTF, Costa EA, Paula JR. Triterpenes involved in the anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. *J Nat Med*. 2012.66:202–207.

43. Santiago KB, Conti BJ, Andrade BFMT, Silva JJM, Rogez HLG, Crevelin EJ, Beraldo de Moraes LA, Veneziani RCS, Ambrosio SR, Bastos JK, et al. 2015. Immunomodulatory action of *Copaifera* spp. oleoresins on cytokine production by human monocytes. *Biomed Pharmacother*. 70:12–18

44. Souza MC, Siani AC, Ramos MFS, Menezes-de-Lima O Jr, Henriques MGMO. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. *Die Pharm*.2003.. 58:582–586.

45. Carmo GMD, Baldissera MD, Vaucher RA, Rech VC, Oliveira CB, Sagrillo MR *et al*. Effect of the treatment with *Achyrocline satureioides* (free and nanocapsules essential oil) and diminazene aceturate on hematological and biochemical parameters in rats infected by *Trypanosoma evansi*. *Experimental parasitology*. 2015, 149: 39-46.

46. Baldissera MD, Oliveira CB, Rech VC, Rezer JFP, Sagrillo MR, Alves MP, *et al*. Treatment with essential oil of *Achyrocline satureioides* in rats infected with *Trypanosoma evansi*: Relationship between protective effect and tissue damage. *Pathology – Research and practice*. 2014, 210: 10068-74.

47. da Silva LM, Farias JA, Boeing T, Somensi LB, Beber AP, Cury BJ, *et al*. Hydroalcoholic Extract from Inflorescences of *Achyrocline satureioides* (Compositae) Ameliorates Dextran Sulphate Sodium-Induced Colitis in Mice by Attenuation in the Production of Inflammatory Cytokines and Oxidative Mediators. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016, 2016:1-15.

48. Barioni ED, Santin JR, Machado ID, Rodrigues SF, Ferraz-de-Paula V, Wagner TM, *et al*. *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. Hydroalcoholic Extract Inhibits Neutrophil Functions Related to Innate Host Defense. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013, 2013:1-12.

49. Moresco K, Silveira A, Zeidan-Chulia F, Correa A, Oliveria R, Borges A, *et al*. Effects of *Achyrocline satureioides* Inflorescence Extracts against Pathogenic

Intestinal Bacteria: Chemical Characterization, In Vitro Tests, and In Vivo Evaluation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2017, 2017:1-10.

50. Cosentino M, Bombelli R, Carcano E, Luini A, Marino F, Crema F, *et al.* Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. infusion: a study on human leukocytes. *J Ethnopharmacol.* 2008, 116(3):501-7.

51. Souza CF, Baldissera MD, Cossetin LF, Dalla Lana DF, Monteiro SG. *Achyrocline satureioides* essential oil loaded in nanocapsules ameliorate the antioxidant/oxidant status in heart of rats infected with *Trypanosoma evansi*. *Microb Pathog.* 2017, 105:30-6.

52. Stolz ED, Müller LG, Trojan-Rodrigues M, Baumhardt E, Ritter MR, Rates SMK. Survey of plants popularly used for pain relief in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 2014, 24: 185-196.

53. Retta D, Dellacassa E, Villamil J, Suárez AS, Bandoni AL. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. *Industrial crops and products.* 2012, 38:27-38.

54. Dutra RC, Campos MM, Santos ARS, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res.* 2016. 112:4–29

55. Michelin EMZ. Obtenção de extrato de erva baleeira (*Cordia verbenacea* DC) Por diferentes técnicas: medida da Atividade biológica, modelagem matemática e Determinação do equilíbrio de fases [Tese]. Florianópolis: Universidade federal de Santa Catarina; 2009.

56. Passos GF, Fernandes ES, da Cunha FM, Ferreira J, Pianowski LF, Campos MM, *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *J Ethnopharmacol.* 2007, 110(2):323-33.

57. Aulton ME, Taylor KMG, editores. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.

58. Asensio CM, Paredes AJ, Martin MP, Allemandi DA, Nepote V, Grosso NR. Antioxidant Stability Study of Oregano Essential Oil Microcapsules Prepared by *Spray-drying*. *J Food Sci.* 2017, 82(12): 2864-72.

59. Alves SF. Estudo da composição química, de atividades biológicas e microencapsulação do óleo essencial dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel - Fabaceae ("sucupira") [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás. 2012.

60. Suave J, Dall'agnol EC, Pezzini APT, Silva DAK, Meier MM, Soldi V.

Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Health and Environment Journal*. 2006, 7(2): 12-20.

61, Wandrey, C, Bartkowiak, A., e Harding, SE. Materials for Encapsulation In: N. J. Zuidam, & V. A. Nedovic, *Encapsulation technologies for food active ingredients and food processing*, 2009. 31–100.

62. Fang, Z., e Bhandari, B. Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 2010. 21(10), 510-523.

63. Thies, C. Microcapsules. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2003. 3892-3903.

64. Santos, EB. *Sistemas Químicos Nanoestruturados: Nanopartículas Carócio-Casca em Suporte Poroso Funcional e Filmes Finos Alternados de Óxidos Semicondutores (TiO₂, MoO₃, WO₃)*. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2011

65. Heger, R. *Microencapsulation of Food Ingredients*. Boca Raton, CRC Press. Helene, G. (1998). Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n 3) to eicosapentaenoic acid (20:5n 3) and docosahexaenoic acid (22:6n 3)? *Int. J. Vitam. Nutr.* 2016Res. 68, 159–173

66 Saéñz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 2009. 114(2), 616-622.

67. Favaro-Trindade, C. S., Pinho, S., & Rocha, G. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2008.11(2), 103-1

68. Huertas RAP. Revisión: Microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 2010, 63(2): 5669-84.

69. Quek, S. Y., Chen, Q. & Shi, J. . *Microencapsulation of Food Ingredients for Functional Foods*. 2015

70. Stuna-Zujeva A, Irbe Z, Berzina-Cimdina L. Controlling the morphology of ceramic and composite powders obtained via spray drying – A review. *Ceramic international*. 2017, (43): 11543-51.

71. Eshraghi N, Caes S, Mahmoud A, Cloots R, Vertruyen B, Boschini F. Sodium vanadium (III) fluorophosphate/carbon nanotubes composite (NVPF/CNT) prepared by *Spray-drying*: good electrochemical performance thanks to well-dispersed CNT network within NVPF particles *Eletrochimica Acta*. 2017, (228): 319-24.

72. Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of

Spray-drying in microencapsulation of food ingredients - An overview. Food Research International. 2007, (40): 1107-21.

73. Kumar A, Gernaey KV, De Beer T, Nopens I. Model-based analysis of high shear wet granulation from batch to continuous processes in pharmaceutical production: a critical review. Eur J Pharm Biopharm. 2013, 85(3 Pt B):814-32.

74. Gupta AK, Mittal A, Jha KK. Fast dissolving tablet – a review. The Pharma Innovation. 2012, 1(1): 1-8.

75. Srividya B, Sowmya C, Reddy SP. Capsules and it's technology: na overview. International Journal of Pharmaceutical Drug Analysis. 2014, 2(9): 727-733.

76. Sartor RB. Modelagem, simulação e otimização de uma unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor [dissertação]. Porto Alegre: Universidade federal do Rio Grande do Sul. 2009.

77. Koester M, Thommes M. New insights into the pelletization mechanism by extrusion/speronization. Pharm. Sci. Tech. 2010, 11(4): 1549-1551.

78. Fung JJ, Lim YY. Effect of Air-and Oven-Drying on the Activity of Polyphenol Oxidases and Peroxidases in the Leaves of *Gynura procumbens*. Monash university Malaysia. 2016, Out: 1-10.

79. Vanhoorne V, Bekaert B, Peeters E, De Beer T, Remon JP, Vervaet C. Improved tableability after a polymorphic transition of delta-mannitol during twin screw granulation. International Journal of pharmaceutics. 2016, (506):13-24.

80. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira Volume 1. 5ª Ed. Brasília: Anvisa; 2010.

81. Marinho JS. Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas contendo alto teor de produto seco por aspensão de frutos de *Libidibia ferre* Mart [dissertação]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas. 2016.

82. Souza HB, Pinto JDB. Avaliação das propriedades tecnológicas de granulados de amido e lactose e para produção de comprimidos por compressão direta [Trabalho de conclusão de curso]. Bragança Paulista: Universidade São Francisco. 2010.

83. Corrêa PC, Resende O, Ribeiro DM. Isotermas de sorção de espigas de milho: obtenção e modelagem. Revista brasileira do milho e sorgo. 2005, 4(1): 126-34.

84. Solaiman A, Tatari AK, Elkordy AA. Naproxen Microparticulate Systems Prepared Using In Situ Crystallisation and freeze-drying techniques. Pharm. Sci. Tech.

2016, 18(5): 1438-46.

85. Oliveira FAA. Micropartículas de goma do cajueiro associada ao óleo essencial de varronia verbenacea (dc.) Ou de achyrocline satureioides (lam.) D. C. [dissertação]. Campinas: Universidade estadual de Campinas. 2016.

86. Fernandes RVB, Borges SV, Botrel DA. Influence of spray drying operating conditions on microencapsulated rosemary essential oil properties. *Ciência e tecnologia de alimentos*. 2013, 33(Supl. 1): 171-78.

87. Beristain CI, García HS, Vernon-Carter EJ. Spray-dried Encapsulation of Cardamom (*Elettaria cardamomum*) Essential Oil with Mesquite (*Prosopis juliflora*) Gum. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*. 2001, (34): 398-401.

88. Garcia LC. Microencapsulação por *Spray-drying* de óleo essencial de manjeriço [Tese de doutorado]. Campinas: Universidade estadual de Campinas. 2013.

89. Wang J, Cao Y, Sun B, Wang C. Physicochemical and release characterization of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Food Chemistry*. 2011, (127): 1680-85.

90. Campelo-Felix PH, Souza HJB, Figueiredo JA, Fernandes RVB, Botel DA, Oliveira CR, *et al.* Prebiotic Carbohydrates. Effect on Reconstitution, Storage, Release, and Antioxidant Properties of Lime Essential Oil Microparticles. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2017, (65): 445-53.

91. Loss RA, Pereira GN, Boschetto DL, Aguiar GSP, Machado JR, Chaves LMPC, *et al.* Encapsulation of eugenyl acetate in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. *Journal of food sci. technol.* 2016, 53(10): 3859-64.

92. Parris N, Cooke PH, Hicks KB. Encapsulation of Essential Oils in Zein Nanospherical Particles. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005, 53(12): 4788-92.

93. Bhandari BR, D'Arcy BR, Padukka I. Encapsulation of Lemon Oil by Paste Method Using β -Cyclodextrin - Encapsulation Efficiency and Profile of Oil Volatiles. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1999, (47): 5194-97.

94. Bringas-Lantigua M, Expósito-Molina I, Reineccius GA, López-Hernández O, Pino JÁ. Influence of Spray Dryer Air Temperatures on Encapsulated Mandarin Oil. 2011, (29): 520-26.

95. Cetti JR, Witt SE, Scavone TA, inventors; The Procter & Gamble Company, assignee. Personal care compositions. United States patent US 2018/0134989 A1.

2018, 17 May.

96. Doorn AL, Corda G, Witteveen F, Siegel D, inventors; Givaudan S.A., assignee. Flavour composition. United States patent US 2017/0181454 A1. 2017, 29 Jun.

97. Lau ETL, Johnson SK, Stanley RA, Mikkelsen D, Fang Z, Halley PJ, Steadman KJ. Preparation and In Vitro Release of Drug-Loaded Microparticles for Oral Delivery Using Wholegrain Sorghum Kafirin Protein. *International Journal of polymer science*. 2015: 1-10.

98. Berendsen R, Güell C, Ferrando M. Spray dried double emulsions containing procyanidin-rich extracts produced by premix membrane emulsification: effect of interfacial composition. *Food Chemistry*. 2015, (178): 251-58.

99. Belotti S, Rossi A, Colombo P, Bettini R, Rekkas D, Politis S, *et al.* Spray-dried amikacin sulphate powder for inhalation in cystic fibrosis patients: the role of ethanol in particle formation. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2015, (93):165-72

100. Ribeiro RF, Motta MH, Härter APG, Flores FC, Beck RCR, Schaffazick SR, *et al.* Spray-dried powders improve the controlled release of antifungal tioconazole-loaded polymeric nanocapsules compared to with lyophilized products. *Materials science and engineering C*. 2016 (C59):875-884.

101. Oriqui LR, Mori M. Guia para determinação da estabilidade de produtos químicos. *Quimica nova*. 2013, 36(2):340-7.

102. Bejar AK, Mihoubi NB, Kechaou N. Moisture sorption isotherms – Experimental and mathematical investigations of orange (*Citrus sinensis*) peel and leaves. *Food Chemistry*. 2012, (132):1728-35.

103. Campelo PH, Sanches EA, Fernandes RVB, Botrel DA, Borges SV. Stability of lime essential oil microparticles produced with proteincarbohydrate blends. *Food research international*. 2018, (105):936-44.

104. Quincot G, Azenha M, Barros J, Faria R. Use of salt solutions for assuring constant relative humidity conditions in contained environments. *Fundação para a Ciência e a Tecnologia*. 2011.

105. Moncada J, Tamayo JA, Cardona CA. Techno-economic and environmental assessment of essential oil extraction from Oregano (*Origanum vulgare*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in Colombia. *Journal of Cleaner Production*. 2016, 112: 172-181.

106. Simone VD, Caccavo D, Lamberti G, d'Amore M, Barba AA. Wet-granulation process phenomenological analysis and process parameters optimization. *Powder technology*. 2018, 340: 411-19
107. Suresh P, Sreedhar I, Vaidhiswaran R, Venugopal A. A comprehensive review on process and engineering aspects of pharmaceutical wet granulation. *Chemical engineering journal*. 2017, 328: 785-815.
108. Muley S, Nandgude T, Poddar S. Extrusion–spherulization a promising pelletization technique in-depth review. *Journal of pharmaceutical sciences*; 2016, (II): 684-99.
109. Tan L, Carella AJ, Ren Y, Lo JB. Process optimization for continuous extrusion wet granulation. *Pharmaceutical development and technology*. 2011, 16(4): 302-15.
110. Keleb EI, Vermeire A, Vervaet C, Remon JP. Extrusion Granulation and High Shear Granulation of Different Grades of Lactose and Highly Dosed Drugs A Comparative Study. *Drug development and industrial pharmacy*. 2004, 30(6): 679-91.
111. Dukić-Ott A, Thommes M, Remon JP, Kleinebudde P, Vervaet C. Production of pellets via extrusion–spherulisation without the incorporation of microcrystalline cellulose: A critical review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009, 71: 38-46.
112. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Coordenação de Registro de Insumos Farmacêuticos Ativos: 3.2.S.3.1. – Elucidação da Estrutura e de outras características. 2009. <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/guia/3.2.S.3.1.html> Acesso em: Novembro de 2018.
113. Fernandes RVB, Borges SV, Botrel DA. Gum arabic starch maltodextrin inulin as wall materials on the microencapsulation of Rosemary oil. *Carbohydrate polymers*. 2014, 101: 524-32.
114. Villanova JCO, Lima TH, Patrício OS, Pereira FV, Ayres E. Síntese e caracterização de beads acrílicos preparados por polimerização em suspensão visando aplicação como excipiente farmacêutico para compressão direta. *Química nova*. 2012, 35(1): 124-31.
115. Pombal R, Barata P, Oliveira R. Estabilidade de medicamentos manipulados. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*. 2010, 7: 330-41.
116. Silva AFT, Burggraeve A, Dendon Q, Meeren PV, Sandler N, Kerkhof TVD, *et al.* Particle sizing measurements in pharmaceutical applications - Comparison of in-

process methods versus off-line methods. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013, 85: 1006-18.

117. Benelli L, Oliveira WP. Propriedades físicas e velocidade mínima de fluidização de partículas sementes empregadas em processos de aglomeração de produtos farmacêuticos e alimentícios. *Congresso brasileiro de sistemas particulados*. 2015, 1-11.

118. Nalluri VR, Schirg P, Gao C, Viridis A, Imandidis G, Kuentz M. Different modes of dynamic image analysis in monitoring of pharmaceutical dry milling process. *International Journal of Pharmaceutics* 2010, 391: 107-114.

119. Müller P, Seeger M, Tomas J. Compression and breakage behavior of γ -Al₂O₃ granules. *Powder technology*. 2013, 237: 125-33.

120. Garcia AQR, Pereira TCB, Dias ILT. Estudo das propriedades de fluxo no desenvolvimento de paracetamol pó veiculado em sachê. *Revista brasileira de farmácia*. 2012, 93(4): 469-75.

121. United States Pharmacopey. 1174: Powder Flow PF 30(6). 2016. Disponível em: https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/general-chapter/g05_pf_30_6_2004.pdf, Acesso em Novembro de 2018.

122. Lago VV, Pereira RN, Bertol CD. Propriedades micromeríticas e análise físico-química de matérias primas de alopurinol. *Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada*. 2012, 33(3): 385-93.

123. Caliskan G, Dirim SN. The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. *Powder technology*. 2016, (287):308-14.

124. Turchiuli C, Fuchs M, Bohin M, Cuvelier ME, Ordonnaud C, Peyrat-Maillard MN, *et al.* Oil encapsulation by spray drying and fluidised bed agglomeration. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2005, (6):29-35.

125. Agnihotri N, Mishra R, Goda C, Arora M. Microencapsulation - A Novel Approach in Drug Delivery: a review. *Indo global journal of pharmaceutical sciences*. 2012, 2(1): 1-20.

126. Zhao Y, Wang C, Chow AHL, Ren K, Gong T, Zhang Z, Zheng Y. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil Formulation and bioavailability studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010. 383: 170-7.

127. Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011. 415: 34-52.
128. Manadas R, Pina MEP, Veiga F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2002, 38(4): 375-99.
129. Dash V, Mishra SK, Singh M, Goyal AK, Rath G. Release Kinetic Studies of Aspirin Microcapsules from Ethyl Cellulose, Cellulose Acetate Phthalate and their Mixtures by Emulsion Solvent Evaporation Method. *Scientia Pharmaceutica*. 2009. 78: 93-101.
130. Dima C, Patrascu L, Cantaragiu A, Alexe P, Dima S. The kinetics of the swelling process and the release mechanisms of *Coriandrum sativum* L. essential oil from chitosan.alginate.inulin microcapsules. *Food Chemistry*. 2016, 195: 39-48.
131. Garcia JMO. Fármacos antiulcerosos - avaliação do perfil de utilização, efeitos secundários e potenciais interações medicamentosas [Dissertação]. Covilhã: Universidade de Beira do Interior. 2015.
132. Freire AC, Podczeczek F, Sousa J, Veiga F. Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I - O cólon como local de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2006, 42(3): 319-55.
133. Moura MRL, Reyes FGR. Interação fármaco-nutriente: uma revisão. *Revista de Nutrição*. 2002, 15(2): 223-38.
134. Dairiki JK, Majolo C, Chagas EC, Chaves FCM, Oliveira MR, Morais IS. Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. *Circular técnica*. 2013: 1-8.
135. Souza CRF, Ferraz-Freitas PN, Oliveira WP. Complexos de inclusão binários, ternários e quaternários contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*. 2016,39(8): 979-86.
136. Carmo EL, Fernandes RVB, Borges SV. Microencapsulação por spray drying, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. *Revista de Engenharia Química e Química*. 2015, 1(2): 30-44.
137. Santos AS, Rehder VLG, Pianowski LF, Calixto JB, Magalhães PM. Composição química de frações ativas do óleo essencial de *Cordia verbenacea*. *Sociedade brasileira de química*. 30ª Reunião da sociedade brasileira de química. 2007.

138. Amaral W, Deschamps C, Biasi LA, Bizzo HR, Machado MP, Silva LE. Yield and chemical composition of the essential oil of species of the Asteracea family from Atlantic Forest, South of Brazil. *Journal of essential oil research*. 2018, 30(4):278-284.
139. Aldred EM, Buck C, Vall K. *Pharmacology A Handbook for Complementary Healthcare Professionals*. 1st ed. London: Churchill Livingstone. 2009.
140. Michielin EMZ, Salvador AA, Riehl CAS, Smânia Jr A, Smânia EFA, Ferreira SRS. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by diferente methods. *Bioresource Technology*. 2009, 100: 6615-23.
141. Paula-Freire LIG, Andersen ML, Gama VS, Molska GR, Carlini ELA. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. *Phytomedicine*. 2014, 21: 356-62.
142. Medeiros R, Passos GF, Vitor CE, Koeppe J, Mazzuco TL, Pianowski LF, *et al*. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *British Journal of Pharmacology*. 2007, 151: 618-27.
143. Rogerio AP, Andrade EL, Leite DFP, Figueiredo CP, Calixto JB. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene α -humulene in experimental airways allergic inflammation. *British Journal of Pharmacology*. 2009, 158: 1074-87.
144. el Hadri A, del Rio MAG, Sanz J, Coloma AG, Idaomar M, Ribas B, *et al*. Cytotoxic activity of α -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2010, 76(3): 343-56.
145. Bharate SS, Bharate SB, Bajaj NA. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. *Journal of excipientes and food chemistry*. 2010, 1(3): 3-26.
146. De Simone V, Dalmoro A, Lamberti G, Caccavo D, d'Amore M, Barba AA. HPMC granules by wet granulation process Effect of vitamin load on physicochemical, mechanical and release properties. *Carbohydrate polymers*. 2018, 181: 939-47.
147. Cortéz-Camargo S, Cruz-Olivares J, Barragán-Huerta BE, Dublán-García O, Román-Guerrero A, Pérez-Alonso C. Microencapsulation by spray drying of lemon essential oil Evaluation of mixtures of mesquite gum nopal mucilage as new wall materials. *Journal of microencapsulation* 2017, 34(4): 395-407.

148. Oriqui LR, Mori M, Wongtschowski P. Guia para a determinação da estabilidade de produtos químicos. *Química nova*. 2013, 36(2): 340-47.

149. De Lucca JM, Teixeira RM, Teixeira HF, Koester LS. Cápsulas duras com enchimento líquido ou semi-sólido: uma revisão sobre sua produção e aplicação na liberação de fármacos. *Acta Farm. Bonaerense*. 2005, 24(3): 458-67.

9. Apêndices

9.1. Testes granulométricos para seleção de formulação.

Diferentes formulações forem utilizadas para determinar o grânulo que melhor se adaptasse ao estudo, podendo este também ser produzido via *spray-drying*. As formulações utilizadas foram retiradas da literatura e adaptadas.

Tabela 14. Diferentes formulações de grânulos encontrados em literatura para realização de teste granulométrico

Preparo (referência)	Ingredientes	Quantidade
Formulação A	Lactose	8,05 g
	Amido	1,12 g
	Talco	0,89 g
	Polivinilpirrolidona	0,125 g
	Água	3,0 mL
Formulação B	Lactose	63,8 g
	Amido	8,9 g
	Talco	q.s.p. 79,9 g
	Álcool 70% (v/v)	q.s. aglutinação
Formulação C	Celulose microcristalina	5 g
	Água	6,37 mL
Formulação D	Celulose microcristalina	2,5 g
	Lactose	2,5 g
	Tween 80	0,3 g
	Água	4,0 mL
Formulação E	Celulose microcristalina	2,4 g
	Lactose	2,5 g
	Polivinilpirrolidona	0,1 g
	Água	4,0 mL

Formulação A e B: adaptados da Farmacopéia portuguesa, 1999; Formulação C: adaptado de Zeesham, 2009; Formulação D: adaptado de Koester & Thommes, 2010; Formulação E: de Ibrahim, 2013.

Teste granulométrico realizado de acordo com metodologia da Farmacopeia Brasileira 5ª ed, utilizando conjunto de 4 tamis de malhas de tamanhos decrescentes (850, 600, 188, 127 μm), na qual a malha cuja retenção é de no mínimo 80% do total, indicará a escolha da granulometria.

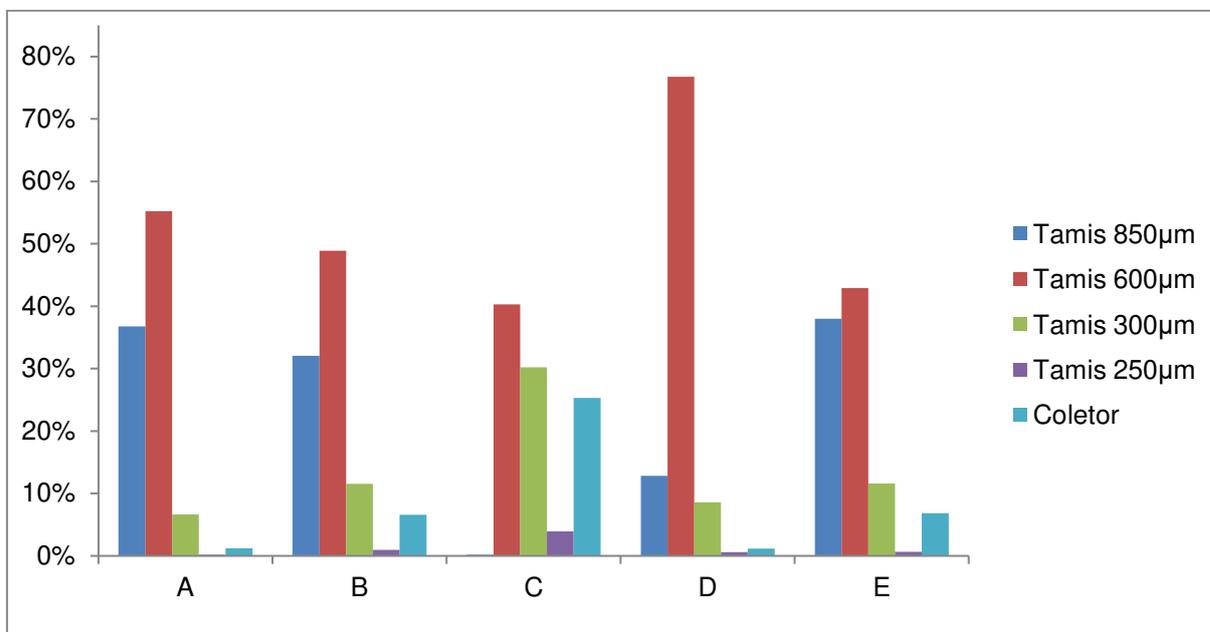


Figura 17. Resultado do teste de granulometria utilizando as diferentes formulações (A a E) baseadas em literatura, apresentando as porcentagens de distribuição em diferentes tamises.

De acordo com os testes granulométricos, a que mais se aproximou dos 80% retido em uma das malhas foi a formulação D, a qual foi a eleita para uso no presente estudo. O uso do Tween 80 foi adaptado para que os óleos essenciais pudessem ser veiculados através da água acrescida nas formulações no momento de aglutinação.

9.2. Metodologia de extração de óleo essencial por ultrassom e centrifugação

Extração de óleo essencial a partir de formulação de granulado farmacêutico

Objetivo:

Verificar gravimetricamente a quantidade de óleo essencial de *Varronia verbenacea* e *Acyroclines satureioides* extraídas a partir de uma formulação farmacêutica de granulado.

Materiais:

Celulose microcristalina..... 5,00g

Lactose..... 5,00g

Mistura de óleos essenciais... 1,0g

Procedimento:

- 1- Pesar os pós e acondiciona-los em béquer de massa conhecida. Misturá-los bem.
- 2- Adicionar a mistura dos óleos essenciais à mistura de pós e homogeneizar com cuidado garantindo a espalhabilidade do material.
- 3- Pesar analiticamente 1,0 g deste pó resultante em tubo tipo Falcon (anotar peso da tampa e do tubo separadamente).
- 4- Adicionar 15 mL de diclorometano e agitar levemente o tubo com as mãos (o suficiente para causar suspensão das partículas), evitar que o conteúdo atinja a tampa. Levar ao ultrassom por 4 min, realizando uma pausa aos 2 min para ressuspender as partículas por agitação manual.
- 5- Centrifugar por 10 min a 1500G.
- 6- Verter o sobrenadante em Erlenmeyer.
- 7- Realizar mais duas extrações, porém utilizando 10 mL de Diclorometano no lugar de 15 mL. Verter todos os sobrenadantes no mesmo Erlenmeyer.
- 8- Verter os sobrenadantes recolhidos no Erlenmeyer sobre sistema de filtração a vácuo (utilizando papel filtro de massa conhecida) e recolhendo-os em balão de fundo redondo de 125 mL (de massa conhecida) contendo cerca de 0,5 g de trietilcitrato. Agitar o balão com o filtrado por 5 min, manualmente.
- 9- Submeter o filtrado presente no balão a destilação a vácuo (rotaevaporador) a 38°C, 60 rpm, com pressão de 200 mmHg, por 10 min.
- 10- Pesar balão com resíduo.

9.3. Resultados extração por ultrassom e centrifugação

Tabela 15. Testes de extração realizados de acordo com metodologia de extração por ultrassom e centrifugação.

	Mistura de pós e Óleos (g)	Trietil citrato (g)	Óleo de Erva-baleeira (g)	Óleo de macela (g)
Branco	0,51005	-	-	-
Ensaio 1	0,50017	-	0,04999	0,04974
Ensaio 2	1,00524	-	0,04999	0,04974
Ensaio 3	1,11835	-	0,06075	0,05847
Ensaio 4	1,02618	-	0,05033	0,0516
Ensaio 5	1,00051	-	0,05033	0,0516
Ensaio 6	1,06715	0,5099	0,05033	0,0516
Ensaio 7	1,10795	0,5091	0,05508	0,05234
Ensaio 8	1,00333	0,507	0,05033	0,0516

Tabela 16 Resultado dos procedimentos extrativos utilizando técnica de extração por ultrassom e centrifugação.

	Óleo recuperado (g)	Óleo recuperado (%)*
Branco	-	-
Ensaio 1	0,0186	18,6
Ensaio 2	0,0621	62,3
Ensaio 3	0,0987	82,8
Ensaio 4	0,0560	54,9
Ensaio 5	0,1371	52,7
Ensaio 6	0,0774	75,9
Ensaio 7	0,0571	53,2
Ensaio 8	0,0826	81,0

* Baseado na quantidade inicial de óleo essencial utilizado no preparo

9.4. Teste da constância de óleo essencial por rotaevaporação utilizando vácuo.

Para determinar se a perda dos óleos essenciais não estava ocorrendo devido ao uso de vácuo no processo de remoção dos solventes utilizados na extração, os óleos essenciais foram acondicionados em balão de fundo redondo e submetidos a evaporação a vácuo por diferentes tempos.

Tabela 17 Perda de óleo essencial em função do tempo de utilização em evaporador rotativo a vácuo.

Tempo	Massa de óleo essencial (g)		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Inicial	0,2101	0,1896	0,1047
10 min	0,2033	0,1794	0,1003
20 min	0,1905	0,1791	0,0865

Nota-se que com o decorrer do tempo no evaporador rotativo sob vácuo, a perda de óleo essencial continuou tornando tal procedimento inviável para utilização neste trabalho.

9.5. Extração de óleos essenciais a partir de formulação farmacêutica de granulado

Extração de óleo essencial a partir de formulação de granulado farmacêutico

Objetivo:

Verificar gravimetricamente e volumetricamente a quantidade de óleo essencial de *Varronia curassavica* e *Acyroclines stureioides* extraídas a partir de uma formulação farmacêutica de granulado.

Componentes em gramas:

Celulose microcristalina..... 2,25

Lactose..... 2,25

Mistura de óleos essenciais... 0,5

Água..... q.s.p. massa final de pó

Aparelho de Clevenger

Procedimento:

- 1- Pesar os pós e acondicioná-los em béquer de massa conhecida. Misturá-los bem;
- 2- Adicionar a mistura dos óleos essenciais à mistura de pós e homogeneizar com cuidado garantindo a espalhabilidade do material.
- 3- Posicionar o equipamento de Clevenger e o condensador (ligado a uma linha de refrigeração);
- 4- Adicionar o pó e água destilada a um balão de fundo redondo de 500 mL, de modo que a concentração seja de 1g de pó para 40mL de água. Utilizar no mínimo 5g de pó para o procedimento;
- 5- Colocar o balão em uma manta de aquecimento e acoplá-lo ao aparelho de Clevenger;
- 6- Ligar a linha de refrigeração, e então ligar o aquecimento da manta;
- 7- Extrair por 3 h, ou até que o volume de óleo recolhido seja constante;
- 8- Anotar volume de óleo e recolhe-lo.
- 9- Calcular a massa obtida a partir da densidade média dos dois óleos ($d = 0,88825 \text{ g/L}$)

9.6. Rendimento extrativo por hidrodestilação em aparelho de Clevenger

Os valores obtidos a partir da extração descrita no item 9.5. estão expostos na Tabela 18.

Tabela 18. Rendimento da recuperação dos óleos essenciais a partir da mistura de pós para formulação

Teste	Óleo inicial (g)	Óleo recuperado (g)	Rendimento (%)
1	0,4993	0,4175	83,62
2	0,4955	0,4175	84,25
3	0,4918	0,4085	83,06

A média final do rendimento extrativo foi de 83,64%, e este valor foi utilizado como base para cálculo do rendimento final utilizado no trabalho.

9.7. Cadastro de patrimônio genético



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AE903BD

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AE903BD**
 Usuário: **UNICAMP**
 CPF/CNPJ: **46.068.425/0001-33**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso:

Pesquisa Científica Bioprospecção Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Achyrocline satureioides

Cordia verbenacea

Acmella oleracea

Título da Atividade: **Avaliação da atividade de extratos vegetais nativos**

Equipe

Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues	UNICAMP
José Cláudio Klier Monteiro Filho	unicamp
Carla Beatriz Grespan Bottoli	unicamp
Gislaine Correa da Silva	unicamp

Data do Cadastro: **12/09/2018 10:42:28**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:51** de **13/09/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**