

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

VANDERSON BARBOSA BERNARDO

**CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO ATOMIZADO DE**  
*Aspidosperma tomentosum* MART. (APOCYNACEAE)

Maceió, AL

2012

VANDERSON BARBOSA BERNARDO

**CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO ATOMIZADO DE**  
*Aspidosperma tomentosum* MART. (APOCYNACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências com ênfase em Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo  
Júnior

Maceió, AL

2012

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

B523c Bernardo, Vanderson Barbosa.  
Caracterização do extrato hidroalcoólico atomizado de *Aspidosperma tomentosum* Mart. (Apocynaceae) / Vanderson Barbosa. – 2012.  
94 f. : il. tabs., grafs.

Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.  
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2012.

Bibliografia: f. 85-94.

1. *Aspidosperma tomentosum*. 2. Spray dryer. 3. Flavanoídes. 4. HPLC.  
5. Atividade antioxidante. I. Título.

CDU: 547.9

*Dedico este trabalho aos meus pais, Eduardo e Valquíria, por tudo que me ensinaram e  
por sempre acreditarem em mim.*

## AGRADECIMENTOS

*À toda a minha família, principalmente, ao meu irmão, Eduardo, e ao meu avô, seu Dedé,  
pelo apoio oferecido ao longo de todos esses anos*

*À minha amada Tainan, companheira para toda a vida*

*Aos meus amigos que tanto contribuíram para a realização deste trabalho, em especial para  
Leandro, Daniel, Pedro, Ísis, Carla e Ingrid*

*A todo o pessoal do LPqRN*

*À prof<sup>a</sup> Rusiene e ao Edgar, pela ajuda com as análises térmicas*

*À CAPES, pelo apoio financeiro*

*Ao prof<sup>a</sup> Ticiano, pelo auxílio nas análises de HPLC e pelos ensinamentos desde a época da  
graduação*

*Aos prof<sup>s</sup> Irinaldo e Euzébio, pela colaboração durante este percurso*

*Ao prof<sup>o</sup> João Xavier, pelos ensinamentos, pela cobrança e pela oportunidade de realizar  
este trabalho*

*A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram durante esta jornada*

## RESUMO

As espécies do gênero *Aspidosperma* compreendem árvores de médio a grande porte e se encontram amplamente distribuídas pelo continente, com cerca de 50 espécies catalogadas no Brasil. A espécie *Aspidosperma tomentosum* é uma árvore nativa do Brasil que pode atingir 15 metros de altura e que apresenta estudos, apesar de escassos, descrevendo suas atividades antineoplásica, no sistema cardiovascular, antimicrobiana, analgésica e anti-inflamatória, além do isolamento de alcaloides. Tendo em vista as atividades biológicas descritas, contrastando com a escassez de estudos encontrados, realizamos um estudo com o extrato hidroalcoólico (bruto) da casca do caule da planta, visando à identificação de compostos bioativos, a obtenção e a caracterização de um produto farmacêutico intermediário na forma de pó, a quantificação dos compostos isolados no extrato e a avaliação de sua atividade antioxidante. Oriundo do extrato foi obtido um precipitado em metanol, a partir do qual foi possível isolar e identificar os flavonoides quercetina e isoramnetina. O extrato bruto foi atomizado em *spray dryer*, usando dióxido de silício coloidal (10%) como adjuvante de secagem, e um pó fino, com rendimento de 49%, foi obtido. A espectroscopia na região do infravermelho mostrou os mesmos estiramentos para os extratos bruto e atomizado. O produto se mostrou termicamente estável, com baixa umidade (5,29%) e alto resíduo acima de 600 °C. A quantificação dos flavonoides por HPLC resultou em teor menor destes compostos para o extrato atomizado (17,3%) que para o extrato bruto (44%). Os resultados de quantificação e análise térmica sugerem que houve acúmulo do adjuvante durante o processo de secagem. O extrato bruto, o extrato atomizado e o precipitado exibiram atividade antioxidante na concentração avaliada (4,95 µg/mL).

Palavras-chave: *Aspidosperma tomentosum*. *Spray dryer*. Flavonoides. Caracterização de pós. HPLC. Atividade antioxidante.

## ABSTRACT

Species of *Aspidosperma* genus comprise trees from medium to large size and are broadly distributed through the continent, with about 50 species catalogued in Brazil. *Aspidosperma tomentosum* is a Brazilian native tree which can reach 15 meters high and which presents studies, although rare, describing its antineoplastic, on cardiovascular system, antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory. Furthermore, alkaloids have been isolated from it. Considering the described biological activities, contrasting with the scarcity of studies found, we performed a work with the stem bark hydroalcoholic (crude) extract, aiming the identification of bioactive compounds, the obtainment and characterization of a pharmaceutical in a powder form, the isolated compounds quantification and the evaluation of antioxidant activity. A precipitate in methanol was obtained derived of the crude extract, from which was possible to isolate and identify the flavonoids quercetin and isorhamnetin. The crude extract was spray dried, using colloidal silicon dioxide as drying adjuvant (10%), and a finely powdered product, with yield of 49%, was made. Infrared spectroscopy showed the same absorptions for crude and spray dried extracts. The product exhibited thermal stability, low moisture content (5.29%) and elevated residue above 600 °C. Flavonoid quantification by HPLC showed that the content of these compounds in the spray dried extract (17,32%) is lower than in the crude extract (44%). Data of quantification and thermal analysis suggest that an accumulation of adjuvant took place during the drying process. Crude extract, spray dried extract and the precipitate exhibited antioxidant activity in the analyzed concentration (4.95 µg/mL).

Key words: *Aspidosperma tomentosum*. Spray dryer. Flavonoids. Poder characterization. Antioxidante activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Núcleo fundamental dos flavonoides .....	22
Figura 2. Estruturas dos principais grupos de flavonoides.....	22
Figura 3. Estruturas dos flavonoides isolados de <i>Aspidosperma quebracho-blanco</i> .....	28
Figura 4. (A) <i>Aspidosperma tomentosum</i> , (B) casca do caule, (C) flores, (D) folhas, (E) frutos e sementes. (Fonte: REDE DE SEMENTES DO CERRADO).....	31
Figura 5. Estruturas dos alcaloides isolados de <i>A. tomentosum</i> .....	32
Figura 6. Esquema de um equipamento de <i>spray dryer</i> com atomizador pneumático. (1) Aquecedor elétrico. (2) Bico pneumático. (3) Câmara de secagem. (4) Ciclone e coletor. (5) Filtro. (6) Aspirador para geração do fluxo (modificado de Informação de produto. Mini Spray Dryer B-290). .....	34
Figura 7. Mini Spray Dryer B-290 (modificado de Informação de produto. Mini Spray Dryer B-290).....	35
Figura 8. Formação das partículas sólidas (modificado de OLIVEIRA E PETROVCK, 2010). .....	36
Figura 9. Obtenção e destino do extrato bruto e do precipitado de <i>A. tomentosum</i> .....	43
Figura 10. CCD do extrato bruto de <i>A. tomentosum</i> (esquerda) e do ATppt (Fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3:\text{CH}_3\text{COOH} - 4:1:0,1$ ). .....	52
Figura 11. Espectro na região do infravermelho de ATppt. ....	53
Figura 12. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de ATppt (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). (A) Espectro completo; (B) Expansão na faixa de 50-180 ppm. ....	55
Figura 13. Estrutura do esqueleto de flavonol proposto para os compostos presentes em ATppt.....	57
Figura 14. Espectro de $^1\text{H}$ RMN de ATppt (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). (A) Completo; (B) Expansão na faixa de 6-8 ppm.....	58

Figura 15. Flavonóis isolados de <i>A. tomentosum</i> (ATppt): Quercetina (40) e Isorramnetina (41). .....	61
Figura 16. Espectro de HSQC RMN de ATppt (A) e ampliação (B) ( $^1\text{H}$ 400 MHz, $^{13}\text{C}$ 100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). .....	62
Figura 17. Espectro HMBC RMN de ATppt ( $^1\text{H}$ 400 MHz, $^{13}\text{C}$ 100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). .....	63
Figura 18. Espectro NOESY RMN de ATppt ( $^1\text{H}$ 400 MHz, $^{13}\text{C}$ 100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). .....	63
Figura 19. Comparação entre os espectros do extrato bruto (em azul) e do extrato atomizado de <i>A. tomentosum</i> (em preto). .....	65
Figura 20. Curva termogravimétrica do extrato bruto de <i>A. tomentosum</i> . .....	68
Figura 21. Curva termogravimétrica do extrato atomizado de <i>A. tomentosum</i> . .....	69
Figura 22. Valores de pH em função da concentração do extrato atomizado de <i>A. tomentosum</i> . .....	71
Figura 23. Determinação da distribuição granulométrica do extrato atomizado de <i>A. tomentosum</i> . .....	72
Figura 24. Fotomicrografias do extrato atomizado de <i>A. tomentosum</i> . .....	74
Figura 25. Cromatogramas de ATppt com fase móvel MeOH:CH <sub>3</sub> COOH (A) 55:45 e (B) 60:40. .....	75
Figura 26. Cromatogramas de ATppt com fase móvel MeOH:CH <sub>3</sub> COOH (A) 70:30 e (B) 73:27. .....	75
Figura 27. Cromatogramas do padrão de quercetina nas concentrações (A) 200 µg/mL, (B) 100 µg/mL e (C) 20 µg/mL. .....	77
Figura 28. Curva de calibração do padrão de quercetina mostrando a relação linear entre a concentração e a área sob a curva. ....	78
Figura 29. Cromatogramas (A) de ATppt, (B) do extrato bruto e (C) do extrato atomizado de <i>A. tomentosum</i> . .....	79
Figura 30. Percentagem de inibição do radical ABTS para o ATppt, o extrato bruto e o extrato atomizado. ....	81

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Classificação quimiotaxonômica das espécies do gênero *Aspidosperma* (adaptado de PEREIRA et al., 2007).....26
- Quadro 2.** Colorações indicativas para a presença de antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis e xantonas, chalconas e auronas, flananonóis (Modificado de MATOS, 1997)..... 44
- Quadro 3.** Colorações indicativas para a presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas (Modificado de MATOS, 1997).....44
- Quadro 4.** Prospecção fitoquímica do extrato da casca do caule de *A. tomentosum*.....51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Comparação dos dados de $^{13}\text{C}$ RMN [ $\delta$ (ppm), DMSO- $d_6$ , 100 MHz) do ATppt com dados da literatura.....	59
<b>Tabela 2.</b> Comparação dos dados de $^1\text{H}$ RMN [ $\delta$ (ppm), J (Hz), DMSO- $d_6$ , 400 MHz) do composto 1 com dados da literatura. ....	60
<b>Tabela 3.</b> Comparação dos dados de $^1\text{H}$ RMN [ $\delta$ (ppm), J (Hz), DMSO- $d_6$ , 400 MHz) do composto 2 com dados da literatura. ....	60
<b>Tabela 4.</b> Rendimento do processo de secagem. ....	64
<b>Tabela 5.</b> Valores dos estiramentos na região do infravermelho dos extratos bruto e atomizado de <i>A. tomentosum</i> e grupos químicos característicos aos quais estão associados. ....	66
<b>Tabela 6.</b> Valores das deformações na região do infravermelho dos extratos bruto e atomizado de <i>A. tomentosum</i> .....	67
<b>Tabela 7.</b> Etapas de perda de massa obtidas da curva termogravimétrica do extrato bruto de <i>A. tomentosum</i> .....	69
<b>Tabela 8.</b> Etapas de perda de massa obtidas da curva termogravimétrica do extrato atomizado de <i>A. tomentosum</i> . ....	70
<b>Tabela 9.</b> Determinação do conteúdo de água do extrato atomizado de <i>A. tomentosum</i> .....	70
<b>Tabela 10.</b> Valores de pH obtidos para soluções de extrato atomizado de <i>A. tomentosum</i> em diferentes concentrações.....	71
<b>Tabela 11.</b> Determinação da distribuição granulométrica do extrato atomizado de <i>A. tomentosum</i> .....	73
<b>Tabela 12.</b> Relação entre os valores de concentração da solução de quercetina e a área sob a curva apresentada nos cromatogramas. ....	78
<b>Tabela 13.</b> Relação entre a área sob a curva (ASC) e a concentração de quercetina e isorramnetina em ATppt e nos extratos bruto e atomizado de <i>A. tomentosum</i> . ....	80
<b>Tabela 14.</b> Comparação dos dados de atividade antioxidante (em mmol de eq. Trolox/g de amostra) com a literatura. ....	82

## Lista de Abreviaturas e Siglas

$^{13}\text{C}$  RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

$^1\text{H}$  RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1

A. - *Aspidosperma*

ABTS – 2,2'-Azonobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

APT – Teste do Próton Ligado (do inglês, *Attached Proton Test*)

ASC – Área Sob a Curva

AT – *Aspidosperma tomentosum*

ATppt - precipitado em metanol do extrato bruto de *A. tomentosum*

ATR – Reflectância Total Atenuada (do inglês, *Attenuated Total Reflectance*)

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

DMSO- $d_6$  – Dimetilsulfóxido deuterado

EEB – Extrato Etanólico Bruto

EtOH – Etanol

FT-IR – Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform InfraRed*)

HMBC – Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações (do inglês, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*)

HSQC – Correlação Heteronuclear Quântica Simples (do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Correlation*)

HSV-1 – Vírus Herpes Humano tipo 1

IC $_{50}$  – Concentração que inibe 50% do crescimento do micro-organismo

IQB – Instituto de Química e Biotecnologia

LabTCoM – Laboratório de Tecnologia e Controle de Medicamentos

LPqRN – Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais

MeOH – Metanol

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

TG – Termogravimetria

TMS – Tetrametilsilano

UV – Ultravioleta

WHO – Organização Mundial da Saúde (do inglês, *World Health Organization*)

$\delta$  – Deslocamento químico

$\lambda$  – Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Importância Histórica dos Produtos de Origem Natural .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Considerações sobre os Flavonoides .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 O Gênero <i>Aspidosperma</i> (Apocynaceae) .....</b>	<b>25</b>
2.3.1 Atividades Biológicas .....	29
<b>2.4 <i>Aspidosperma Tomentosum</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>2.5 Secagem em <i>Spray Dryer</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>39</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Solventes, Materiais e Equipamentos .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Coleta e Identificação do Material Vegetal .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3 Obtenção do Extrato .....</b>	<b>42</b>
4.3.1 Remoção do Precipitado .....	42
<b>4.4 Secagem em <i>Spray Dryer</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>4.5 Análise Fitoquímica.....</b>	<b>43</b>
4.5.1 Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonoides .....	43
4.5.2 Teste para Leucoantocianidinas, Catequinas, Flavanonas .....	44
4.5.3 Teste para Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas .....	44
4.5.4 Teste para Esteroides e Triterpenos (Lieberman-Burchard) .....	45

4.5.5 Teste para Saponinas .....	45
4.5.6 Teste com Reagente de Dragendorff .....	45
4.5.7 Teste para Antraquinonas, Antronas e Cumarinas .....	45
4.5.8. Teste para Fenóis e Taninos .....	45
<b>4.6 Separação Cromatográfica .....</b>	<b>46</b>
4.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	46
4.6.2 Quantificação dos Flavonoides por HPLC .....	46
<b>4.7 Análise Térmica .....</b>	<b>47</b>
<b>4.8 Determinação de Conteúdo de Água .....</b>	<b>47</b>
<b>4.9 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier .....</b>	<b>47</b>
<b>4.10 Ressonância Magnética Nuclear .....</b>	<b>48</b>
<b>4.11 Determinação da Perda por Dessecação.....</b>	<b>48</b>
<b>4.12 Eficiência de Secagem .....</b>	<b>48</b>
<b>4.13 Análise Granulométrica .....</b>	<b>48</b>
<b>4.14 Microscopia Eletrônica de Varredura .....</b>	<b>49</b>
<b>4.15 Determinação do pH.....</b>	<b>49</b>
<b>4.16 Determinação da Atividade Antirradicalar .....</b>	<b>49</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>5.1 Análise Fitoquímica e Elucidação Estrutural .....</b>	<b>51</b>
<b>5.2 Obtenção do Extrato Seco em <i>Spray Dryer</i> .....</b>	<b>64</b>
<b>5.3 Caracterização do Extrato Seco em <i>Spray Dryer</i> .....</b>	<b>64</b>
5.3.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho .....	64
5.3.2 Análises Térmicas e Determinação de Umidade Residual .....	68

5.3.3 Determinação do pH do Extrato Atomizado .....	71
5.3.4. Análise Granulométrica.....	72
5.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	73
<b>5.4 Determinação do Teor de Quercetina e Isorramnetina no Precipitado e nos Extratos Bruto e Atomizado Por HPLC .....</b>	<b>75</b>
<b>5.5 Determinação da Atividade Antirradicalar pelo Método de ABTS .....</b>	<b>81</b>
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>

# 1 Introdução

---

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas e seus derivados para fins terapêuticos é milenar e abrange diversas culturas em todo o mundo. Apesar dos grandes avanços pelos quais a medicina moderna passou nas últimas décadas, o papel das plantas medicinais não perdeu sua importância no cuidado à saúde (CALIXTO, 2000; COUTO, 2011; OLIVEIRA, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008), em alguns países da Ásia e da África chega a 80% a parcela da população que depende da medicina tradicional para cuidados básicos com a saúde.

Espécies do gênero *Aspidosperma*, família Apocynaceae, encontram-se amplamente distribuídas pelo continente. O gênero compreende tipicamente árvores de médio a grande porte e, no Brasil, tem cerca de 50 espécies catalogadas (AQUINO, 2006; ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009). Dentre os metabólitos secundários produzidos por espécies deste gênero, destaca-se a presença frequente de estruturas de natureza alcaloídica (AQUINO, 2006; ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2007; PEREIRA et al., 2007).

A espécie *Aspidosperma tomentosum* é uma árvore nativa do Brasil, conhecida como peroba-do-campo ou peroba-do-cerrado, dentre outras sinonímias, que chega a atingir 15 metros de altura. *A. tomentosum*, como é característico do gênero, é uma fonte para a obtenção de alcaloides indólicos (AQUINO, 2006). Apesar da escassez de estudos sobre esta espécie, algumas atividades farmacológicas estão descritas na literatura: antineoplásica (KOHN et al., 2006), vasodilatadora, hipotensora e bradicárdica (FURTADO, 2009), antifúngica (AQUINO, 2006), analgésica e anti-inflamatória (AQUINO, 2010).

Com o crescimento do número de medicamentos fitoterápicos disponíveis no mercado nacional (BRASIL, 2012), aumenta também a necessidade do uso de técnicas eficientes para a produção e controle de qualidade destes. No desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, a técnica de secagem em *spray dryer* tem sido bastante empregada visando à obtenção de produtos intermediários com alta qualidade, com a manutenção da concentração de seus metabólitos secundários e melhores características tecnológicas (VASCONCELOS et al., 2005; GALLO et al., 2011; LIU et al., 2011).

Em face do exposto, realizamos um estudo do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *A. tomentosum* e, a partir do mesmo extrato, obtivemos um produto farmacêutico intermediário na forma de pó utilizando a técnica de secagem por *spray dryer*. O pó foi caracterizado visando assegurar a qualidade do produto obtido.

## **2 Revisão da Literatura**

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Importância histórica dos produtos de origem natural

Plantas medicinais têm sido usadas para o tratamento das mais variadas doenças por séculos. A experiência acumulada e passada adiante através das gerações permitiu ao homem conhecer os efeitos terapêuticos e tóxicos de produtos de origem natural, muitos dos quais fazem parte do arsenal de medicamentos modernos (CALIXTO, 2000; TANTRY, 2009). Mesmo em face do aprimoramento das metodologias de síntese de novos fármacos, a química de produtos naturais continua a ser uma ferramenta imprescindível na descoberta de novos fármacos (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Os textos médicos mais antigos, remontando à antiga Mesopotâmia, abrangem cerca de 1000 plantas e substâncias derivadas de plantas, dentre elas o óleo de espécies de cedro (*Cedrus*), a resina de mirra (*Commiphora myrrha*) e o suco da polpa de papoula (*Papaver somniferum*). O Papiro Ebers, antiquíssimo texto egípcio, contém centenas de prescrições complexas e agentes naturais, como a *Aloe vera*. Hipócrates, em seu *Corpus Hippocraticum*, descreveu o uso de mais de 400 agentes terapêuticos de origem natural. Neste compêndio, célebre médico grego detalha o uso de *Atropa beladonna* como anestésico. Dioscorides, em sua *De Materia Medica*, reúne informações sobre a dose e a eficácia de cerca de 600 remédios derivados de plantas. Galeno, médico e farmacêutico grego, registrou centenas de derivados vegetais com poder medicinal e demonstrou que estes, além dos efeitos terapêuticos, também apresentam potencial tóxico (JI; LI; ZHANG, 2009; TANTRY, 2009)

O tratamento de doenças através de uso de plantas medicinais se desenvolveu de forma marcante também no Oriente. Textos de origem milenar, como o *Charaka Samhita*, primeiro tratado da *Ayurveda*, e o *Wu Shi Er Bing Fang* (Prescrições para cinquenta e duas doenças, em tradução livre) descrevem centenas de derivados vegetais usados nas medicinas tradicionais indiana e chinesa. (JI; LI; ZHANG, 2009; TANTRY, 2009).

O conhecimento associado ao uso de plantas medicinais pela medicina tradicional de diferentes culturas rende frutos até os dias de hoje, muitos dos medicamentos usados na terapêutica moderna têm aí sua origem. Compostos isolados de fontes naturais também contribuíram para revelar novos aspectos de fisiologia. Para citar alguns exemplos, temos: os glicosídeos cardiotônicos, obtidos de espécies do gênero *Digitalis*, ajudaram na elucidação do

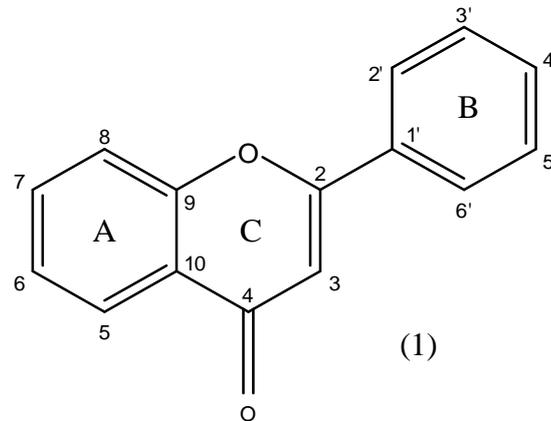
papel da bomba Na-K-ATPase; através da morfina se descobriu o caminho para os receptores afetados por opioides endógenos; o uso de muscarina, nicotina e tubocurarina ajudou a explorar os diferentes tipos de receptores colinérgicos (BARREIRO, 1990; VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; HARVEY, 2008).

Os avanços ocorridos nos dois últimos séculos na química moderna forneceram ferramentas para o isolamento e a determinação estrutural de compostos orgânicos. No início do século 19, o farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm isolou a morfina a partir do ópio. Com o passar do tempo, outros compostos foram isolados, identificados e sintetizados, muitos dos quais ainda fazem parte do arsenal terapêutico atual (BARREIRO; BOLZANI, 2009; JI; LI; ZHANG, 2009; TANTRY, 2009).

Com o aprimoramento da síntese orgânica e o surgimento de novas metodologias para o desenvolvimento de fármacos no século passado, como a química combinatória, métodos de screening biológico automatizado (*High Throughput Screening*) e a modelagem molecular, a pesquisa fitoquímica perdeu um pouco do espaço que sempre teve no auxílio à saúde. Em contrapartida, o surgimento de novas drogas de origem natural, sobretudo antineoplásicos como o paclitaxel, a vincristina e a vimblastina, renovou o interesse da indústria farmacêutica na pesquisa envolvendo produtos naturais. (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; BARREIRO; BOLZANI, 2009; NEWMAN; CRAGG, 2012)

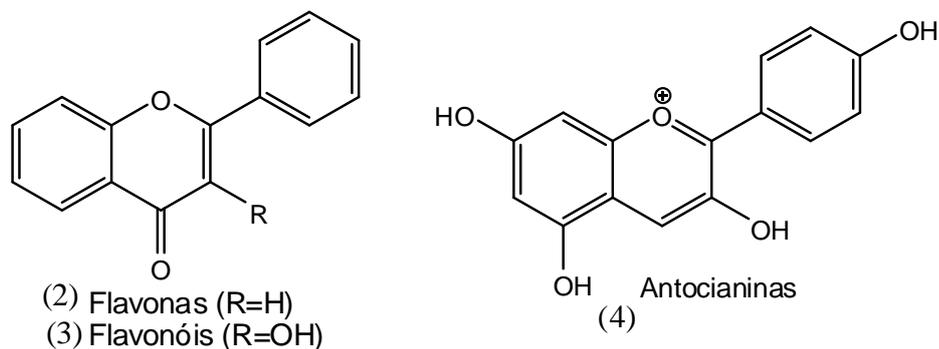
## **2.2 Considerações sobre os flavonoides**

Os flavonoides são metabólitos secundários, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides, que constituem uma importante classe de polifenóis e são largamente distribuídos no reino vegetal. Os compostos pertencentes a esta classe apresentam em comum a estrutura fenilbenzopirona (C6-C3-C6) (Figura 1.) (ANDENSEN; MARKHAM, 2006; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

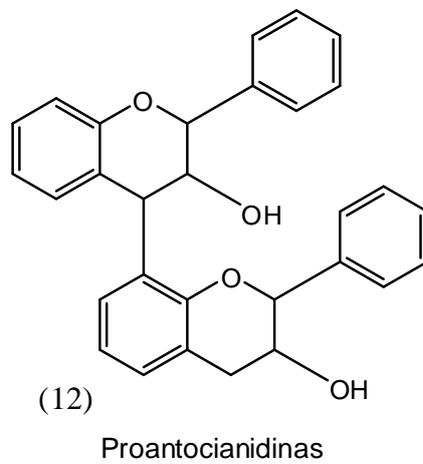
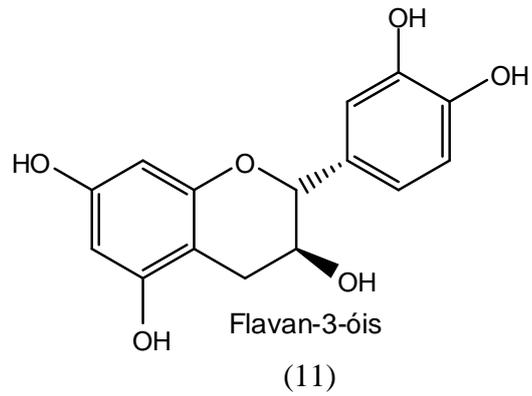
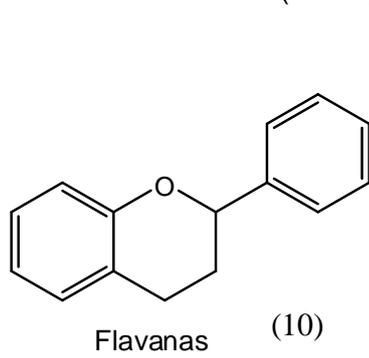
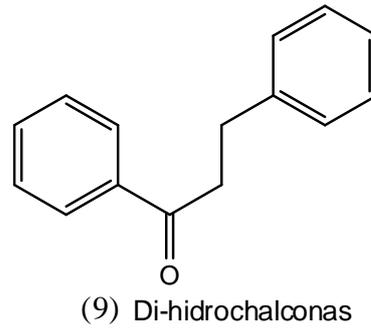
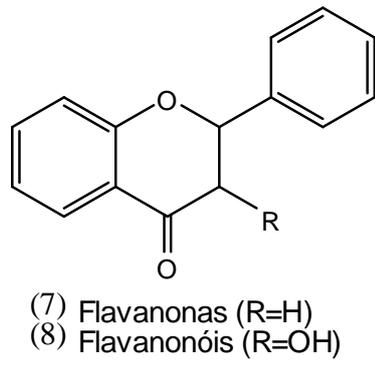
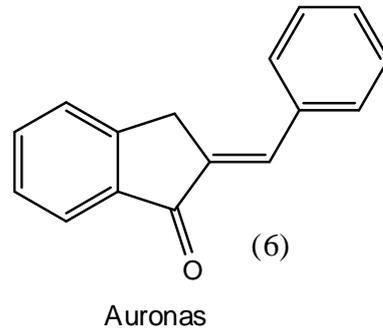
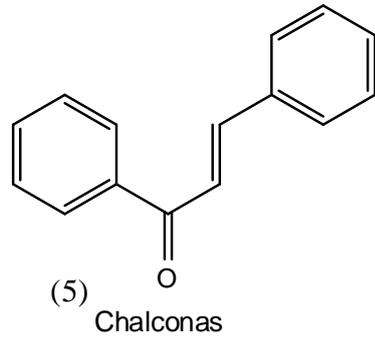
**Figura 1.** Núcleo fundamental dos flavonoides

Fonte, Autor, 2012.

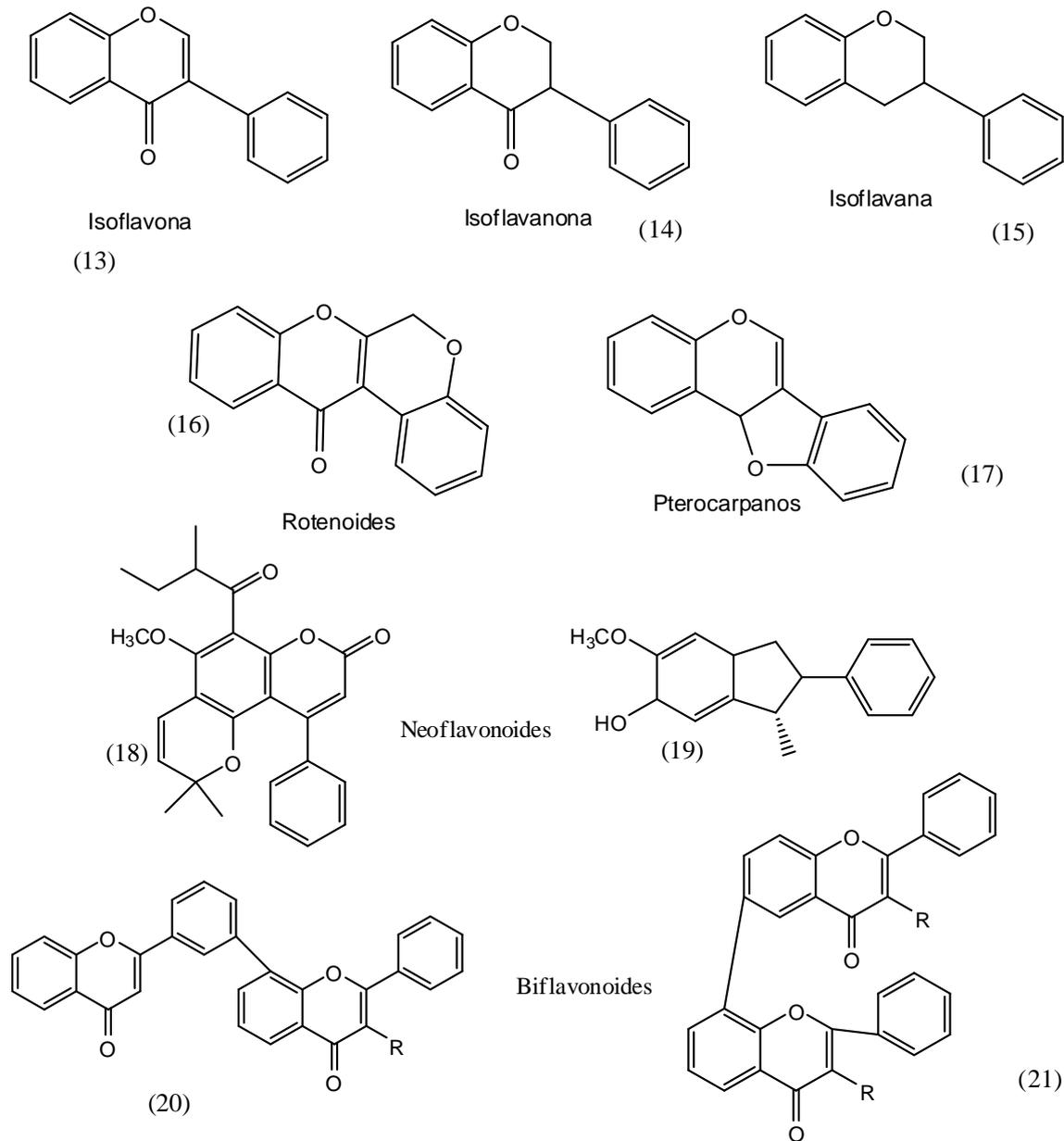
Este grupo se divide, a depender da estrutura, nas seguintes subclasses: flavonas (2) e flavonóis (3); antocianinas (4); chalconas (5); auronas (6); di-hidroflavonoides [flavanonas (7), flavanonóis (8) e di-hidrochalconas (9)]; flavanas (10), flavan-3-óis (11) e proantocianidinas (12) (taninos); isoflavonoides [isoflavona (13), isoflavonol (14), isoflavana (15), rotenoides (16) e pterocarpanos (17)]; neoflavonoides (18) e (19); biflavonoides (20) e (21). A Figura 2 mostra as estruturas das principais grupos de flavonoides. Podem se apresentar em suas formas livres ou conjugados com açúcares, na forma de heterosídeos (HAVSTEEN, 2002; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

**Figura 2. Estruturas dos principais grupos de flavonoides (continua).**

**Figura 3. Estruturas dos principais grupos de flavonoides (continuação).**



**Figura 2. Estruturas dos principais grupos de flavonoides (continuação).**



Fonte: Autor, 2012

Há grande abundância desta classe de compostos nos vegetais superiores, sendo encontrados com frequência em frutos, no vinho, em cereais, corantes alimentares. Dentre as diversas funções atribuídas aos flavonoides nos vegetais, destacam-se: proteção contra a radiação ultravioleta (UV) e visível; proteção contra insetos e micro-organismos patogênicos; atração de animais para polinização; antioxidante; agentes alelopáticos; e inibição enzimática (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008).

Esta classe de metabólitos secundários desperta grande interesse econômico, alguns são usados como pigmentos, outros têm importante papel no processo de curtimento do couro, fazem parte do processo de fermentação do chá-da-índia, da produção de cacau e corrigem cor e valor nutricional de alimentos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Os flavonoides têm importante papel na saúde humana. A literatura está repleta de estudos sobre suas propriedades terapêuticas, dentre as quais podem ser citadas: anti-inflamatória e analgésica (GONZÁLEZ-GALLEGO; SÁNCHEZ-CAMPOS; TUÑÓN, 2007; HAVSTEEN, 2002; TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008); antineoplásica (REN et al., 2003); antiviral, antibacteriana e antifúngica (CUSHNIE; LAMB, 2005; FOWLER et al., 2011); antioxidante e hepatoprotetora (HAVSTEEN, 2002; TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008; SANDHAR et al., 2011); neuroprotetora (YOU DIM; SHUKITT-HALE; JOSEPH, 2004; HWANG; SHIH; YEN, 2012); entre outras.

### **2.3 O gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae)**

O gênero *Aspidosperma*, família Apocynaceae, está amplamente distribuído pelo continente americano. Espécies deste gênero são encontradas desde o México até a Argentina, sendo mais frequentes em regiões tropicais, sobretudo na Bolívia, Argentina, Brasil, México, Paraguai e Peru (WOODSON, 1951; PEREIRA et al., 2007). No Brasil, cerca de 50 espécies foram catalogadas e estão distribuídas em diversos ecossistemas (AQUINO, 2006; ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009). O quadro 1 mostra a classificação quimiotaxonômica do gênero *Aspidosperma*, compreendendo 50 espécies em 8 séries (PEREIRA et al., 2007).

**Quadro 1. Classificação taxonômica das espécies do gênero *Aspidosperma*.**

<b>Série</b>	<b>Espécies</b>
<b>Rígida</b>	<i>A. rigidum</i> Rusby
<b>Nítida</b>	<i>A. Auriculatum</i> Mgf.; <i>A. carapanauba</i> M. Pichon; <i>A. compactinervium</i> Kuhlmann; <i>A. discolor</i> A. DC.; <i>A. eburneum</i> F. Allem; <i>A. excelsum</i> Benth; <i>A. marcgravianum</i> Woodson; <i>A. nitidum</i> Benth ex Müll.-Arg., <i>A. oblongum</i> A. DC.; <i>A. spegazzinii</i> Molf. Ex Meyer
<b>Quebranchines</b>	<i>A. chakensis</i> Spegazzini; e <i>A. quebracho-blanco</i> Schlecht
<b>Polyneura</b>	<i>A. cuspa</i> Blake; <i>A. cylindrocarpon</i> Müell.-Arg.; <i>A. dispernum</i> , <i>A. peroba</i> , <i>A. polyneuron</i> Müll.-Arg.; e <i>A. sessiliflorum</i>
<b>Pyricolla</b>	<i>A. australe</i> Müll.-Arg.; <i>A. campus-belus</i> A. P. Duarte; <i>A. gomesianum</i> A. DC.; <i>A. multiflorum</i> A. DC.; <i>A. nigricans</i> Handro; <i>A. olivaceum</i> Müll.-Arg.; <i>A. parvifolium</i> ; <i>A. populifolium</i> A. DC.; <i>A. pyricollum</i> Muell.-Arg.; <i>A. pyrifolium</i> Mart.; <i>A. quirandy</i> ; <i>A. refractum</i> Mart.; <i>A. rhombeosignatum</i> ; <i>A. subincanum</i> Mart.; <i>A. tomentosum</i> Mart.; <i>A. ulei</i> Mgf.; e <i>A. vargasii</i>
<b>Nobile</b>	<i>A. album</i> (Vahl) R. Bent.; <i>A. desmanthum</i> Benth ex. Müll.-Arg.; <i>A. exalatum</i> Monachino; <i>A. fendleri</i> ; <i>A. limae</i> Woodson; <i>A. megalocarpon</i> Müll.-Arg.; <i>A. melanocalyx</i> Müll.-Arg.; <i>A. neblinae</i> Monachino; <i>A. obscurinervium</i> Azembuja; <i>A. sandwithianum</i> ; e <i>A. spruceanum</i> Benth
<b>Macrocarpa</b>	<i>A. duckei</i> ; <i>A. macrocarpon</i> Mart.; e <i>A. verbascifolium</i> Müll.-Arg.
<b>Tometosa</b>	<i>A. formosanum</i> ; e <i>A. daysycarpum</i> A. DC.

Fonte: Autor, 2012 – adaptado de PEREIRA et al., 2007.

Fazem parte deste gênero espécies arbóreas tropicais, que variam de 2 a 60 metros de altura, com flores e sementes abundantes, geralmente produtoras de látex e copas amplas (WOODSON, 1951; PEREIRA et al., 2007). São conhecidas por vários nomes populares, dentre os quais: perobas, guatambus e pau-pereiro (OLIVEIRA et al., 2007; REDE DE SEMENTE DO CERRADO, 2012).

Além da qualidade da madeira para a fabricação de móveis, as espécies de *Aspidosperma* despertam grande interesse no que concerne ao isolamento de seus metabólitos secundários e das atividades biológicas destes.

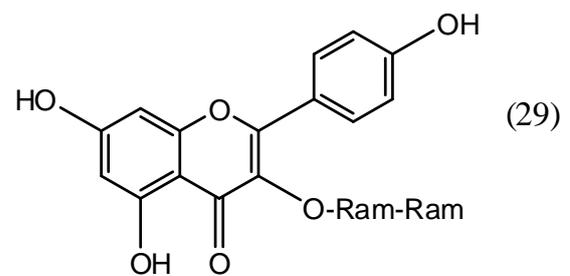
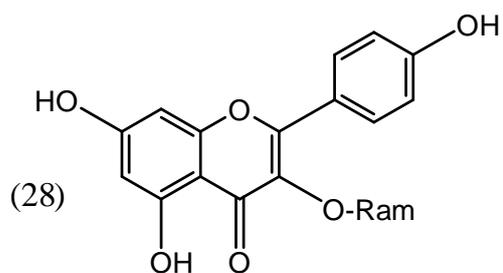
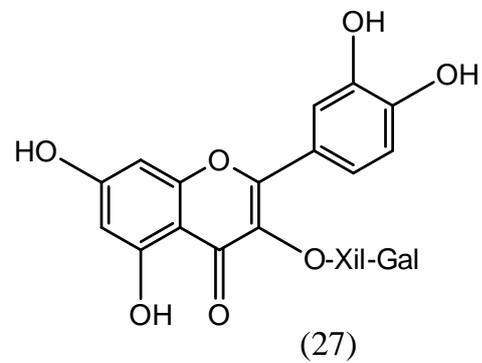
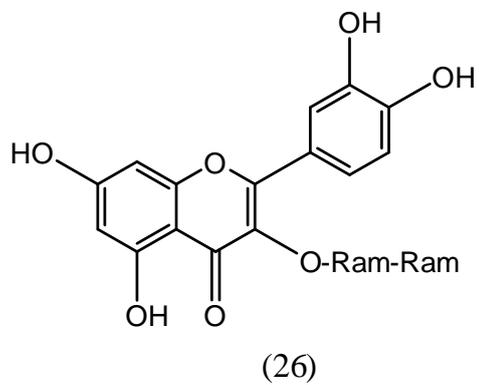
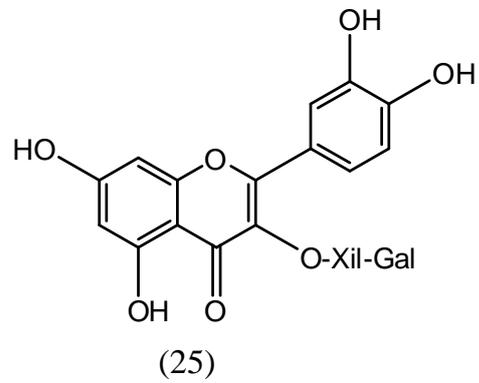
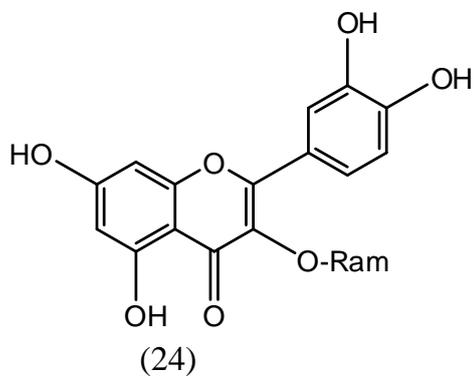
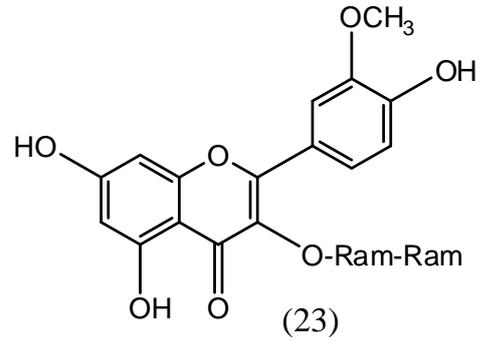
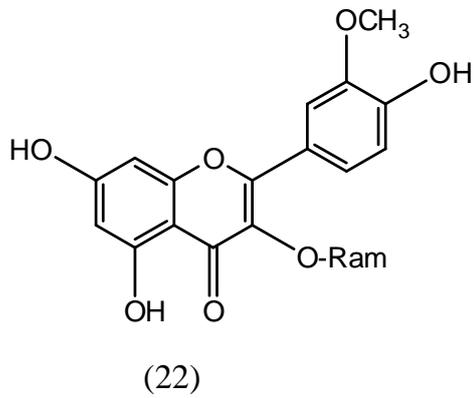
A família Apocynaceae tem como característica fitoquímica mais marcante a presença de compostos com estruturas alcaloídicas. No gênero *Aspidosperma*, os alcaloides indólicos são os compostos mais encontrados (PEREIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009). O trabalho de Pereira e colaboradores (2007) é um excelente exemplo da presença e da diversidade estrutural dos alcaloides indólicos isolados deste gênero. O levantamento realizado pelos pesquisadores descreve 247 estruturas de alcaloides indólicos isolados até 2006.

Devido à grande importância e à frequência com que são encontrados, os alcaloides são considerados marcadores quimiotaxonômicos para a classificação das espécies do gênero *Aspidosperma* (PEREIRA et al., 2007). Como exemplos temos que a série Nitida é caracterizada pelos alcaloides indólicos dos tipos heteroiombina e corinanteol e que os principais constituintes das séries Prycolla e Tomentosa são do tipo uleína e relacionados (ARNDT et al., 1967).

Os alcaloides são, indiscutivelmente, os produtos naturais que despertam maior interesse no gênero em questão, contudo, outras classes de metabólitos secundários, porém com frequência menor, também foram estudadas em espécies de *Aspidosperma*. Como exemplos, pode-se citar os trabalhos de Pereira et al. (2006) e Barbosa et al. (2010) que relatam o isolamento de triterpenos a partir de *A. nitidum* e *A. illustre*, respectivamente. Além de terpenos, esteroides também foram isolados de *A. nitidum* (PEREIRA et al., 2006).

O isolamento de flavonoides a partir de espécies de *Aspidosperma* é extremamente raro. Pelloto e Del Pero (1995) relataram o isolamento de oito heterosídeos a partir de folhas de *A. quebracho-blanco* (Figura 3): isoramnetina-3-O-ramnosilglicosídeo (22), isoramnetina-3-O-ramnosildiglicosídeo (23), quercetina-3-O-ramnosilglicosídeo (24), quercetina-3-O-xilosilgalactosídeo (25), quercetina-3-O-ramnosildiglicosídeo (26), quercetina-3-O-xilosilgalactosilglicosídeo (27), campferol-3-O-ramnosilglicosídeo (28), campferol-3-O-ramnosildiglicosídeo (29).

Figura 4. Estruturas dos flavonoides isolados de *Aspidosperma quebracho-blanco*.



Fonte: Autor, 2012.

### 2.3.1 Atividades biológicas

Além dos estudos de isolamento e elucidação estrutural dos metabólitos secundários presentes nas aspidospermas, o gênero vem sendo extensamente pesquisado acerca de seu potencial terapêutico. Tanto as atividades de extratos e frações (OLIVEIRA et al., 2009; CAMPOS et al., 2006) como de compostos isolados foram avaliadas (MITAINE-OFFER et al., 2002; TANAKA et al., 2007).

A atividade antimicrobiana de algumas espécies do gênero foi avaliada. Alcaloides isolados da casca da raiz de *Aspidosperma excelsum* se mostraram ativos contra bactérias Gram positivas e inativas, contra Gram negativas (VERPOORTE et al., 1983). *A. pyricolum* e *A. olivaceum* exibiram atividade moderada frente a *B. subtilis*. *A. ramiflorum* apresentou atividade baixa contra a bactéria Gram negativa *Escherichia coli* (OLIVEIRA et al., 2009; AGRIPINO et al., 2004), moderada, contra o *Staphylococcus aureus* e alta, contra o *Bacillus subtilis* (OLIVEIRA et al., 2009), e se mostrou ativa também contra o fungo *Cryptococcus neoformans* (DE SOUZA et al., 2006).

O alcaloide elipticina, extraído de *A. williansii*, é conhecido por suas atividades antineoplásica e citotóxica em várias linhagens tumorais (SAKAMOTO-HOJO et al., 1988). Frações ricas em alcaloides de *A. ulei* manifestaram efeito pró-erétil em ratos e levaram ao relaxamento de corpos cavernosos isolados de coelhos (CAMPOS et al., 2006, 2008). Sperling et al. (2002) demonstraram o efeito do extrato rico em alcaloides de *A. quebracho-blanco* sobre receptores  $\alpha$ -adrenérgicos em pênis humanos. A atividade farmacológica observada está ligada ao conteúdo de ioimbina dos extratos, alcaloide conhecido por bloquear receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e pelo seu uso no tratamento da disfunção erétil (SPERLING et al., 2002; CAMPOS et al. 2006, 2008).

Espécies de *Aspidosperma* também foram avaliadas quanto a seu potencial no controle de pragas. O extrato hexânico da raiz de *Aspidosperma macrocarpon* (sinonímia de *A. macrocarpum*) inibiu totalmente a atividade de  $\alpha$ -amilases de *Zabrotes subfasciatus*, conhecido como caruncho do feijão mexicano, e reduziu a atividade enzimática de outro caruncho do feijão, *Acanthoscelides obtectusem*, 14,69%, sem inibir  $\alpha$ -amilases de saliva humana, mostrando grande afinidade e especificidade (SILVA et al., 2009). O extrato bruto da casca do caule de *A. pyrifolium* foi ativo contra larvas da mariposa *Plutella xylostella*. A fração alcaloídica derivada da mesma parte da planta causou letalidade de 100% a 4 mg/L. A

atividade larvicida foi associada à presença dos alcaloides monoterpinoindólicos aspidofractinina, 15-demetoxipirifolina e N-formilaspidofractinina (TRINDADE et al., 2008).

O uso de plantas deste gênero no combate a doenças inflamatórias também está relatado na literatura. A casca do caule de *A. pyrifolium* é usada pela população do Cariri Paraíbano em inflamações do trato urinário e em dermatites (AGRA et al., 2007). Pereira et al. (2006) relataram a relevante atividade anti-inflamatória do extrato do caule de *A. nitidum* in vivo, usando o teste de edema induzido por carragenina em camundongos.

Grande parte dos estudos farmacológicos envolvendo *Aspidosperma* trata da avaliação de suas atividades frente a protozoários, sobretudo no combate à malária. Alcaloides isolados de *A. pyrifolium* e de *A. megalocarpon* exibiram forte atividade in vitro frente ao *Plasmodium falciparum*. (WENIGER et al., 2001; MITAINE-OFFER et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2009). Bourdy et al. (2004) testaram a atividade de 72 extratos, de 62 espécies diferentes, contra o *P. falciparum*. O extrato da casca de *A. quebracho-blanco* foi um dos sete que exibiram forte efeito antimalárico. Elipticina e aspidocarpina, isolados de *A. vargasii* e *A. desmanthum*, respectivamente, apresentaram significante inibição de crescimento do parasita ( $IC_{50} = 73$  e  $19$  nM, respectivamente) (ANDRADE-NETO et al., 2007). Apesar de deter o maior número de estudos, a malária não é a única doença causada por protozoário contra a qual alcaloides isolados de plantas do gênero *Aspidosperma* têm sido avaliados. O extrato alcaloídico de *A. ramiflorum* mostrou atividade significativa contra promastigotas (forma extracelular do parasita) de *Leishmania brasiliensis* (FERREIRA et al., 2004) e *L. amazonenses* (FERREIRA et al., 2004; TANAKA et al., 2007), agentes etiológicos da leishmaniose.

#### **2.4 *Aspidosperma tomentosum***

*Aspidosperma tomentosum* é uma espécie arbórea nativa do Brasil, que pode chegar até 15 metros de altura e tem casca espessa fissurada. Os ramos jovens possuem densa cobertura de pelos verde-escuros. Apresentam folhas alternadas com margem irregular. As flores são pequenas e amareladas, os frutos podem ser gêmeos ou isolados e possuem três ou quatro sementes. *Aspidosperma* significa semente em forma de escudo e *tomentosum*, piloso (Figura 4.) (REDE SEMENTES DO CERRADO, 2012).

**Figura 5.** (A) *Aspdiosperma tomentosum*, (B) casca do caule, (C) flores, (D) folhas, (E) frutos e sementes.



Fonte: REDE DE SEMENTES DO CERRADO, 2012.

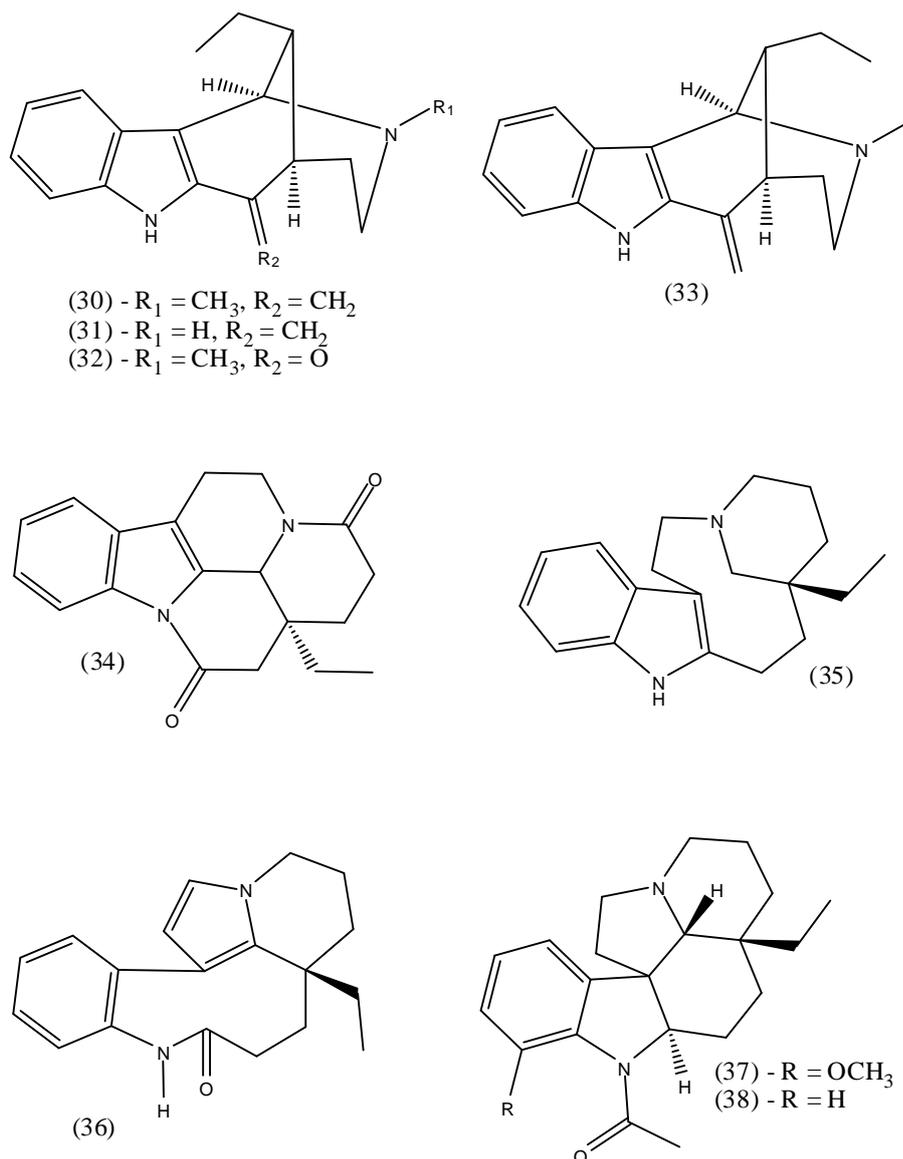
Esta espécie é conhecida por muitos nomes populares: peroba do campo; peroba do cerrado; pereira; palmeira do campo; carrasco; guatambu; guatambu vermelho; ipê peroba; pau cetim; pau pereira; pau pereira do campo; pau pereira do mato; pequiá; pequiá da pedra; pequiá sobre; pereira branca; peroba; peroba amarela; peroba rosa; perobinha; piquiá; e pitiá. É muito apreciada na fabricação de móveis e objetos decorativos. (REDE DE SEMENTES DO CERRADO, 2012).

O número de estudos acerca desta espécie é escasso. O extrato etanólico do caule exibiu atividade *in vitro* contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas. A partir da fração alcaloídica da mesma parte da planta, a uleína (30) foi isolada (SILVA et al., 2001).

Aquino (2006) isolou 9 alcaloides diferentes de partes distintas de *A. tomentosum* (Figura 5): dos ramos – uleína (30), desmetiluléina (31), desmetileno-oxo-uleína (32), 20-

epiuleína (33), eburnamonin-19-ona (34); das folhas – uleína (30), desmetileno-oxo-uleína (32); das sementes – uleína (30), quebrachamina (35), razinilama (36), 1-acetil-17-metóxi-aspidospermidina (37); dos arilos – quebrachamina (35), razinilama (36), 1-acetil-aspidospermidina (38), 1-acetil-17-metóxi-aspidospermidina (37).

**Figura 6. Estruturas dos alcaloides isolados de *A. tomentosum*.**



Fonte: Autor, 2012.

O extrato etanólico da casca do caule da planta mostrou fraca atividade antimicrobiana frente às bactérias *S. aureus* e *B. subtilis* e não foi ativo contra leveduras (*Candida parapsilosis*) (PESSINI et al., 2011). Os extratos etanólico e em diclorometano foram testados frente a diferentes linhagens celulares e mostraram atividade em células de mama, expressando um fenótipo de multirresistência a drogas, pulmão e melanoma, sendo a

atividade citocida mais promissora encontrada para o extrato em diclorometano contra a linhagem mamária (KOHN et al., 2006). A atividade antiviral de *A. tomentosum* foi avaliada frente a HSV-1 (Vírus Herpes Humano tipo 1) e a células Vero, uma linhagem celular derivada de rim do macaco verde africano e usada primariamente em estudos de replicação viral. O extrato dos frutos mostrou atividade moderada ( $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ ) contra o HSV-1 e baixa ( $IC_{50} = 121,7 \mu\text{g/mL}$ ), no ensaio com as células Vero (BRANDÃO et al., 2011).

Foram atribuídas atividades no sistema cardiovascular ao extrato da casca do caule de *A. tomentosum*, onde este promoveu hipotensão e bradicardia em ratos normotensos não anestesiados, provavelmente devido à vasodilatação periférica decorrente da interação com os canais de  $Ca^{2+}$  (FURTADO, 2009). Foi relatado também que o extrato bruto da mesma parte da planta e suas frações exibiram atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, sendo a fração clorofórmica a mais ativa (AQUINO, 2010).

## 2.5 Secagem em *Spray Dryer*

Uma das operações mais frequentes na produção de medicamentos é a secagem, sendo empregada no processamento de diversos materiais para a obtenção de pós e grânulos (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). O *spray dryer*, conhecido como secagem por aspersão, atomização ou nebulização, é uma das poucas tecnologias disponíveis para a conversão de uma solução ou suspensão a um sólido seco (pó) em uma única operação (ÇELIK.; WENDEL, 2005; GOHEL et al., 2009).

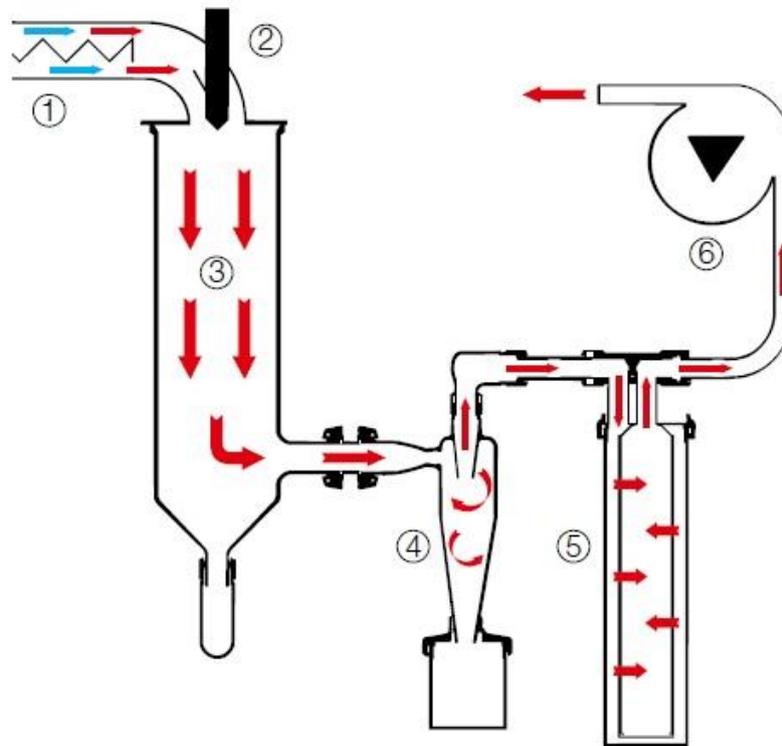
A primeira descrição de secagem de produtos na forma de *spray* foi feita em uma patente ainda no século XIX, mas o processo só encontrou aplicação significativa a parti da década de 1920 (ÇELIK.; WENDEL, 2005). Atualmente, a técnica é usada em grande variedade de indústrias, como a alimentícia, de produtos farmacêuticos, cosméticos e químicos, têxtil e eletrônica. Na indústria farmacêutica, uma das primeiras aplicações da técnica foi a obtenção de extratos secos de matérias primas ativas a partir de plantas (ÇELIK.; WENDEL, 2005; SOLLOHUB; CAL, 2010).

A secagem por aspersão se destaca por gerar produtos com melhores características tecnológicas quando comparada a outras técnicas. Este processo leva a produtos com altas estabilidades físico-química, química e microbiológica, de fácil padronização, com pós e grânulos homogêneos e alta concentração de compostos ativos (VASCONCELOS et al.,

2005; PATEL; PATEL; SUTHAR, 2009; SOLLOHUB; CAL, 2010; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

O processo de secagem em *spray dryer* apresenta três estágios fundamentais: a atomização (ou nebulização) do líquido e formação do spray; o contato das gotículas formadas com ar quente e evaporação do solvente; e separação e coleta do material seco. A figura 6 ilustra as partes que compõe um equipamento *spray dryer* e as etapas de secagem.

**Figura 7. Esquema de um equipamento de *spray dryer* com atomizador pneumático. (1) Aquecedor elétrico. (2) Bico pneumático. (3) Câmara de secagem. (4) Ciclone e coletor. (5) Filtro. (6) Aspirador para geração do fluxo.**



Fonte: Autor, 2012 – modificado de Informação de produto. Mini Spray Dryer B-290

Inicialmente, a amostra em solução (ou em suspensão) é bombeada através de dutos que passam por um aquecedor elétrico até atingir o bico pneumático, onde ocorre a divisão do líquido em gotículas de tamanho reduzido. Estas gotículas são injetadas na câmara de secagem, na qual ocorre a evaporação do solvente. O material seco é, por fim, coletado. Ao fim do sistema está localizado o aspirador responsável por gerar o fluxo da amostra em direção ao coletor e, antes do aspirador, um filtro evita que as partículas menores sejam dispersas no ambiente. O equipamento correspondente ao esquema descrito na figura 6 é mostrado na figura 7.

**Figura 8. Mini Spray Dryer B-290.**



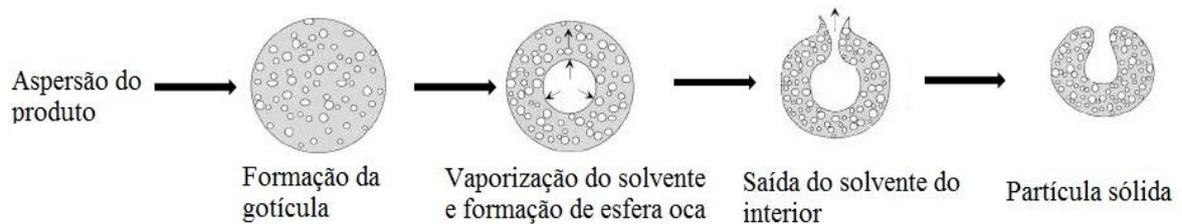
Fonte: Informação de produto Mini Spray Dryer B-290.

A atomização é o processo pelo qual a suspensão é desintegrada em gotículas na forma de spray. O atomizador é parte fundamental do equipamento (PATEL; PATEL; SUTHAR, 2009), a formação de um *spray* com grande superfície de contato é crítica para que haja condições de evaporação ótimas. São classificados em três tipos básicos: de pressão; pneumáticos; e de disco giratório (ÇELIK; WENDEL, 2005; GOHEL et al., 2009; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; NANDIYANTO; OKUYAMA, 2011)

Uma vez que o líquido é atomizado, ele entra em contato com o gás aquecido na câmara de secagem para que a evaporação seja feita de forma igual pela superfície de todas as gotas. A interação com o ar pode ocorrer de três formas, co-corrente, contracorrente e misto. Na primeira, as gotículas e o ar fluem na mesma direção e no modo contracorrente, em direções opostas. A terceira forma usa uma configuração na qual as duas anteriores são incorporadas (ÇELIK; WENDEL, 2005; NANDIYANTO; OKUYAMA, 2011). À etapa de

secagem segue a separação e coleta do pó retido no ciclone e no coletor (Figura 6). A figura 8 demonstra o processo de secagem e formação das partículas sólidas.

**Figura 9. Formação das partículas sólidas.**



Fonte: Autor, 2012 – modificado de OLIVEIRA E PETROVCK, 2010.

Como já mencionado, a técnica de secagem por aspersão tem as mais variadas aplicações. De Souza et al. (2007) avaliaram a atividade anti-inflamatória de pós secos de *Achyrocline satureioides* e de quercetina. Os extratos secos por *spray-drying* e *freeze-drying* (com congelamento), preparados com adição de 50% de dióxido de silício coloidal, inibiram a inflamação aguda quando administrados por via oral. Relataram ainda que a adição de polissorbato 80, um emulsificante muito usado nas indústrias farmacêutica e alimentícia, leva a aumento na atividade demonstrada pelos extratos e que a quercetina, sem efeito quando isolada, inibiu o edema causado por carragenina.

O aumento na concentração de colesterol na formação de lipossomas de lisozima foi responsável por reduzir o tamanho dos lipossomas e aumentar a eficiência de aprisionamento da enzima. O processo de secagem não influenciou na atividade biológica (CHARNVANICH; VARDHANABHUTI; KULVANICH, 2010). Sham et al. (2004) descreveram a produção de pós contendo nanopartículas com tamanho e forma viáveis para administração por via pulmonar. O excipiente escolhido para o processo de secagem tem grande importância, o aumento na concentração de maltodextrina, por exemplo, foi responsável por elevar a retenção de nutracêuticos de mirtilo durante o processo de secagem (MA; DOLAN 2011). Em estudo de compressão direta de pós contendo misturas binárias de paracetamol e carboidratos, a influência dos adjuvantes sobre o processo foi avaliada. Três misturas binárias contendo o fármaco e os excipientes manitol, eritrol e maltodextrina levaram a rendimento e resistência à compressão elevados (GONNISSEN; REMON; VERVAET, 2007).

A atividade antiulcerativa de pós atomizados preparados com extrato das folhas de *Maytenus ilicifolia* foi testada com e sem a adição de óxido de silício coloidal. O pó contendo o adjuvante demonstrou maior efeito protetor, contudo, este aumento na atividade se deveu à redução no tamanho da lesão provocada pelo próprio excipiente, que se mostrou ativo mesmo quando administrado isoladamente (MARTINS; GUTERRES; ORTEGA, 2003)

Através da secagem por aspersão foi possível produzir um pó estável e de baixa higroscopicidade a partir da mucilagem de cactos *Opuntia ficus-indica*, mesmo sem o uso de excipientes. A umidade residual e o rendimento do processo se mostraram inversamente proporcionais à temperatura de entrada do equipamento (LEÓN-MARTÍNEZ; MÉNDEZ-LAGUNAS; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, 2010). Goula e Adamopoulos (2005) usaram um sistema de secagem modificado para a produção de pós a partir de polpa de tomate. O sistema, que consistia de um desumidificador ligado à entrada de ar, originou um produto com umidade mais baixa e densidade e solubilidade mais elevadas quando comparadas ao sistema de *spray dryer* convencional.

## **3 Objetivos**

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o produto intermediário atomizado em *spray dryer* obtido a partir do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Aspidosperma tomentosum*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Identificar marcadores bioativos a partir o extrato hidroalcoólico de *A. tomentosum*;
- Avaliar a viabilidade da secagem por atomização em *Spray Dryer* do extrato hidroalcoólico de *A. tomentosum*;
- Caracterizar o extrato seco através de espectrometria na região do infravermelho e análise térmica;
- Determinar a uniformidade das partículas secas através da avaliação da distribuição, do tamanho e da morfologia;
- Quantificar, por HPLC, o teor dos marcadores no extrato seco da planta obtido por secagem em *Spray Dryer*;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato, antes e depois do processo de atomização.

## **4 Metodologia**

---

## **4 METODOLOGIA**

O estudo fitoquímico e a avaliação da atividade antioxidante foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) e o processo de atomização por *Spray Dryer*, no Laboratório de Tecnologia e Controle de Medicamentos (LabTCoM).

### **4.1 Solventes, Materiais e Equipamentos**

Os extratos foram preparados em percolador de aço inoxidável. Os solventes utilizados (hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol) eram grau P. A. ou comercial, sendo estes destilados no laboratório.

Para a concentração das soluções de grande volume usou-se evaporador rotatório (BÜCHI, Modelo R-210) e para as de pequeno volume, capela de exaustão (Permutation), à temperatura ambiente.

Nas análises por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizou-se cromatofolhas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> da Merck. Estas placas cromatográficas foram reveladas sob irradiação de luz ultravioleta em comprimentos de onda 254 e 356 nm ou borrifadas com solução ácida de sulfato cérico. Sílica gel 60 (230-400 mesh, da Merck) foi usada nas colunas cromatográficas sob pressão atmosférica;

As pesagens foram efetuadas em balança eletrônica analítica (Modelo AX 200) e semianalítica, das marcas Shimadzu e Bel, respectivamente.

### **4.2 Coleta e identificação do material vegetal**

A espécie *A. tomentosum* foi coletada em maio de 2004, na cidade de Planaltina-GO e identificada pelo botânico Dr. José Elias de Paula, da Universidade de Brasília, onde uma exsicata [No. JEP 3732 (UnB)] encontra-se depositada.

### 4.3 Obtenção do extrato

A casca do caule da planta foi submetida à secagem em estufa a 40°C por 72 horas e posteriormente à trituração. Foram obtidos 3,64 kg da planta seca e triturada. O material foi submetido à extração com 20 L de etanol 90 % em percolador, à temperatura ambiente por 96 h. O extrato obtido foi concentrado sob pressão reduzida, em evaporador rotatório, e forneceu 316,55 g (8,696 %) de extrato etanólico bruto (EEB).

Durante a concentração do extrato ocorreu a formação de um precipitado amarelado em grande quantidade. Este foi separado da fração solúvel utilizando a metodologia a seguir.

#### 4.3.1 Remoção do precipitado

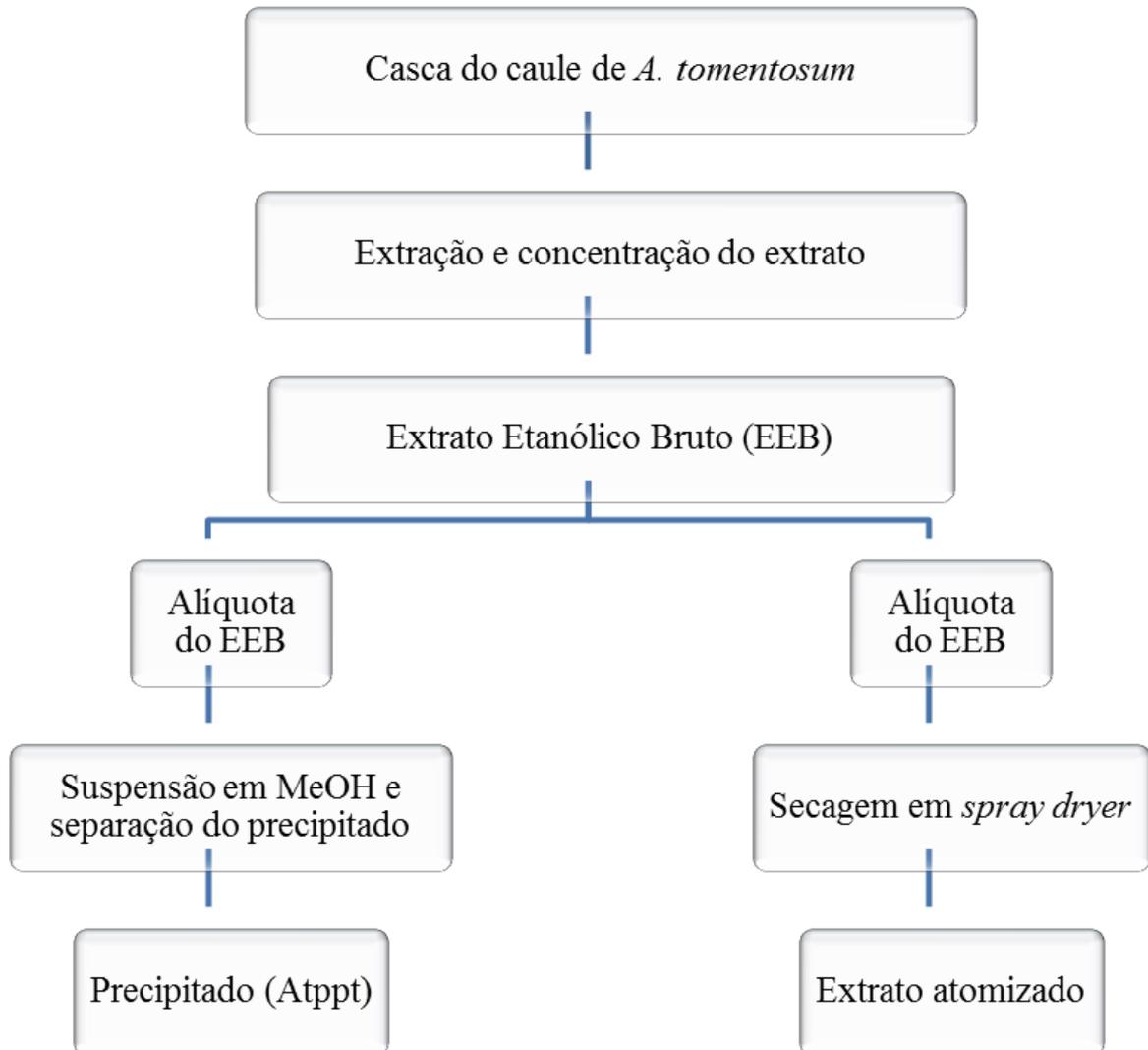
Uma alíquota de 74,10 g do extrato etanólico foi suspensa em metanol. A fase insolúvel foi separada do sobrenadante (água-mãe) por filtração a vácuo em funil de buchner, resultando em 11,10 g (14,98 %) de um precipitado de cor amarela, codificado como ATppt.

### 4.4 Secagem em *Spray dryer*

O extrato bruto (17 g) foi suspenso em erlenmeyer em uma mistura de etanol:água (3:7). À suspensão foi adicionado dióxido de silício coloidal (Aerosil®) até atingir 10% da massa do material sólido.

O material suspenso foi submetido à atomização em equipamento Mini Spray Dryer, modelo B-290, da Buchi. O equipamento foi ajustado com os seguintes parâmetros: temperatura de entrada, 160 °C; temperatura de saída, 75 °C; aspirador, 80 %; bomba, 33 %.

**Figura 10. Obtenção e destino do extrato bruto e do precipitado de *A. tomentosum*.**



Fonte: Autor, 2012.

#### 4.5 Análise fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada seguindo a metodologia descrita por Matos (1997). Amostras do extrato bruto e do precipitado (ATppt) foram usados nestas análises.

##### 4.5.1 Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonoides

O extrato bruto e o precipitado foram avaliados quanto à presença de antocianinas, antocianidinas e flavonoides. Solubilizou-se 3 mg de cada um dos materiais em 3 mL de EtOH. Preparou-se três tubos de ensaio para cada amostra. O pH do tubo 1 foi ajustado para 3 com HCl 3 M. Os tubos 2 e 3 foram alcalinizados a pH 8,5 e pH 11 com NaOH 1 M. As mudanças de coloração observadas foram interpretadas segundo o quadro 2.

**Quadro 2. Colorações indicativas para a presença de antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis e xantonas, chalconas e auronas, flananonóis.**

Metabólitos	Coloração observada		
	pH 3	pH 8,5	pH 11
Antocianinas e antocianidinas	Vermelho	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	-		Amarela
Chalconas e auronas	Vermelho		Vermelho purpúreo
Flananonóis	-		Vermelho alaranjado

Fonte: Autor, 2012 – modificado de MATOS, 1997

#### 4.5.2 Teste para Leucoantocianidinas, Catequinas, Flavanonas

Dois tubos foram preparados para cada amostra (extrato bruto e extrato atomizado) e numerados. O pH do primeiro tubo foi ajustado para 2 pela adição de HCl 1 M e o segundo foi alcalinizado com NaOH 1 M até pH 11. Os tubos foram aquecidos por 3 minutos. As mudanças de coloração observadas foram interpretadas segundo o quadro 3.

**Quadro 3. Colorações indicativas para a presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas.**

Metabólitos	Coloração observada	
	pH 2	pH 11
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas	Pardo-amarelada	-
Flavanonas	-	Vermelho alaranjado

Fonte: Autor, 2012 – modificado de MATOS, 1997

#### 4.5.3 Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Adicionou-se magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado a um tubo contendo a amostra. Aguardou-se o fim da reação indicada pelo fim da efervescência e observou-se a mudança da coloração da mistura reacional. O aparecimento ou a intensificação de cor vermelha indica a presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou na forma de heterosídeos.

#### 4.5.4 Teste para esteroides e triterpenos (Lieberman-Burchard)

Uma alíquota do extrato foi diluída em 2 mL de  $\text{CHCl}_3$  e filtrada em funil coberto com  $\text{NaSO}_4$  anidro para retirada da água residual. Ao tubo de ensaio contendo esta solução foi adicionado 1 mL de anidrido acético e, depois de agitação branda, adicionou-se  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Depois de nova agitação se observou o aparecimento de coloração. Coloração azul evanescente seguida de verde permanente indica a presença de esteroides livres. Coloração de parda até vermelha indica triterpenos pentacíclicos livres.

#### 4.5.5 Teste para saponinas

O resíduo insolúvel em clorofórmio do teste anterior foi separado, dissolvido em 10 mL de água destilada e filtrado para um tubo de ensaio. O tubo foi vigorosamente agitado e se observou se houve a formação de espuma. Aparecimento de espuma persistente e abundante é indicativo da presença de saponinas.

#### 4.5.6 Teste com reagente de Dragendorff

O extrato foi submetido ao teste com reagente de Dragendorff para avaliação da presença de alcaloides. O teste é qualitativo e indica a presença de alcaloides pela formação de um precipitado vermelho-alaranjado.

#### 4.5.7 Teste para antraquinonas, antronas e cumarinas

Os testes para antraquinonas, antronas e cumarinas foram realizados em placa de CCD. Os extratos foram solubilizados em metanol, aplicados na placa de CCD e eluídos com uma mistura  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (9:1). Após a eluição, borrifou-se  $\text{KOH}$  a 10%, esperou-se secar e observou-se a presença das cores indicativas em luz ultravioleta no comprimento de onda de 365 nm. O surgimento de coloração azul é indicativo de cumarina, vermelho, de antraquinona, e amarelo, de antrona.

#### 4.5.8 Teste para fenóis e taninos

A um tubo contendo 3 mL da solução extrativa adicionou-se três gotas de uma solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$ . Após agitação, foi observado se houve variação de cor ou formação de precipitado. Coloração variável entre azul e vermelho indica a presença de fenóis. A formação

de precipitado azul escuro indica a presença de taninos hidrolisáveis e de precipitado verde, a presença de taninos condensados.

## 4.6 Separação cromatográfica

### 4.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Os cromatogramas foram obtidos em equipamento HPLC da Shimadzu (sistema: deseisificador DGU-20 A5; bomba LC-20AT; forno CTO-10ASVP; controladora CBM-20A; *software* LC Solution). O detector foi ajustado para o comprimento de onda de 380 nm. O fluxo da fase móvel foi de 0,6 mL/min, com temperatura do forno de 35°C. Utilizou-se como fase móvel uma mistura de metanol e solução de ácido acético (0,25%) (70:30) e coluna C-18 (250 mm x 0,4 mm x 5 µm).

### 4.6.2 Quantificação dos flavonoides por HPLC

Preparação da solução do padrão de quercetina:

1. Uma amostra de 100 mg do padrão foi pesada, transferida para um balão volumétrico de 50 mL e solubilizada em 40 mL de MeOH em banho ultrassônico por 15 minutos.
2. O volume foi completado para 50 mL a fim de se obter uma concentração de 2 mg/mL.
3. Em seguida, 1 mL da solução obtida em no item 2 foi transferido para um balão de 10 mL e volume foi completado com MeOH para se obter uma concentração de 200 µg/mL.
4. A partir da solução obtida no item 2, mais duas soluções com concentrações diferentes foram preparadas. Alíquotas de 0,5 e 0,1 mL foram transferidos para balões de 10 mL e os volumes foram completados com MeOH para se obter concentrações de 100 e 20 µg/mL

Preparação das soluções do extrato bruto, do precipitado (ATppt) e do extrato atomizado:

- Para as amostras do extrato bruto e do ATppt, seguiu-se o mesmo procedimento usado na preparação do padrão de quercetina (1-3), resultando na concentração

de 200 µg/mL, porém, a solubilização da amostra foi feita em uma mistura de MeOH:(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO.

- Para o extrato atomizado, a amostra pesada foi de 111,11 mg, correspondendo a 100 mg de extrato bruto + 11,11 mg de dióxido de silício coloidal. A metodologia posterior à pesagem foi igual à usada para o extrato bruto e o precipitado

A partir das soluções do padrão de quercetina, a curva de calibração foi determinada. O sistema de solventes MeOH:CH<sub>3</sub>COOH (0,25 %) foi usado como fase móvel e a eluição foi isocrática. As amostras foram injetadas em duplicata e a quantificação foi feita a partir do cálculo da área sob a curva das amostras analisadas em comparação com o padrão de quercetina. A análise foi realizada em sistema HPLC da Shimadzu com os seguintes parâmetros: fluxo de 0,6 mL/min; coluna C-18 (250 mm x 0,4 mm x 5 µm); forno a 35 °C; e detector UV ajustado a 380 nm.

#### **4.7 Análise térmica**

A análise térmica foi realizada no Laboratório de Biocombustíveis e Energia (LaBEn). As curvas de termogravimetria (TG) foram obtidas em equipamento modelo DTG-60, da Shimadzu. Para o extrato bruto, uma amostra de 5,064 mg foi analisada em cadinho de platina, com fluxo de ar de 20 mL/min, taxa de aquecimento de 20°C/min e varredura de 20°C a 800°C. Para o extrato bruto atomizado, uma amostra de 3,92 mg foi analisada nas mesmas condições utilizadas para o extrato bruto.

#### **4.8 Determinação de conteúdo de água**

O conteúdo de água foi determinado em titulador Karl Fischer, Metler Toledo, modelo DL38, usando solução Hydra-point e metanol anidro. A calibração foi realizada em triplicata com água deionizada. A amostra foi analisada com três determinações, sendo os resultados expressos em percentagem de água ± desvio padrão.

#### **4.9 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier**

Os espectros na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram obtidos em aparelho Varian 660-IR/FT-IR pela técnica de Reflectância Total Atenuada (ATR).

#### 4.10 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) e  $^{13}\text{C}$ , usando a técnica de APT, (100 MHz) foram obtidos em equipamento VNMRS-500, da Varian. DMSO- $d_6$  foi o solvente utilizado. O sinal TMS foi utilizado como referência interna.

#### 4.11 Determinação da perda por dessecação

Pesou-se 100 mg do extrato seco. O material foi submetido à dessecação em estufa (100-105°C) por 3 horas. Deixou-se resfriar em dessecador, com sílica, e pesou-se. O resíduo seco foi calculado como porcentagem de massa (BRASIL, 2010).

#### 4.12 Eficiência de secagem

A eficiência de secagem foi determinada dividindo-se a massa obtida no processo de secagem por nebulização pelo valor da massa do extrato hidroalcoólico somado à massa do adjuvante acrescentado e multiplicando o resultado por 100.

#### 4.13 Análise Granulométrica

Para a determinação da granulometria foram utilizados tamises de aço inoxidável de numerações 42 (355  $\mu\text{m}$ ), 60 (250  $\mu\text{m}$ ), 80 (180  $\mu\text{m}$ ), 100 (149  $\mu\text{m}$ ), 120 (125  $\mu\text{m}$ ) e 200 (74  $\mu\text{m}$ ). O conjunto de tamises foi montado com o de maior abertura sobre o de menor. A agitação foi feita em equipamento em agitador eletromagnético Produtest. O reostato foi ajustado para a vibração máxima (10). A agitação ocorreu por 15 minutos a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . O percentual retido em cada tamis foi calculado segunda à equação 1.

$$\% \textit{Retida no tamis} = \frac{M_r}{M_t} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

onde:

$M_r$  = Massa da amostra retida em cada tamis (em gramas);

$M_t$  = Massa total depositada no tamis de maior abertura (em gramas);

100 = Fator de porcentagem.

#### 4.14 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das partículas sólidas foi observada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), em equipamento JEOL-JSM 6460, sob vácuo, com voltagem de 30 kV. As fotomicrografias foram obtidas no Laboratório de Dispositivos e Nanoestruturas (LDN), com aumentos entre 100 e 3500 vezes.

#### 4.15 Determinação do pH

Uma amostra de *A. tomentosum* pesando 25 mg foi diluída em 25 mL de água destilada a fim de obter a concentração de 1 mg/mL. A partir desta, efetuou-se diluições, com água destilada, atingindo as concentrações de 0,5, 0,25 e 0,1 mg/mL. O equipamento foi calibrado com padrões de pH 4 e 7 a  $25 \pm 1$  °C. O eletrodo foi submerso nas soluções até a estabilização do valor de pH. O equipamento pHmeter, modelo PHS-3B, da PHTEK foi utilizado para as análises.

#### 4.16 Determinação da atividade antirradicalar

A atividade antioxidante dos extratos bruto e atomizado na concentração de 4,95 µg/mL foi determinada pelo método de captura do radical ABTS. O preparo do radical ABTS [2,2'-Azonobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi realizado a partir da mistura de 5 mL de uma solução de ABTS 7 mM com 88 µL de persulfato de potássio 140 mM, que foi mantida no escuro, por 16 horas. Em seguida, a mistura reacional foi diluída com álcool etílico até atingir a absorvância de  $0,70\text{nm} \pm 0,05$ . O trolox foi utilizado como padrão e diferentes concentrações foram usadas (100-4000 µM) para se obter a curva de calibração. A leitura foi realizada em  $\lambda$  igual a 734 nm, usando etanol como branco para calibrar o espectrofotômetro (RUFINO et al., 2007).

## **5 Resultados e Discussão**

---

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise fitoquímica e elucidação estrutural

A partir do extrato bruto de *A. tomentosum* realizou-se uma análise fitoquímica preliminar a fim de avaliar, de forma qualitativa, as classes de metabólitos secundários presentes. O quadro 4 apresenta os resultados obtidos na prospecção.

**Quadro 4. Prospecção fitoquímica do extrato da casca do caule de *A. tomentosum*.**

Teste	Resultado encontrado
Antocianinas	Positivo
Antocianidinas	Positivo
Flavonoides	Positivo
Leucoantocianidinas	Positivo
Catequinas	Positivo
Flavononas	Positivo
Flavonóis	Positivo
Xantonas	Positivo
Esteroides e Triterpenos	Esteroides livres
Saponinas	Positivo
Alcaloides	Negativo
Antraquinonas	Negativo
Antronas	Negativo
Cumarinas	Negativo
Fenóis e Taninos	Taninos condensados de catequinas

Dois dos resultados apresentados acima atraem a atenção: a ausência de alcaloides e a presença de flavonoides. Como já mencionado, o gênero *Aspidosperma* é reconhecido pela produção de alcaloides. Estudos com a casca do caule de *A. ramiflorum* (TANAKA et al., 2006) e de *A. pyrifolium* (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2007) relatam o isolamento de alcaloides com esqueleto monoterpinoindólico. O trabalho de Aquino (2006) descreve alcaloides obtidos a partir dos ramos, das folhas, das sementes e dos arilos de *A. tomentosum*. A uleína foi isolada a partir do caule desta espécie (DA SILVA et al., 2001), não há, contudo, relatos de alcaloides obtidos da casca do seu caule.

O teste positivo para flavonoides desperta interesse devido à escassez de achados desta classe de produtos naturais no gênero *Aspidosperma*, sendo o único artigo publicado nesse contexto o trabalho de Pelloto e Del Pero (1995). O precipitado em metanol (ATppt), também positivo para flavonoides, chamou atenção quanto à quantidade obtida, cerca de 15% do extrato usado para a precipitação, e quanto ao modo pelo qual foi obtido, através de precipitação e subseqüente filtração simples. A análise por CCD sugeriu a presença de dois componentes majoritários na amostra (Figura 10).

**Figura 11. CCD do extrato bruto de *A. tomentosum* (esquerda) e do ATppt (Fase móvel  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3:\text{CH}_3\text{COOH} - 4:1:0,1$ ).**

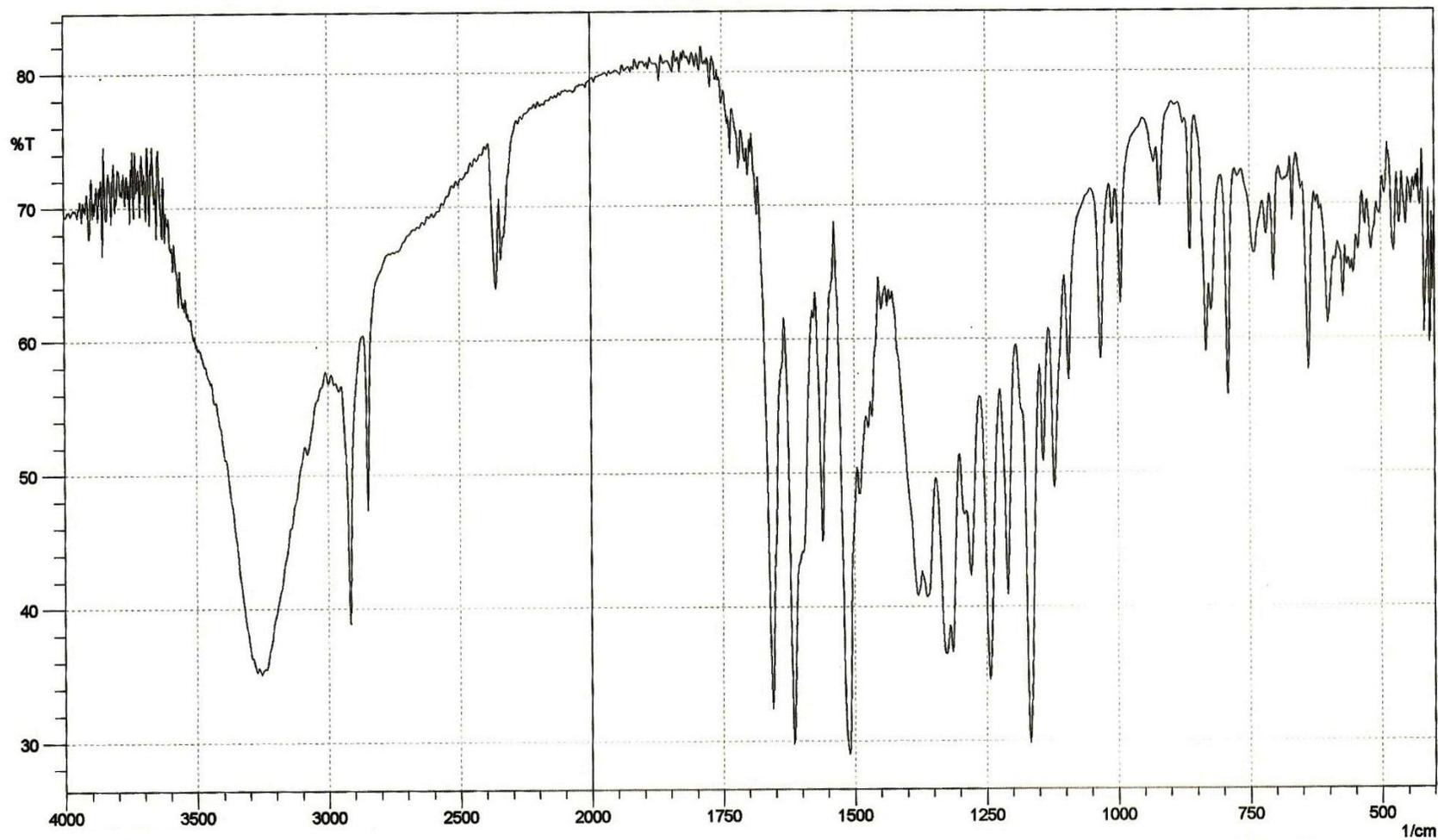


Fonte: Autor, 2012.

O ATppt foi submetido à análise espectroscópica na região do infravermelho e o espectro resultante é mostrado na figura 10. O espectro mostra uma banda larga em  $3220\text{ cm}^{-1}$  característica de O–H em ligação de hidrogênio e estiramentos de ligação C–H de metila e/ou metileno ( $2954$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ ). O estiramento de forte intensidade em  $1655\text{ cm}^{-1}$  se encontra na região de grupo C=O de aril-cetona (LOPES; FASCIO, 2004). Os estiramentos na faixa de  $1605\text{-}1470\text{ cm}^{-1}$  sugerem a presença de ligações C=C de composto aromático. Esperar-se-ia encontrar estiramentos relativos às ligações  $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$  de anel aromático entre  $3100$  e  $3010\text{ cm}^{-1}$ , entretanto, estes podem estar encobertos pela banda larga da hidroxila. Várias bandas decorrentes de deformação no plano de ligações  $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$  aromáticas são encontradas na faixa de  $1300\text{-}100\text{ cm}^{-1}$ , no entanto, raramente são úteis para a interpretação do espectro, pois deformações de outros grupos absorvem na mesma região (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Os grupamentos apontados pelo espectro no infravermelho condizem com os encontrados na estrutura de flavonoides. No intuito de elucidar a composição do precipitado, análises de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram realizadas.

Figura 12. Espectro na região do infravermelho de ATppt.



Fonte: Autor, 2012

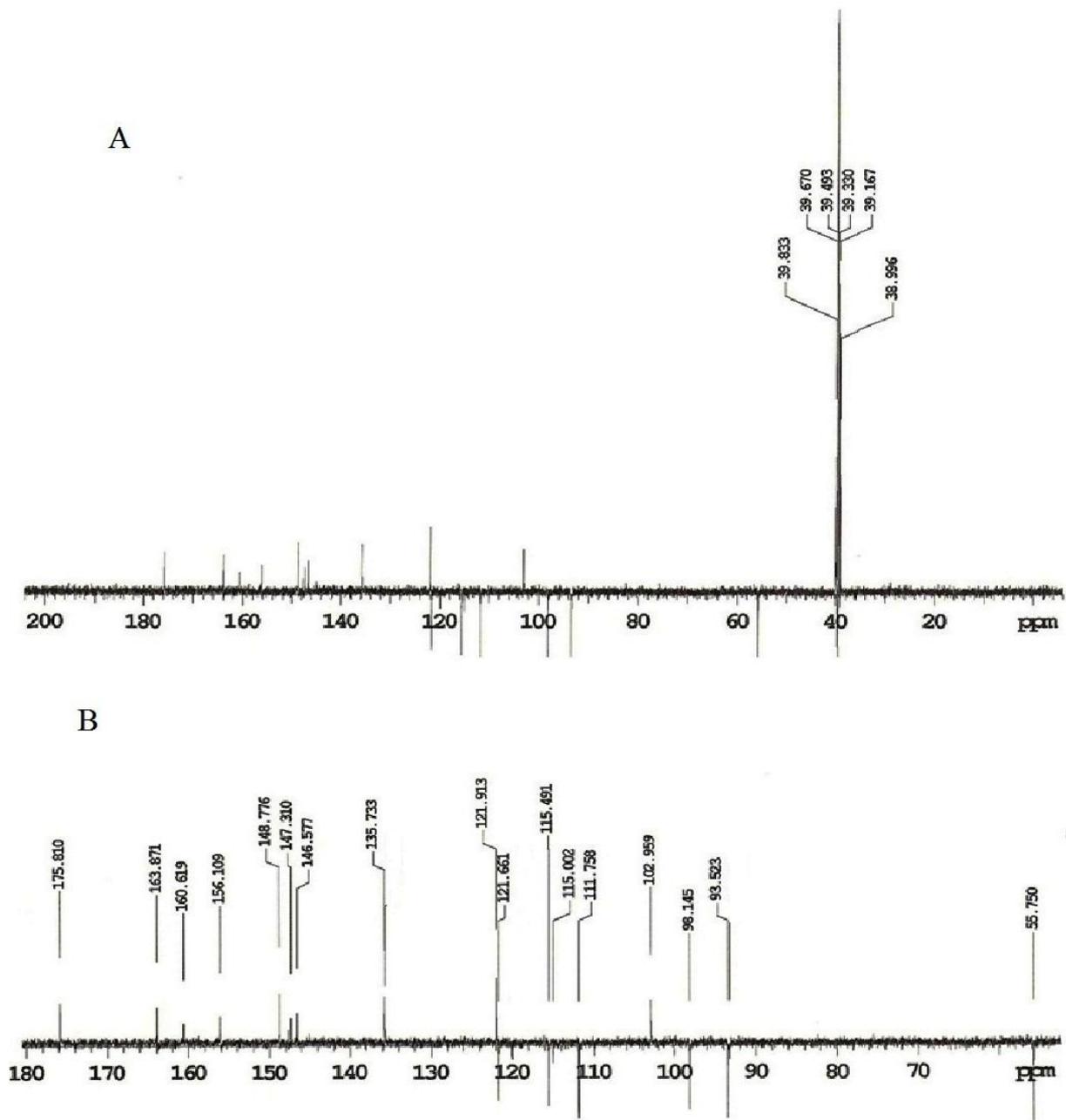
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (APT – 100 MHz) de ATppt (Figura 12) apresentou 16 sinais com os seguintes deslocamentos químicos ( $\delta$ ) : 175,81; 163,71; 160,62; 156,11; 148,78; 147,31; 146,58; 135,7; 121,91; 121,66; 115,49; 111,76; 102,96; 98,14; 93,52; 55,75 ppm. Destes, seis sinais são oriundos de carbonos ligados a átomos de hidrogênio, sendo cinco de carbonos metínicos (121,66, 115,49, 111,76, 98,14 e 93,52 ppm) e um de carbono com hibridização  $\text{sp}^3$  (55,75 ppm). O sinal do solvente (DMSO-*d*<sub>6</sub>) aparece em 39,41 ppm (GOTTLIEB; KOTLYAR; NUDELMAN, 1997). O sinal em 55,75 ppm indica a presença do grupo metoxila ( $\text{OCH}_3$ ) na estrutura. O espectro no infravermelho (Figura 11) apresenta os estiramentos esperados para estruturas que contêm uma função fenilalquiléter (1243 e 1035  $\text{cm}^{-1}$ ) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001). O grupamento carbonila apontado pelo espectro no infravermelho (Figura 11) aparece como o sinal em campo mais baixo do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  175,81 ppm).

À exceção do carbono do grupo metoxila, todos os valores de  $\delta$  estão relacionados a carbonos com hibridização  $\text{sp}^2$ . Os deslocamentos encontrados, junto com ausência de sinal para carbono  $\text{sp}^3$  além do observado na metoxila, levam a crer que a estrutura (ou estruturas) estudada seja a de uma flavona ou um flavonol (Figura 2). O valor de deslocamento da metoxila fornece mais uma informação, o grupo está localizado em posição sem impedimento estérico, com  $\delta$  próximo a 56 ppm, pois, caso este efeito estivesse presente, o valor de  $\delta$  estaria próximo a 60 ppm. No caso da metoxilação em C-3 (3-*O*-metilquercetina), o valor de  $\delta$  fica em torno de 59 ppm. Com isto, as possibilidades para a posição da metoxila diminuem para os carbonos 7, 3' ou 4' (SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009).

Os deslocamentos em 98,14 e 93,52 ppm, relacionados a carbonos metínicos aromáticos aparecem abaixo da faixa de  $\delta$  para carbonos aromáticos. Estes valores são consistentes com a presença de grupos OH como substituintes nas posições 5 e 7 do anel A (SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009). Grupos hidroxila em posição *orto* aumentam a blindagem do núcleo de carbono, o que diminui o deslocamento químico (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001). Estes dados sugerem que os valores de  $\delta$  estejam relacionados a C-6 (98,14 ppm) e a C-8 (93,52 ppm), sendo o valor inferior atribuído ao carbono 8 devido ao padrão de substituição em relação a ele, exibindo um OH em posição *orto* (C-7) e um em *para* (C-5), uma função éter em *orto* (posição 1) e uma carbonila em *meta* (C-4). Considerando este padrão de substituição para o anel A, os valores de  $\delta$  163,71 e 160,62 ppm seriam atribuídos aos carbonos hidroxilados 7 e 5, respectivamente. O maior  $\delta$  é atribuído ao

C-7 devido ao padrão de substituição deste em relação ao C-5, a carbonila em posição *para* relativa ao C-7 confere maior efeito de desproteção do que a mesma em posição *orto* em relação ao C-5 (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001).

**Figura 13.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de ATppt (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ). (A) Espectro completo; (B) Expansão na faixa de 50-180 ppm.

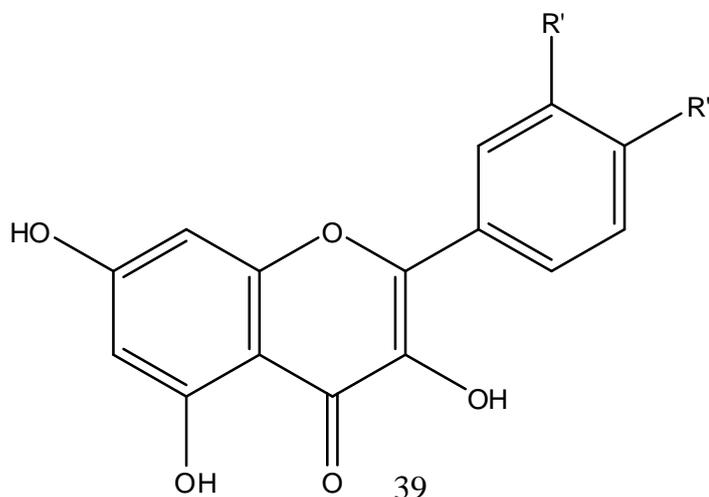


Fonte: Autor, 2012.

Dando continuidade às atribuições dos deslocamentos químicos do anel A, os carbonos 9 e 10 foram analisados. Para o carbono em posição 9, espera-se um valor de  $\delta$  elevado, pois ele está ligado a um átomo de oxigênio, tem uma carbonila em *orto* e duas hidroxilas em *meta*. Dito isto, sugere-se que o  $\delta$  de C-9 seja o de 156,11 ppm. Este valor está de acordo com o trabalho de Silva, Carvalho e Braz-Filho (2009), onde os autores analisaram 16 flavonóis e encontraram valores de  $\delta$  de C-9 entre 156 e 158 ppm em 11 deles. Já para o carbono 10, as posições relativas dos substituintes conferem maior proteção, a presença da carbonila em posição *ipso* (C-4), as hidroxilas em *orto* e em *para* (C-5 e C-7, respectivamente), e a função éter em *orto* fazem com que este carbono se encontre na região mais protegida do espectro de carbonos aromáticos. Quando se analisam os sinais exibidos no espectro da figura 12, pode-se sugerir para o carbono 10 o deslocamento químico de 102,96 ppm. No mesmo trabalho citado acima, os autores encontraram para a maioria dos valores de  $\delta$  de C-10 valores próximos a 104 ppm.

Com os dados obtidos até aqui, pode-se propor um esqueleto de flavona ou flavonol para os compostos presentes no ATppt. Através da análise do valor de  $\delta$  do C-3 é possível diferenciar entre as estruturas de flavonóis e flavona. O deslocamento químico deste carbono, no caso das flavonas sem substituintes no C-2', encontra-se próximo a 105 ppm (PELTER; WARD; GRAY, 1976). O carbono 3 dos flavonóis, por outro lado, gera um sinal com  $\delta$  maior, geralmente entre 135 e 140 ppm, devido à presença do grupamento OH (SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009). Assim, pode-se atribuir o sinal em 135,73 ppm ao carbono em posição 3 e propor uma estrutura de flavonol (39) para os compostos encontrados no precipitado, com o anel A apresentando o padrão de substituição di-hidroxilado nas posições 5 e 7, como mostrado na figura 13. Os radicais (R) mostrados na figura 13 podem ser os grupos OH ou OCH<sub>3</sub>.

**Figura 14. Estrutura do esqueleto de flavonol proposto para os compostos presentes em ATppt.**



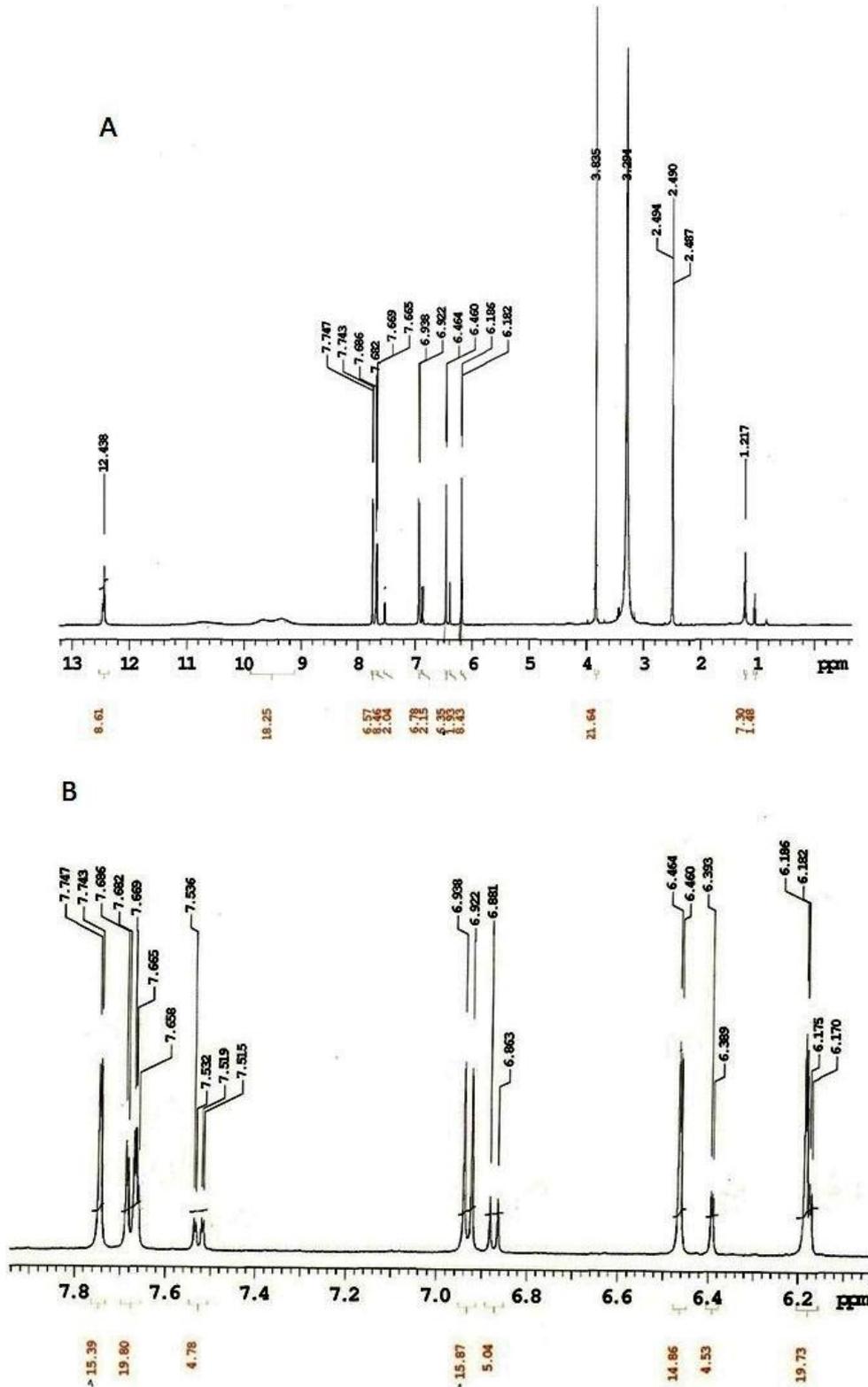
Fonte: Autor, 2012.

Como foi visto na CCD (Figura 10), o ATppt é constituído por, pelo menos, dois compostos. Somados a isto, os resultados obtidos no espectro de  $^{13}\text{C}$  sugerem que, havendo dois ou mais compostos, suas estruturas devem ser muito próximas, pois, em caso contrário, esperar-se-ia mais sinais de carbono. No espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Figura 14), os sinais dos átomos de hidrogênio reforçam a ideia de que há dois compostos com estruturas correlatas. O espectro mostra sinais que parecem estar duplicados, com deslocamentos próximos e com a mesma multiplicidade, mas com intensidades diferentes. A exceção é o simpleto em 3,83 ppm. Este corresponde ao sinal do grupo metoxila, com integração para três átomos de hidrogênio, indicando que o grupo está presente em apenas um dos compostos. O sinal em 12,4 ppm indica a presença de hidroxila em ligação de hidrogênio, o que corrobora com os dados de  $^{13}\text{C}$  em relação à substituição no carbono 5 (Figura 12).

O espectro de  $^1\text{H}$  apresenta 10 sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos (Figura 14): um duplete (d) em 7,74; um duplo duplete (dd) sobreposto a um duplete em 7,67; dd em 7,52; d em 6,93; d em 6,87; d em 6,46; d em 6,39; d em 6,18; e d em 6,17 ppm. Destacam-se ainda os sinais relativos ao solvente ( $\text{DMSO-}d_6$ ) em  $\delta$  2,49 ppm e à água residual presente neste ( $\delta$  3,29 ppm) (GOTTLIEB; KOTLYAR; NUDELMAN, 1997). Os maiores valores de  $\delta$  nos flavonóis são encontrados nos hidrogênios ligados aos carbonos 2' (H-2') e 6' (H-6') (MOUSALLAMI; AFIFI; HUSSEIN, 2002; SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO,

2009). Pode-se diferenciar H-2' e H-6' através do acoplamento, pois este é o único a apresentar um duplo duplete.

Figura 15. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de ATppt (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ). (A) Completo; (B) Expansão na faixa de 6-8 ppm.



Fonte: Autor, 2012.

De forma semelhante ao que foi mostrado no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , o padrão de substituição do anel A dos flavonoides confere aos átomos de hidrogênio presentes nele maior proteção no espectro de  $^1\text{H}$  RMN. O carbono 5, por sua vez, apresenta  $\delta$  de valor intermediário com acoplamento em *orto*. Após a análise dos espectros, os dados obtidos a partir do ATppt foram comparados com os encontrados na literatura. A tabela 1 relaciona os valores de  $\delta$  de  $^{13}\text{C}$  com os flavonóis já descritos.

**Tabela 1. Comparação dos dados de  $^{13}\text{C}$  RMN [ $\delta$  (ppm), DMSO- $d_6$ , 100 MHz) do ATppt com dados da literatura.**

Carbono	ATppt	Quercetina <sup>1</sup>	3- <i>O</i> -metil- quercetina <sup>2</sup>	Isorramnetina <sup>3</sup>	4'- <i>O</i> -metil- quercetina <sup>3</sup>
C-2	148,78	146,9	155,43	146,7	146,1
C-3	135,7	135,5	137,94	135,9	136,0
C-4	175,81	175,8	178,94	175,9	175,8
C-5	160,62	160,7	161,87	160,7	160,6
C-6	98,14	98,2	98,03	98,3	98,1
C-7	163,71	163,9	163,57	164,0	163,8
C-8	93,52	93,3	93,1	93,7	93,3
C-9	156,11	156,2	156,49	156,2	156,1
C-10	102,96	103,1	104,59	103,1	102,9
C-1'	121,91	122,1	121,68	122,1	123,3
C-2'	111,76	115,3	114,59	111,8	114,5
C-3'	146,58	145	144,59	147,4	146,2
C-4'	147,31	147,6	147,78	148,9	149,2
C-5'	115,49	115,6	114,19	115,6	111,7
C-6'	121,66	120	120,78	121,8	119,7
OCH <sub>3</sub>	55,75	-	58,84	55,8	55,5

<sup>1</sup> MARKHAM; TERNAI, 1976; <sup>2</sup>SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009; <sup>3</sup>LEE et al., 2008.

Os resultados obtidos no espectro de  $^1\text{H}$  RMN estão descritos nas tabelas 2 e 3. As atribuições das posições dos átomos nas estruturas foram confirmadas nos espectros de RMN HSQC (Figura 16) e HMBC (Figura 17). A tabela 2 mostra os valores de  $\delta$  do composto não metoxilado (composto 1), que apresenta sinais com intensidade menor, e a tabela 3, os valores da substância metoxilada (composto 2). Os resultados são comparados com dados encontrados na literatura.

**Tabela 2. Comparação dos dados de  $^1\text{H}$  RMN [ $\delta$  (ppm), J (Hz), DMSO- $d_6$ , 400 MHz] do composto 1 com dados da literatura.**

	Composto 1	Quercetina <sup>1</sup>
H-6	6,17 (d, $J=2,5$ )	6,26 (d, $J=2,5$ )
H-8	6,39 (d, $J=2,5$ )	6,53 (d, $J=2,5$ )
H-2'	7,67 (d, $J=2,5$ )	7,83 (d, $J=2,5$ )
H-5'	6,87 (d, $J=8$ )	6,99 (d, $J=9$ )
H-6'	7,52 (dd, $J=2,5$ e 8)	7,7 (dd, $J=2,5$ e 9)

<sup>1</sup>KURKIN; PRAVDIVTSEVA, 2007

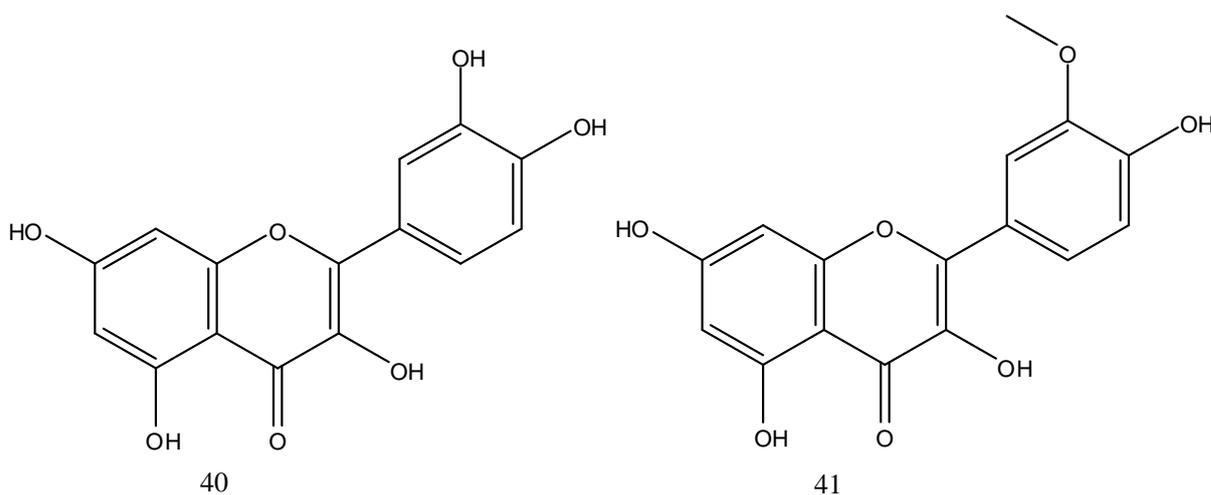
**Tabela 3. Comparação dos dados de  $^1\text{H}$  RMN [ $\delta$  (ppm), J (Hz), DMSO- $d_6$ , 400 MHz] do composto 2 com dados da literatura.**

	Composto 2	Isorramnetina <sup>1</sup>	4'- <i>O</i> -metilquercetina <sup>1</sup>
H-6	6,18 (d, $J=2,5$ )	6,19 (d, $J=2,1$ )	6,19 (d, $J=2,1$ )
H-8	6,46 (d, $J=2,5$ )	6,47 (d, $J=2,1$ )	6,42 (d, $J=2,1$ )
H-2'	7,74 (d, $J=2,5$ )	7,75 (d, $J=2,1$ )	7,67 (m)
H-5'	6,93 (d, $J=8$ )	6,94 (d, $J=8,5$ )	7,65 (m)
H-6'	7,67 (dd, $J=2,5$ e 8)	7,68 (dd, $J=2,1$ e 8,5)	7,08 (d, $J=8,4$ )
OCH3	3,83 (s)	3,84 (s)	3,84 (s)

<sup>1</sup>LEE et al., 2008

Os dados apresentados levam à identificação do composto 1 como o flavonol quercetina (40) (3,5,7,3',4'-penta-hidroxi-flavona) (Figura 15). Para o composto 2, a posição da metoxila pode ser confirmada, junto com os dados mostrados na tabela 3, através do espectro de NOESY (Figura 18). O espectro mostra a interação entre os átomos de hidrogênio da metoxila e o hidrogênio ligado ao C-2', confirmando que o grupo OCH<sub>3</sub> está ligado ao carbono 3'. Assim, o composto 2 foi identificado como o flavonol isorramnetina (41) (3'-O-metilquercetina) (Figura 15). Como já discutido, os glicosídeos destes flavonoides foram isolados de *A. quebracho-blanco* (PELLOTO; DEL PERO, 1995), no entanto, o isolamento das formas agliconas ainda não fora feito para este gênero.

**Figura 16. Flavonóis isolados de *A. tomentosum* (ATppt): Quercetina (40) e Isorramnetina (41).**



Fonte: Autor, 2012.

Figura 17. Espectro de HSQC RMN de ATppt (A) e ampliação (B) ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

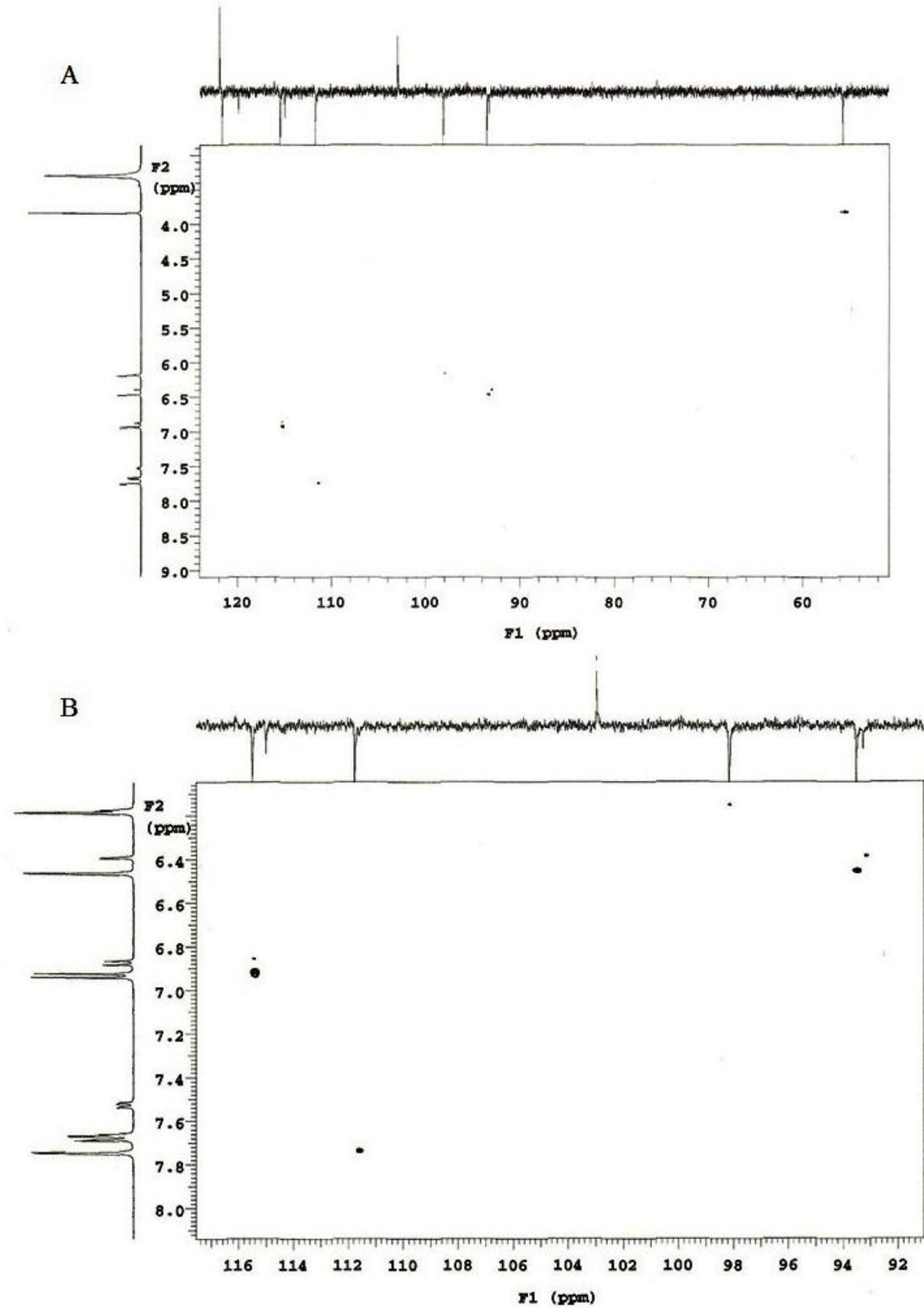
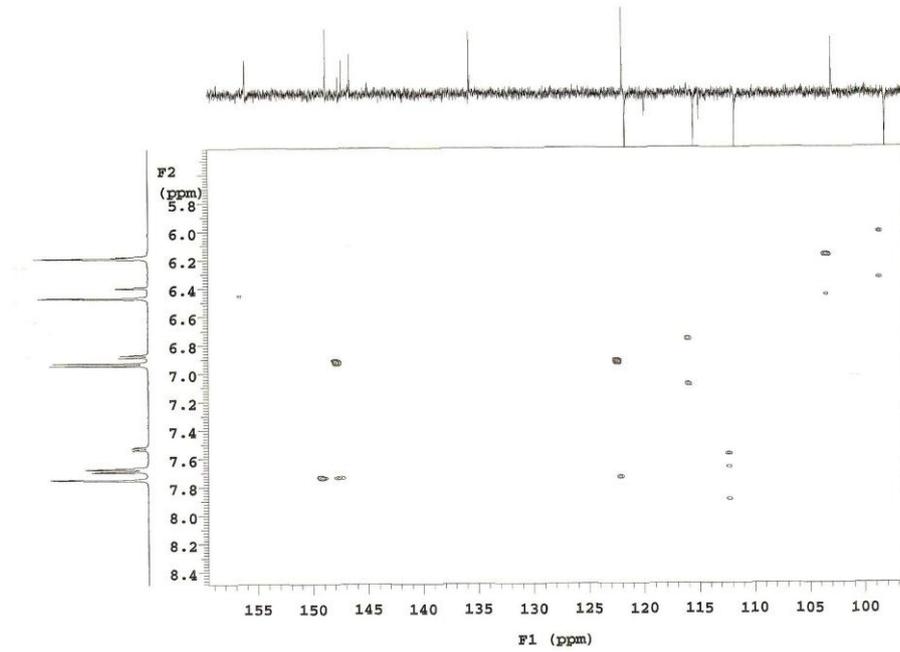
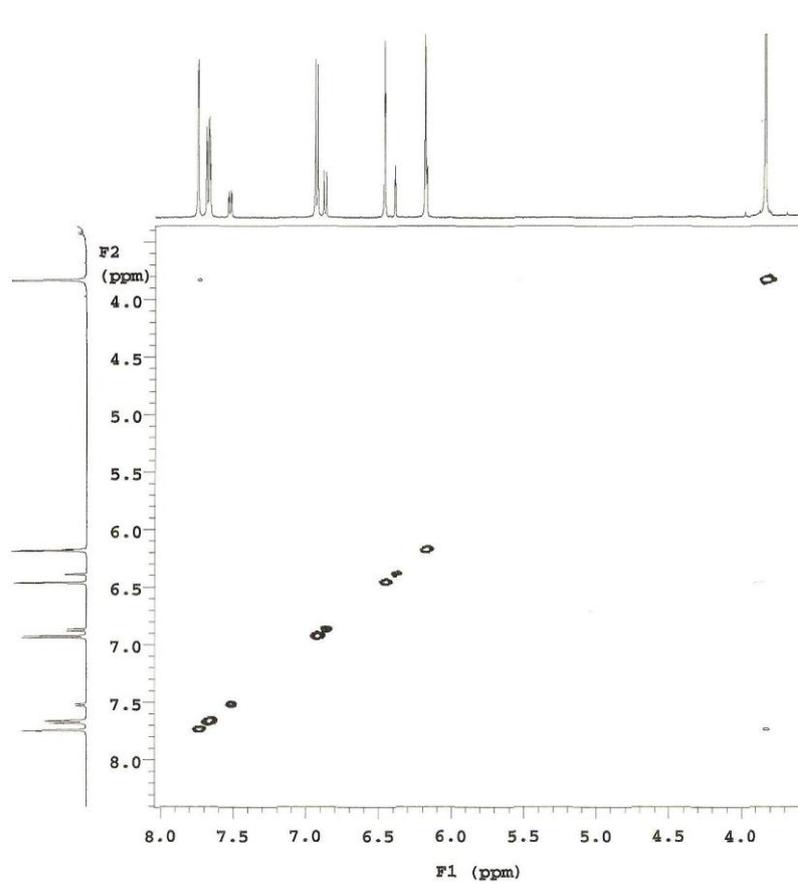


Figura 18. Espectro HMBC RMN de ATppt ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



Fonte: Autor, 2012.

Figura 19. Espectro NOESY RMN de ATppt ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



Fonte: Autor, 2012.

## 5.2 Obtenção do extrato seco em *spray dryer*

O extrato bruto de *A. tomentosum* foi utilizado para a obtenção de um produto farmacêutico intermediário na forma de pó através secagem por aspersão em *spray dryer*. O dióxido de silício coloidal (Aerosil®) foi escolhido como adjuvante a ser adicionado durante o processo de secagem devido às características tecnológicas que confere ao produto, como o aumento no rendimento de secagem, baixa umidade residual e tamanho de partículas uniforme (VASCONCELOS et al., 2005; OLIVEIRA; PETROVICK, 2009). A tabela 4 descreve a formulação do extrato seco e o rendimento do processo de secagem.

**Tabela 4.** Rendimento do processo de secagem.

Extrato bruto (g)	Dióxido de silício coloidal (g)	Extrato seco (g)	Rendimento (%)
15	1,5	8,08	49

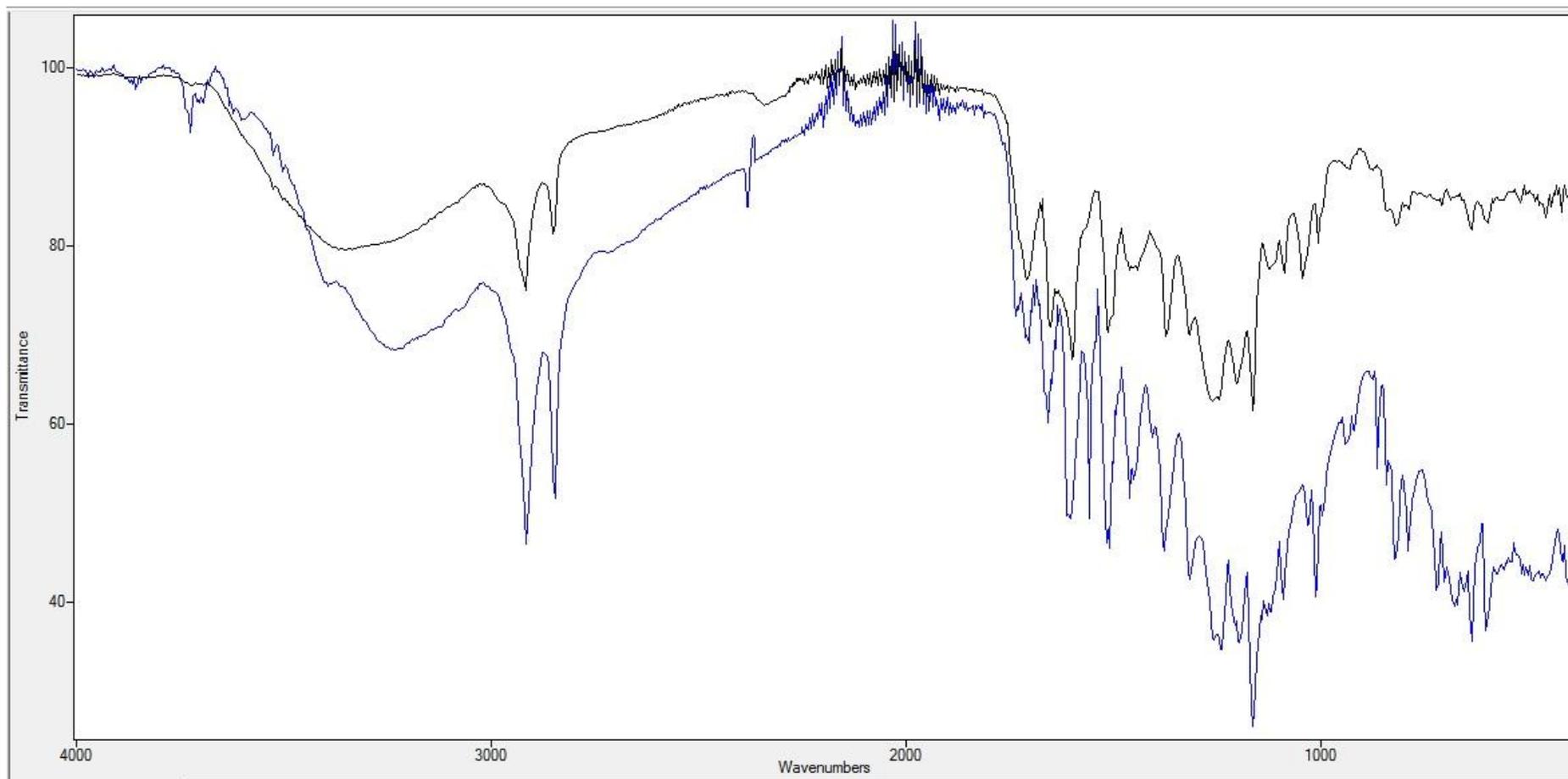
O rendimento do processo de secagem apresenta grande variação, a depender do tipo da amostra e dos parâmetros estabelecidos. O rendimento obtido com o extrato de *A. tomentosum* (49%) apresenta valor intermediário, sabendo-se que a faixa de rendimentos encontrados para o processo é extensa. Como exemplos, temos os rendimentos para a obtenção de pó de lisozima, de 55 a 75% (CHARNVANICH; VARDHANABHUTI; KULVANICH, 2010), de exopolissacrídeos do cogumelo *Agaricus brazei*, de 24 a 42% (FERNANDES et al., 2001) e Cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*), de 55 a 85% (GALLO et al., 2011).

## 5.3 Caracterização do extrato seco em *spray dryer*

### 5.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é muito útil na caracterização dos grupos funcionais de compostos orgânicos, sejam puros ou em misturas complexas. Além desta função, esta técnica pode auxiliar na avaliação da qualidade do produto obtido na secagem por aspersão. A figura 19 compara os espectros do extrato bruto (azul) e do extrato atomizado (preto).

Figura 20. Comparação entre os espectros do extrato bruto (em azul) e do extrato atomizado de *A. tomentosum* (em preto).



Fonte: Autor, 2012.

A tabela 5 mostra os valores dos estiramentos presentes nos espectros no infravermelho dos extratos bruto e atomizado e grupos químicos aos quais estão associados. Os estiramentos do extrato atomizado representam os valores da composição de extrato bruto e dióxido de silício coloidal.

**Tabela 5. Valores dos estiramentos na região do infravermelho dos extratos bruto e atomizado de *A. tomentosum* e grupos químicos característicos aos quais estão associados.**

Grupos característicos	Extrato bruto (cm <sup>-1</sup> )	Extrato atomizado (cm <sup>-1</sup> )
O–H	3233	3360
Csp <sup>3</sup> –H	2916	2916
	2847	2850
	1736	-
C=O	1701	1709
	1659	1651
	1609	1601
C=C de aromático	1558	1562
	1516	1512
	1454	1454
Csp <sup>3</sup> –H	1377	1375

Dentre os valores apresentados na tabela 5, dois chamam atenção: o deslocamento da banda da ligação O–H de 3233 para 3360 cm<sup>-1</sup>; e desaparecimento do estiramento em 1736 cm<sup>-1</sup>. Estes dados estão relacionados à presença do adjuvante. O dióxido de silício coloidal apresenta uma banda larga em 3700-3200 cm<sup>-1</sup> (Si–O–H), uma banda de baixa intensidade em 1740-1700 cm<sup>-1</sup> (Si=O) e uma banda larga e de alta intensidade próximo a 1100 cm<sup>-1</sup> (LONGHINI, 2006; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). A presença dos grupos OH do extrato e do adjuvante forma a banda larga com máximo em 3360 cm<sup>-1</sup>. O valor de 1709 cm<sup>-1</sup>, por sua vez, representa o máximo de absorção da banda que vai de 1755 a 1682 cm<sup>-1</sup>, englobando os três estiramentos em uma única banda.

A tabela 6 mostra os dados de comparação das deformações na região de “impressão digital” do espectro no infravermelho (LOPES; FASCIO, 2004). Os resultados exibidos na tabela 5 e 6, apresentando estiramentos compatíveis para o extrato antes e depois do processo de secagem, constituem um indicativo da qualidade do produto.

**Tabela 6. Valores das deformações na região do infravermelho dos extratos bruto e atomizado de *A. tomentosum*.**

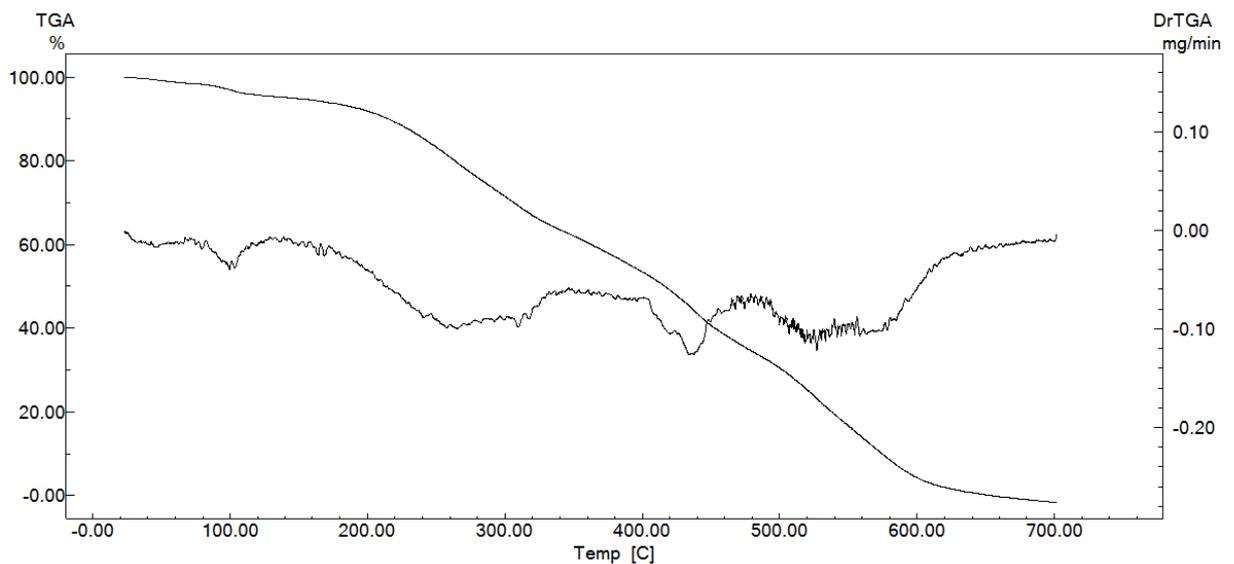
Extrato bruto (cm <sup>-1</sup> )	Extrato atomizado (cm <sup>-1</sup> )
1315	1315
1258	1259
1242	1243
1165	1165
1091	1088
1015	1014
864	868
822	818
790	787
718	714
671	680
637	636
602	602

### 5.3.2 Análises térmicas e determinação de umidade residual

O uso das análises térmicas no controle de qualidade e na padronização de extratos vegetais é bastante difundido, atuando como ferramenta em estudos de compatibilidade com excipientes (COSTA et al., 2011; MEDEIROS; MEDEIROS; MACÊDO, 2002). O comportamento térmico do extrato bruto (Figura 20; Tabela 7) e do extrato atomizado (Figura 21; Tabela 8) de *A. tomentosum* foi avaliado através de análise termogravimétrica.

A decomposição térmica do extrato bruto aconteceu em cinco estágios principais, o que é evidenciado pela derivada da curva termogravimétrica (Figura 20), sendo as duas primeiras perdas de massa atribuídas à umidade presente na amostra. As duas etapas seguintes constituem a decomposição térmica dos metabólitos secundários presentes na amostra e a última etapa caracteriza a carbonização da matéria orgânica restante. As etapas de decomposição térmica do extrato bruto estão descritas na tabela 7.

**Figura 21. Curva termogravimétrica do extrato bruto de *A. tomentosum*.**



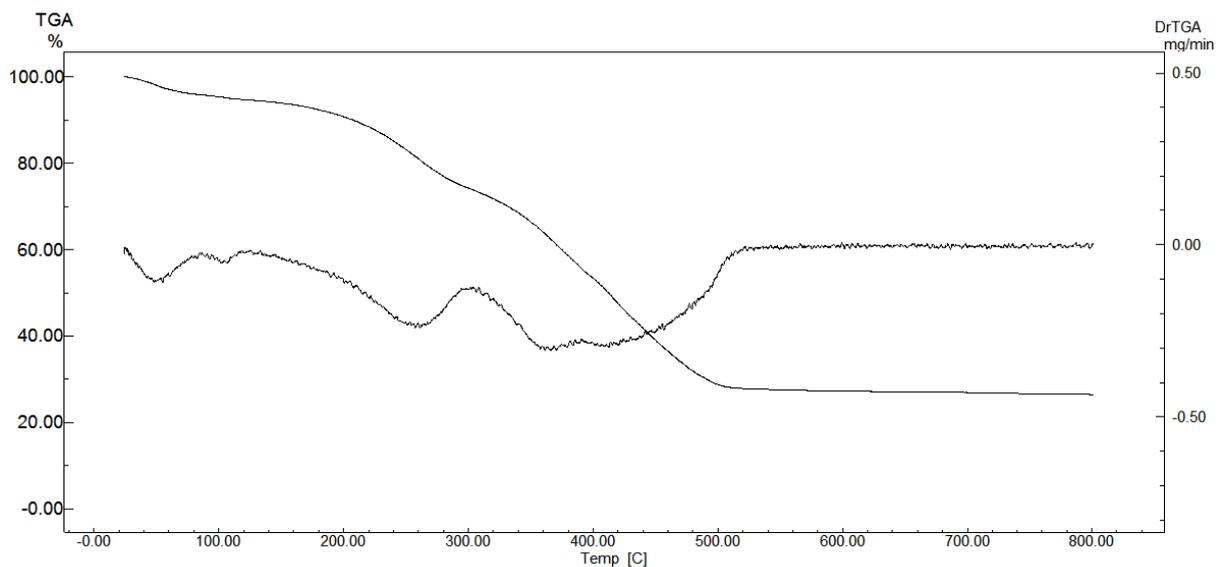
Fonte: Autor, 2012.

**Tabela 7. Etapas de perda de massa obtidas da curva termogravimétrica do extrato bruto de *A. tomentosum*.**

Etapas de decomposição térmica	T (°C)	Perda de massa (%)
1 <sup>a</sup>	23-70	1,531
2 <sup>a</sup>	71-132	3,163
3 <sup>a</sup>	133-347	32,857
4 <sup>a</sup>	348-477	27,398
5 <sup>a</sup>	480-660	34,770

A curva termogravimétrica do extrato atomizado apresenta quatro estágios de decomposição térmica, contrastando com os cinco estágios descritos para o extrato bruto. As duas primeiras etapas mostradas na derivada da curva (Figura 21), de forma análoga a do extrato bruto, são oriundas da presença de solvente residual na amostra de extrato atomizado e resultam na perda de 5,45% de massa (Tabela 8). A perda por dessecação, determinada em estufa, indica um valor de umidade residual compatível com o encontrado na análise termogravimétrica, de 5,4%.

**Figura 22. Curva termogravimétrica do extrato atomizado de *A. tomentosum*.**



Fonte: Autor, 2012.

**Tabela 8. Etapas de perda de massa obtidas da curva termogravimétrica do extrato atomizado de *A. tomentosum*.**

Etapas de decomposição térmica	T (°C)	Perda de massa (%)
1 <sup>a</sup>	23-84	4,21
2 <sup>a</sup>	85-123	1,24
3 <sup>a</sup>	124-301	20,56
4 <sup>a</sup>	302-525	46,31

No intuito de determinar de forma precisa o conteúdo de água do extrato atomizado, o método de Karl Fischer foi utilizado. A tabela 9 relaciona as massas de amostra analisadas às percentagens de água encontradas.

**Tabela 9. Determinação do conteúdo de água do extrato atomizado de *A. tomentosum*.**

Extrato bruto de <i>A. tomentosum</i> (mg)	Água (%)
25,6	5,36
26,1	5,19
27,2	5,31
Média (Desvio padrão)	5,287 ( $\pm 0,071$ )

O controle da umidade residual é fundamental, visto que o conteúdo de água influencia em outras propriedades do pó, como a densidade e a solubilidade (GOULA; ADAMOPOULOS, 2005), além de propiciar o crescimento microbológico e acelerar reações químicas, como processos de oxidação. A presença do dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem, além da temperatura de entrada do equipamento, auxilia na manutenção da baixa umidade requerida em um produto farmacêutico. (GALLO et al., 2011).

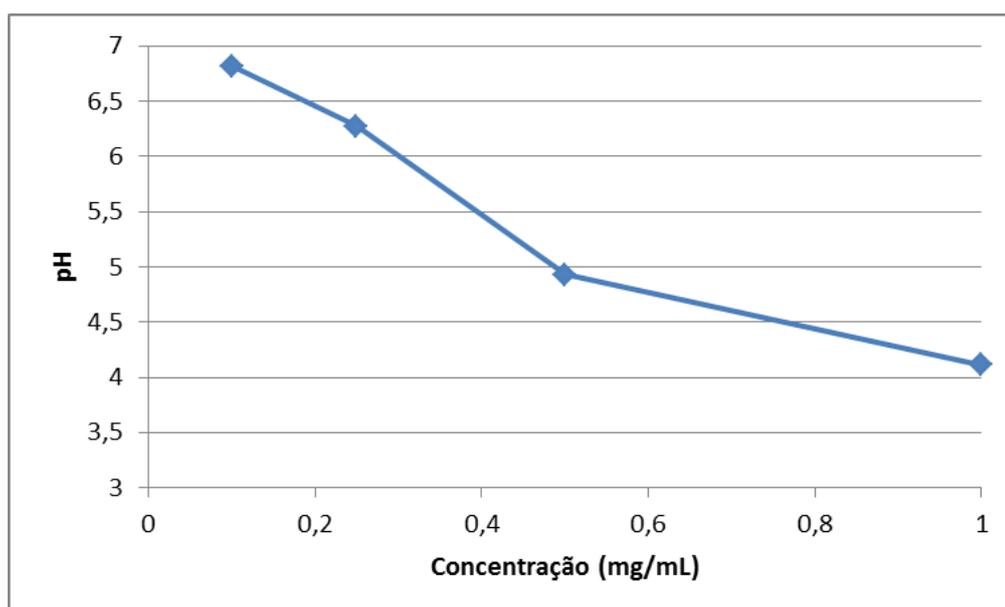
A terceira decomposição térmica ocorre entre 124 °C e 301 °C, com uma perda de massa mais significativa, 20,56%, que corresponde ao início da degradação dos metabólitos secundários presentes no extrato atomizado. O último estágio apresenta a maior perda de massa para as duas amostras estudadas. Contudo, o extrato atomizado origina um resíduo de massa ao final da análise maior do que o esperado. Apesar de a formulação ser composta de 10 % de Aerosil<sup>®</sup> e 90% de extrato bruto, o material submetido ao processo de secagem ainda

retém cerca de 27% de massa em temperatura superior a 600 °C. Um efeito semelhante foi observado em uma mistura binária de Aerosil® e ácido gálico (1:1) (LONGHINI, 2006), onde a formulação apresenta apenas 20% de perda de massa e não, os 50% esperados. Estes dados sugerem que houve acúmulo de dióxido de silício durante o processo de secagem.

### 5.3.3 Determinação do pH do extrato atomizado

O pH é um fator de grande importância para a qualidade de medicamentos, influenciando na velocidade de reações químicas e no crescimento microbológico (LIU et al., 2011). O pH do extrato atomizado foi determinado em solução com três concentrações: 0,5, 0,25 e 0,1 mg/mL (Figura 22). A tabela 10 relaciona os valores de pH às concentrações avaliadas.

**Figura 23. Valores de pH em função da concentração do extrato atomizado de *A. tomentosum*.**



Fonte: Autor, 2012

**Tabela 10. Valores de pH obtidos para soluções de extrato atomizado de *A. tomentosum* em diferentes concentrações.**

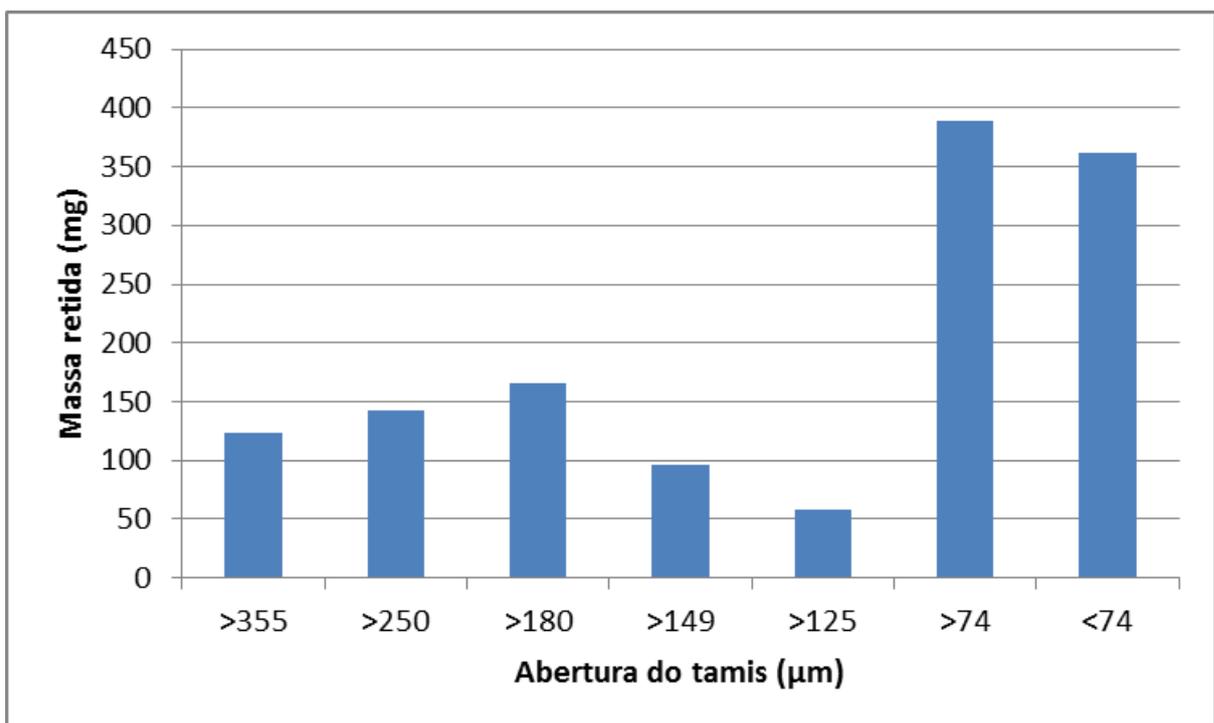
Concentração (mg/mL)	pH
0,1	6,82
0,25	6,27
0,5	4,93
1	4,11

Os valores de pH apresentados são coerentes com os dados apresentados na prospecção fitoquímica do extrato (quadro 4). A acidez do extrato é condizente com sua composição rica em compostos de natureza ácida, como os flavonoides descritos, e com a ausência de compostos alcaloídicos, que poderiam conferir alcalinidade à amostra.

#### 5.3.4. Análise Granulométrica

A granulometria do pó obtido pelo processo de aspersão foi expressa em função da abertura da malha dos tamises utilizados (BRASIL, 2010). Os resultados do ensaio de tamisação (Figura 23; Tabela 11) evidenciam que o produto se apresenta finamente dividido e que a maior parte do pó se encontra em uma faixa estreita de distribuição granulométrica.

**Figura 24. Determinação da distribuição granulométrica do extrato atomizado de *A. tomentosum*.**



Fonte: Autor, 2012.

A tabela 11 relaciona a massa retida em cada tamis, e a percentagem desta massa em relação ao total depositado no tamis superior, com o diâmetro de cada tamis usado.

**Tabela 11. Determinação da distribuição granulométrica do extrato atomizado de *A. tomentosum*.**

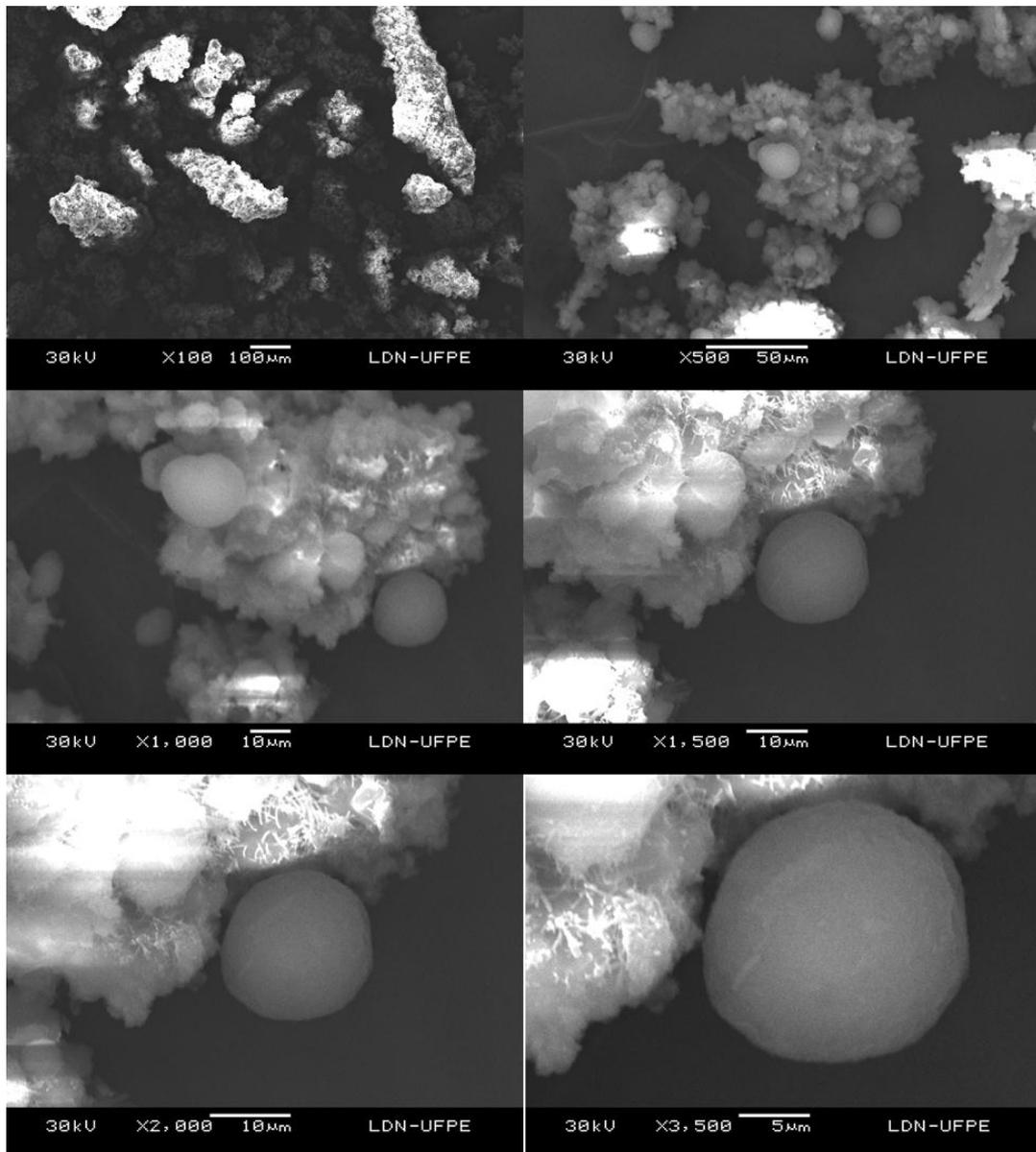
Abertura da malha ( $\mu\text{m}$ )	Massa retida (mg)	Massa retida (%)
355	123	9,3
250	142,9	10,7
180	165,8	12,4
149	95,8	7,3
125	58	4,5
74	389	28,8
Menor que 74	361	26,8

O tamanho de partícula exibido pela análise granulométrica do extrato atomizado se encontra dentro da faixa esperada para produtos obtidos por secagem em *spray dryer*, sendo o diâmetro médio, geralmente, inferior a 200  $\mu\text{m}$  (ÇELIK; WENDEL, 2005), contudo, valores maiores também são encontrados (COSTA et al., 2009). No presente estudo, cerca de 80% da massa do pó apresentou diâmetro inferior a 200  $\mu\text{m}$  e mais da metade (55,3%), menor que 125  $\mu\text{m}$ . Este tamanho reduzido é interessante como perspectiva para o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica sólida do extrato, pois pode propiciar, devido à alta superfície de contato que apresenta, maior velocidade de dissolução e, por conseguinte, contribuir para a absorção por via oral.

### 5.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das partículas foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A figura 24 mostra as fotomicrografias do extrato atomizado obtidas com aumentos entre 100 e 3500 vezes.

**Figura 25. Fotomicrografias do extrato atomizado de *A. tomentosum*.**



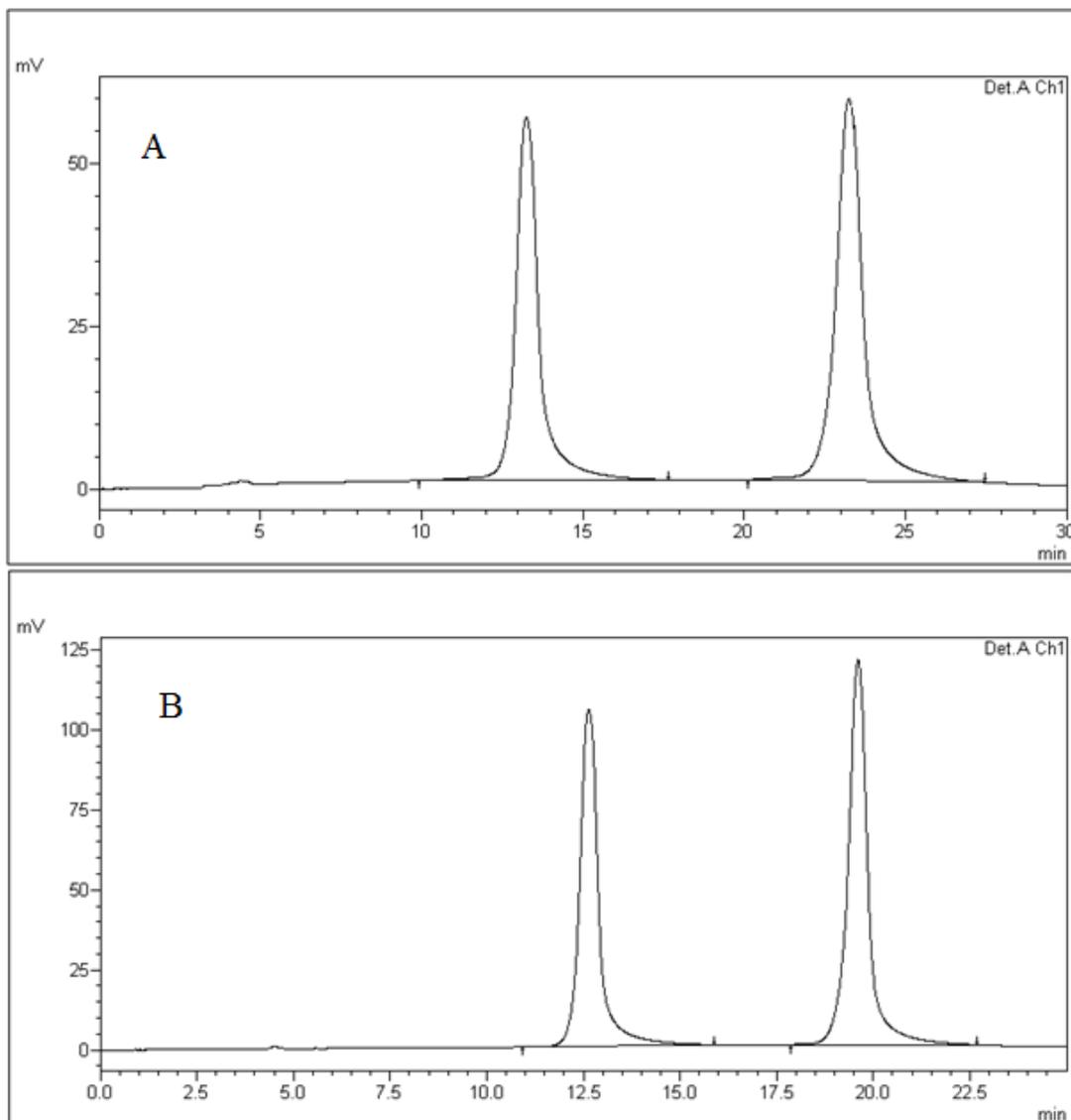
Fonte: Autor, 2012.

As fotomicrografias mostram aglomerados de partículas esféricas com diâmetros variando entre 10 e 20 μm. Tanto a forma esferoidal quanto o tamanho reduzido são características esperadas para produtos obtidos a partir do método de secagem em estudo (SOUZA, 2003; OLIVEIRA, 2007). A figura 24 mostra ainda que a distribuição granulométrica apresentada pelo extrato atomizado (Figura 23; Tabela 11) decorre da presença dos aglomerados das partículas esféricas.

#### 5.4 Determinação do teor de quercetina e isorramnetina no precipitado e nos extratos bruto e atomizado por HPLC

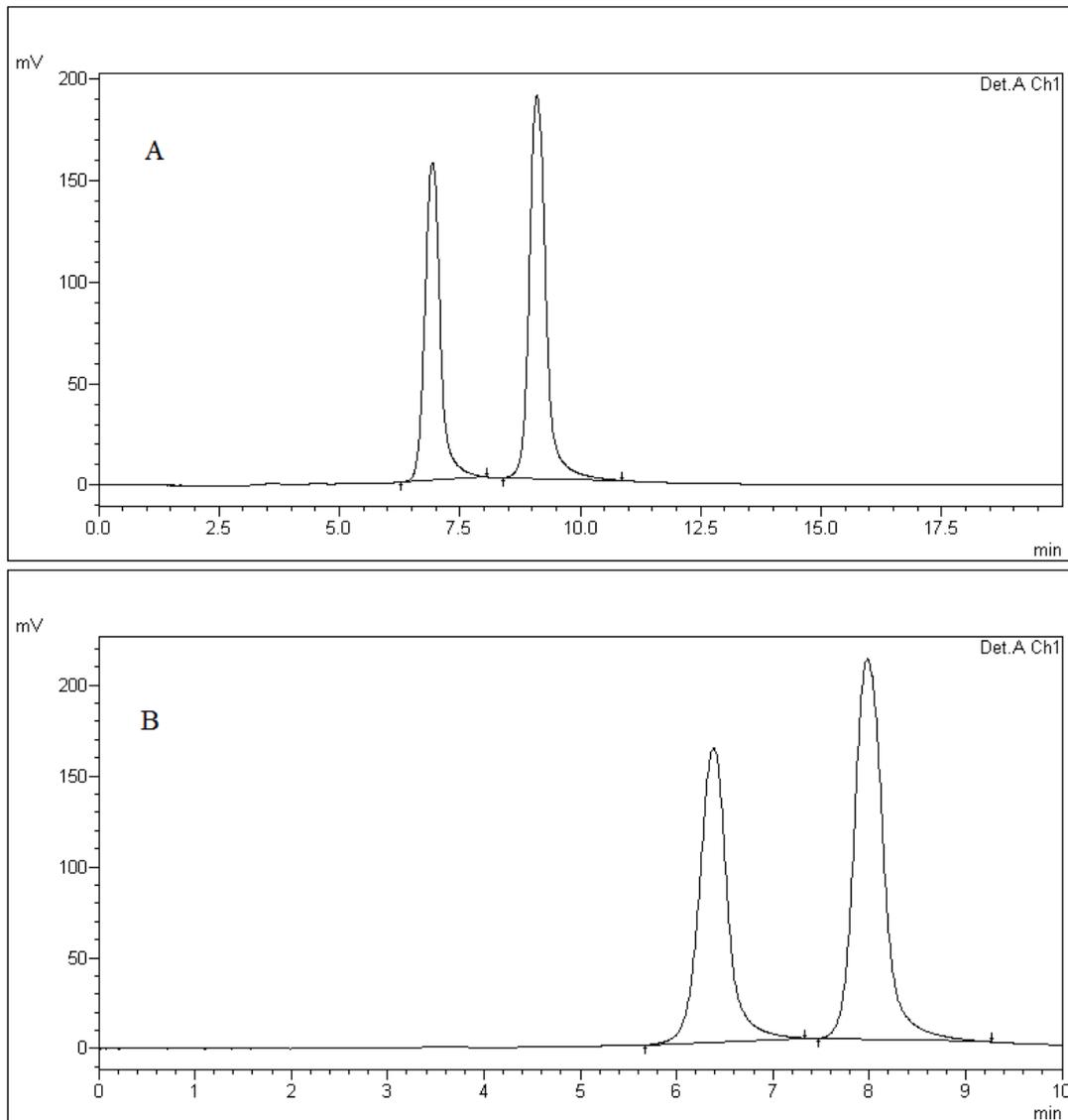
Inicialmente, foram estabelecidas condições de separação que proporcionassem resolução adequada entre as bandas dos dois flavonoides identificados na seção 5.1 e baixo tempo de análise, de forma a otimizar o experimento e evitar o desperdício de solvente. A eluição foi realizada com o sistema de solventes MeOH:CH<sub>3</sub>COOH (0,25%), de forma isocrática, nas seguintes proporções: 55:45; 60:40; 70:30; e 73:27. As figuras 25 e 26 mostram os cromatogramas do precipitado.

**Figura 26. Cromatogramas de ATppt com fase móvel MeOH:CH<sub>3</sub>COOH (A) 55:45 e (B) 60:40.**



Fonte: Autor, 2012.

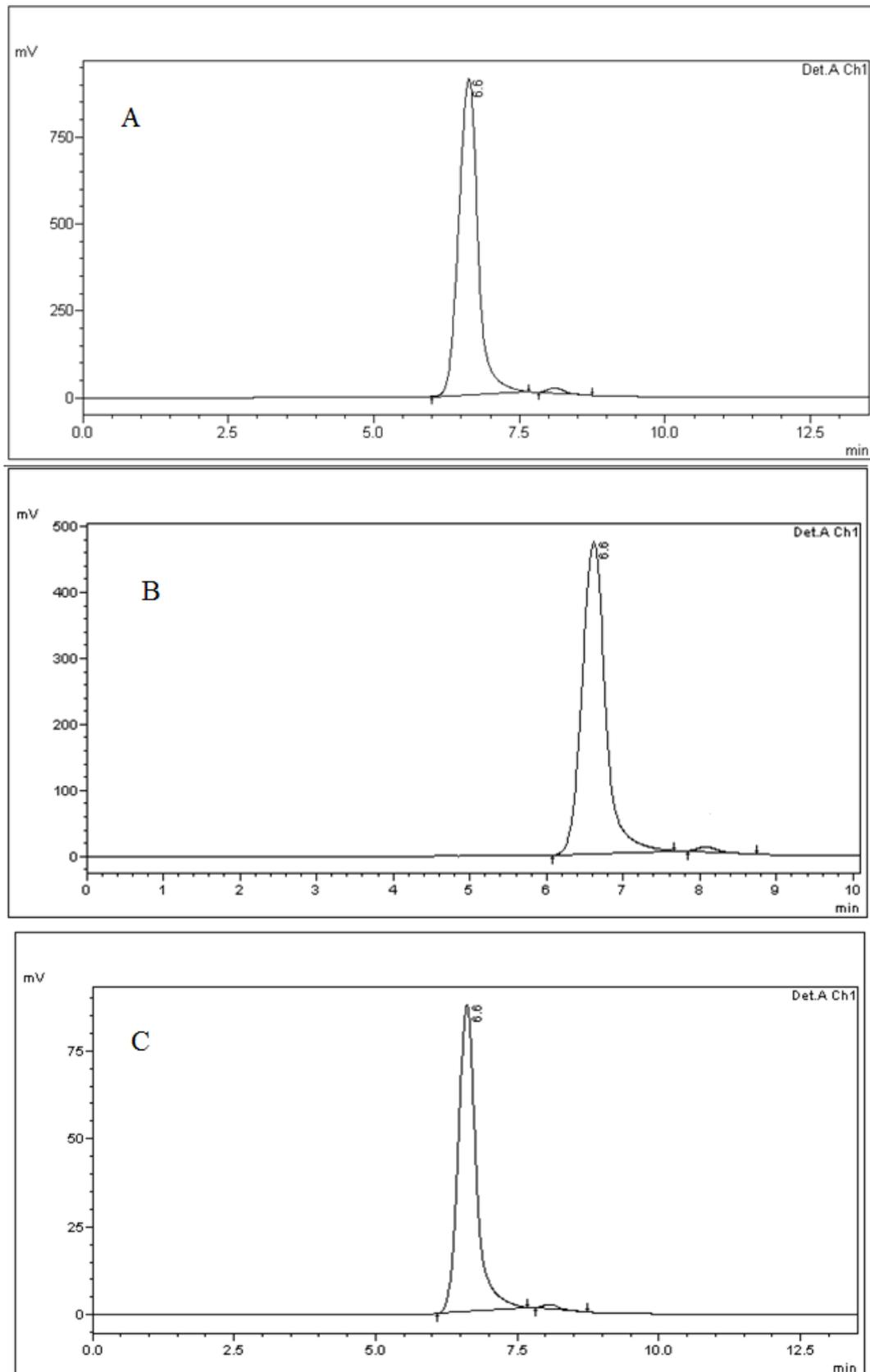
**Figura 27. Cromatogramas de ATppt com fase móvel MeOH:CH<sub>3</sub>COOH (A) 70:30 e (B) 73:27.**



Fonte: Autor, 2012.

Com base nos cromatogramas obtidos de ATppt, a fase móvel com metanol e ácido acético a 0,25% na proporção de 70:30 (Figura 26. A) foi escolhida para a quantificação subsequente. O passo seguinte consistiu na injeção de três concentrações do padrão de quercetina (20, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ) a fim de se estabelecer a relação entre a concentração de cada amostra injetada e a área sob a curva (ASC) gerada nos cromatogramas, mostrados na figura 27.

Figura 28. Cromatogramas do padrão de quercetina nas concentrações (A) 200  $\mu\text{g/mL}$ , (B) 100  $\mu\text{g/mL}$  e (C) 20  $\mu\text{g/mL}$ .



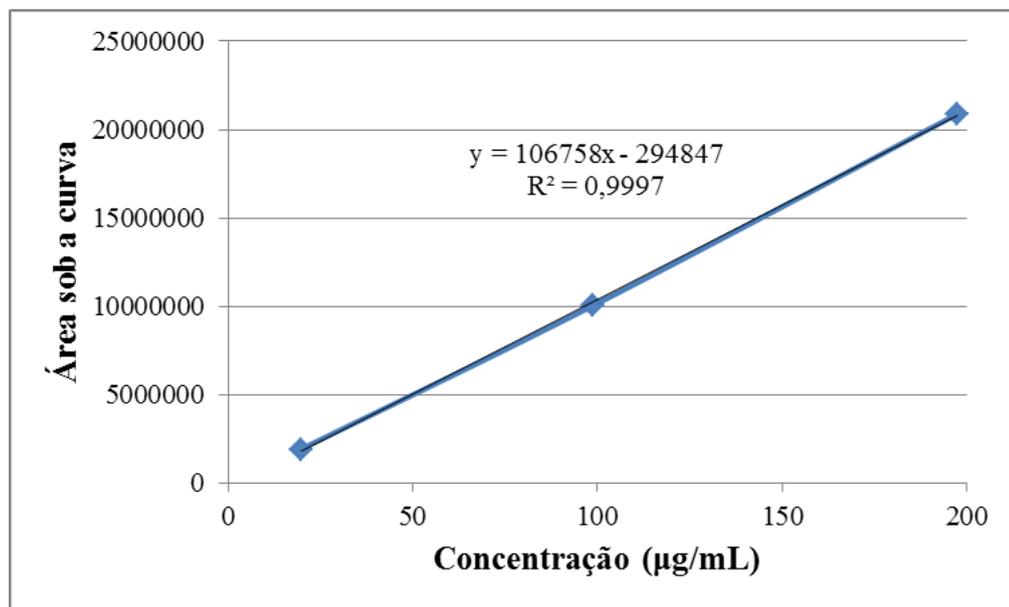
Fonte: Autor, 2012.

O padrão de quercetina, com 98,7% de pureza, apresenta tempo de retenção de 6,6 minutos nas condições estabelecidas e a área da banda (Tabela 12) é proporcional à concentração da amostra. A partir desta relação entre a área e a concentração foi construída a curva de calibração mostrada na figura 28, com a equação da reta representada por  $y = 106758x - 294847$  e que se mostrou linear no intervalo de estudo, com  $R^2 = 0,9997$ .

**Tabela 12. Relação entre os valores de concentração da solução de quercetina e a área sob a curva apresentada nos cromatogramas.**

Concentração do padrão de quercetina (98,7% puro) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração líquida de quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área sob a curva
20	19,74	1925905
100	98,7	10038087
200	197,4	20869790

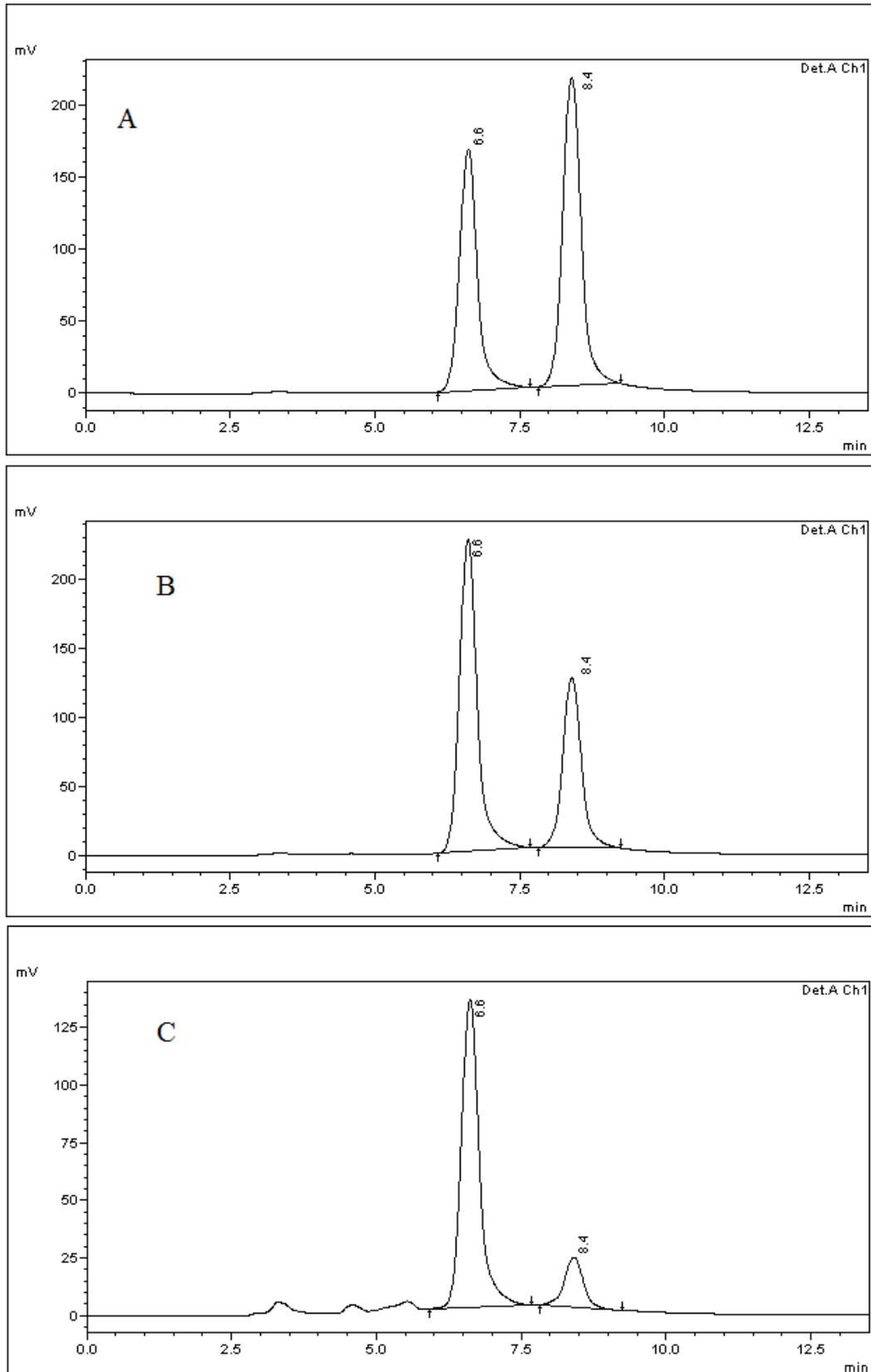
**Figura 29. Curva de calibração do padrão de quercetina mostrando a relação linear entre a concentração e a área sob a curva.**



Fonte: Autor, 2012.

As amostras dos extratos bruto e atomizado e de ATppt, na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , foram eluídas sob as mesmas condições utilizadas para o padrão de quercetina. Os cromatogramas para estas amostras são exibidos na figura 29.

Figura 30. Cromatogramas (A) de ATppt, (B) do extrato bruto e (C) do extrato atomizado de *A. tomentosum*.



Fonte: Autor, 2012.

Os cromatogramas (Figura 29) mostram um pico com tempo de retenção de 6,6 referente à quercetina e o pico da isorramnetina em 8,4 minutos. A comparação entre os valores de ASC obtidos para as amostras analisadas e a curva de calibração do padrão de quercetina permite estipular as concentrações dos flavonoides nos extratos bruto e atomizado e em ATppt (Tabela 13).

**Tabela 13. Relação entre a área sob a curva (ASC) e a concentração de quercetina e isorramnetina em ATppt e nos extratos bruto e atomizado de *A. tomentosum*.**

Amostras	ASC – quercetina	ASC - isorramnetina	Concentração de quercetina (µg/mL)	Concentração de isorramnetina (µg/mL)
ATppt	3631381	4769646	36,3	47,7
Extrato bruto	5053427	2872838	50,5	28,7
Extrato atomizado	2918781	496852	29,2	5

Os dados exibidos na tabela 13 confirmam a alta concentração destes compostos na parte da planta estudada, onde para o extrato bruto da casca do caule, a soma das concentrações dos dois flavonoides representa cerca de 44% da concentração injetada. Este resultado é ainda mais significativo quando comparado com o teor de flavonoides de matérias primas para produção de fitoterápicos à base de *Ginkgo biloba*, espécie conhecida pela produção desta classe de compostos, encontrado por Bara, Cirilo e Oliveira (2004), que variou de 22 a 28% para extratos secos padronizados obtidos de diferentes fornecedores.

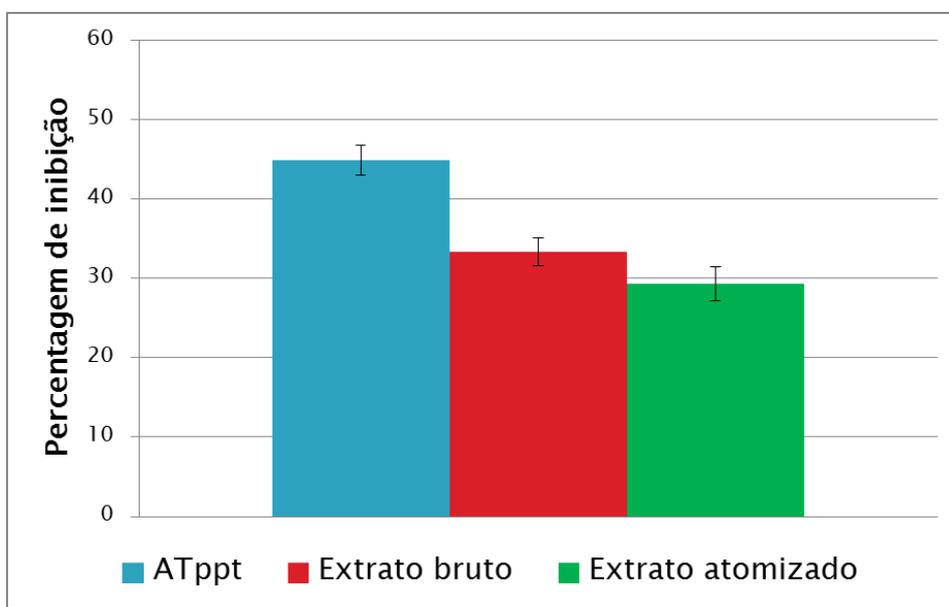
A figura 29 mostra a diferença da proporção entre os dois flavonoides no extrato bruto e no precipitado. Apesar de a concentração de quercetina ser maior no extrato, durante o processo de precipitação, maior quantidade de isorramnetina foi retida na fase sólida, evidenciando a diferença de solubilidade entre os dois compostos conferida pelo grupo OCH<sub>3</sub>. O extrato atomizado apresentou, por sua vez, teor dos dois compostos inferior ao esperado (17,3%), sobretudo para a isorramnetina. O cromatograma mostra ainda três bandas com tempos de retenção entre 3 e 6 minutos que, apesar da baixa concentração, podem indicar a presença de produtos de degradação oriundos da amostra. A degradação de compostos durante o processo de secagem não é comum, mas já foi reportada na literatura, Souza (2003), por exemplo, observou elevados valores de degradação de flavonoides em produto obtido em *spray dryer*.

Estes dados, associados aos resultados de termogravimetria (resíduo, acima de 600 °C, superior ao valor de 10% de dióxido de silício adicionado) (Figura 21), sugerem que, a concentração final de Aerosil<sup>®</sup> no produto pode ser maior do que a adicionada à formulação. A baixa solubilidade dos compostos estudados pode ser um dos motivos para este resultado.

### 5.5 Determinação da atividade antirradicalar pelo método de ABTS

A atividade antioxidante do extrato bruto, do extrato atomizado e de ATppt foi determinada pela captura do radical livre ABTS, o composto antioxidante trolox (ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico) foi usado como padrão para comparação e os resultados foram expressos como  $\mu\text{M}$  de equivalente trolox (RUFINO et al., 2007). As amostras foram preparadas com concentração de 0,5 mg/mL e, a partir destas, alíquotas de 2  $\mu\text{L}$  foram utilizadas para volume final de análise de 202  $\mu\text{L}$ , resultando em uma concentração final de 4,95  $\mu\text{g/mL}$ . A figura 29 mostra a percentagem de inibição equivalente a cada uma das amostras.

**Figura 31. Percentagem de inibição do radical ABTS para o ATppt, o extrato bruto e o extrato atomizado.**



Fonte: Autor, 2012.

A amostra de ATppt apresentou o maior valor de inibição do radical ABTS ( $44,9 \pm 1,9\%$ ), o que pode ser explicado devido à alta concentração de flavonoides presente no precipitado. O extrato atomizado mostrou a menor atividade antioxidante ( $29,3 \pm 2,2\%$  de inibição), embora sem diferença significativa em relação à atividade do extrato bruto ( $33,3 \pm 2,2\%$ ).

1,8% de inibição). Além da percentagem de inibição, os dados foram aplicados à curva de calibração do padrão trolox e a atividade foi avaliada em função deste, como  $\mu\text{mol}$  de trolox por grama de extrato. A tabela 14 relaciona os dados encontrados para as amostras em estudo a valores de antioxidantes descritos na literatura.

**Tabela 14. Comparação dos dados de atividade antioxidante (em  $\text{mmol}$  de eq. Trolox/g de amostra) com a literatura.**

<i>A. tomentosum</i>			Literatura		
ATppt	Extrato bruto	Extrato atomizado	Noz-pecã <sup>1</sup>	Quercetina <sup>2</sup>	Campferol <sup>2</sup>
3,54	2,6	2,28	2,6	4,7	1,34

<sup>1</sup>Extrato alcoólico da casca de noz-pecã (PRADO et al., 2009); <sup>2</sup> PIETTA, 2000

Os dados da tabela 14 evidenciam a importante atividade antioxidante encontrada para a casca do caule de *A. tomentosum*, onde as três amostras avaliadas apresentam efeito superior ao do campferol (PIETTA, 2000). O resultado do extrato bruto foi igual ao do extrato mais ativo de noz-pecã (*Carya illinoensis*), espécie rica em compostos antioxidantes (PRADO; ARAGÃO; FETT, 2009). O ATppt, como esperado, mostrou a maior atividade, novamente, devido à sua alta concentração de flavonoides. O menor valor observado para o extrato atomizado é coerente com os dados apresentados até aqui quanto à sua composição, contudo o produto obtido em *spray dryer* ainda apresenta atividade antioxidante elevada.

A atividade apresentada pelo extrato atomizado, apesar de consistir em menor quantidade de metabólitos secundários, como demonstrado pela análise térmica e pela quantificação por HPLC, mostra-se semelhante à do extrato bruto. Estes resultados mostram a importância do processo de secagem em *spray dryer* para extratos de plantas, sobretudo extratos ricos em compostos de baixa solubilidade, como os flavonoides.

## **6 Conclusões e Perspectivas**

---

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O estudo fitoquímico da casca do caule de *A. tomentosum* levou à identificação de dois flavonoides, quercetina e isorramnetina.

A espectroscopia na região do infravermelho indicou que as mesmas classes de compostos estão presentes no extrato antes e depois do processo de secagem. O produto seco apresentou rendimento de valor intermediário, estabilidade térmica adequada, com baixa umidade residual e tamanho de partícula reduzido.

A quantificação dos flavonoides no extrato atomizado evidenciou que houve redução da concentração destes compostos em relação ao extrato bruto durante o processo de secagem.

Todas as amostras testadas exibiram atividade antioxidante quando avaliadas pelo método do radical ABTS.

As principais perspectivas geradas por este trabalho são o desenvolvimento e a caracterização de uma formulação a partir do extrato atomizado de *A. tomentosum*, visando à produção de um fitoterápico.

## **Referências**

---

## REFERÊNCIAS

ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids**: Chemistry, biochemistry and applications. CRC Press, Taylor & Francis group, 2006.

ANDRADE-NETO, V. F. et al. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 3, p. 359-365, 2007.

AQUINO, A. B. **Avaliação do perfil anti-inflamatório e antinociceptivo da casca do caule de *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae)**. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.

AQUINO, E. M. **Análise química e biológica dos alcaloides de *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg. e *Aspidosperma tomentosum* Mart.** 2006. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. et al. Isolation and characterisation of the monoterpene indole alkaloids of *Aspidosperma pyriforme*. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, p. 183-188, 2007.

ARNDT, R. R. et al Alkaloid studies: LVIII: the alkaloids of six *Aspidosperma* species. **Phytochemistry**, v. 6, p. 1653-1658, 1967.

BARA, M. T. F.; CIRILO, H. N.; OLIVEIRA, V. Determinação de ginkgoflavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência em matérias-primas e produtos acabados. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 1, n.1, p. 1-7, 2004.

BARBOSA, L. F. et al. Chemical constituents from *Aspidosperma illustre* (Apocynaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 8, p. 1434-1438, 2010.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 13, n. 1, 1990.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 2009.

BOURDY, G. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 269-277, 2004.

BRANDÃO, G. C. et al. Antivaril activity of plants occurring in State of Minas Gerais (Brazil): part 3. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 4, p. 233-236, 2011.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 533, de 28 Março de 2012. Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 mar. 2012 Seção 1, p. 62.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMPOS, A. R. et al. Relaxant effects of an alkaloid-rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark on isolated rabbit corpus cavernosum. **International Journal of Impotence Research**, v. 20, p. 255–263, 2008.

CAMPOS, A. R. et al. Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 240-244, 2006.

ÇELIK, M.; WENDEL, S. C. Spray drying and pharmaceutical applications. In: PARIKH, D. M. **Pharmaceutical granulation technology**, 2. ed., Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2005. p. 129-158.

CHARNVANICH, D.; VARDHANABHUTI, N.; KULVANICH, P. Effect of cholesterol on the properties of spray-dried lysozyme-loaded liposomal powders. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 11, n. 2, p. 832-842, 2010.

COSTA, R. S. ET al. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 3, p. 169-174, 2009.

COUTO, R. O. Obtenção e caracterização do extrato seco padronizado da *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae). 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 26, 343–356, 2005.

DE SOUZA, A. C. M. et al. Propriedades antifúngicas dos alcaloides de *Aspidosperma ramiflorum*. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2006, Águas de Lindóia. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2006.

DE SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C. extracts by oral route. **Phytomedicine**, v. 14, p. 102-108, 2007.

FERNANDES, M. B. A. et al. Influence of drying methods over in vitro antitumoral effects of exopolysaccharides produced by *Agaricus blazei* LPB 03 on submerged fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 253-261, 2011.

FERREIRA, I. C. P. et al. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.

FOWLER, Z. L. et al. Development of non-natural flavanones as antimicrobial agents. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

FURTADO, F. F. Efeitos cardiovasculares induzidos pelo extrato etanólico de *Aspidosperma tomentosum* Mart. (Apocynaceae), em ratos. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal da Paraíba, 2009.

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

GOHEL, M. C. et al. Spray Drying: A review. **Pharmainfo**, 2009. Disponível em: <http://www.pharmainfo.net/reviews/spray-drying-review>. Acesso em: 25/04/2012.

GONNISEN, Y.; REMON, J. P.; VERVAET, C. Development of directly compressible powders via co-spray drying. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 220–226, 2007.

GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. **Nutrición Hospitalaria**. v. 22, n. 3, 287-93, 2007.

GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 7512-7515, 1997.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. The effect on powder properties. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 35–42, 2005.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**. v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics** v. 96, p. 67-202, 2002.

HWANG, S-L.; SHIH, P-H.; YEN, G-C. Neuroprotective Effects of Citrus Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 877–885, 2012.

Informação de produto. Mini Spray Dryer B-290. Disponível em:  
[http://www.buchi.com/Mini\\_Spray\\_Dryer\\_B-290.179.0.html](http://www.buchi.com/Mini_Spray_Dryer_B-290.179.0.html). Acesso em: 15/05/2012

JI, H-F; LI, X-J; ZHANG, H-Y. Natural products and drug Discovery. **European Molecular Biology Organization Reports**. v. 10, n. 3, 2009.

KOHN, L. K. et al. Antiproliferative activity of crude extract and fractions obtained from *Aspidosperma tomentosum* Mart. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, p. 110-115, 2006.

KURKIN, V. A.; PRAVDIVTSEVA, O. E. Flavonoids from the aerial part of *Hypericum perforatum*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, n. 5, p. 620-621, 2007.

LEE, E. et al. Effects of hydroxyl and methoxy substituents on NMR data in flavonoids. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 29, n. 2, p. 507-510, 2008.

LEÓN-MARTÍNEZ, F. M.; MÉNDEZ-LAGUNAS, L. L.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, J. Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on poder properties and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 864-870, 2010.

LIU, X. et al. Quality evaluation of *Panax notoginseng* extract dried by different drying methods. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 10-14, 2011.

LONGHINI, R. Avaliação de interações do ácido gálico frente a adjuvantes empregados em formas farmacêuticas sólidas. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

MA, K. L. M.; DOLAN, K. D. Effects of spray drying on antioxidante capacity and anthocyanidin content of blueberry by-products. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 7, p. 156-164, 2011.

MARKHAM, K. R.; TERNAL, B.  $^{13}\text{C}$  NMR of flavonoids – II. Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. **Tetrahedron**, v. 32, p. 2607-2612, 1976.

MARTINS, A. G.; GUTERRES, S. S.; ORTEGA, G. G. Anti-ulcer activity of spray-dried powders prepared from leaf extracts of *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2003.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza, EUFC, 1997.

MEDEIROS, A. C. D.; MEDEIROS, I. A.; MACÊDO, R. O. Thermal studies of *Albizia inopinata* crude extract in the presence of cyclodextrin and Aerosil<sup>®</sup> by TG and DSC coupled to the photovisual system. **Thermochimica Acta**, v. 392-393, p. 93-98, 2002.

MITAINE-OFFER, A. C. et al Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. **Phytochemistry**, v. 9, p. 142-145, 2002.

MOUSALLAMI, A. M. D. E.; AFIFI, M. S.; HUSSEIN, S. A. M. Acylated flavonol diglucosides from *Lotus polyphyllus*. **Phytochemistry**, v. 60, p. 807-811, 2002.

NANDIYANTO, A. B. D.; OKUYAMA, K. O. Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges. **Advanced Powder Technology**, v. 22, p. 1-19, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311–335, 2012.

OLIVEIRA, A. B. et al. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phythomedicines. Part I. Alkaloids. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v. 81, n. 4, p. 715-740, 2009.

OLIVEIRA, A. B. et al. Isolamento de alcalóides de *Aspidosperma tomentosum* biomonitorado por testes in vitro contra *Trypanosoma cruzi*. **III Semana de Pós-Graduação da UFMG**, 2001.

OLIVEIRA, A. J. B. et al. Preliminary Studies on the Antibacterial Activity of Ethanol Crude Extracts and Alkaloids from Species of *Aspidosperma*. **Pharmaceutical Biology**, **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 1085-1089, 2009.

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

OLIVEIRA, P. C. Obtenção e caracterização do extrato seco padronizado dos frutos da sucupira *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

PATEL, R. P.; PATEL, M. P.; SUTHAR, A. M. Spray drying technology: an overview. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 10, p. 44-47, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy**: A guide for students of organic chemistry, 3<sup>a</sup> ed, Thomson Learning, 2001.

PELOTTO, J. P.; DEL PERO, M. A. Flavonoids from *Aspidosperma quebracho-blanco* leaves. **Fitoterapia**, v. 66, n. 1, p. 88, 1995.

PELTER, A; WARD, R. S; GRAY, T. I. The Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids and related. **Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 2475-2483, 1976.

PEREIRA, M. M. et al. Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (APOCYNACEAE). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 970-983, 2007.

PEREIRA, M. M. et al. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 1-8, 2006.

PESSINI, G. L. et al. Evaluation of Antimicrobial Activity of Three Species of *Aspidosperma*. In: **XX Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina**, 2011.

PETROVICK, G. F. Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado revestido contendo produto seco por spray drying de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. Asteraceae (marcela). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2006.

PIETTA, P.-G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PRADO, A. C. P; ARAGÃO, A. M.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Kock]. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 4, p. 323-332, 2009.

REDE DE SEMENTES DO CERRADO. Disponível em <http://www.rededesementesdocerrado.com.br/> Acesso em: 20/04/2012.

REN, W. et al. Flavonoids: Promising anticancer agents. **Medicinal Research Reviews**. v. 23, n. 4, p. 519-534, 2003.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>+</sup>. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical, 4p, **Comunicado Técnico on-line**: 128, 2007.

SAKAMOTO-HOJO, E. T. et al. Clastogenic effect of the plant alkaloid ellipticine on bone marrow cells of Wistar rats and on human peripheral blood lymphocytes. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 199, n. 1, p. 11-19, 1988.

SANDHAR, H. K. et al. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1 n. 1, p. 25-41, 2011.

SHAM, J. O. H. et al. Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 457-467, 2004.

SILVA, E. M. et al. Inhibitory action of Cerrado plants against mammalian and insect  $\alpha$ -amylases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, p. 141-146, 2009.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1119-1128, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6<sup>a</sup> ed. Ed. LTC, 2000.

SOLLOHUB, K.; CAL, K. Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 587-597, 2010.

SOUZA, C. R. F. Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos *spray-dryer* e leito de jorro. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2003.

SPERLING, H. et al. An extract from the bark of *Aspidosperma quebracho blanco* binds to human penile  $\alpha$ -adrenoceptors. **The Journal of Urology**, v. 168, p 160-163, 2002.

TANAKA, J. C. A. et al. Antibacterial activity of indole alkaloids. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 387-391, 2006.

TANAKA, J. C. A. et al. Antileishmanial activity of índole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**, v. 14, p. 377-380, 2007.

TANTRY, M. A. Plant natural products and drugs: A comprehensive study. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 4, n. 6, p. 241-249, 2009.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoides as Nutraceuticals: A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 1089-1099, 2008.

TRINDADE, R. C. P. et al. Mortality of *Plutella xylostella* larvae treated with *Aspidosperma pyrifolium* ethanol extracts. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1813-1816, 2008.

VASCONCELOS, E. A. F. Et al. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 243-249, 2005.

VERPOORTE, R. et al. Medicinal Plants of Surinam III: Antimicrobially Active Alkaloids from *Aspidosperma excelsum*. **Planta Medicinal**, v. 48, n.8, p. 283-289, 1983.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WENIGER, B. et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 193-200, 2001.

WOODSON, R. E. Studies in the Apocynaceae. VIII. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 38, p. 119-206, 1951.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Fact Sheets: Fact Sheet N° 134 – Traditional Medicine. 2008. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>. Acesso em: 12/04/2012.

YOU DIM, K. A.; SHUKITT-HALE, B. JOSEPH, J. A. Flavonoids and the brain: interactions at the blood–brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 11, p. 1683–1693, 2004.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Cap. 23, p. 577-614. 6ª ed., Ed. UFRGS, Florianópolis, 2007.