



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA**

HEITOR RIBEIRO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE FORMULAÇÕES
CONTENDO EXTRATO ETANÓLICO DOS FRUTOS DE *Euterpe
oleracea* Mart. (AÇÁÍ)**

**Macapá
2017**

HEITOR RIBEIRO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE FORMULAÇÕES
CONTENDO EXTRATO ETANÓLICO DOS FRUTOS DE *Euterpe
oleracea* Mart. (AÇÁI)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Doutor em Inovação Farmacêutica.

Orientador: Prof. Tit. José Carlos Tavares
Carvalho

**Macapá
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

612.39
S586d Silva, Heitor Ribeiro da.

Desenvolvimento tecnológico de formulações contendo extrato etanólico dos frutos de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) / Heitor Ribeiro da Silva; orientador, José Carlos Tavares Carvalho; – Macapá, 2017.

135 f.

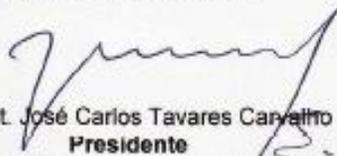
Tese (doutorado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica.

1. Antocianinas. 2. Nanopartículas. 3. Antioxidante. I. Carvalho, José Carlos Tavares, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

**Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica
da Universidade Federal do Amapá
BANCA EXAMINADORA**

Aluno: Heitor Ribeiro da Silva

Orientador: Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho


Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente

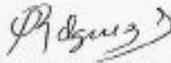
Professor Titular do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá


Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Jr
Membro Titular

Professor na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará


Profa. Dra. Lorane Izabel da Silva Hage Melim
Membro Titular

Professora do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá


Prof. Dr. Jesus Rafael Rodrigues Amado
Membro Titular

Professor na Facultad de Farmácia da Universidad de Oriente-Cuba


Prof. Dr. Rodrigo Alvez Soares Cruz
Membro Titular

Professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá

Data:

Dedico este trabalho...

A Deus

À minha querida avó Antonieta Soares, pelo apoio, cuidado e exemplo de vida constantemente

À minha esposa Mayara Brito de Sousa e minha filha Mariana Sousa da Silva que me fazem ser uma pessoa melhor a cada dia. Aos meus pais Edson e Edenise pelo amor, dedicação e apoio dispensados em todos os momentos da minha vida, juntamente com meu irmão Vitor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por absolutamente tudo.

À minha família, minha esposa e filha, meus maravilhosos pais, irmão e familiares pelo apoio, carinho e incentivo demonstrados em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Carlos Tavares pela orientação concedida, apoio e confiança que me foram depositados, além das oportunidades proporcionadas. Muito obrigado prof. José Carlos.

Ao Prof. Dr. Jesus Rafael Rodriguez Amado pelo grande apoio, pelos ensinamentos e paciência durante todo o suporte que me proporcionou durante o trabalho.

Ao Prof. Dr. Hady Keita pela contribuição nos estudos toxicológicos.

A Universidade Federal do Amapá e ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica, pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

À colega Daniele da Cruz de Assis por ser meu braço direito nos experimentos do trabalho.

À família do Laboratório de Pesquisa em Fármacos que todos os dias dispensa carinho e apoio.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica que acompanham nossos passos no cotidiano e servem sempre de inspiração.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros e profundos agradecimentos.

1 INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 AÇAÍ	16
2.1.1 Aspectos botânicos	16
2.1.1.1 Principais espécies	16
2.1.1.2 Descrição da planta	16
2.1.2 Aspectos economicos	18
2.1.3 Estudos biológicos	18
2.1.3.1 Aplicações tradicionais	18
2.1.3.2 Antioxidante	18
2.1.3.3 Anti-inflamatória	19
2.1.3.4 Efeitos na dislipidemia	19
2.1.4 Constituição fitoquímica	21
2.1.5 Aplicações	24
2.1.5.1 Bebidas de açaí e outros subprodutos	24
2.1.5.2 Biocosmética	25
2.1.5.3 Farmacêutica e aplicações funcionais	25
2 SUBSTÂNCIAS COM PROVÁVEL AÇÃO ANTIOXIDANTE PRESENTES NO AÇAÍ ..	27
2.2.1 Compostos polifenólicos	27
2.2.1.1 Antocianinas	28
2.2.1.1.1 Extração de antocianinas a partir de vegetais	29
2.2.1.1.2 Métodos de quantificação das antocianinas	30
2.2.1.1.3 Estabilidade das antocianinas	31
2.3 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES CONTENDO EXTRATOS VEGETAIS	32
2.3.1 Métodos para obtenção de comprimidos- compressão direta	33
2.3.2 Nanopartículas poliméricas	35
2.3.2.1 Nanopartículas poliméricas contendo extratos vegatis e bioativos	37
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 MATERIAL	42
4.1.1 Matéria-prima vegetal	42
4.1.2 Reagentes e soluções	42
4.1.3 Equipamentos	43
4.2 MÉTODOS	43
4.2.1 Obtenção e caracterização física e química do extrato etanólico dos frutos de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. (EEEE)	43
4.2.1.1 Processo de obtenção do EEEEO	43
4.2.1.1.1 Planejamento fatorial	43
4.2.1.1.2 Processo extrativo	44
4.2.1.1.3 Determinação do teor de sólidos	45
4.2.1.1.4 Determinação da densidade aparente	45
4.2.1.1.5 Determinação do pH	45
4.2.1.1.6 Determinação de fenóis totais	45

4.2.1.1.7 Determinação do teor de antocianinas totais	46
4.2.1.1.8 Análise de dados	46
4.2.2 Caracterização física e química do extrato etanólico liofilizado dos frutos de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. (EEEE)	47
4.2.2.1 Liofilização	47
4.2.2.2 Determinação do pH do EEEO	47
4.2.2.3 Determinação de perda por dessecação do EEEO	47
4.2.2.4 Determinação de cinzas totais do EEEO	48
4.2.2.5 Análise elementar por Espectrometria de Absorção Atômica do EEEO	48
4.2.2.6 Perfil por cromatografia em camada delgada (CCD) do EEEO	48
4.2.2.7 Perfil por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/UV) do EEEO	49
4.2.2.8 Perfil espectroscópico na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do EEEO	49
4.2.2.9 Perfil térmico do EEEO	49
4.2.2.10 Microscopia Eletrônica de Varredura do EEEO	49
4.2.2.11 Determinação do teor de antocianinas totais	50
4.2.2.12 Avaliação do potencial antioxidante por DPPH do EEEO	50
4.2.2.13 Teste de toxicidade aguda oral do EEEO em <i>Rattus norvegicus</i> linhagem Wistar fêmeas	51
4.2.2.13.1 Animais	51
4.2.2.13.2 <i>Screening</i> hipocrático	52
4.2.2.13.3 Avaliação ponderal	52
4.2.2.13.4 Consumo de água e ração	52
4.2.2.13.5 Análise macroscópica	53
4.2.2.13.6 Análise estatística	53
4.2.3 Desenvolvimento do sistema polimérico nanoparticulado contendo EEEO.....	53
4.2.3.1 Síntese do sistema polimérico nanoparticulado contendo EEEO	53
4.2.3.2 Caracterização do sistema polimérico nanoparticulado contendo EEEO	53
4.2.3.2.1 Determinação do diâmetro médio, potencial zeta e polidispersão do SPN contendo EEEO	53
4.2.3.2.2 Condutividade e pH dos SPN contendo EEEO	54
4.2.3.2.3 Eficiência de encapsulamento do SPN contendo EEEO	54
4.2.3.2.4 Avaliação de estabilidade por centrifugação do SPN contendo EEEO	54
4.2.3.2.5 Estudo de estabilidade do SPN contendo EEEO	54
4.2.4 Estudo da liberação <i>in vitro</i> de antocianinas totais pelo SPN após permeação em membrana sintética e biológica	55
4.2.4.1 Sistema de permeação (adaptado de Silva Júnior (2006) e Meira (2010))	55
4.2.4.2 Experimentos realizados em membrana sintética	56
4.2.4.3 Experimentos realizados em membrana biológica	56
4.2.5 Desenvolvimento da formulação de comprimidos contendo EEEO	57
4.2.5.1 Excipientes utilizados	57
4.2.5.2 Desenvolvimento e caracterização das formulações	57
4.2.5.2.1 Perfil de compactação	58
4.2.5.2.2 Determinação das densidades bruta e de compactação	58
4.2.5.2.3 Determinação do índice de compressibilidade	59
4.2.5.2.4 Determinação do tempo e velocidade de fluxo	59
4.2.6 Desenvolvimento e caracterização do comprimento	59
4.2.6.1 Determinação do peso médio	59
4.2.6.2 Perfil de compressão	60
4.2.6.3 Determinação da friabilidade	60
4.2.6.4 Determinação da dureza	60
4.2.6.5 Determinação do tempo de desintegração	60

4.2.6.6 Desenvolvimento do perfil de dissolução	60
4.2.6.6.1 Preparação do suco digestivo	61
4.2.6.6.2 Teste de dissolução	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 MATERIAL	62
5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO DOS FRUTOS DE <i>Euterpe oleracea</i> Mart. (EEEE)	62
5.2.1 Influência dos fatores experimentais no teor de sólidos totais	62
5.2.2 Influência dos fatores experimentais no teor de fenóis totais	65
5.2.3 Influência dos fatores experimentais no teor de antocianinas totais	67
5.2.4 Seleção das melhores condições do processo de extração	69
5.2.5 Caracterização física e química do extrato etanólico liofilizado dos frutos <i>Euterpe oleracea</i> Mart. (EEEE)	72
5.2.5.1 Determinação do pH, perda por dessecação e teor de cinzas totais do EEEO ..	73
5.2.5.2 Análise elementar por Espectrometria de Absorção Atômica do EEEO	74
5.2.5.3 Perfil por cromatografia em camada delgada (CCD) do EEEO	75
5.2.5.4 Perfil por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/UV) do EEEO	76
5.2.5.5 Perfil espectrocópico na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do EEEO	77
5.2.5.6 Perfil térmico do EEEO	78
5.2.5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura do EEEO	80
5.2.5.8 Determinação do teor de antocianinas totais do EEEO	80
5.2.5.9 Avaliação do sequestro de radicais por DPPH do EEEO	81
5.2.5.10 Teste de toxicidade aguda oral do EEEO	81
5.2.5.10.1 <i>Screening</i> hipocrático	81
5.2.5.10.2 Avaliação ponderal	82
5.2.5.10.3 Consumo de água e ração	83
5.2.5.10.4 Análise macroscópica dos órgãos	83
5.3 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA POLIÉRICO NANOPARTICULADO CONTENDO EEEO	84
5.3.1 Caracterização do sistema polimérico nanoparticulado contendo EEEO	85
5.3.2 Estudo da liberação <i>in vitro</i> de antocianinas totais pelo SPN após permeação em membrana sintética e biológica	91
5.4 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO DE COMPRIMIDOS CONTENDO EEEO	95
5.4.1 Obtenção e caracterização do EEEO por liofilização com adjuvantes	95
5.4.2 Desenvolvimento e caracterização do comprimido	99
5.4.3 Desenvolvimento do perfil de dissolução dos comprimidos contendo EEEO	106
6 CONCLUSÃO	108
REFERÊNCIAS	109
ANEXOS E APÊNDICES	130
ANEXO 1- Parecer do Comitê de Ética	130
APÊNDICE A. Artigo I	131
APÊNDICE B. Artigo II	132
APÊNDICE C. Artigo III	133
APÊNDICE D. Pedido de patente	134

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Principais antocianinas presentes na <i>Euterpe oleracea</i> Mart	23
Figura 2.	Cátion flavilium	28
Figura 3.	<i>Euterpe oleracea</i> Mart., família: Arecaceae, frutos maduros, árvore nativa no Recanto Santa Clara, Município de Mazagão-AP	42
Figura 4.	Sistema de permeação <i>in vitro</i>	56
Figura 5.	Perturbação da resposta teor de sólidos totais com fatores codificados	63
Figura 6.	Perturbação da resposta fenóis totais com fatores codificados	65
Figura 7.	Perturbação da resposta antocianinas totais com fatores codificados	67
Figura 8.	Perfil por CCD do EEEO e seus principais valores de Rfs. Rf1: 0,40 e Rf2: 0,54	68
Figura 9.	Perfil por CLAE/UV do EEEO e espectro UV do pico majoritário	76
Figura 10.	Espectro na região do infravermelho do EEEO	78
Figura 11.	Perfil térmico (DSC/TGA) do EEEO	79
Figura 12.	Aspecto macroscópico (A) e microscópico (por MEV, 6B) do EEEO. A fotografia A foi obtida por máquina fotográfica Canon (Japão)	80
Figura 13.	Efeito do tratamento por via oral do grupo controle (água destilada) e tratado (EEEO 2000 mg/Kg) sobre o desenvolvimento ponderal (g) de ratas Wistar, observadas por 15 dias	82
Figura 14.	Efeito do tratamento por via oral do grupo controle (água destilada) e tratado (EEEO 2000 mg/Kg) sobre o consumo de água (mL) de ratas Wistar, observadas por 15 dias	83
Figura 15.	Efeito do tratamento por via oral do grupo controle (água destilada) e tratado (EEEO 2000 mg/Kg) sobre o consumo de ração (g) de ratas Wistar, observadas por 15 dias	83

Figura 16.	Efeito do pH sobre o tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta	87
Figura 17.	Influência da temperatura sobre o tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta	88
Figura 18.	Tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta do SPN contendo EEEO armazenado em temperatura ambiente protegido da luminosidade	88
Figura 19.	Tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta do SPN contendo EEEO armazenado em temperatura ambiente e exposto à luminosidade	89
Figura 20.	Tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta do SPN contendo EEEO armazenado em estufa (50 °C ± 2)	89
Figura 21.	Teor de antocianinas totais do EEEO em solução aquosa (condição 1) e do SPN contendo EEEO em três condições experimentais	90
Figura 22.	Perfis de permeação para antocianinas totais presentes no SPN contendo EEEO determinadas por pH diferencial. Membrana sintética (acetato de celulose), Membrana biológica (pele suína)	92
Figura 23.	EEEO seco com dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina ..	96
Figura 24.	Espectros na região do infravermelho do EEEO, celulose microcristalina e dióxido de silício coloidal	96
Figura 25.	Curvas TG para EEEO (com adjuvantes), celulose microcristalina e dióxido de silício coloidal	98
Figura 26.	Curvas DSC para EEEO (com adjuvantes), celulose microcristalina e dióxido de silício coloidal	98
Figura 27.	Resultado da análise da equação de Heckel	103
Figura 28.	Relação entre dureza e friabilidade com a força de compressão	104
Figura 29.	Tempo de desintegração em relação à força de compressão	105
Figura 30.	Perfil de dissolução dos comprimidos contendo EEEO	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estudos farmacológicos e toxicológicos com <i>Euterpe oleracea</i> Mart., extratos e derivados	20
Tabela 2.	Formulações de sistemas nanoparticulados poliméricos contendo extratos vegetais	37
Tabela 3.	Formulações com ativos de origem natural	38
Tabela 4.	Matriz do planejamento experimental Fatorial 2^3 utilizado no processo de extração das antocianinas	44
Tabela 5.	Categorias das substâncias segundo a classe de toxicidade aguda (CTA)	51
Tabela 6.	Desenvolvimento da formulação com variação de estearato	58
Tabela 7.	Resultados da matriz experimental obtida para o processo de extração de antocianinas	62
Tabela 8.	Análise de variância para o modelo polinomial de primeiro grau ajustado para sólidos totais	63
Tabela 9.	Análise de variância para o modelo polinomial de primeiro grau ajustado para fenóis totais	66
Tabela 10.	Análise de variância para o modelo polinomial de primeiro grau ajustado para a raiz quadrada do teor de antocianinas	68
Tabela 11.	Restrições para a seleção do melhor processo de extração	70
Tabela 12.	Comparação estatística entre o resultado previsto e o observado utilizando a condição obtida com a função desejável	70
Tabela 13.	Tabela 13 - Determinação do pH, perda por dessecação, resíduo de evaporação e teor de cinzas totais do EEEO	73
Tabela 14.	Composição elementar do EEEO	74
Tabela 15.	Tempos de retenção, intensidade e absorções no UV dos picos encontrados no perfil por CLAE/UV do EEEO	76
Tabela 16.	Resultados físico-químicos da NP contendo EEEO	85
Tabela 17.	Efeitos da formulação sobre os níveis de permeação	92
Tabela 18.	Perfil de compactação das formulações testadas	99
Tabela 19.	Análise das propriedades de fluxo, densidade e volume bruto e de compactação	101
Tabela 20.	Perfil de compressão com as forças de compressão utilizadas	103

Tabela 21.	Análise de peso médio, coeficiente de variação e desvio padrão	105
Tabela 22.	Valores referências de dissolução em farmacopeias	107

A *Euterpe oleracea* Mart. é uma planta que apresenta vários estudos sobre sua composição e propriedades biológicas. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento tecnológico de formulações contendo extrato seco etanólico de *Euterpe oleracea* Mart. (EEEEO) e reportar de forma sistemática o emprego de metodologias de tecnologia farmacêutica por meio da caracterização física e química do EEEEO, obtido após planejamento experimental visando obter um maior teor de antocianinas, com controle desde a coleta até o desenvolvimento das formulações. Para caracterização do EEEEO utilizaram-se os parâmetros específicos para extratos vegetais contidos nas Farmacopeias Brasileira V e Americana (USP). Utilizou-se também técnicas como análise térmica, IFTR, espectroscopia de absorção atômica, MEV, CCD, CLAE e espectrofotometria no UV. O sistema polimérico nanoparticulado (SPN) foi obtido pelo método de nanoprecipitação. A caracterização envolveu a determinação do pH, tamanho de partícula, potencial zeta, eficiência de encapsulação e antocianinas totais. Todos os parâmetros mensurados foram avaliados frente a condições de estresse a curto e longo prazo. Os comprimidos foram desenvolvidos e caracterizados quanto às propriedades de fluxo, compactação, dureza, friabilidade, desintegração e perfil de dissolução. Foi avaliada a toxicidade aguda do EEEEO por via oral em *Rattus norvegicus* Wistar fêmeas. Quanto maior a quantidade de ácido acético, maior o teor de antocianinas totais. O SPN contendo EEEEO apresentou boa estabilidade e demonstrou ser adequado para prolongamento da vida útil de antocianinas do EEEEO. Observou-se a liberação de antocianinas totais do SPN em membrana sintética (1005,92 µg/mL) e biológica (940,11 µg/mL) em sistema de permeação. A formulação de comprimidos escolhida continha 0,11g de estearato de magnésio. O teste de dissolução mostrou que o comprimido apresenta liberação imediata. Não foi observada toxicidade aguda do EEEEO quando administrado por via oral em ratas. O EEEEO possui capacidade de sequestro de radicais com IC₅₀ para DPPH de 31,5 ± 2,31 ppm

Palavras-chaves: antocianinas, nanopartículas, comprimidos, antioxidante, açai, *Euterpe oleracea*.

Euterpe oleracea Mart. is a plant that presents several composition and biological studies. This work aimed the technological development of formulations containing hydroethanolic dry extract of *Euterpe oleracea* Mart. (EEEEO) and systematically report the use of pharmaceutical technology methodologies through the physical and chemical characterization of the EEEEO, which was obtained after an experimental design aiming to obtain a higher content of anthocyanins. The quality control has been done since the collection to the development of the formulations. The selection of the best form of extraction was done through a factorial design. To characterize the EEEEO, the specific parameters for plant extracts contained in the Brazilian and American Pharmacopoeias (USP) were used. In addition to the pharmacopoeial parameters, techniques such as thermal analysis, IFTR, atomic absorption spectroscopy, SEM, CCD, HPLC and UV spectrophotometry were used. The nanoparticulate polymer system (SPN) was obtained by the nanoprecipitation method. The characterization involved the determination of pH, particle size, zeta potential, encapsulation efficiency and total anthocyanins. All measured parameters were evaluated against short and long term stress conditions. The tablets were developed and characterized for flow properties, compaction, hardness, friability, desintegration and dissolution profile. Acute oral EEEEO toxicity was evaluated. It was observed that the higher amount of acetic acid, the higher total anthocyanins content. The SPN containing EEEEO showed good stability and proved to be adequate for prolonging the useful life of anthocyanins from açai. It was also observed the release of total anthocyanins from the synthetic and biological membrane SPN in a permeation system. The tablet formulation chosen contained 0.11 g of magnesium stearate. The dissolution test showed a tablet with virtually immediate release. No acute EEEEO toxicity was observed when administered orally in rats. The EEEEO has radical sequestration capacity with IC₅₀ for DPPH of 31.5 ± 2.31 ppm.

Keywords: anthocyanins, nanoparticles, tablets, antioxidant, acai, *Euterpe oleracea*.

O desenvolvimento, prospecção e avaliação biológica de formulações contendo extratos vegetais constituem fatores de extrema relevância para serem trabalhados no Brasil, ao considerar o grande potencial terapêutico das espécies vegetais do país. As plantas medicinais constituem fonte importante de produtos com atividades biológicas e muitos deles tornam-se protótipos para a síntese de um grande número de compostos bioativos. A utilização destas plantas ou de seus derivados ocupa considerável espaço na indústria farmacêutica.

Leva-se também em consideração o fato da pesquisa relacionada às plantas medicinais, com fins para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, ser atividade multiprofissional e interdisciplinar que podem melhorar a qualidade de vida da população. Isso se dá pela colaboração com o desenvolvimento de produtos de melhor qualidade e com a divulgação de informações científicas que possibilitem o uso racional das mesmas.

Entre estas espécies, destaca-se a *Euterpe oleracea* Mart. (Arecaceae), que é muito comum na Região Norte do país, popularmente conhecida como açaí. Inúmeras pesquisas descrevem a composição química do açaí, que é rico em polifenóis, com altos teores de antocianinas, compostos que possuem excelentes propriedades antioxidantes, assim como, diversas outras atividades biológicas já foram relatadas para esta espécie. Os frutos de açaí são, principalmente, usados para a produção de polpa congelada. No entanto, a alta perecibilidade destes é o principal fator limitante de sua vida de prateleira e produtos deles advindos.

Com este grande aporte de informações acerca do açaí, torna-se necessário propor formulações contendo partes da planta ou derivados dela, que ao mesmo tempo, possam oferecer a atividade visada e mostrar-se estável quanto aos seus constituintes. O trabalho suscita como alternativas para otimizar a estabilidade destes constituintes, bem como possibilitar sua utilização em preparações farmacêuticas, aqui duas formulações, que são um sistema polimérico nanoparticulado e comprimidos obtidos por compressão direta, ambas contendo extrato de *Euterpe oleracea* Mart.

Na área farmacêutica, sistemas poliméricos nanoparticulados são mais utilizados para a veiculação de fármacos, pois agregam vantagens como a possibilidade de evitar a destruição do ativo no trato gastrointestinal, no caso de administração oral e aumentar a

estabilidade frente a fatores ambientais, já que promovem proteção contra oxigênio, umidade, luz, entre outros.

Além disso, dependendo da matriz polimérica utilizada, possibilitam o aumento da solubilidade dos ativos e podem proporcionar uma liberação prolongada, diminuindo a flutuação da dose e a frequência de administração, devido ao aumento do tempo de efeito terapêutico, o que conseqüentemente facilita a adesão do paciente ao tratamento. A produção de sistemas poliméricos nanoparticulados contendo extrato de *Euterpe oleracea* Mart., dos frutos de açaí permite aplicações tecnológicas nas áreas alimentícia, cosmética e farmacêutica.

Já os comprimidos, que são formas farmacêuticas sólidas contendo princípios ativos, normalmente preparados com auxílio de adjuvantes farmacêuticos adequados, possuem vantagens como boa estabilidade físico-química, principalmente quando comparados a formas farmacêuticas líquidas, são de fácil fabricação, manuseio e transporte, podem ser obtidos em grandes quantidades por sistemas mais robustos de produção, boa apresentação, maior precisão de dosagem por unidade tomada e custo de produção viável.

Quanto a produção, a compressão direta requer uma área física menor e menos equipamentos e mão-de-obra, já que envolve somente três estágios: a pesagem dos pós componentes da formulação, a mistura destes e a compressão. Além disso, o método de compressão direta é o que melhor preserva a estabilidade dos componentes da formulação, quando comparado aos procedimentos que incluem granulação, já que não utiliza umidificação (adição de solução aglutinante) e aquecimento (secagem) durante a produção, que poderia comprometer a integridade dos componentes do extrato de *E. oleracea* Mart.

Por isso é considerado adequado para o processamento de substâncias higroscópicas e termolábeis, características estas muitas vezes típicas de extratos vegetais. Outra vantagem da compressão direta é a desintegração rápida do comprimido, em que as partículas do fármaco são liberadas facilmente dos excipientes do comprimido e ficam prontamente disponíveis para a dissolução.

Neste contexto, considerando a relevância econômica e ecológica da coleta dos frutos de *Euterpe oleracea* para comercialização na forma de polpa e o potencial para processamento de novos produtos de valor agregado. Neste trabalho foi proposto desenvolver formulações contendo extrato de *E. oleracea* Mart. (açaí), espécie vegetal de uso corrente na região que, se aproveitada em preparações farmacêuticas, pode surgir como opção para suporte à saúde e utilização na indústria farmacêutica.

2.1 AÇAÍ

2.1.1 Aspectos botânicos

2.1.1.1 Principais espécies

O açazeiro pertence à família *Arecaceae* que possui, aproximadamente, 200 gêneros e cerca de 2.600 espécies, com distribuição tropical e subtropical em sua maior parte (JONES, 1995).

Os números de espécies do gênero apresentam diferenças em revisões. Pode-se observar em alguns estudos, além do açazeiro, mais 48 espécies, distribuídas na América do Sul e na América Central (GLASSMAN, 1972). Porém, na revisão proposta por Uhl e Dransfield (1986) constam 28 espécies, corroborado por outros autores (CHOI *et al.*, 1998), enquanto Henderson e Galeano (1996) consideram apenas 7 espécies como componentes do táxon *Euterpe*.

As mais importantes espécies nativas do Brasil são *E. oleracea*, que é o foco deste trabalho, *E. edulis* e *E. precatória*. A primeira, popularmente conhecida como palmito, ou também "açai-do-Pará" e "açai verdadeiro", foi durante muitos anos a principal fonte de matéria-prima para a indústria de palmito em conserva, com relativa diminuição nos dias atuais por esgotamento das reservas naturais. A segunda apresenta usos no setor agroindustrial, como a principal fonte de extração de palmito e pela utilização de seus frutos em menor escala que as outras duas. A última espécie também produz frutos com o mesmo uso do açai e palmito (MUÑIZ-MIRETS *et al.*, 1996; CHOI *et al.*, 1998).

2.1.1.2 Descrição da planta

O açazeiro é uma palmeira cespitosa, com até 25 estipes por touceira em estágios de desenvolvimento diferenciado. Os estipes das plantas adultas apresentam altura e diâmetro variando entre 3 m e 20 m e 7 cm e 18 cm, respectivamente, sustentando, em sua porção terminal, um conjunto de 8 a 14 folhas, sendo cilíndricos, externamente lisos,

de cor cinza, com manchas de líquens (HENDERSON; GALEANO, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1998).

As folhas, são compostas, pinadas de arranjo espiralado, com 40 a 80 pares de folíolos, opostos ou sub-opostos e inseridos em intervalos regulares. Os folíolos são pendentes nos indivíduos adultos e ligeiramente horizontais nos indivíduos jovens, com base obtusa e extremidade apical pontiaguda, apresentando comprimento entre 20 cm e 50 cm e largura entre 2 cm e 3 cm. Em cada folíolo encontra-se uma nervura central, proeminente na face adaxial e mais dois conjuntos com duas ou três nervuras, proeminentes na face abaxial, uniformemente distribuídos em relação ao plano divisório da nervura central (PRANCE; SILVA, 1975; HENDERSON; GALEANO, 1996).

A inflorescência é infrafoliar, desenvolvendo-se em maior intensidade após a queda da folha e quando aberta apresenta-se disposta quase horizontalmente. Possui pedúnculo, com comprimento entre 5 cm e 15 cm e diâmetro entre 2,7 cm e 4,0 cm (HENDERSON; GALEANO, 1996).

É envolvida totalmente por duas brácteas: uma espatela ligular e uma espata de formato navicular e de consistência cartácea-coriácea. As flores estaminadas e pistiladas, encontram-se inseridas em alvéolos, com disposição ordenada em tríades, de tal forma que cada flor feminina fica ladeada por duas flores masculinas (CAVALCANTE, 1991; HENDERSON; GALEANO, 1996), com exceção do terço terminal de cada ráquila (onde as flores encontram-se inseridas em alvéolos), que apresenta, na maioria dos casos, somente flores masculinas, o que proporciona a presença de 80,5% de flores masculinas e apenas 19,5% de flores femininas na inflorescência (CALZAVARA, 1972).

O fruto é uma drupa globosa ou levemente depressa, apresentando resíduo do estigma lateralmente, com diâmetro variando entre 1 cm e 2 cm e pesando, em média, 1,5 g. O epicarpo, na maturação, é roxo ou verde. O mesocarpo, com cerca de 1 mm de espessura, é polposo, envolvendo um endocarpo volumoso e duro que acompanha, aproximadamente, a forma do fruto e contém em seu interior uma semente, com embrião diminuto e endosperma abundante e ruminado (CAVALCANTE, 1991; HENDERSON; GALEANO, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1998).

O sistema radicular é do tipo fasciculado relativamente denso, com raízes emergindo do estipe da planta adulta em altura de 30 cm a 40 cm acima da superfície do solo (HENDERSON; GALEANO, 1996). As raízes são providas de lenticelas e aerênquimas e prolongam-se, superficialmente, por até cerca de 3,0 m a 3,5 m da base do estipe, em indivíduos com três anos de idade, podendo, em plantas com mais de dez anos, atingir 5 m a 6 m de extensão (MENEZES NETO, 1994).

2.1.2 Aspectos econômicos

A região norte do Brasil possui grande movimento econômico devido o interesse na polpa do Açaí e no palmito em conserva (GALOTTA; BOAVENTURA; LIMA, 2008). Os números anuais giram em torno de 200 milhões de dólares, sendo 10% da exportação de palmitos de outros países, evidenciando a grande participação do Brasil neste cenário (ROGEZ, 2000).

O estado do Pará foi o principal contribuinte na produção nacional de açaí, com 50,8% da produção nacional neste mesmo ano. Combinado com a produção de outros estados, tem-se cerca de 215,3 mil toneladas, aproximadamente US\$ 700.000 (VERA DE ROSSO *et al.*, 2008).

O chamado vinho do açaí, é obtido a partir dos frutos do açazeiro, após amolecimento com água quente e despulpamento manual ou mecânico (CALZAVARA, 1972). O açaí faz parte da dieta complementar de boa parte das famílias de estados da região norte do Brasil (CALZAVARA, 1972; MUNIZ-MIRET *et al.*, 1996; ROGEZ, 2000; SCHAUSS *et al.*, 2006a).

2.1.3 Estudos biológicos

2.1.3.1 Aplicações tradicionais

A medicina tradicional, em alguns casos, passa a ser a única forma de tratar as necessidades da população, devido as dificuldades de algumas regiões, por serem distantes dos grandes centros, com difícil acesso e deslocamento da população (GALOTTA; BOAVENTURA; LIMA, 2005).

O uso da *E. oleracea* como planta medicinal é identificado em diversos países. Na Guiana Francesa, por exemplo, é usada em combinação com outras plantas medicinais, como antimalárico. A parte mais usada da planta é a raiz (VIGNEROM *et al.*, 2005).

Ainda na Guiana Francesa é possível encontrar registros do uso do açaí como agente no tratamento da leishmaniose, o uso é subcutâneo. Há relatos do uso no tratamento para diarreia na Colômbia e Suriname (GALLORI *et al.*, 2004; PACHECO-PALENCIA; MERTENS-TALCOTT; TALCOTT, 2008; ODONNE *et al.*, 2011).

2.1.3.2 Antioxidante

O açaí é bastante conhecido e estudado por sua atividade antioxidante, pela riqueza em compostos fenólicos, principalmente antocianinas, proantocianinas e outros (SANTOS *et al.*, 2008). Segundo Spada *et al.* (2009), o fruto e a polpa do açaí congelada são ricos em compostos fenólicos responsáveis pela atividade antioxidante. Neste estudo, os autores demonstraram a atividade antioxidante da polpa do açaí no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de ratos tratados com peróxido de hidrogênio oxidante (H₂O₂).

Os compostos fenólicos que tem grande contribuição para atividade antioxidante são as antocianinas. Muitas atividades farmacológicas podem ser identificadas nas antocianinas como anticarcinogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante (BOBBIO *et al.*, 2000; MENEZES; TORRES; SRUR, 2008).

Hogan *et al.* (2010) relataram em seu trabalho uma investigação sobre as propriedades antioxidantes e antiproliferativas em células de glioma C6, células de cérebro de ratos MDA-468 e células humanas de câncer de mama, do extrato rico em antocianinas proveniente do açaí. O estudo mostrou que o extrato induziu a apoptose das células de glioma C6. O teste também foi conduzido com outras frutas ricas em antocianinas, porém os autores não encontraram nenhum efeito supressor contra as células de glioma C6.

2.1.3.3 Anti-inflamatória

Além da grande quantidade de compostos fenólicos, o açaí também tem um alto teor lipídico, que pode estar ligado à diminuição do processo inflamatório (FAVACHO *et al.*, 2011). A parte lipídica da polpa do açaí apresenta cerca de 24% de ácidos graxos saturados, 59% de ácidos graxos monoinsaturados e 17% de ácidos graxos poliinsaturados (ROGEZ, 2000).

Por ter efeitos sobre a inibição das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) e na inibição de lipopolissacarídeo (LPS) que induz a formação do óxido nítrico, o açaí é considerado um possível agente anti-inflamatório (SCHAUSS *et al.*, 2006).

2.1.3.4 Efeitos na dislipidemia

Estudos têm demonstrado que consumir alimentos ricos em antioxidantes pode alterar o metabolismo lipídico e a homeostase da glicose, o que reduz significativamente as complicações da diabetes tipo 2 e síndrome metabólica (DEMBINSKA-KIEC *et al.*, 2008).

Em 2011, foi realizado um estudo com 10 participantes, 5 homens e 5 mulheres, com sobrepeso. Os pacientes consumiram durante 1 mês a polpa do açaí. Os níveis de glicose desses pacientes diminuíram, de $98,0 \pm 10,1$ mg/dl para $92,8 \pm 10,9$ mg/dl ($p=0.018$). Houve também redução nos níveis de colesterol total, e uma diminuição não muito significativa foi detectada nos níveis de triglicérides VLDL (UDANI *et al.*, 2011).

Outros estudos demonstram também uma melhora no perfil lipídico, em ensaios realizados em animais com uma dieta induzindo a hipercolesterolemia (DE SOUZA *et al.*, 2010). Foi observado que os componentes presentes no açaí induziram um efeito vasodilatador de longa duração em vasos mesentéricos de ratos, o que possibilita o uso do açaí no tratamento de doenças cardiovasculares (ROCHA *et al.*, 2007). A Tabela 1 contém estudos farmacológicos e toxicológicos com *Euterpe oleracea* Mart., extratos e derivados.

Tabela 1 - Estudos farmacológicos e toxicológicos com *Euterpe oleracea* Mart., extratos e derivados

ATIVIDADE	AUTORES	IN VIVO/ IN VITRO	BIOMODELO/ENSAIO
Antioxidante	CHIN <i>et al.</i> , 2008	<i>in vitro</i>	DPPH
	CHOI <i>et al.</i> , 1998	<i>in vitro</i>	DPPH e ensaio do ânion superóxido
	DE BEM <i>et al.</i> , 2014	<i>in vivo</i>	Modelo com ratos: primeiro sistema de defesa antioxidante
			Modelo com ratos: oxidação proteica e primeiro sistema de defesa antioxidante
	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2010	<i>in vivo</i>	primeiro sistema de defesa antioxidante
	GORDON <i>et al.</i> , 2012	<i>in vitro</i>	TEAC e TOSC
	HOGAN <i>et al.</i> , 2010	<i>in vitro</i>	TEAC e TOSC
	KANG <i>et al.</i> , 2010	<i>in vitro</i>	ORAC
	LICHTENTHALER <i>et al.</i> , 2005	<i>in vitro</i>	TOSC
	PACHECO-PALENCIA <i>et al.</i> , 2008	<i>in vitro</i>	TEAC
	ROJANO <i>et al.</i> , 2011	<i>in vitro</i>	ABTS, DPPH, FRAP e ORAC
	RUFINO <i>et al.</i> , 2010	<i>in vitro</i>	ABTS, DPPH e FRAP
	SANTOS <i>et al.</i> , 2008	<i>in vitro</i>	ABTS
	SCHAUSS <i>et al.</i> , 2006b	<i>in vitro</i>	SOD, ORAC, NORAC, HORAC e TAO
	SPADA <i>et al.</i> , 2009	<i>in vitro</i>	SOD-TBARS
		SNAP com cultura de célula.	
MATHEUS <i>et al.</i> , 2006	<i>in vitro</i>	Capacidade de aprisionamento de óxido nítrico	
ROCHA <i>et al.</i> , 2007	<i>in vivo</i>	Modelo com ratos: Determinação de	

formação de NO			
Antineoplásica	DEL POZO-INSFRAN <i>et al.</i> , 2006	<i>in vitro</i>	Proliferação celular e apoptose
	HOGAN <i>et al.</i> , 2010	<i>In vitro</i>	Ratos, indução da apoptose de células C-6 de glioma cerebral
	SILVA <i>et al.</i> , 2014	<i>In vitro</i>	Linha celular humana, potencial antitumorigênico na linha celular MCF-7
Anti-inflamatória	FAVACHO <i>et al.</i> , 2010	<i>in vivo</i>	Modelo com ratos: edema
	KANG <i>et al.</i> , 2011	<i>in vivo</i>	Ratos, SEAP
	SCHAUSS <i>et al.</i> , 2006b	<i>in vivo</i>	Ratos, inibição ciclooxigenase (COX) - 1 e COX-2
	MATHEUS <i>et al.</i> , 2006	<i>In vitro</i>	Ratos, Produção de NO na linha de células de macrófagos
Genotoxicidade	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2010	<i>in vivo</i>	Modelo com ratos: teste de micronúcleos e ensaio cometa
Citoproteção	CHIN <i>et al.</i> , 2008	<i>in vitro</i>	Culturas de células MCF-7 estressadas por H ₂ O ₂
Dislipidemia	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2010	<i>in vivo</i>	Modelo com ratos: Hipocolesterolêmico
	UDANI <i>et al.</i> , 2011	<i>in vivo</i>	Sobrepeso humano, avaliação do perfil lipídico e do parâmetro metabólico
	XIE <i>et al.</i> , 2011	<i>in vivo</i>	Modelo com ratos: aterosclerose

2.1.4 Constituição fitoquímica

A espécie *E. oleraceae* é conhecida por ser rica em polifenóis, flavonoides e antocianinas (GALLORI *et al.*, 2004; SCHAUSS *et al.*, 2006a; CHIN *et al.*, 2008; PACHECO-PALENCIA; DUNCAN, TALCOTT, 2009). Tanto que amostras liofilizadas foram utilizadas para obter padrões isolados de cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina- 3-O-rutinosídeo (Figura 1) (GOUVEA *et al.*, 2012).

As antocianinas são glicosídeos de antocianidinas. Pertencentes à classe de flavonoides e possuem, no seu núcleo básico, o íon 4-hidroxi-flavilo. A elas têm sido atribuídas a cor de uma determinada variedade de vegetais, principalmente a cor púrpura, assim como a atividade antioxidante do fruto (MUÑIZ-MIRET *et al.*, 1996; DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2006).

Segundo Lichtenthaler *et al.* (2005) os níveis de antocianinas contidos na polpa de açaí preparada com frutos coletados a partir das mesmas árvores em diferentes anos estão entre 88-211 mg/L.

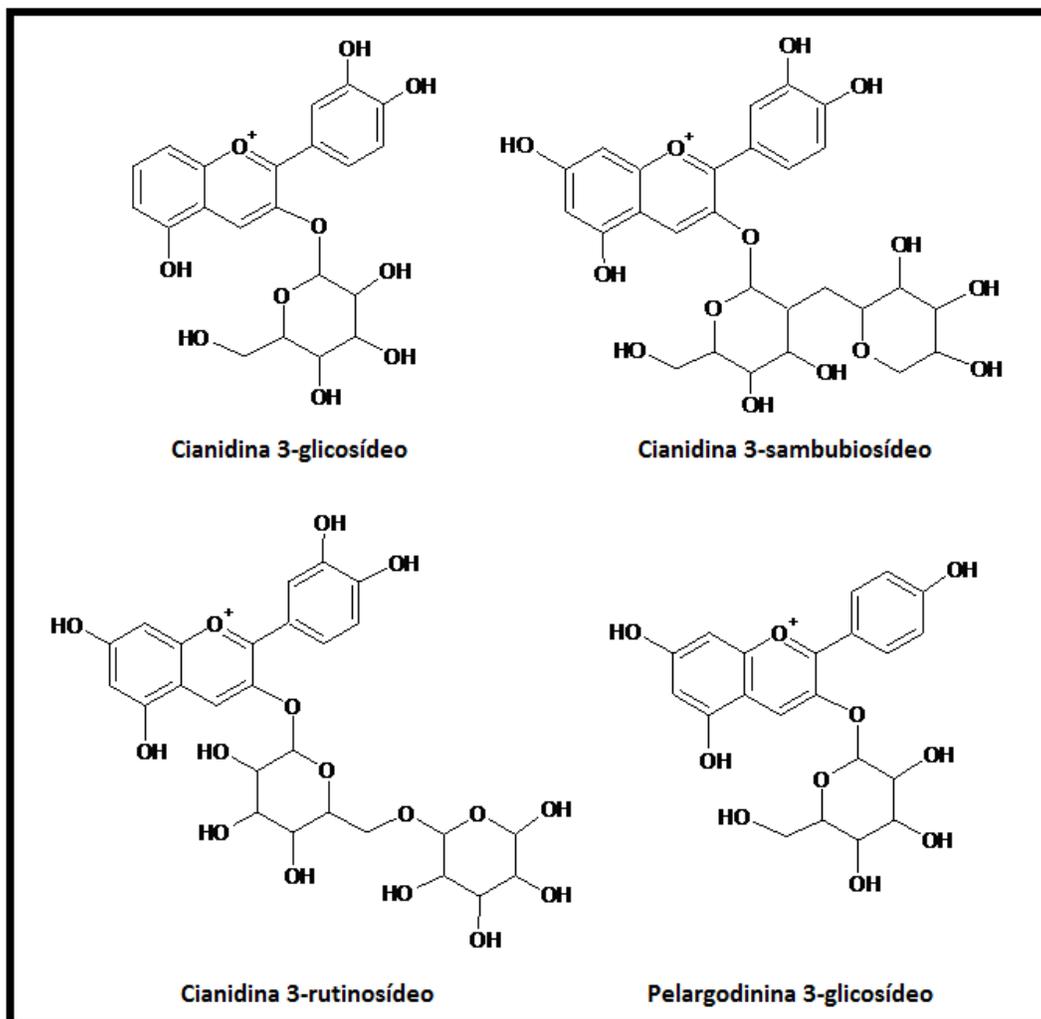
As principais antocianinas no açaí são cianidina 3-O-glicosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo (GALLORI *et al.*, 2004; LICHTENTHALER *et al.*, 2005; SCHAUSS *et al.*, 2006b.; VERA DE ROSSO *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2010).

Outras antocianinas foram encontradas em menores quantidades. Estas incluem peonidina-3-rutinosídeo e peonidina 3-glicosídeo que foram relatadas com teor de 2 mg GAE (ácido gálico) /100 g e 4 mg GAE/100 g, respectivamente (SCHAUSS *et al.*, 2006a). Além disso, certas antocianinas tais como cianidina 3-arabinosilarabinosídeo, cianidina 3-arabinosídeo, cianidina 3-acetil hexose foram mencionadas (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2004).

Dias *et al.* (2012) conseguiram extrair os compostos lipofílicos e quantificar as antocianinas utilizando um método UHPLC-PDA. Cianidina-3-arabinosídeo e cianidina-3-arabinosil-arabinosídeo foram relatadas como os principais compostos de antocianinas presentes, além da presença também de outras 3 antocianinas minoritárias (peonidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo e peonidina-3-rutinosídeo). A detecção pela primeira vez de cianidina-di-O-glicosídeo também foi relatada.

No açaí os principais flavonoides (além de antocianinas) encontrados são a quercetina, e orientina e seus derivados, bem como proantocianidinas. Este grupo representou aproximadamente 1289 mg / 100 g de peso seco (LICHTENTHALER *et al.*, 2005; PACHECO-PALENCIA; DUNCAN, TALCOTT, 2009; SCHAUSS *et al.*, 2006a). Outros flavonóides que têm sido descritos são epicatequina, catequina, rutina, orientina, homoorientina, isovitexina, escoparina, taxifolina desoxihexose, apigenina, crisoeirol, di-hidrocaempferol, velutin, 5,4'-di-hidroxi-7, 3',5'-trimetoxi flavona, luteolina diglicosídeo e dímeros procianidina (BOBBIO *et al.*, 2000; GALLORI *et al.*, 2004; DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2006; SCHAUSS *et al.*, 2006b; VERA DE ROSSO *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2010; ROJANO *et al.*, 2011).

Figura 1: Principais antocianinas presentes na *Euterpe oleraceae* Mart.



Alguns dados sobre a ação antioxidante das espécies são conflitantes. Del Pozo-Insfran *et al.* (2004), concluíram que as antocianinas foram o fator predominante para a capacidade antioxidante do açaí, inclusive, maior que a uva muscadínia e vários outros frutos. Schauss *et al.* (2006b) e Ribeiro *et al.* (2010) relataram baixo a moderado conteúdo de compostos fenólicos no açaí reponsáveis por esta ação (13,9 mg/g GAE).

Em relação ao perfil fenólico, na caracterização descrita por Del Pozo-Insfran *et al.* (2004), os ácidos fenólicos predominantes em ordem decrescente na polpa de *E. oleracea* foram: ácido ferrúlico, p-hidroxibenzóico, gálico, protocatéquico, elágico, vanílico, ácidos p-cumáricos e ácido elágico glicosídico. Estes compostos foram identificados por HPLC e espectrometria de massa.

Este perfil de compostos fenólicos mais tarde foi confirmado por outros estudos e, adicionalmente, outras substâncias (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2004; GALLORI *et al.*,

2004; LICHTENTHALER *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2010; ROJANO *et al.*, 2011; GORDON *et al.*, 2012).

Usando os ensaios ORAC, CAP-e e ROS, Kang *et al.*, (2010), relacionou a ação antioxidante do açaí a sete flavonóides (orientina, homoorientina, vitexina, luteolina, criseriol, quercetina, e di-hidrocaempferol).

Um grande número de ácidos graxos é citado como: linoleico (LA, 12,5%), ácido oleico (OE, 56,2%) e palmítico (24,1%) (SCHAUSS *et al.*, 2006a). LA pode contribuir para um efeito cardioprotetor e junto com OE melhorar perfis lipídios (BHATTACHARYA *et al.*, 2006). Um grande número de outros ácidos graxos também é relatado no mesmo estudo. Esses resultados estão em concordância com os achados por Mantovani *et al.* (2003), que efetuaram um estudo das diferentes partes da semente de *E. oleracea* (pericarpo, endocarpo e toda a fruta).

Nascimento *et al.* (2008), utilizando a extração enzimática, demonstrou a composição da fração lipídica de *E. oleracea*, que compreende dos cerca de 71% de ácidos graxos insaturados, 60,8% monoinsaturados e 10,3% de poli-insaturados.

Schauss *et al.* (2006a) também relataram o perfil de aminoácidos e 0,48 mg/g de peso seco de esteróis, com 0,44 mg de b-sitosterol. Nos óleos fixos de *E. oleracea* houve um perfil semelhante ao descrito para as polpas, em que entre os principais compostos fenólicos estavam: ácido gálico, cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutinosídeo. A principal diferença foi a presença de luteolina-8-C-glicosídeo (orientina) e luteolina-6-C-glicosídeo (homo-orientina) em maiores quantidades do que no trabalho relatado por outros autores (SILVA; ROGEZ, 2013).

Pequenas quantidades de carotenóides, b-caroteno, a-caroteno, luteína e de a-tocoferol foram detectadas na polpa de *E. oleracea* (RIBEIRO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2013). Conforme Darnet *et al.* (2011), a polpa de açaí é rica em tocoferóis (A, B, C e δ-tocoferol) e conta com a presença de vitamina E (394 µg/g de material seco em questão de α-tocoferol).

Outros 22 compostos dos frutos de *E. oleracea* foram identificados por Chin *et al.* (2008), incluindo nove lignanas, três flavonoides, três monoterpenoides e dois norisoprenoides.

2.1.5 Aplicações

2.1.5.1 Bebidas de açaí e outros subprodutos

Inúmeros produtos como bebidas isotônicas, sucos concentrados, polpas de fruta, óleos para o uso farmacêutico são fabricados a partir do sumo de açaí. A extração do suco de açaí é efetuada por meio de processos que podem ser mecânicos ou manuais. Para essa extração é utilizada água e maquinaria adequada para o processo de despulpamento do fruto. Segundo a regulamentação do Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento, o suco do açaí pode ser classificado dependendo da quantidade de água usada durante o processo de extração da polpa do fruto (ROGEZ, 2000; NOGUEIRA; FIGUEIREDO; MULLER, 2005).

A polpa do açaí pode ser consumida de diversas formas já conhecidas, como sorvetes, geleias e cremes. E novas formas estão sendo introduzidas no mercado, na busca por diversificar ainda mais o uso do açaí, produtos como o licor de açaí, o açaí em pó, ou pasteurizado, açaí com leite condensado (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2001; ALEXANDRE; CUNHA, 2004; HOMMA *et al.*, 2006; DHANJI; PAGLIARUSSI, 2010).

Muitos avanços na produção e consumo do açaí tem acontecido no ramo das indústrias de bebidas. No entanto, ainda existe uma limitação na disponibilidade do sumo no mercado mundial. Tornando mais prudente, devido ao avanço das indústrias de bebidas funcionais, usar apenas o extrato do açaí como um aromatizante natural (BALASWAMY *et al.*, 2011; BOGHANI; RAHEEM; HASHMI, 2012).

Com o constante aumento de consumo do açaí nas grandes cidades brasileiras e estrangeiras, há necessidade de uma padronização da qualidade desse produto (PAGLIARUSSI, 2010).

2.1.5.2 Biocosmética

O uso do açaí em cosméticos já é bastante estudado, cerca de 34 empresas trabalham hoje com o açaí em suas formulações com linhas de produtos que abrangem desde xampus a cremes antirrugas, que apresentam em sua composição o óleo ou extrato do açaí. Como o açaí apresenta um alto teor de antocianinas, que pertence ao grupo de compostos fenólicos (bioativos que apresentam importantes funções e ações biológicas, por ter essa atividade antioxidante), tem sido utilizado com apelo para o tratamento e prevenção de alterações cutâneas (PACHECO-PALENCIA *et al.*, 2009; HOGAN *et al.*, 2010; YUYAMA *et al.*, 2011; HERCULANO, 2013).

2.1.5.3 Farmacêutica e aplicações funcionais

Segundo Clewell *et al.* (2010) em seu estudo com o medicamento 112 graus para disfunção erétil, em sua composição havia L-tirosina, um aminoácido não-essencial, extrato de semente da *Tribulus terrestris*, extrato da raiz de *Panax ginseng*, raiz de *Butea superba*, raiz de *Pueraria mirifica* e frutos da *E. oleracea*. O estudo afirma que o medicamento 112 graus não apresenta risco toxicológico e funciona da forma esperada em ratos.

Córdova-Fraga *et al.* (2004) mostram em seu trabalho outra maneira de usar o açaí. Como agente de contraste em exames de ressonância magnética no trato gastrointestinal. Na análise da composição do açaí a presença de ferro, manganês e cobre foi constatada. Com testes de comparação usando agentes de contraste já disponíveis no mercado, água e o açaí que não tem nenhuma garantia de eficácia. Os resultados da comparação demonstraram que a ingestão de açaí aumenta a definição do exame, afirmando o potencial do uso clínico do açaí.

O uso de intermediários vem chamando a atenção na área de produtos funcionais, como a pasta de açaí desidratado. Esse processo de desidratação que a polpa do açaí passa, é considerado um método de conservação, que também aumenta seus benefícios (CARNEIRO *et al.*, 2012).

A partir do processo de liofilização, que consiste na retirada de água do produto por sublimação, é obtido o pó liofilizado de açaí, que pode ser encontrado em formulações de diversos suplementos. Diferentes formas farmacêuticas podem apresentar esse pó, como cápsulas e comprimidos, mas também pode ser encontrado em bebidas energéticas, aditivos de sucos concentrados, iogurtes (VANDRESEN *et al.*, 2009).

Diante disso Constant (2003) desenvolveu em seu trabalho um método para a extração de antocianinas do açaí. Uma solução foi preparada de maltodextrina e b-ciclodextrina; a solução foi seca por meio de liofilização. O aditivo foi aplicado em uma bebida isotônica, iogurte e como um pó. O aditivo de cor de açaí foi comparado com um outro aditivo que está disponível no mercado, fabricado a partir das antocianinas encontradas na uva. Os resultados demonstraram que o corante de açaí foi mais eficiente, apresentando uma cor mais estável por um tempo mais prolongado. Foi observado que o aditivo de açaí não pode ser usado em bebidas isotônicas devido a degradação de antocianinas que ocorre.

Monteiro (2011) avaliou o processo de produção do açaí em pó desengordurado, com dois métodos de desidratação, secagem por *spray drying* e liofilização. Oito ensaios foram desenvolvidos para a escolha da temperatura de entrada de ar e concentração do

agente carreador. A temperatura do ar de entrada escolhida foi 104°C, e 5% de maltodextrina (agente carreador).

As três amostras (açai em pó com maltodextrina, sem maltodextrina e açai liofilizado) foram submetidas a análise de rendimento do pó, percentual de lipídeos, teor de antocianinas, molhabilidade e cor. O açai liofilizado apresentou maior teor de antocianinas, 8,6 mg/g de pó desengordurado, e lipídios cerca de 99% de rendimento do óleo.

2.2. SUBSTÂNCIAS COM PROVÁVEL AÇÃO ANTIOXIDANTE PRESENTES NO AÇAÍ

2.2.1 Compostos polifenólicos

Polifenóis são os agentes antioxidantes mais abundantes da dieta humana e encontram-se divididos em classes, sendo que as principais são os ácidos fenólicos e os flavonoides. Os polifenóis, junto com outros compostos redutores presentes na dieta humana, tais como vitamina C, vitamina E e carotenoides, protegem os tecidos do corpo contra estresse oxidativo e patologias associadas como cânceres, doenças coronarianas e inflamações (TAPIERO *et al.*, 2002; KARAKAYA, 2004)

O consumo humano diário de flavonoides varia de 6 a 64 mg, podendo chegar até 1 g por dia. Estes compostos, exclusivamente produzidos por vegetais, são bastante encontrados em chás verdes, frutas, verduras, plantas medicinais, vinhos tintos e fitoterápicos. Mais de 4000 flavonoides já foram estudados, sendo conhecidas suas estruturas e atividades biológicas. São divididos em diferentes classes: antocianinas, flavanas, flavononas, flavonas, flavonóis e isoflavonoides (MIRANDA, 2005; NINFALI *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

Os antioxidantes fenólicos interagem, preferencialmente, com o radical peróxil por ser este mais prevalente na etapa da autoxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio (DECKER, 1998). O radical fenoxil resultante, embora relativamente estável, pode interferir na reação de propagação ao reagir com um radical peróxil, via interação entre radicais. O composto formado, por ação da luz ultravioleta e temperaturas elevadas, poderá originar novos radicais, comprometendo a eficiência do antioxidante, que é determinada pelos grupos

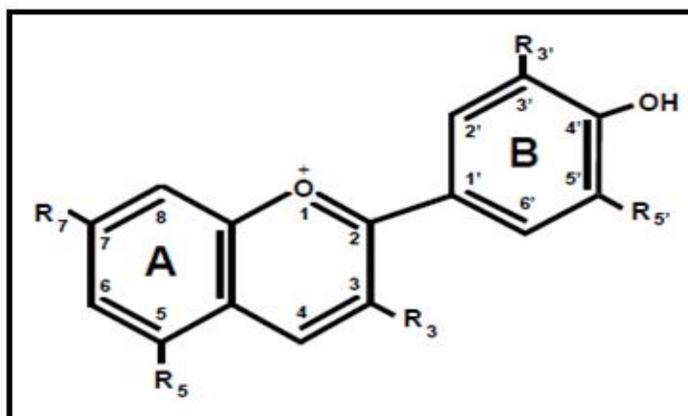
funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como, pelo tamanho da cadeia desses grupos (SHAHIDI, JANITHA, WANASUNDARA, 1992).

2.2.1.1 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos solúveis em água, de coloração intensa e amplamente distribuídos na natureza. Elas são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e as tonalidades da cor vermelha que aparecem em muitas flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas (BROUILLARD, 1982; MARKAKIS, 1982; JACKMAN; YADA; TUNG, 1987; GONNET, 1998). Apesar da ampla distribuição, as antocianinas ainda apresentam uso restrito como corantes alimentícios e farmacêuticos devido a dificuldades relacionadas com sua estabilidade e purificação (MAZZA; BROUILLARD, 1987).

Estruturalmente, as antocianinas são derivados glicosilados do cátion 2-fenil benzopirilium, também denominado de cátion flavilium (JACKMAN; YADA; TUNG, 1987). Os açúcares mais comumente ligados à estrutura molecular central, em geral nas hidroxilas das posições 3, 5 e 7, são monossacarídeos como glicose, galactose, arabinose, raminose, porém, podem apresentar-se também na forma de di e trissacarídeos. As variações estruturais das antocianinas denotam diferentes açúcares ligados, polimerização e nos modos ou posições de hidroxilação e metilação (VON ELBE; SCHWARTZ, 1996).

Figura 2: Cátion flavilium



Fonte: Autor

Em alguns casos, os açúcares apresentam-se acilados pelos ácidos p-coumárico, cafeico, fenílico e vanílico. A molécula de antocianina não glicosilada (aglicona) é

denominada antocianidina e raramente ocorre na natureza, em geral, é resultante do processo de isolamento das antocianinas (MAZZA; MINIATI, 1993).

As antocianidinas mais comuns são: pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, malvidina e petunidina (TIMBERLAKE; BRIDLE, 1975). Uma vez que as antocianidinas são menos estáveis e solúveis em água que as antocianinas, entende-se que a glicosilação confere solubilidade e estabilidade ao pigmento (HARBONE, 1979; JACKMAN; YADA; TUNG, 1987; LEE; HONG, 1992; OKUMURA; SOARES; CAVALHEIRO, 2002; TERCI; ROSSI, 2002).

As antocianinas possuem a propriedade de apresentarem diferentes cores de acordo com o do pH do meio em que se encontram, o que as torna de interesse para uso como indicadores de pH. As mudanças estruturais das moléculas ocorridas mediante à variação do pH, permitem a obtenção de soluções incolores ou coloridas, podendo ser vermelha, violeta, azul ou amarela (TERCI; ROSSI, 2002).

As antocianinas estão presentes na alimentação humana sendo encontradas em diversos vegetais como: uva, maçã, feijão preto, morango, amora, jaboticaba, cerejas, jambolão, chicória, cenouras púrpuras, dentre outros, assim como em seus derivados (LAZCANO; YOO; PIKE, 2001; MATAIX; CASTRO, 2001; OKUMURA; SOARES, CAVALHEIRO, 2002).

2.2.1.1.1 Extração de antocianinas a partir de vegetais

O grau de extração das antocianinas depende de uma série de fatores, entre eles a relação volume de solvente/massa de matéria-prima, do tipo de solvente empregado (etanol, metanol, água) e tipo de ácido (ácido clorídrico, ácido cítrico, tartárico, fórmico, acético, propiônico) (PAZMINO-DURAN *et al.*, 2001).

As antocianinas são muito solúveis em água. Portanto, facilmente extraídas de plantas utilizando-se soluções polares. O solvente mais utilizado na extração de antocianinas é o metanol, apesar da toxicidade (FRANCIS, 1996). Entretanto, para algumas aplicações onde o aspecto quantitativo não é prioridade, etanol e água surgem como opção. Ainda assim, o metanol é 20% mais eficiente que etanol e 73% mais efetivo que a água (TERCI, 2004).

Muitos pesquisadores empregaram solventes alcoólicos acidificados, por exemplo, HCl (1% v/v) em metanol, visto que o ácido previne a oxidação das antocianinas. Porém, Jackman, Yada e Tung (1987) citam que a concentração do ácido clorídrico em metanol não deve ser superior a 0,05% pois, na tentativa de estabilizar a antocianina, o

ácido modifica a forma nativa da mesma devido ao rompimento das associações com metais e co-pigmentos, podendo levar à decomposição de pigmentos acilados.

Geralmente, após a extração das antocianinas, os extratos brutos são concentrados utilizando-se evaporadores rotativos a vácuo com temperaturas inferiores a 40°C até massa constante, o que resulta em um resíduo viscoso (SOARES; CAVALHEIRO, 2001).

2.2.1.1.2 Métodos de quantificação das antocianinas

Geralmente, os extratos antociânicos contêm, além dos pigmentos de interesse, compostos interferentes. São exemplos: outros compostos polifenólicos, açúcares, ácidos ou mesmo as antocianidinas como resultado da degradação das antocianinas (JACKMAN; YADA; TUNG., 1987).

Brouillard, em 1982, descreveu diferentes métodos para a quantificação de antocianinas. Estes métodos são classificados em três grupos: aqueles relacionados a extratos que contém pouco ou nenhum interferente, com produtos de degradação como interferentes e aqueles que visam a quantificação de cada pigmento individualmente.

Para a quantificação de antocianinas em extratos vegetais frescos, onde, geralmente, há poucos interferentes, realiza-se a leitura da absorbância do extrato diluído em álcool acidificado em um único comprimento de onda situado na região do visível, entre 465 e 550 nm. Para a determinação do conteúdo total de antocianinas em um extrato contendo dois ou mais tipos de antocianinas, quando não há substâncias interferentes, realiza-se o mesmo procedimento, porém, deve-se conhecer previamente a proporção de cada antocianina assim como suas absorvidades molares (JACKMAN; YADA; TUNG, 1987).

Nos extratos em que os produtos de degradação (antocianidinas e açúcares) podem estar presentes, as antocianinas devem ser quantificadas pelo método do pH Diferencial ou pelo método subtrativo. Este último está relacionado com a leitura da absorbância do extrato no comprimento de onda na região do visível onde há absorção máxima. Após isso, adiciona-se um agente branqueador ao extrato (sulfito de sódio ou peróxido de hidrogênio), e realiza-se novamente a leitura no mesmo comprimento de onda, que se refere à leitura “do branco”. Uma de suas desvantagens é que os agentes branqueadores não são específicos para antocianinas e além de causarem um decréscimo na absorção dos produtos de degradação (JACKMAN; YADA; TUNG, 1987).

O método do pH Diferencial, proposto por Fuleki e Francis (1968), tem sido amplamente utilizado para a quantificação de antocianinas. Ele se baseia na obtenção de espectros das soluções em 2 valores de pH, visto que com sua alteração, observam-se transformações nas estruturas das antocianinas e, conseqüentemente, nas cores das soluções onde estão contidas.

São utilizadas soluções de pH 1,0 e 4,5 para a diluição do extrato que se deseja quantificar e dois comprimentos de onda são escolhidos para a leitura da absorbância, um correspondente ao comprimento de onda de máxima absorção (próximo a 520 nm) e outro em 700 nm, onde não ocorre absorção. Em pH 1,0, a solução contendo as antocianinas torna-se vermelha e em pH 4,5, incolor. Portanto, a absorbância das soluções em 520 nm em pH 1,0 é respectiva à concentração das antocianinas presentes no extrato. A absorbância lida para a solução de pH 4,5 em 520 nm refere-se aos produtos de degradação das antocianinas, as antocianidinas, que não possuem a propriedade de alterarem a coloração da solução em que se encontram em função do pH. Por fim, as leituras a 700 nm devem servir para corrigir eventuais espalhamentos de luz causados por partículas em suspensão, que de acordo com os autores, podem estar presentes em extratos de frutas (FULEKI; FRANCIS, 1968; WROLSTAD, 2000).

2.2.1.1.3 Estabilidade das antocianinas

O pH é o fator mais importante no que diz respeito à coloração das antocianinas. Antocianinas são estáveis e se encontram na forma colorida como cátion flavilium apenas em soluções bastante ácidas (GONNET, 1998).

Se a coloração das antocianinas, no entanto, fosse considerada apenas em função do pH, poder-se-ia concluir que as flores e frutas não deveriam ser coloridas uma vez que o pH natural dos vegetais é geralmente próximo da neutralidade. Nestas condições de pH, as antocianinas não se encontrariam sob a forma colorida se não existisse algum fator estabilizante. Este fator é conhecido como copigmentação, que consiste na ligação entre o pigmento e outra molécula denominada de co-pigmento (flavonoides não antociânicos, compostos fenólicos em geral, ácido alifáticos, entre outros) envolvendo mecanismos químicos de copigmentação inter ou intra molecular e auto associação (GOTO; KONDO, 1991).

A glicosilação também afeta a estabilidade do pigmento, sendo a antocianidina menos estável que a correspondente antocianina. Antocianinas contendo dois ou mais grupos acilas aromáticos são estáveis em meio neutro, possivelmente, como resultado da

ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxil fenólico das antocianinas e os ácidos aromáticos (MAZZA; MINIATI, 1993).

As antocianinas são destruídas pelo calor durante o processamento e estocagem dos produtos. O mecanismo, apesar de não ter sido totalmente elucidado, parece estar relacionado com a quebra do anel heterocíclico da pseudo base com formação da chalcona. A luz exerce efeito duplo sob as antocianinas: favorece sua biossíntese, porém acelera sua degradação. O oxigênio acelera a degradação das antocianinas (MARKAKIS, 1982).

2.3 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES CONTENDO EXTRATOS VEGETAIS

Os estágios iniciais de qualquer formulação nova implicam em estudos para coletar informações básicas sobre as características físicas e químicas do fármaco a ser utilizado em uma forma farmacêutica. Os estudos básicos compreendem o trabalho de pré-formulação, necessários antes de iniciar uma formulação. A forma física influencia no processo de dissolução, velocidade e magnitude da absorção uma vez que a liberação do fármaco pelo veículo implica em alterações de penetração devido à disponibilidade do mesmo (ALLEN JÚNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2007).

No caso de formulações contendo extratos vegetais, a escolha apropriada da forma farmacêutica e da via de administração requer considerações prévias relacionadas a eficácia e segurança do marcador químico ativo presente na planta medicinal ou derivado intermediário, de modo que, durante a transformação do material vegetal em um produto tecnicamente elaborado, a qualidade seja assegurada pela preservação da integridade química e farmacológica do(s) marcador(es) químico(s) da planta, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de sua utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico (TOLEDO *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2007; FERREIRA; LEITE, 2008).

Forma farmacêutica é definida como o estado final de apresentação que os princípios ativos farmacêuticos possuem após uma ou mais operações farmacêuticas efetuadas com ou sem a adição de excipientes apropriados, a fim de facilitar a sua utilização e obter o efeito terapêutico desejado, com características apropriadas a determinada via de administração (FERREIRA; LEITE, 2008).

Nesse sentido, a obtenção de formas farmacêuticas derivadas de matéria-prima vegetal necessita de um planejamento inicial, com a finalidade de planejar o manejo adequado da matéria-prima vegetal e demais excipientes de acordo com as especificações dos mesmos, além da determinação sequencial das ações de

transformação tecnológica e monitoramento dos pontos e metodologias de controle de qualidade mais apropriadas segundo as legislações e normatizações vigentes (TOLEDO *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O estudo de estabilidade do fármaco e de sua associação com o excipiente deve ser avaliado, pois é comum o fármaco sofrer decomposições em consequência de reações indesejadas com componentes do veículo em função do pH, temperatura, radiação, luz ou umidade, afetando também a estabilidade do sistema (CARSTENSEN, 1995; BILIA *et al.*, 2001).

2.3.1 Métodos para obtenção de comprimidos- compressão direta

Os comprimidos são preparações farmacêuticas sólidas, de forma variada, geralmente cilíndrica ou lenticular, obtidas por meio de mistura e compressão de várias substâncias medicamentosas secas (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995).

Os comprimidos são responsáveis por mais de 80% das formas farmacêuticas administradas ao homem. As principais razões dessa grande utilização são: a facilidade de produção, a conveniência da administração oral e sua estabilidade quando comparada à de um líquido ou semissólido (JIVRAJ; MARTINI; THOMSON, 2000).

A produção de comprimidos pode ser efetuada por meio de 3 métodos: a granulação úmida, a granulação seca e a compressão direta (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995; REMINGTON, 2000; LACHMAN; LIEBERMAN; DANING, 2001).

A compressão direta é uma técnica muito utilizada na manufatura de comprimidos e sua utilização tem aumentado muito nos últimos anos (NADA; GRAF, 1998; EISSENS *et al.*, 2002; HAUSCHILD; PICKER-FREYER, 2004).

Entre suas vantagens estão: a diminuição no tempo de fabricação aumentando a produtividade, a eliminação de várias etapas de processamento diminuindo a probabilidade de contaminação cruzada, a diminuição do consumo de energia e a redução do custo final do produto. Também requer uma área física menor e menor número de equipamentos e mão-de-obra, já que envolve somente três estágios: a pesagem dos pós que compõem a formulação, a mistura destes e a compressão. Logo, a validação de um processo por compressão direta é mais rápida, fácil e barata (FACHAUX *et al.* 1995; JIVRAJ; MARTINI; THOMSON, 2000; TERASHITA; IMAMURA, 2002).

Além disso, o método de compressão direta é o que melhor preserva a estabilidade dos componentes da formulação, quando comparado aos procedimentos que incluem granulação, já que não utiliza umidade (adição de solução aglutinante) e aquecimento

(secagem) durante a produção. Por isso é considerado adequado para o processamento de substâncias higroscópicas e termolábeis. Outra vantagem da compressão direta é a otimização da desintegração do comprimido, onde cada partícula do fármaco é liberada da massa do comprimido e fica disponível para a dissolução (SHANGRAW, 1989).

Quando os fármacos são termolábeis a compressão direta é a técnica de escolha. Para certos fármacos, a dissolução é mais rápida quando o comprimido é produzido por compressão direta, como por exemplo a norfloxacin. A principal limitação desse método se dá em utilizar somente 30% ou menos de princípio ativo, não sendo indicado para fármacos de baixo escoamento e segregação (JIVRAJ; MARTINI; THOMSON, 2000).

O sucesso do desenvolvimento e planejamento de um comprimido obtido por compressão direta se dá, principalmente, pela correta escolha dos excipientes. A compressibilidade desses excipientes depende das propriedades moleculares dos compostos (massa molecular, estrutura cristalina, propriedades termodinâmicas, entre outras) e das propriedades da partícula propriamente dita (tamanho da partícula, forma, entre outras) (WU; HO; SHEU, 2001).

A escolha dos excipientes ou adjuvantes para a composição de uma formulação para compressão direta necessita de cuidados para que seja mantida a estabilidade física dos comprimidos resultantes. Os diluentes são produtos inertes e estáveis, adicionados à formulação para originarem comprimidos de peso conveniente no caso de substâncias ativas em pequenas dosagens. A lactose é um exemplo de um diluente solúvel e a celulose microcristalina um diluente insolúvel (SHETH; BANDELIN; SHANGRAW, 1980; LACHMAN; LIEBERMAN; DANING, 2001).

Como os excipientes são apenas misturados à seco antes da compressão, é essencial que os excipientes aglutinantes possuam determinadas características como boa compactação, para que os comprimidos estejam de acordo com os requerimentos de dureza e friabilidade; bom fluxo para atender às especificações de uniformidade de conteúdo; serem inertes para que não ocorra interação com outras substâncias; estáveis para atender ao prazo de validade estabelecido e átoxicos para conciliar os requerimentos regulatórios (EISSENS *et al.* 2002).

De acordo com Jivraj, Martini e Thomson (2000), o processo de compactação de um comprimido por compressão direta pode ser descrito de acordo com os seguintes mecanismos:

a) Rearranjo: quando as partículas se movem dentro da cavidade da matriz para ocupar os espaços que existem entre as partículas.

b) Deformação: quando as partículas não podem se rearranjar sozinhas então o material começa a deformar elasticamente.

c) Compactação: quando o limite elástico do material é excedido, assim o material deforma plasticamente ou destrutivamente (fragmentação ou *brittle fracture*). A ocorrência dos mecanismos depende das características do material, da velocidade e força de compressão e do tamanho da partícula. A deformação plástica formará novas ligações pelo aumento da superfície de contato e a fragmentação cria novas superfícies que favorecem a formação de novas ligações.

d) Relaxamento: quando a força de compressão é cessada o comprimido é ejetado da matriz e sofre um relaxamento. Se as forças elásticas forem mais intensas que a força tensil do comprimido, a sua integridade será comprometida.

O sucesso da produção dos comprimidos está no balanço correto entre a deformação plástica e a fragmentação. Para isso, deve haver uma boa mistura entre o fármaco (normalmente tem deformação elástica) e excipientes (com deformação plástica e fragmentação) (JIVRAJ; MARTINI; THOMSON, 2000).

Quando um fármaco estiver presente em alta dose em uma formulação de compressão direta e não possuir boas características de fluxo nem de compactação, a escolha dos excipientes (diluente, lubrificantes, desintegrantes e deslizantes) será extremamente crítica para formar uma unidade compacta aceitável e fisicamente estável (SHETH; BANDELIN; SHANGRAW, 1980).

A adição de um aglutinante seco nas misturas para comprimir visa dar coesão e aumentar as propriedades elásticas-plásticas, uma vez que, afeta a força tensil dos comprimidos em diferentes proporções, dependendo da quantidade e do tamanho das partículas. Normalmente, o aglutinante muda a natureza da área superficial disponível para a formação das pontes interparticulares. Logo, se a quantidade de aglutinante adicionada for suficiente, as propriedades superficiais do material tornam-se idênticas às propriedades do aglutinante seco (ADOLFSSON; CARAMELLA; NYSTRÖN, 1998).

2.3.2 Nanopartículas poliméricas

O termo nanotecnologia está relacionado ao desenvolvimento e uso de materiais e sistemas em nanoescala, isto é, 1 a 100 nanômetros. Trata-se de um campo em ascensão principalmente nas últimas décadas, o qual une conhecimento de diversas áreas e possui ampla aplicabilidade (BHARALI *et al.*, 2011; SAFARI; ZANEAR, 2013).

As nanopartículas poliméricas são elaboradas a partir de polímeros que podem ter origem natural ou sintética. Entre os principais polímeros sintéticos empregados na obtenção de nanopartículas pode-se mencionar a PCL (policaprolactona), o PLGA (ácido poli láctico-co-glicólico) e o PLA (ácido poli láctico). A quitosana é um polissacarídeo que também vem sendo bastante utilizado na preparação de sistemas nanoparticulados, devido à sua origem natural e sua capacidade mucoadesiva. Todos estes polímeros apresentam como principal vantagem o fato de serem biocompatíveis e biodegradáveis, reduzindo os impactos da formulação no organismo (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; PLAPIED *et al.*, 2011).

Na área farmacêutica, a nanotecnologia é mais utilizada para a veiculação de fármacos, pois agrega vantagens como a possibilidade de evitar a destruição do ativo no trato gastrointestinal, no caso de administração oral (PLAPIED, *et al.*, 2011), e aumentar a estabilidade frente a fatores ambientais, já que promove proteção contra oxigênio, umidade, luz, entre outros (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Além disso, de acordo com a matriz polimérica utilizada, possibilita o aumento da solubilidade dos ativos e pode proporcionar uma liberação prolongada, diminuindo a flutuação de dose e a frequência de administração, devido ao aumento do tempo de efeito terapêutico, o que consequentemente facilita a adesão do paciente ao tratamento. Outra vantagem diz respeito à vetorização das substâncias ativas, que evita sua dispersão para tecidos que não sejam o alvo, assim permitindo o uso de doses adequadas e minimizando os efeitos colaterais (LIN TAN; CHOONG; DASS, 2010; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

A utilização de produtos naturais para o tratamento de doenças, também é um recurso frequentemente empregado (VEIGA JR; PINTO; MACIEL, 2005). Além disso, muitas indústrias farmacêuticas utilizam ativos isolados de plantas, extratos ou até mesmo as usam como base para o desenvolvimento de novas moléculas (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006), devido possuírem excelente potencial terapêutico (SARAF, 2010).

Considerando as propriedades terapêuticas dos produtos naturais e as diversas vantagens proporcionadas pelos sistemas nanoparticulados, estudos mencionando o desenvolvimento de nanopartículas carreadoras de compostos naturais vêm sendo publicados, boa parte deles empregando nanopartículas poliméricas. Pode-se citar publicações abordando a inclusão de ativos naturais com propriedades antitumorais em sistemas nanoparticulados (BHARALI *et al.*, 2011; SANNA *et al.*, 2013), já que a vetorização destes compostos para os tecidos tumorais proporciona comprovada

potencialização de seus efeitos, tanto *in vitro* (NAIR *et al.*, 2012) quanto *in vivo* (CIRPANLI *et al.*, 2011).

A nanotecnologia também possibilita o aumento da biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos, como foi observado com a curcumina, que teve sua solubilidade melhorada através da inclusão em nanopartículas poliméricas (YEN *et al.*, 2010).

Contudo, diversos parâmetros devem ser considerados durante o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados, principalmente quando se deseja otimizar as formulações obtidas com relação a propriedades como eficiência de inclusão, tamanho e perfil de liberação. A escolha de um método de obtenção e de um polímero é diretamente influenciada por fatores como as características físico-químicas do composto a ser incluso, o tecido alvo, a via de administração utilizada, o tipo de liberação desejada, entre outros (REIS *et al.*, 2006; RAO; GECKELER, 2011).

Produtos naturais, principalmente quando na forma de extratos, apresentam características complexas e sua inclusão pode envolver uma mistura de diversos componentes, dificultando o desenvolvimento da formulação (RIBEIRO *et al.*, 2013). O conhecimento das características dos sistemas nanoparticulados obtidos até então pode auxiliar o pesquisador, possibilitando o direcionamento do estudo a ser realizado.

2.3.2.1 Nanopartículas poliméricas contendo extratos vegetais e bioativos

A nanotecnologia aplicada à farmácia e, especificamente, para carreamento de ativos é uma linha de pesquisa relativamente recente. Além disto, para esta revisão, foram considerados apenas artigos que relatam a inclusão de substâncias de procedência natural em nanopartículas com estrutura polimérica, restringindo ainda mais a seleção dos trabalhos. Tais fatores tornam o assunto tratado bastante específico.

A Tabela 2 mostra as formulações que foram trabalhadas com extratos vegetais nos últimos anos, onde é possível reparar os métodos e polímeros mais empregados.

Tabela 2 - Formulações de sistemas nanoparticulados poliméricos contendo extratos vegetais

Método	Polímero	Extrato	Referência
Emulsificação- Evaporação	PCL	Extrato de <i>Uncaria tomensa</i>	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2013
	PLGA	Extrato de casca de <i>Cinnamon zeylanicum</i>	HILL; TAYLOR; GOMES, 2013
		Extrato de	BHATTACHARYYA;

Nanoprecipitação	PLGA	<i>Gelsemium sempervirens</i>	PAUL; KHUDA- BUKSH, 2010
		Extrato de <i>Ginkgo biloba</i>	HAN <i>et al.</i> , 2012
		Extrato de <i>Phytolacca decandra</i>	DAS <i>et al.</i> , 2012
		Extrato de <i>Polygala senega</i>	PAUL <i>et al.</i> , 2011
		Extrato de semente de uva	NARAYANAN <i>et al.</i> , 2010
		Extrato de <i>Syzygium jambolanum</i>	SAMADDER <i>et al.</i> , 2012

A Tabela 3 apresenta as formulações trabalhadas com ativos de origem natural.

Tabela 3 - Formulações com ativos de origem natural

Método	Polímero	Ativo	Referência
Emulsificação- Evaporação	PCL	α -tocoferol	BYUN <i>et al.</i> , 2011
		Vimblastina	PRABU <i>et al.</i> , 2008
	PLA	Quercitrin	KUMARI <i>et al.</i> , 2011
		Betacaroteno	YUSUF <i>et al.</i> , 2012
	PLGA	Bufalina	YIN <i>et al.</i> , 2012
		Camptotecina	McCAROON <i>et al.</i> 2008
		Cinamaldeído	GOMES; MOREIRA; CASTELL-PEREZ, 2011
		Curcumina	NAIR <i>et al.</i> , 2012
		Curcumina	MUKERJEE; VISH WANATHA, 2009
		Curcumina	MISRA; SAHOO, 2011
		Eugenol	GOMES <i>et al.</i> , 2011
	Vincristina	SONG <i>et al.</i> , 2008	
	Dupla Emulsificação- Evaporação	PLGA	β -escina

Coacervação	Quitosana	Condroitina	DA SILVA <i>et al.</i> ,
		Fucodaina	2012
Gelificação iônica	Quitosana	Catequina	HU <i>et al.</i> , 2008
		Timoquinona	ALAM <i>et al.</i> , 2012
Nanoprecipitação	PCL	Camptotecina	CIRPANLI <i>et al.</i> ,
		Resveratrol	2011
	PLGA	Camptotecina	SHAO <i>et al.</i> , 2009
		Catequina	CIRPANLI <i>et al.</i> ,
		Cumarina	2011
		Curcumina	KHUDA-BUKHSH <i>et al.</i> , 2010
		Timoquinona	ANAND <i>et al.</i> , 2010
		Quercetina	RAVINDRAN <i>et al.</i> ,
		Kaempferol	2010
		Grandisina	POOL <i>et al.</i> , 2012
2013			
PVP	Curcumina	YEN <i>et al.</i> , 2010	
Eudragit®	Genisteína	TANG <i>et al.</i> , 2011	
	Quercetina	WU <i>et al.</i> , 2008	
	Naringenina	YEN <i>et al.</i> , 2009	

Com exceção do trabalho de Yin *et al.* (2012), que usa bufalina, a principal substância bioativa presente no veneno de sapo, todos os outros ativos são de origem vegetal. Dos ativos oriundos de vegetais, é válido destacar alguns como o extrato de *Uncaria tomentosa* (RIBEIRO *et al.*, 2013), planta com o nome popular “unha de gato”, onde estão presentes alcaloides com atividade antitumoral.

Narayanan *et al.* (2010) utilizam o extrato da semente de uva. Samadder *et al.* (2012) preparam extrato de *Syzygium jambolanum*. E Yen *et al.* (2009) faz uso de

naringenina, encontrada em frutas cítricas. A cúrcuma (*Curcuma longa*), tem destaque no setor alimentício e tem sido bastante estudada para obtenção de nanopartículas, tendo a curcumina (YEN *et al.*, 2010) como substância mais utilizada.

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o desenvolvimento tecnológico de formas farmacêuticas partindo de extrato etanólico dos frutos de *Euterpe oleracea* Mart. (açai).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter, caracterizar físico-quimicamente e investigar possíveis efeitos toxicológicos agudos do extrato etanólico dos frutos de *Euterpe oleracea* Mart.;

Desenvolver um sistema polimérico nanoparticulado contendo o extrato etanólico dos frutos de *Euterpe oleracea* Mart.

Desenvolver comprimidos contendo o extrato etanólico dos frutos de *Euterpe oleracea* Mart.

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matéria-prima vegetal

Figura 3: *Euterpe oleracea* Mart., família: Arecaceae, frutos maduros, árvore nativa no Recanto Santa Clara, Município de Mazagão-AP.



Fonte: Autor.

Os frutos maduros de *Euterpe oleracea* Mart. foram coletados pela manhã, no "Recanto Santa Clara" (localizado em -0.96039 N; -51.268450 O), situado no Município de Mazagão, Estado do Amapá, Brasil, em fevereiro de 2016.

O material foi conservado sob refrigeração até o momento do seu processamento. Uma exsicata da espécie foi depositado no Herbário do Instituto de Pesquisa do Amapá, Brasil (HAMAB) com o número 10777.

4.1.2 Reagentes e soluções

Foram utilizados os seguintes reagentes e soluções: Acetato de etila P.A. - Quimex, acetonitrila P.A. - Baker Analyzed[®] HPLC, ácido acético glacial HPLC - Quimex,

ácido acético glacial P.A. - Quimex, ácido clorídrico P.A. - Quimex, água ultra pura tipo I LAFQ, etanol 70%, etanol 92,8%, etanol PA 99,3% Quimex, metanol Baker Analyzed[®] HPLC - J.T. Baker, metanol P.A. Quimex.

Polímeros: PLGA, PCL e Eudragit[®].

Ácido pirogálico PA - alphatec.

4.1.3 Equipamentos

Balança analítica Bioprecisa FA2104N; microscópio eletrônico de varredura Quanta-600 (FEI, Eindhoven, Netherlands); estufa termostaticada Quimis Q-314M222; condutivímetro modelo 170 (ATI-ORION); balança analítica modelo BK 500 (Gehaka); potenciômetro modelo pH3B (pHTek); câmara de luz ultravioleta 254-365 nm; cromatoplasmas padronizadas marca Merck[®] com dimensões de 10 cm x 10 cm; espectrômetro de infravermelho IRAffinity-1 spectrometer (Shimadzu); espectrofotômetro UV-VIS UV mini- 1240 (Shimadzu); cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu CLASS-VP; equipado com bombas de alta pressão mod. CTO-10AS; amostrador automático mod. SIL-20AC; liofilizador de bancada, Terroni AISI 304; centrífuga Sigma 4K 15; coluna RP-C18 Agilent Zorbax ODS (150 mm x 4.6 mm, 5 µm); Dessecador; Filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno 0,45 µm (Millipore); pesa-filtro; cadinho, picnômetro, percolador termostaticado; evaporador rotativo

4.2 MÉTODOS

As análises descritas a seguir foram realizadas nos Laboratórios de Pesquisa em Fármacos da Universidade Federal do Amapá - UNIFAP e Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica (NANOFARM) da Universidade Federal do Pará - UFPA.

4.2.1 Obtenção e caracterização física e química do extrato etanólico dos frutos de *Euterpe oleracea* Mart. (EEAO)

4.2.1.1 Processo de obtenção do EEEO

4.2.1.1.1 Planejamento fatorial

O processo de extração foi desenvolvido a partir do planejamento fatorial, visando a obtenção da maior concentração de antocianinas dos frutos do açaí. Procedeu-se com extrações por maceração utilizando um planejamento fatorial completo 2^3 com dois pontos centrais para estudar a influência das três variáveis independentes (volume de etanol 92% (400-500 mL), o volume de ácido acético concentrado (25-75 mL) e tempo de extração (4-6h) sobre as variáveis de resposta (sólidos totais (%), fenóis totais (%)) e antocianinas totais (%) de acordo com o desenho mostrado na tabela 4.

Cada uma das corridas foram efetuadas em triplicata. Os ensaios foram randomizados de acordo com o software design expert (EstatEase, EUA).

Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental Fatorial 2^3 utilizado no processo de extração das antocianinas

No.	Alcool 92% (mL)		(Acido Acético(mL)		Tempo (h)	
	Real	Codificado	Real	Codificado	Real	Codificado
1	400,00	(-1)	25,00	(-1)	4,00	(-1)
2	400,00	(-1)	25,00	(-1)	6,00	(+1)
3	400,00	(-1)	75,00	(+1)	4,00	(-1)
4	400,00	(-1)	75,00	(+1)	6,00	(+1)
5	450,00	(0)	50,00	(0)	5,00	(0)
6	450,00	(0)	50,00	(0)	5,00	(0)
7	500,00	(+1)	25,00	(-1)	6,00	(+1)
8	500,00	(+1)	25,00	(-1)	4,00	(-1)
9	500,00	(+1)	75,00	(+1)	6,00	(+1)
10	500,00	(+1)	75,00	(+1)	4,00	(-1)

Um modelo linear de regressão múltipla foi usado para descrever as variáveis respostas (Y) em relação com os fatores estudados:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde β_0 , β_i , e $\beta_{i,j}$ representam o efeito médio dos fatores, o efeito principal, e as interações entre os fatores, respectivamente (MONTGOMERY; GEORGE, 2003). *Design Expert* versão 6.0 foi utilizado para o planejamento experimental e para análise dos dados.

4.2.1.1.2 Processo extrativo

Para a extração 100 g da fruta madura triturada da planta foram adicionados a um erlenmayer de 1000 mL. As quantidades apropriadas dos dissolventes (ácido acético e etanol 92%) foram adicionadas. Os frascos foram cobertos com papel alumínio para proteção do extrato perante a luz. A extração foi conduzida pelo tempo descrito na Tabela 1 para cada experimento. Após este tempo, o extrato foi filtrado através de papel de filtro Whatman nº 1 e o filtrado foi preservado de luz em um frasco âmbar, sob refrigeração.

4.2.1.1.3 Determinação do teor de sólidos

Cerca de 1 g dos extratos em solução foi pesado e transferido para pesa-filtro previamente tarado. O material foi levado à secura em placa aquecedora e dessecado em estufa sob a temperatura de 105°C por duas horas. Após este período, o pesa-filtro foi resfriado em dessecador e pesado em balança analítica. O teor de sólidos foi calculado em relação a 100 g de extrato seco, pela média de três determinações (FARMACOPEIA BRASILEIRA V, 2010).

4.2.1.1.4 Determinação de densidade aparente

Um picnômetro com capacidade para 5 mL, previamente tarado, foi preenchido com o líquido padrão (água recém-destillada e fervida) e pesado. Em seguida o picnômetro foi preenchido com 5 mL da amostra (extratos) e pesado. A relação, em triplicata, entre o peso da amostra e do padrão, em um volume fixo à temperatura de 25-28°C forneceu o valor da densidade aparente (FARMACOPEIA BRASILEIRA V, 2010).

4.2.1.1.5 Determinação de pH

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro (Hanna Instruments, Espanha) previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 (Alphatec, Brasil) e os resultados correspondem à média de três determinações (FARMACOPEIA BRASILEIRA V, 2010).

4.2.1.1.6 Determinação de fenóis totais

A concentração de fenóis totais foi realizada por espectrofotometria usando o método de Folin-Ciocalteu (BRITISH PHARMACOPEIA, 2010).

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste da mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6⁺ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias (IKAWA *et al.*, 2003).

4.2.1.1.7 Determinação do teor de antocianinas totais

O método do pH diferencial para determinação de antocianina monomérica, expresso em cianidina-3-O-glicosídeo, foi utilizado como a referência (AOAC, 2006). Em um balão volumétrico de 50 mL (0,025 M, cloreto de potássio Sigma, EUA) foram adicionados 10 mL de uma solução tampão de pH 1 e 1 mL de extrato. O volume foi completado utilizando a mesma solução tampão. Em outro balão de mesma capacidade, a solução tampão de pH 4,5 (acetato de sódio 0,4 M, Sigma EUA) a mesma alíquota utilizada anteriormente foi adicionada.

O volume foi completado com o mesmo tampão. Ambos frascos foram gentilmente agitados, e deixados em repouso por 5 minutos. Depois disso, as soluções foram filtradas através de papel de filtro Whatman n° 1. A seguir, a absorvância de ambas as amostras foram registradas usando um espectrofotômetro (Shimadzu, Japão) em comprimentos de onda de 520 e 700 nm. O conteúdo total de antocianinas (AT) foi calculado como equivalentes a cianidina-3-O-glicosídeo (mg/L), utilizando a expressão seguinte:

$$AT \text{ (mg/mL)} = A * 834.9 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde $A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5}$; e 834.9 é um termo constante, incluindo a absorvidade molar da cianidina-3-O-glicosídeo, o peso molecular da cianidina-3-O-glicosídeo, fator de diluição, o comprimento do percurso da célula e o fator de correção do peso.

4.2.1.1.8 Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados usando software Design Expert (Versão 6.0.1, Stat-Ease, Inc. Minneapolis, EUA). Para selecionar o modelo adequado para descrever o comportamento das respostas, empregou-se análise de variância. Foi selecionado o

modelo no qual o valor p do teste Anova foi significativo para $p < 0,05$, com menor PRES e maior valor R^2 . O número de pontos experimentais (10) foi o suficiente para avaliar se a resposta é ajustada a uma linear, duas interação dos fatores (2FI), modelo quadrático e cúbico (GABRIELSON; LINDBERG; LUNDTEDT, 2002).

4.2.2 Caracterização física e química do extrato etanólico liofilizado dos frutos de *Euterpe oleraceae* Mart. (EEEE)

4.2.2.1 Liofilização

Após a escolha do extrato para continuidade do trabalho (EEEE), o mesmo foi concentrado em evaporador rotativo a vácuo (IKA Werke, Suíça) até a evaporação total do solvente. Em seguida, o extrato concentrado foi congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente liofilizado durante 72 horas em liofilizador (LS 3000, Terroni, Brasil). Após este tempo, o extrato liofilizado (EEEE) foi mantido protegido de luminosidade, ar e umidade.

4.2.2.2 Determinação do pH do EEEEO

Aproximadamente 1 g do EEEEO foi pesado e diluído em 15 mL de água destilada, a solução foi filtrada. Uma medida direta do líquido filtrado foi utilizada para determinar o valor de pH em potenciômetro previamente calibrado (Hanna Instruments, Espanha). O medidor de pH foi calibrado usando uma solução tampão de pH 4 e pH 7 (Alphatec, Brasil). As medições foram realizadas em triplicata a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. A média e o desvio-padrão foram informados.

4.2.2.3 Determinação de perda por dessecação do EEEEO

Exatamente 2 gramas EEEEO foram transferidos para um pesa-filtro. A amostra foi submetida a aquecimento em estufa a 105°C durante 2 horas, seguido de resfriamento em dessecador e pesagem (FARMACOPEIA BRASILEIRA V, 2010). A operação foi repetida até obtenção de peso constante. Os resultados de três determinações foram avaliados em termos de porcentagem ponderal sobre a quantidade da amostra, utilizando a equação:

$$\% \text{ perda} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

Pa = peso da amostra (g)

Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação (g)

Os = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação (g)

4.2.2.4 Determinação de cinzas totais do EEEO

A quantidade de substâncias residuais não-voláteis no processo de incineração é determinada pelo teor de cinzas. Utilizando-se os pesos da droga vegetal antes e depois da incineração obtém-se um valor que é utilizado para o cálculo da porcentagem de cinzas em relação à droga seca ao ar (FARMACOPÉIA BRASILEIRA V, 2010).

Exatamente 2 gramas do EEEO, foram transferidos para cadinhos de porcelana previamente calcinados, resfriados e tarados nas condições empregadas durante a análise propriamente dita. As amostras dos pós nos cadinhos foram então carbonizadas em mufla a 450°C por 2 horas. Após resfriamento em dessecador sob vácuo, as mesmas foram pesadas em balança analítica, repetindo-se o procedimento até a obtenção de peso constante. A porcentagem de cinzas foi calculada em relação à droga seca (FARMACOPÉIA BRASILEIRA V, 2010).

4.2.2.5 Análise elementar por Espectrometria de Absorção Atômica do EEEO

A presença dos elementos químicos nos produtos naturais desempenha um papel importante na atividade antioxidante deles. Por esse motivo, determinou-se o conteúdo dos elementos minerais no extrato seco. A determinação deu-se por Espectrometria de Absorção Atômica (QUIMIS, AA6300, Shimadzu, Japão), utilizando um amostrador automático (ASC 6100) com um otimizador FAAS. As cinzas foram dissolvidas em 1 mL de ácido nítrico concentrado e vertidas para um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com água destilada. A solução foi filtrada e diretamente lida no equipamento e a concentração dos elementos minerais foi determinada usando curvas de calibração adequadas. Foram efetuadas as análises de ferro, manganês, zinco, cobre, níquel, cádmio, alumínio e chumbo.

4.2.2.6 Perfil por cromatografia em camada delgada (CCD) do EEEO

O perfil cromatográfico por CCD do EEEO foi obtido utilizando lâminas de CCD pré-revestidas alugram (R) extra SIL GF254 (Macherey-Nagel; Alemanha). A fase móvel foi n-butanol: ácido acético: água (4: 1: 5) (WAGNER; BLADT, 2001). O ensaio efetuado por uma hora e as placas foram reveladas utilizando hidróxido de amônio a 10% e luz UV.

4.2.2.7 Perfil por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/UV) do EEEO

Para o perfil por CLAE foi utilizado o cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência Shimadzu® Class-VP; equipado com bombas de alta pressão mod. LC-20 AT; amostrador automático mod. SIL-20AC; Detector UV SPD 20A; temperatura do compartimento da coluna de 30°C; fluxo de 0,5 mL/min; coluna C-18 Agilent. Programação por gradiente com fase móvel A: 14:85:1 (metanol:água:ácido acético) e B: 99:1 (acetonitrila:ácido acético). O comprimento de onda foi de 520 nm. O perfil UV-Vis foi obtido em espectrofotômetro Quimis UV, usando comprimentos de onda entre 200-800 nm.

4.2.2.8 Perfil espectroscópico na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do EEEO

Para a obtenção do perfil espectroscópico na região do IV do EEEO as leituras foram realizadas em espectrômetro IRAffinity-1 (Shimadzu, Japão) no comprimento de onda na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} . Onde quantidades apropriadas da amostra foram comprimidas com Brometo de Potássio (KBr), com uma resolução de 1 cm^{-1} e acumulação de 100 scans (taxa de varredura de 0,5 cm^{-1}/s) (SILVA JUNIOR, 2006).

4.2.2.9 Perfil térmico do EEEO

Foram obtidas as curvas de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) do EEEO, usando um aparelho TA - Instruments, modelo 2960, nas seguintes condições: velocidade de aquecimento 5°C/min em atmosfera de nitrogênio a um fluxo de 50 mL/min, usando um cadinho ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) com aproximadamente 8-10 mg da amostra, entre entre 25-300°C (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2006).

4.2.2.10 Microscopia Eletrônica de Varredura do EEEO

Micrografias de superfície do EEEO foram obtidas através de microscópio eletrônico de varredura (MEV), utilizando um microscópio TM3030Plus Tabletop (Hitachi, Japão), operado a 15 kV.

4.2.2.11 Determinação do teor de antocianinas totais

O teor de antocianinas totais foi determinado com amostras do EEEO (~50 mg) solubilizadas em soluções tampão de pH 1,0 e pH 4,5. A Equação 4 foi utilizada para determinar o teor de antocianinas totais presentes no EEEO:

$$CAT (\% p/p) = \frac{A}{\epsilon \times l} \times MM \times FD \times \frac{v}{m} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Onde, MM é a massa molecular da antocianina de referência; FD é o fator de diluição utilizado; v é o volume de solução; m é a massa de extrato utilizada.

4.2.2.12 Avaliação do potencial antioxidante por DPPH do EEEO

Soluções de diferentes concentrações do EEEO foram preparadas, utilizando etanol 90% acidificado. O potencial antioxidante destas soluções foi avaliado pelo método de inibição do radical DPPH (SCHAUSS, 2006b). A 2 mL de cada solução de EEEO adicionou-se 1 mL de solução de DPPH 0,1 mmol/L (Sigma, EUA). A mistura foi incubada a 25 ° C durante 30 min, protegida da luz. Após este tempo, mediu-se a absorvância a 517 nm. Como branco foram utilizadas as soluções de EEEO preparadas, como um controle da solução de DPPH. A porcentagem de inibição do radical DPPH (% I) foi determinada pela equação:

$$\% I = [(ADPPH - AE) / ADPPH] \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

Onde: AE = absorvância das soluções de extrato e ADPPH = absorvância de DPPH.

Os dados foram normalizados utilizando o logaritmo natural das concentrações das soluções de EEEO. Subsequentemente, foi realizada uma regressão linear entre os logaritmos das concentrações e porcentagens de inibição de DPPH. Em seguida, determinou-se a IC50 de DPPH por uma análise de regressão linear utilizando o StatGraphics Centurion, StatEase Co. MA, EUA.

4.2.2.13 Teste de toxicidade aguda oral do EEEO em *Rattus norvegicus* linhagem Wistar fêmeas

Para avaliação da toxicidade aguda do EEEO, utilizou-se metodologia adaptada das diretrizes da OECD 423 - "Toxicidade Aguda de Classe" (OECD, 2001) (Tabela 5) e no "Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos" da ANVISA, publicado pela Resolução RE 90/04 (BRASIL, 2004).

A dose inicial, selecionada entre as doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg, foi aquela mais propensa a produzir mortalidade. Assim, os animais receberam dose máxima de 2000 mg/kg de peso corpóreo (p.c), respectivamente, administrados oralmente em dose única por gavagem (G2). Cada animal foi observado por 24 h e, mantidos separadamente sob observação por 14 dias.

Tabela 5 -Categorias das substâncias segundo a classe de toxicidade aguda (CTA).

CTA	Faixa da DL 50 (mg/kg)	Classificação
CTA 5	DL50 > 2000	Não classificada
CTA 4	300 < DL50 < 2000	Perigosa
CTA 3	50 < DL50 < 300	Tóxica
CTA 2	5 < DL50 < 50	Muito tóxica
CTA 1	DL50 < 5	Altamente Tóxica

4.2.2.13.1 Animais

Foram utilizados dez (n = 10) *Rattus norvegicus* linhagem Wistar fêmeas, isogênicas, com 8 a 12 semanas de idade e peso variando de 200 a 250g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade de Campinas - UNICAMP. Após a chegada dos animais, os mesmos passaram por um período de adaptação, sendo mantidos em estantes climatizadas com temperatura controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) obedecendo a um ciclo claro/escuro de 12 horas (período claro das 7:00 h da manhã as 19:00 h da noite) recebendo água e ração à vontade. Os animais ficaram em jejum por 10 horas anteriormente à administração, com acesso livre somente à água, com ração permitida, 3 horas após a administração da substância avaliada.

O manejo e cuidado com os animais seguiram os princípios éticos da experimentação animal em conformidade com os princípios definidos pelo Colégio

Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com os preceitos da legislação brasileira (Lei Arouca - Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008), e os critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). O projeto adotado foi aprovado na reunião de 25 de fevereiro de 2015, recebendo o parecer nº 002/2015, estando de acordo com os princípios de ética e bem-estar animal (Anexo A).

4.2.2.13.2 *Screening* hipocrático

Análise comportamental sistemática ocorreu nos períodos de 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h, e a cada 24 h por 15 dias, observando os seguintes parâmetros: estado de consciência e disposição (irritação, resposta ao toque, frêmito vocal), coordenação motora (resposta ao aperto da cauda, resposta ao aperto), tônus muscular (força para agarrar e contorção), reflexos (auricular e corneal), atividade do sistema nervoso central (tremores, convulsão, anestesia, sedação), atividade do sistema nervoso autônomo (micção, defecação, piloereção e respiração) e outros (morte, straub, hipnose, lacrimação, ptose, ataxia, hipotermia, cianose, hiperemia, trem posterior, estresse, salivação, diarreia, sangramento). Os sinais de toxicidade, a época do seu aparecimento, a intensidade, a duração e a progressão dos mesmos foram anotados, tabulando-os numa escala de 0 a 4, sendo: ausente = 0, raro = 1, pouco = 2, moderado = 3 e intenso = 4, para posterior análise.

4.2.2.13.3 Avaliação ponderal

Para a avaliação diária da massa corpórea dos animais, foi utilizada balança Gehaka BG4000, com capacidade de 4200 g e precisão de 0,1 g. O ganho de massa foi avaliado diariamente durante os 14 dias, conforme o protocolo experimental. Sendo selecionados os dias d0, d3, d6, d9, d12 e d15 para análise estatística.

4.2.2.13.4 Consumo de água e ração

O consumo de água e ração foi mensurado, diariamente, desde o início do tratamento, utilizando-se a balança citada anteriormente. Sendo diariamente oferecido 50 g de ração para cada animal. Em relação à água, a cada dia também foi avaliado a ingestão de água, com disponibilidade de 100 mL diariamente.

4.2.2.13.5 Análise macroscópica

Após a eutanásia dos animais, os órgãos (coração, pulmões, baço, fígado, rins e pâncrea) foram retirados e analisados quanto aos parâmetros macroscópicos, sendo: coloração e aspecto.

4.2.2.13.6 Análise estatística

Os resultados obtidos nas análises estão expressos em média \pm erro padrão da média (média \pm E.P.M). Para comparar os dados do consumo de água, ração, desenvolvimento ponderal, aplicou-se o ANOVA, seguido teste de Turkey. O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0.05$). O software empregado foi o GraphPad Prism[®] (versão 5.03).

4.2.3 Desenvolvimento do sistema polimérico nanoparticulado contendo EEEO

4.2.3.1 Síntese do sistema polimérico nanoparticulado contendo EEEO

Para a síntese do sistema polimérico nanoparticulado (SPN) contendo EEEO, foi utilizado o método de nanoprecipitação, que consiste na precipitação ou deposição interfacial de um polímero pré-formado, uma vez que ocorre na interface de uma emulsão O/A. O método foi baseado em Gandhi, Jana e Sen (2014) que baseia-se na preparação de uma solução ácida de 200 mL, sendo 10% de ácido acético em etanol 92%. Em 25 mL desta solução, foram solubilizados o EEEO (50 mg) e o polímero Eudragit[®] (500 mg), sob agitação. Esta solução constituiu a fase orgânica.

Em seguida solubilizou-se, com ajuda de agitador magnético, 500 mg de Tween 80 em 75 g de água destilada. A fase orgânica (contendo EEEO e Eudragit[®]) foi então vertida sobre a fase aquosa sob agitação (Fisatom, SP, Brazil), por 20 minutos.

4.2.3.2 Caracterização do sistema polimérico nanoparticulado contendo EEEO

4.2.3.2.1 Determinação do diâmetro médio, potencial zeta e polidispersão do SPN contendo EEEO

O diâmetro das partículas em suspensão, o potencial zeta e o índice de polidispersão foram determinados através equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). As análises foram realizadas em triplicata.

Também foi avaliado o efeito da temperatura sob as propriedades tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta assim como o comportamento destes parâmetros numa faixa de pH de 1-10.

4.2.3.2.2 Condutividade e pH dos SPN contendo EEEO

As medidas de condutividade específica foram realizadas utilizando-se um condutímetro modelo 170 da ATI-ORION. O pH das amostras foi determinado em potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 e os resultados correspondem à média de três determinações. Ambas as medidas obtidas através da inserção direta do eletrodo.

4.2.3.2.3 Eficiência de encapsulação do SPN contendo EEEO

A concentração total de antocianinas do EEEO no SPN foi determinada pelo método do pH diferencial como descrito para o EEEO.

A concentração de antocianinas livres, ou seja, não associadas às nanopartículas, foi determinada no ultrafiltrado obtido a partir de filtração prévia (ultrafiltração/centrifugação). A quantidade de antocianinas do EEEO associada às partículas foi determinada pelo parâmetro eficiência de encapsulação (EE), calculado da seguinte maneira (MUTHU; SINGH, 2008).

$$EE(\%) = \frac{\text{Concentração de (antocianinas totais - antocianinas livres)}}{\text{Concentração teórica de antocianinas}} \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

4.2.3.2.4 Avaliação de estabilidade por centrifugação do SPN contendo EEEO

Para o teste de centrifugação, 3 gramas da formulação foram submetidos a rotação de 3000 rpm durante 30 minutos. O teste foi efetuado 48 horas e 30 dias após o preparo.

4.2.3.2.5 Estudo de estabilidade do SPN contendo EEEO

O SPN contendo EEEEO e placebo, e o próprio EEEEO, foram armazenados por até 90 dias sob diferentes condições experimentais:

- a) temperatura ambiente, protegidos da luminosidade;
- b) temperatura ambiente, expostos à luminosidade, e;
- c) a 50°C (± 1) protegido da luminosidade.

Os experimentos foram realizados em triplicata. As amostras foram retiradas a intervalos de tempo predeterminados (0, 30, 60 e 90 dias) e analisadas a fim de determinar as dimensões das partículas, pH, teor de antocianinas totais e associadas.

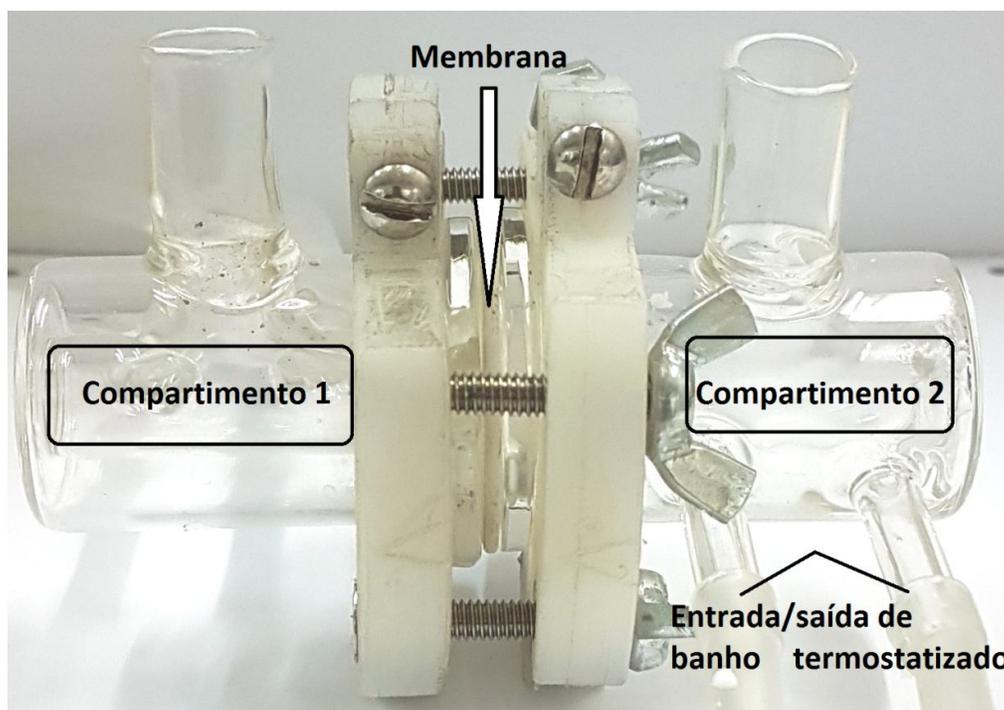
4.2.4 Estudo da liberação *in vitro* de antocianinas totais pelo SPN após permeação em membrana sintética e biológica

4.2.4.1 Sistema de permeação (adaptado de Silva Júnior *et al.* (2006) e Meira (2010)).

Os experimentos foram adaptados de Silva Júnior *et al.* (2006) e Meira (2010). O sistema utilizado consiste de dois compartimentos 1 e 2 de (Figura 4) onde o compartimento 1, é denominado de câmara doadora (CD) e o 2, de câmara receptora (CR). A amostra em estudo é acondicionada na CD e a solução receptora na CR. Entre as duas câmaras as membranas (sintética e biológica) foram inseridas e fixadas. A membrana ficou de um lado em contato com a amostra em estudo e, do outro, com a solução receptora. Desta forma, todo material permeado pela membrana foi quantificado na fase receptora. Tanto a CD como a CR foram aquecidas com banho termostatizado a aproximadamente 36,5°C ± 1 durante todo o processo.

Alíquotas de 200 μ L foram coletadas na CR, nos intervalos pré-determinados de 15, 30, 60, 120, 240 e 480 minutos, simultaneamente à reposição de solução receptora. O tempo total de ensaio foi de 8 horas seguindo as recomendações da World Health Organization - Environmental Health Criteria 235 - Dermal Absorption (WHO, 2006). O método do pH diferencial foi utilizado para determinação do teor de antocianinas totais permeadas.

Figura 4: Sistema de permeação *in vitro*



Fonte: Autor

4.2.4.2 Experimentos realizados em membrana sintética

Foram utilizados cortes de membrana hidrofílica (acetato de celulose, Solvay - Rhodia) previamente fervidos durante 5 minutos. Conforme esquema do processo de difusão a amostra foi colocada em contato com a superfície da membrana na câmara doadora. Na câmara receptora, utilizou-se 5 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 7,4. A área de exposição da membrana foi de aproximadamente 1,77 cm². O experimento foi efetuado em triplicata para cada amostra. Foram realizados experimentos com a formulação desprovida do EEEO com a finalidade de controle confirmatório da especificidade. Os valores determinados para a massa permeada foram plotados em função do tempo.

4.2.4.3 Experimentos realizados em membrana biológica

Foram utilizadas orelhas de suínos obtidas na Feira do Produtor (Macapá-AP), logo após o abate. Após o recebimento, as orelhas foram lavadas em água corrente, pêlos arrancados e embaladas individualmente em papel filme e alumínio, respectivamente. Na véspera dos experimentos, as orelhas foram transferidas para refrigerador para

descongelar. A pele da parte externa das orelhas foi cuidadosamente descolada com bisturi e o excesso de gordura subcutânea foi retirado com auxílio de tesoura e pinça. Foram cortados segmentos circulares de aproximadamente 3 cm de diâmetro (área efetiva para contato com formulação é de 1,77 cm²) com o cuidado de não utilizar as partes com vasos sanguíneos e marcação. O mesmo esquema montado para difusão em membrana sintética foi aplicado para membrana biológica e os resultados comparados entre si.

4.2.5 Desenvolvimento da formulação de comprimidos contendo EEEO

4.2.5.1 Excipientes utilizados

Os excipientes utilizados foram: celulose microcristalina (Avicel, USA); dióxido de silício coloidal (Aerosil[®]V-200, Degusa, Bélgica); amido de milho: (Amidon, Espanha).

4.2.5.2. Desenvolvimento e caracterização das formulações

Foi desenvolvido um granulado base (amido 23%; celulose microcristalina 72%; aerosil 5%) para a compressão direta com EEEO. Optou-se por utilizar adjuvantes de secagem da própria formulação (dióxido de silício coloidal 35% e celulose microcristalina 5% em relação ao teor de sólidos após concentração) na liofilização do EEEO.

Após secagem o extrato também foi caracterizado quanto ao perfil espectroscópico na região do infravermelho e perfil térmico (TG e DSC) como procedido para o extrato sem adjuvante. O tamanho das partículas do pó obtido foi determinado segundo Farmacopeia Brasileira V (2010).

O teor de antocianinas totais foi determinado com amostras do EEEO (~50 mg) solubilizadas em soluções tampão de pH 1,0 e pH 4,5. As leituras de absorvância foram realizadas em 520 nm e 700 nm. Três determinações foram efetuadas utilizando-se amostras em triplicata (totalizando nove determinações) da parte superior, média e inferior do recipiente em que o EEEO fora armazenado. O resultado foi obtido com a média das determinações e foi informado seu desvio padrão. A Equação 7 foi utilizada para determinar o teor de antocianinas totais presentes no EEEO:

$$CAT (\% p/p) = \frac{A}{\epsilon \times l} \times MM \times FD \times \frac{V}{m} \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

Onde, MM é a massa molecular da antocianina de referência; FD é o fator de diluição utilizado; v é o volume de solução; m é a massa de extrato utilizada.

Foram desenvolvidas 4 (quatro) formulações para avaliar qual apresentaria as melhores propriedades para melhor desenvolvimento do comprimido, como pode ser visto na Tabela 6.

Tabela 6 – Desenvolvimento de formulação com variação de estearato

	F1	F2	F3	F4
Granulado	20 g	20 g	20 g	20 g
Lactose	5 g	5 g	5 g	5 g
Estearato de Mg	0,05 g	0,08 g	0,11 g	0,14 g
EEEE	2,5 g	2,5 g	2,5 g	2,5 g

A seleção da formulação de escolha foi efetuada após avaliação do volume bruto, volume de compactação, densidade bruta, densidade de compactação, tempo de fluxo, velocidade de fluxo e índice de compressibilidade.

4.2.5.2.1 Perfil de compactação

O perfil de compactação foi determinado utilizando provetas de 50 mL, com 10 g da amostra, inicialmente foi observado o volume bruto (Vb). Em seguida era submetido a 50, 100, 150 e 250 quedas, até volume constante, obtendo o volume de compactação (Vc). O procedimento foi efetuado em triplicata (FARMACOPEIA BRASILEIRA V, 2010).

4.2.5.2.2 Determinação das densidades bruta e de compactação

As densidades bruta e de compactação (sistemas de empacotamento frouxo e estável) foram determinadas utilizando-se volume de compactação, medindo-se o volume livremente ocupado (Vb) por cerca de 10 g de amostra, em proveta de 50 mL, e após ser submetido a 50, 100, 150 e 250 quedas, o procedimento foi efetuado em triplicata, obtendo-se o volume de compactação (Vc). A densidade bruta (Db) e de compactação (Dc) foram calculadas pelas seguintes equações:

$$Db = \frac{m}{Vb} \quad \text{Equação (8)} \quad Dc = \frac{m}{Vc} \quad \text{Equação (9)}$$

Onde dB = densidade bruta; dC = densidade de compactação; m = massa do pó; Vb = volume bruto do pó; Vc = volume de pó compactado (FARMACOPEIA BRASILEIRA V, 2010).

4.2.5.2.3 Determinação do índice de compressibilidade

Para o cálculo do índice de Carr (IC) ou índice de compressibilidade, foram utilizados os dados obtidos para a dB e dC, segundo a equação:

$$IC (\%) = \frac{d_c - d_b}{d_c} \times 100 \quad \text{Equação (10)}$$

Onde IC = índice de compressibilidade, dc = densidade de compactação e db = densidade bruta (GUYOT *et al.*, 1995).

4.2.5.2.4 Determinação do tempo e velocidade de fluxo

Para a avaliação da velocidade de escoamento, aplicou-se metodologia proposta pela Farmacopeia Americana (USP, 2016) adaptada. Alíquotas de 10 g das amostras foram transferidas para interior do funil de 250 mL, com abertura de 11,3 mm, altura de 14 cm e base fixa, determinando-se a seguir a velocidade de escoamento. E com o auxílio de um cronômetro, determinou-se o tempo necessário para o total escoamento do material através do funil.

4.2.6 Desenvolvimento e caracterização do comprimido

Após a seleção da formulação com as melhores propriedades de fluxo, foi efetuada a compressão do pó, em uma prensa hidráulica. As seguintes forças de compressão foram utilizadas: 4KN, 6KN, 8KN, 10KN e 12KN. E em seguida os comprimidos passaram pelos testes de friabilidade, dureza, desintegração e dissolução.

4.2.6.1 Determinação do peso médio

O peso médio foi determinado com a pesagem de 20 comprimidos individualmente, em balança analítica, como preconiza a Farmacopeia Farmacopeia Brasileira V (2010). O

peso médio foi obtido calculando-se a média aritmética das 20 determinações de peso. Também foram calculados os coeficientes de variação.

4.2.6.2 Perfil de compressão

Foi obtido o perfil de compressão usando comprimidos preparados a pressão de 4, 6, 8, 10 e 12KN. Se utilizou uma prensa hidráulica com uma matriz de 13 mm. A cada pressão aplicada, diâmetro e altura do comprimido foram medidos usando um paquímetro. O peso dos comprimidos foi determinado usando uma balança analítica. Ilustrou-se no Gráfico de Heckel a determinação do tipo de deformação que a compressão causa no pó desenvolvido.

4.2.6.3 Determinação da friabilidade

Foram pesados 20 comprimidos e em seguida colocados em um friabilômetro e submetidos a 20 rpm por 5 minutos. Após esse procedimento os comprimidos foram pesados novamente. Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), o percentual de perda não deve ser maior que 1,5% (FARMACOPEIA BRASILEIRA V, 2010).

4.2.6.4 Determinação da dureza

O teste foi realizado com 10 comprimidos, eliminando qualquer resíduo superficial antes de cada determinação. Os comprimidos são testados, individualmente, obedecendo sempre à mesma orientação (considerar a forma, presença de ranhura e gravação). Expressar o resultado como a média dos valores obtidos nas determinações. O resultado do teste é informativo (FARMACOPEIA BRASILEIRA V, 2010).

4.2.6.5 Determinação do tempo de desintegração

Foram utilizados 6 comprimidos e cada um foi colocado em um recipiente, onde o líquido de imersão foi água à 37°C. O tempo que o comprimido levou para se desintegrar foi cronometrado. O resultado foi expresso como a média dos 6 comprimidos de cada força de compressão testada (FARMACOPEIA BRASILEIRA V, 2010).

4.2.6.6 Desenvolvimento do perfil de dissolução

O perfil de dissolução foi baseado no método descrito pela Farmacopeia Brasileira (2010) item 5.1.5. Foi conduzido em um aparelho de dissolução com seis cubas modelo 299 (Nova Ética, Ltda. São Paulo, Brasil)

4.2.6.6.1 Preparação do suco digestivo

A solução simulada do suco gástrico que foi usada como líquido de imersão consistiu-se de: 16% (massa/volume) de pepsina dissolvida em 0,1 mmol/L de HCl (57633 FIP-U/100g). A mistura de pancreatina-biliar foi preparada por dissolução de 0,4% (massa/volume) de pancreatina e 0,76% (massa/volume) de bile em 0,1 mmol/L de Bicarbonato de sódio (NaHCO₃).

4.2.6.6.2 Teste de dissolução

Em cada cuba, de 900 mL constou a solução simulada de suco gástrico que foi o meio de dissolução, a velocidade de agitação foi de 75 rpm. Onde em cada cuba foi adicionado apenas um comprimido (FARMACOPEIA BRASILEIRA V, 2010).

A dissolução foi estabelecida com a quantificação de antocianinas liberadas no suco digestivo nos tempos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 minutos, retirando-se alíquotas de 5 mL, filtradas com papel filtro (12,5 cm de diâmetro). O teor de antocianinas totais foi determinado pelo método do pH diferencial para cada alíquota como procedido para o EEEO.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MATERIAL

A conservação do material vegetal é muito importante para o adequado desenvolvimento de pesquisas com plantas medicinais. Neste sentido, Rogez (2000) reporta que as condições de umidade relativa e temperatura altas da região, favorecem um rápido crescimento microbiano e há um dessecamento dos frutos, com um acréscimo de adesão da polpa ao caroço, provocando uma perda de rendimento tanto da polpa como do conteúdo de antocianinas. Por isso, os frutos de açaí foram conservados a temperatura -4°C , em geladeira, até sua utilização no processo extrativo.

5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO DOS FRUTOS DE *Euterpe oleraceae* Mart. (EEEE)

Na Tabela 7 são apresentados os resultados das corridas experimentais realizados durante o processo de extração.

Tabela 7 - Resultados da matriz experimental obtida para o processo de extração de antocianinas.

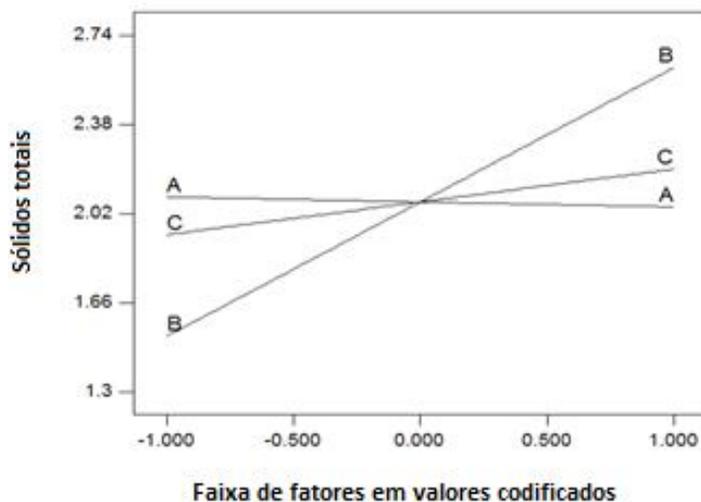
	Etanol 92% (mL)	Ácido acético (mL)	Tempo (h)	pH	Sólidos Totais (%)	Fenóis totais (%)	Antocianinas totais (mg/L)
1	400	25	4	$4,17 \pm 0,14$	$1,30 \pm 0,34$	$66,67 \pm 4,04$	$43,67 \pm 3,26$
2	400	25	6	$4,15 \pm 0,16$	$2,00 \pm 0,26$	$65,71 \pm 4,28$	$45,71 \pm 2,36$
3	400	75	4	$3,47 \pm 0,18$	$2,35 \pm 0,18$	$24,65 \pm 1,81$	$61,75 \pm 3,28$
4	400	75	6	$3,45 \pm 0,11$	$2,70 \pm 0,31$	$28,30 \pm 2,43$	$66,28 \pm 2,71$
5	450	50	5	$3,82 \pm 0,14$	$2,03 \pm 0,41$	$46,01 \pm 2,13$	$48,76 \pm 1,69$
6	450	50	5	$3,81 \pm 0,13$	$2,15 \pm 0,23$	$48,24 \pm 3,38$	$58,21 \pm 4,66$
7	500	25	6	$4,22 \pm 0,11$	$1,45 \pm 0,11$	$60,94 \pm 3,21$	$36,15 \pm 2,57$
8	500	25	4	$4,26 \pm 0,15$	$1,35 \pm 0,54$	$71,88 \pm 3,57$	$46,88 \pm 2,37$
9	500	75	6	$3,51 \pm 0,18$	$2,65 \pm 0,33$	$29,34 \pm 3,85$	$66,53 \pm 1,28$
10	500	75	4	$3,57 \pm 0,14$	$2,74 \pm 0,39$	$33,85 \pm 2,59$	$65,57 \pm 3,10$

Todos os resultados são expressos na média \pm DP, n=3.

5.2.1 Influência dos fatores experimentais no teor de sólidos totais

A Figura 5 apresenta a perturbação para sólidos totais com fatores codificados. O volume de etanol a 92% (A) não afeta o total de sólidos. Porém o volume de ácido acético (B) mostra um efeito visível sobre esta resposta. Quanto maior o volume de ácido acético utilizado, maior o total de sólidos obtidos. Quando ao tempo de extração (C) é aumentado, um pequeno incremento de rendimento sobre a variável de sólidos totais é percebido.

Figura 5: Perturbação da resposta teor de sólidos totais com fatores codificados.



A: volume de etanol 92%, B: volume de ácido acético e C: tempo de extração. O ponto central da figura (0,000): quantidade de álcool (92%) 450 mL: ácido acético 50 mL: tempo de extração 5h).

Na Tabela 8 é apresentada a análise de variância (soma parcial de quadrados) do modelo ajustado para o fator de sólidos totais. Observou-se a significância do modelo ajustado ($p < 0,05$). O teste de falta de ajuste não foi significativo. O valor de r^2 ajustado foi de 0,9850 e o valor de r^2 predito foi 0,9156 com um valor PRESS (soma de quadrados de erro residual prevista de 0,23). Todos os termos e as interações do modelo foram significativos ($p < 0,05$), exceto o fator volume de álcool e a interação volume de ácido-tempo de extração, ambos com $p > 0,05$ (Tabela 8).

Tabela 8 - Análise de variância para o modelo polinomial de primeiro grau ajustado para sólidos totais

Modelo possível	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	F	
				Volume	P ($\alpha=0,05$)
Modelo	2,7579	6	0,4596	123,01	0,0011*
A: Volume de álcool	0,0032	1	0,0032	0,86	0,4230
B: Volume de ácido	2,3544	1	2,3544	630,09	0,0001*
C: Tempo/extração	0,1404	1	0,1404	37,59	0,0087*
A: B interação	0,0882	1	0,0882	23,60	0,0167*

A:C interação	0,1352	1	0,1352	36,18	0,0092*
B:C interação	0,0364	1	0,0364	9,75	0,0523
Residual	0,0112	3	0,0037	-	-
Falta de ajuste	0,0040	2	0,0020	0,28	0,8014
Erro	0,0072	1	0,0072	-	-
Cor Total	2.7700	9	-	-	-

Um dos parâmetros mais importantes em um processo de extração é a quantidade de sólidos solúveis extraídos (SHARAPIN, 2000). A afinidade das antocianinas para o meio ácido, bem como outras substâncias ácidas relativas como flavonoides, polifenóis, aminoácidos, peptídeos ou proteínas que podem ser extraídos neste meio, pode explicar a relação diretamente proporcional entre a quantidade de ácido acético utilizado e o teor de sólidos totais (DAI; MUMPER, 2010). O tempo de extração não apresenta grande influência sobre os sólidos totais extraídos.

Quando se deseja que um modelo matemático descreva um processo de maneira eficiente, é necessário que a variabilidade das respostas seja bem explicada pela variabilidade dos fatores. Dentro desse propósito, o R^2 ajustado representa a ferramenta matemática para medir o grau de resposta explicado pelo modelo. Ele compara o poder explicativo dos modelos de regressão que contém diferentes números de preditos. O R^2 ajustado aumenta somente se o novo termo melhora o modelo mais do que se espera pelo acaso e diminui quando um predito melhora o modelo menos do que o esperado (GABRIELSON; LINDBERG; LUNDTEDT, 2002)

O R^2 predito indica quão bem um modelo de regressão prediz respostas para novas observações. Ele fornece informações cruciais pois, quando há uma diferença maior que 0,3 é um sinal de que o modelo não é bom para a previsão. A estatística PRESS (erro de previsão da soma dos quadrados) é uma forma de validação cruzada utilizada na análise de regressão, para fornecer uma medida sumária do ajuste de um modelo a uma amostra de observações que não foram utilizadas para estimativa. Modelos que estão supraparametrizados tenderiam a dar pequenos resíduos para observações incluídas no modelo de ajuste, mas, grandes resíduos para as observações que são excluídas. Os valores mais baixos de PRESS indicam as melhores estruturas do modelo. O teste de falta de ajuste é uma medida da robustez do modelo ajustado (MONTGOMERY; GEORGE, 2003).

Como o fator Volume de álcool e a interação Volume de ácido-Tempo de extração não foram significativos ($p < 0,05$, Tabela 8), o modelo matemático para esta resposta pode ser expresso como:

$$S. \text{ totais} = 2,07 + 0,54 * B + 0,13 * C + 0,10 * A * B - 0,13 * A * C \text{ Equação (11)}$$

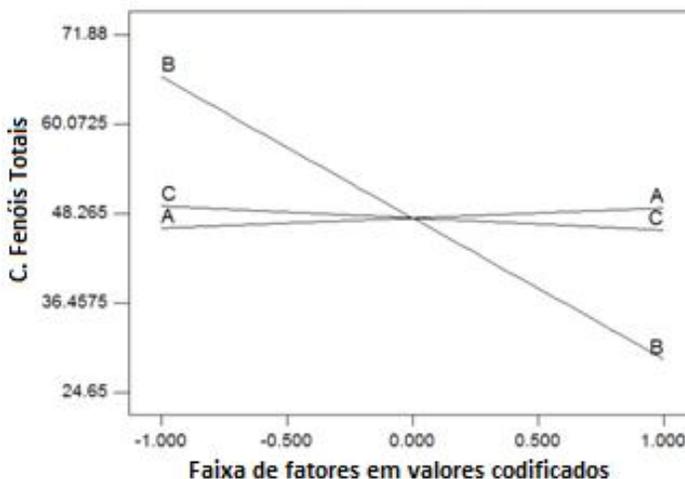
Onde A: volume de etanol 92%; B: volume de ácido acético; C: tempo de extração.

Esta expressão permite fazer uma predição pois, há concordância entre R^2 ajustado (0,9959) e R^2 predito (0,9858) (diferença menor que 0,3), o teste de falta de ajuste não foi significativo e apresenta um valor baixo de PRESS (0,2376). Todas estas estatísticas sugerem que esta resposta é bem explicada pelo modelo.

5.2.2 Influência dos fatores experimentais no teor de fenóis totais

A figura 6 mostra o gráfico de perturbação dos fatores para fenóis totais. O volume de álcool e tempo de extração (linhas A e C, figura 6) não afetam o conteúdo total de fenóis. Por outro lado, à medida que o volume de ácido acético aumentou (linha B, figura 6), observou-se uma acentuada diminuição no total de compostos fenólicos.

Figura 6: Perturbação da resposta fenóis totais com fatores codificados



A: volume de etanol 92%, B: volume de ácido acético e C: tempo de extração. O ponto central da figura (0,000): quantidade de álcool (92%) 450 mL: ácido acético 50 mL: tempo de extração 5h).

Na Tabela 9, é mostrada a análise de variância (soma parcial de quadrados) do modelo ajustado para fenóis totais. Este modelo ajustado mostra significância com $p < 0,05$. Apenas os termos volume de ácido acético e a interação volume de álcool-tempo de

extração mostrou significância ($p < 0,05$). O teste de falta de ajuste não foi significativo. O valor do R^2 ajustado foi 0,9960, o valor do R^2 predito foi 0,9874 com um valor de critério PRESS (erro de previsão da soma dos quadrados) de 36,44.

Tabela 9 - Análise de variância para o modelo polinomial de primeiro grau ajustado para fenóis totais.

Modelo possível	Soma dos quadrados	DF	Quadrado médio	F	
				Valor	P ($\alpha=0,05$)
Modelo	2880,3430	6	480.0572	331.02	0.0030*
A: Volume de álcool	14,2578	1	14.2578	9.83	0.0884
B: Volume de ácido	2777,3600	1	2777.3600	1915.09	0.0005*
C: Tempo de extração	20,3522	1	20,3522	14,03	0,0644
A:B interação	12,0050	1	12,0050	8,28	0,1026
A:C interação	41,1324	1	41,1324	28,36	0,0335*
B:C interação	15,2352	1	15,2352	10,50	0,0834
Residuo	2,9005	2	0,4709	-	-
Falta de ajuste	0,4140	1	1,4505	0,17	0,7533
Erro	2,4864	1	0,4145	-	-
Cor Total	2883,7100	9	2,4864	-	-

* significância, $\alpha=0.05$. GL = Grau de Liberdade

O método de Folin Ciocalteu é um método analítico para estimar os grupos hidroxil totais presentes no extrato que foi reduzido por uma mistura de sais de molibdênio e tungstênio. O método pressupõe que a absorção de luz a 760 nm aumenta de acordo com a quantidade de grupos hidroxil que estão presentes na amostra. Os fenóis são compostos benzílicos cíclicos, ligados a pelo menos um grupo hidroxil associado diretamente com a estrutura do anel. Com base na sua estrutura, distinguem-se dois grupos, nomeadamente os fenóis flavonoides e não flavonoides (BOWYER, 2002).

Ribeiro *et al.* (2010) determinaram conteúdo de compostos fenólicos no açaí em 13,9 mg/g GAE. Estes valores eram mais baixos do que outras bagas escuras. Por exemplo, blueberries liofilizadas tinham um valor mais alto de teor de fenólicos totais com 33 mg GAE/g (CASTREJON *et al.*, 2008).

A redução acentuada observada em fenóis totais, quando o volume de ácido acético aumenta em solução, pode estar relacionada com o fato de serem ácidos fracos (grupo fenólico-OH), o que torna os fenóis mais solúveis em solventes com pH maior que das condições do trabalho. Por isso, são normalmente extraídos utilizando um solvente polar com a adição de hidróxido de sódio ou de potássio. Em um meio ácido, a solubilidade de fenóis é reduzida, exceto as antocianinas (DAI; MUMPER, 2010).

O modelo obtido para fenóis totais representa adequadamente o comportamento desta resposta como consequência da variação dos fatores. Nesse sentido, o modelo mostra concordância entre o R^2 ajustado e R^2 predito (menor que 0,3) com um bom valor de PRESS (MONTGOMERY; GEORGE, 2003). Apenas o fator volume de ácido acético e a interação Volume de álcool-tempo de extração foram significativos ($p < 0,05$) por esta razão, a equação matemática para esta resposta pode ser expressa como:

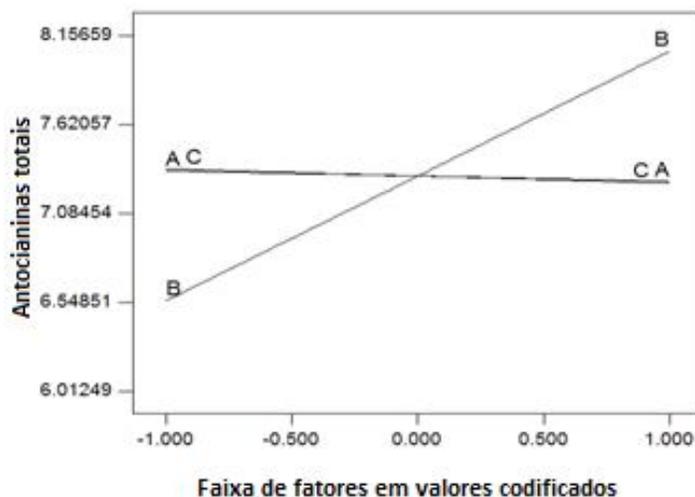
$$\text{Fenóis totais} = 47,67 - 18,63 * B - 2,27 * A * C \quad \text{Equação (12)}$$

Onde A: volume de etanol 92%, B: volume de ácido acético e C: tempo de extração.

5.2.3 Influência dos fatores experimentais no teor de antocianinas totais

A Figura 7 mostra a perturbação dos fatores para a raiz quadrada do teor de antocianinas totais. Os fatores volume de álcool e tempo de extração (linhas A e C, figura 7) praticamente não afetam o teor de antocianinas nos extratos. Por outro lado, à medida que o volume de ácido acético aumenta (linha B, figura 7), observou-se um aumento acentuado no teor de antocianinas.

Figura 7: Perturbação da resposta antocianinas totais com fatores codificados.



Sólidos totais. A: etanol a 92%, B: ácido acético, C: tempo de extração. Ponto central da figura (0,00): quantidade de álcool (92%) 450 mL: ácido acético 50 mL: tempo de extração 5 h.

Na tabela 10 é apresentada a análise de variância (soma parcial de quadrados) do modelo ajustado para a raiz quadrada do teor de antocianinas. O modelo ajustado mostra significância com $p < 0,05$ (Tabela 10). Apenas o volume de ácido acético foi significativo ($p < 0,05$). Não houve interação entre os fatores. O teste de falta de ajuste não foi significativo. O valor r^2 ajustado foi de 0,8467, o valor r^2 predito foi 0,2136 com um valor PRESS de 858,43.

Tabela 10 - Análise de variância para o modelo polinomial de primeiro grau ajustado para a raiz quadrada do teor de antocianinas.

Modelo possível	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	F	
				Volume	P ($\alpha=0,05$)
Modelo	4,5599	3	1,5199	11,35	0,0114*
A: Volume de álcool	0,0081	1	0,0081	0,06	0,8151
B: Volume de ácido	4,5373	1	4,5373	33,89	0,0021*
C: Tempo de extração	0,0144	1	0,0144	0,11	0,7561
Resíduo	0,6694	6	0,1115		
Falta de ajuste	0,4603	5	0,0920	0,55	0,7511
Erro	0,2091	1	0,2091		
Cor Total	5,2293	9			

* significância, $\alpha=0.05$. GL – grau de Liberdade

O método desenvolvido por Fuleki e Francis (1968), conhecido como método do pH diferencial, foi utilizado neste estudo, e é fundamentado nas transformações estruturais sofridas pelas antocianinas em diferentes pHs, resultando em diferentes espectros de absorção. O método tem a vantagem de não necessitar do uso de padrão que tem custo elevado, nem outras correções adicionais, o que agiliza procedimentos de quantificação para rotina industrial.

Portanto, a diferença da absorbância nos diferentes pHs é proporcional à concentração de antocianinas. A concentração destes metabólitos nas amostras de frutas estudadas é obtida em função do padrão cloreto de cianidina-3-O-glicosídeo ($\epsilon = 26900 \text{ g mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em pH 1,0 e solução aquosa), pois é a antocianina predominante na maioria das frutas (GIUSTI; SAONA; WROLSTAD, 1999; TORKANGER POLL; ANDERSEN, 2005).

As antocianinas são os polifenóis mais abundantes no fruto de açaí (SCHAUSS *et al.*, 2006a). Entre as substâncias fenólicas, as antocianinas são consideradas os compostos mais ativos biologicamente, contribuindo para o alto potencial antioxidante (POMPEU; BARATA; ROGEZ, 2009).

São moléculas únicas entre os polifenóis das plantas porque podem estar presentes nos tecidos como diferentes espécies químicas. Em pH baixo, são estáveis e estão predominantemente presentes na forma cátion flavilium, dando uma cor avermelhada em soluções aquosas e essa característica química das antocianinas provavelmente levou a um uso mundial de solventes contendo ácidos minerais ou orgânicos para a extração de antocianinas (REVILLA; RYAN; MARTIN-ORTEGA, 1998; TERCI; ROSSI, 2002).

O efeito do volume de ácido acético no teor de antocianinas dos extratos ocorre porque as elas são os únicos grupos de fenóis que podem ser favorecidos pelo aumento da acidez do meio de solução. Isto porque o oxigênio presente no anel heteronuclear aromático possui uma densidade eletrônica pronunciada que permite aceitar um H⁺ a partir do ácido acético, obtendo uma carga positiva e finalmente dissolvido preferencialmente (DAI; MUMPER, 2010).

O tempo de extração não apresentou significância estatística ($p > 0,05$). Isso pode ser explicado pelo fato de que as antocianinas glicosiladas no fruto do açaí estão localizadas na região mais externa dos frutos (ROGEZ, 2000) e como o volume e a acidez do solvente são adequados, a maioria das antocianinas é extraída logo no início do processo de extração.

Como o volume de ácido acético foi o único fator estatisticamente significativo, a equação matemática do modelo pode ser expressa como:

$$\text{Teor de antocianinas} = 54,07 + 10,96 * B \quad \text{Equação (13)}$$

Onde B é o volume de ácido acético. Apesar do valor do R² ajustado do modelo ser bom (0,8467), o valor de R² predito para esta resposta não foi (0,2136) (diferença maior do que 0,3). Isso é um indicativo de que o modelo não é adequado para as previsões.

5.2.4 Seleção das melhores condições do processo de extração

Para a seleção das melhores condições de extração foi utilizado um grau de importância. O software Design-Expert tem como base para a sua otimização numérica uma função (Equação 14) que utiliza o grau de importância para calcular a média geométrica (multiplicativa) de todas as variáveis desejáveis individuais (di) que variam de 0 (menor) a 1 (mais):

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_n)^{1/n} = (\prod_{i=1}^n d_i)^{1/n} \quad \text{Equação (14)}$$

Onde n é o número de respostas. Se qualquer uma das respostas estiver fora do seu grau de importância, a função global torna-se zero (MONTGOMERY; GEORGE, 2003). Como neste trabalho visou-se obter um extrato rico em antocianinas, foi escolhido o método com maior teor de antocianinas totais. A importância das respostas é mostrada na Tabela 11.

Tabela 11 - Restrições para a seleção do melhor processo de extração.

Nome	Objetivo	Limite	Limite	Importância
		baixo	Alto	
Volume de álcool	Minimizar	400	500	3
Volume de ácido acético	maximizar	25	75	3
Tempo de extração	Minimizar	4	6	3
Sólidos Totais	intervalo	1.3	2.74	3
Fenóis Totais	minimizar	24.65	71.88	4
Antocianinas	maximizar	36.15	66.53	5

Nestas condições foram obtidas três soluções possíveis, todas elas com valor de importância maior do que 0,98. Entre a solução foram incluídas as condições utilizadas nas séries 3 e 4 (Tabela 7). A extração 3 foi a escolhida por possuir um tempo de extração menor.

Nas condições do ensaio número 3 (volume de álcool 92%: 400 mL, Volume de ácido acético: 75 mL, Tempo de extração: 4h), foram efetuadas três repetições. E um teste t de Student para uma comparação do resultado previsto com o que foi obtido. Os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Comparação estatística entre o resultado previsto e o observado utilizando a condição obtida com a função desejável.

Variáveis	Predito	Observado	t-teste	p-valume
Sólidos Totais (%)	2,37	2,31 ± 0,17	2,3349	0,0798
Fenóis Totais (%)	24,89	30,71±2,93	3,4325	0,0264
Antocianinas Totais (mg/L)	66,06	67,23±2,55	0,8218	0,4573

Os resultados mostraram que existem diferenças estatísticas entre o valor observado e o valor predito para o teor de fenóis totais ($p < 0,05$), o valor observado foi

maior que o predito. Porém, não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$) tanto para o teor de sólidos como para o teor de antocianinas totais.

A seleção das melhores condições para o estabelecimento do método de extração é uma tarefa complexa que depende de muitos fatores. Primeiro, os que dependem do fruto selecionado, o grau de amadurecimento, a qualidade do processo de coleta e preparação, e segundo as condições de extração como temperatura, tipo de solvente, tempo de extração, agitação, recipiente protegido da luz (para antocianinas, porque são fotossensíveis). Como a finalidade do extrato é ser usado como antioxidante, é importante considerar a presença dos compostos fenólicos que possui.

A escolha do método de extração de antocianinas depende da proposta de aplicação, de maneira geral é importante que seja um método simples, rápido, de baixo custo e que utilize solventes extratores de baixa toxicidade.

Um estudo foi conduzido com a metodologia de superfície de resposta utilizada para otimizar a extração com solvente de antioxidantes fenólicos de frutos de açaí, utilizando uma equação polinomial de segunda ordem para descrever os dados experimentais para fenóis totais (TP), antocianinas totais (TA) e capacidade antioxidante total (AAO). Um planejamento composto central rotativo com três variáveis (proporção de etanol, concentração de ácido clorídrico e temperatura) foi, em seguida, utilizado. Os resultados mostraram um bom ajuste para o modelo proposto ($R^2 > 0,89$). TP e TA, bem como TA e AAO, mostraram correlações significativas ($P < 0,05$). As condições otimizadas que maximizaram os rendimentos de compostos fenólicos (TP e TA) e AAO de FEO foram: proporção de etanol entre 70% e 80%, concentração de ácido clorídrico entre 0,065 e 0,074 mol / L e uma temperatura de 58° C (POMPEU, SILVA, ROGEZ, 2009).

Constant (2003), recomenda em seu trabalho que a extração de antocianinas do açaí seja obtida com frutos inteiros e frescos, pois o ato de despolar o fruto expõe a antocianina à fatores deteriorantes, o que acaba diminuindo seus valores no momento da quantificação. Também demonstra que a temperatura exerce forte influência, e que uma extração em temperatura ambiente (31+/- 1°C) efetuada em um período de 48 horas sem intervalos, é possível obter um rendimento de antocianinas satisfatório com uma média de 103,24 mg/100 mL, tendo como solvente mais eficiente o etanol 70% acidificado com HCL até pH 2,0.

Com uma metodologia diferente, onde ocorre o amolecimento e despulpamento dos frutos do açaí da mata atlântica, para Novello (2011), o solvente que se mostrou mais

eficiente, foi o etanol a 80% acidificado com ácido cítrico a 0,3%, em uma temperatura de 10 a 15° C, com média de 124,9 mg/100 g de fruto.

O aquecimento durante a extração e concentração deve ser cuidadosamente trabalhado, pois estudos realizados indicaram que as antocianinas são termicamente estáveis somente até 60°C (ALASALVAR; AL-FARSI; SHAHIDI, 2005).

O rendimento de uma extração é calculado a partir da relação percentual entre a massa de material vegetal utilizada no processo e a massa do extraído seco. Dessa forma, partindo-se de 100 g de fruto triturado, foram obtidos rendimentos de 1,3 a 2,7% nos dez experimentos.

Quanto ao pH, os extratos apresentaram caráter ácido. Este fato representa um dado determinante na escolha dos adjuvantes empregados em futuras formulações contendo o material extraído, além de ser um fator de influência na estabilidade das mesmas (MACIEL *et al.*, 2006). As densidades aparentes variaram de 0,89 a 0,91 g/mL, os quais se mantiveram dentro do limite preconizado para extrato e tintura vegetais (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990).

Em valores de pH baixo (pH ~ 2,0), as antocianinas se apresentam na forma de cátion flavílio, exibindo cor vermelha. Quando acontece o equilíbrio ácido-base ocorre uma reação de hidratação do cátion ou a protonação desse íon. A primeira reação gera um produto de coloração incolor, uma pseudobase, chamada carbinol que em meio neutro (pH ~ 6,0) se transforma em chalcona, que também é um produto incolor. Já a segunda reação produz uma base quinoidal, de coloração azul, que se apresenta em co-equilíbrio com o cátion flavílio (CABRITA; FOSSEN; ANDERSEN, 2000; COOPER-DRIVER, 2001; FLESCHHUT *et al.*, 2006).

5.2.5 Caracterização física e química do extrato etanólico liofilizado dos frutos de *Euterpe oleraceae* Mart. (EEEE)

Optou-se em liofilizar o extrato de escolha (EEEE), para manter melhor estabilidade do material, conservando-se sua composição química e sua atividade terapêutica (AYROSA *et al.*, 2007; AYROSA, 2009). Para fins farmacopeicos, os solventes residuais em produtos farmacêuticos são definidos como produtos químicos orgânicos voláteis que são utilizados na produção de substâncias medicamentosas ou excipientes ou na preparação de produtos farmacêuticos e nutracêuticos. Como os solventes residuais não fornecem qualquer benefício, devem ser removidos, para atender

às especificações de ingredientes e produtos, boas práticas de fabricação ou outros requisitos baseados na qualidade (USP, 2012).

Visto que o processo de extração envolvia ácido acético (solvente residual de classe 3, USP), é essencial demonstrar EEEO estava livre de ácido acético ou com limites abaixo do preconizado pela USP, de 5000 ppm. O teor de ácido acético no produto final foi de $25 \pm 2,33$ ppm. Este valor está de acordo com o padrão das autoridades sanitárias internacionais (USP, 2012).

5.2.5.1 Determinação do pH, perda por dessecação e teor de cinzas totais do EEEO

O pH do EEEO foi obtido pela média de três determinações no valor de 4,1, de caráter levemente ácido, característico de um meio rico em antocianinas. Foi caracterizado também através do seu teor de perda por dessecação segundo a Farmacopeia Brasileira V, que em média de três determinações foi obtido um percentual de 1,39%. A importância da determinação da perda por dessecação está ligada à estabilidade microbiológica da matéria-prima vegetal, como expressão da sua suscetibilidade ao desenvolvimento de fungos e bactérias, e à estabilidade química, representada especialmente pelos processos de hidrólise (SHARAPIN, 2000).

Além de, sob o ponto de vista tecnológico, é importante conhecer quantitativamente o conteúdo de água residual e substâncias voláteis presentes na matéria-prima, para que este valor seja considerado nos cálculos de rendimento (DE PAULA, 1996).

A determinação de cinzas totais permite a quantificação do resíduo não-volátil inorgânico presente nas drogas vegetais como integrante natural destas, sendo constituído, em particular, por carbonatos, fosfatos, cloretos e diversos tipos de óxidos (COSTA, 2000).

O resultado encontrado na determinação do teor de cinzas totais para o EEEO foi de 0,62%. Sabe-se que inúmeros fatores podem alterar esse teor, tais como aqueles relacionados aos procedimentos de coleta, secagem e transporte dos materiais, ou mesmo devido às diferenças em termos da localização geográfica dos materiais analisados (SHARAPIN, 2000; SOUSA *et al.*, 2003). Os resultados de pH, perda por dessecação, resíduo de evaporação e teor de cinzas totais do EEEO podem ser observados na Tabela 13.

Tabela 13 - Determinação do pH, perda por dessecação, resíduo de evaporação e teor de cinzas totais do EEEO.

Determinações	Resultados
---------------	------------

pH	4,1 ± 0,03
Perda por dessecação	1,39% ± 0,25
Resíduo de evaporação	97,25% ± 1,28
Teor de cinzas totais	0,62% ± 0,12

Menezes, Torres e Srur (2008) encontraram valores para uma amostra de cinzas da polpa do açaí de 3,68%. Malcher (2011) encontrou cinzas totais de 0,89% a 3,37% para polpas de três localidades, sendo 10 árvores de açaí nativo, 10 árvores de açaí manejado e 10 árvores de açaí plantado, que foram selecionadas e georeferenciadas, totalizando 30 árvores por localidade. Nascimento *et al.*, (2008) avaliaram a composição de açaí médio (tipo B) e verificaram valores de 0,41% de cinzas. Em outro estudo envolvendo a polpa de açaí (integral), os valores de cinzas variaram de 0,15% a 0,43%. Para o açaí tipo B, os valores encontrados foram de 0,16% a 0,39% e para o tipo C, a variação foi de 0,17% a 0,30% (FREGONESI *et al.*, 2010).

5.2.5.2 Análise elementar por Espectrometria de Absorção Atômica do EEEO

O EEEO apresenta um baixo teor de cinzas (0,62%) com uma composição mineral rica, incluindo Mn, Fe, Cu e Ni. Todos estes elementos são cofatores importantes das quatro isoenzimas da superóxido dismutase (SOD) que podem contribuir para a atividade antioxidante *in vivo* deste extrato. Além disso, contém, zinco, cálcio e vestígios de cádmio. A soma do teor mineral total do EEEO é inferior a 20 µg/g, este valor é o limite para os metais pesados (USP, 2012).

Os valores da composição elementar encontrada para as cinzas do EEEO estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14 - Composição elementar do EEEO.

Composição elementar	ppm
Manganés	4.852
Ferro	1.616
Zinco	0.048
Cobre	1.382
Cálcio	1.004
Cádmio	0.003
Níquel	0.369

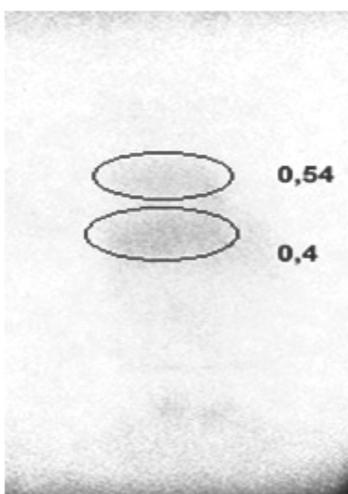
Foi encontrado que a polpa de açaí é rica em minerais essenciais (Ca, Fe, Mg, Zn), mas os níveis de manganês (Mn) são surpreendentemente mais elevados que o das fontes tradicionais destes elementos na dieta humana (DA SILVA; DE ALMEIDA; BARBOSA, 2014). Rogez (2000) cita uma quantidade de minerais de 2,0% a 3,5%.

Gordon *et al.*, (2012) observaram que os valores de cinzas e minerais (com exceção do sódio) tendem a diminuir de acordo com o amadurecimento dos frutos do açaí.

5.2.5.3 Perfil por cromatografia em camada delgada (CCD) do EEEO

A Figura 8 evidencia duas manchas no perfil por CCD do EEEO (observado sob luz ultravioleta 256nm) e seus respectivos Rfs, ilustrando a impressão digital do mesmo.

Figura 8: Perfil por CCD do EEEO e seus principais valores de Rfs. Rf1: 0,40 e Rf2: 0,54



No total, 6 corridas cromatográficas foram realizadas e os fatores de retenção (Rf) para cada mancha correspondem à média aritmética dos valores obtidos nas corridas. A importância das repetições está associada ao fato de que as antocianinas apresentam estruturas moleculares bastantes semelhantes, muitas vezes distintas apenas na quantidade e posições de hidroxilas, no grau de metilação e acilação, bem como no número de unidades de açúcar ligado à molécula (JACKMAN; YADA; TUNG, 1987). Isto consecute em valores de Rf muito próximos.

Logo, pequenas diferenças no valor de Rf podem ser bastante significativas para a avaliação dos resultados. Apesar da identificação de compostos por cromatografia sem padrões não ser recomendável, este procedimento vem sendo aceito na literatura para

inferência de antocianinas em virtude da dificuldade da obtenção de padrões e seu elevado custo. Seguindo dados e valores de referência descritos por Harborne (1979) para a primeira mancha há 12 possibilidades de antocianinas e 5 para a segunda, considerando-se os valores de Rf tabelados dentro do intervalo de média e estimativa de desvio padrão determinados com os dados experimentais. Ávila *et al.* (2009) identificaram através de comparação com padrão, a cianidina-3-O-glicosídeo (cy-3-gluc) com Rf de 0,4.

5.2.5.4 Perfil por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/UV) do EEEO

No perfil cromatográfico por CLAE, foi possível observar quatro picos com tempos de retenção: 5,175; 6,348; 6,786 e 7,712. O espectro UV mostra os picos característicos das antocianinas em 281 nm e 523 nm. Como pode ser visto na Figura 9. E na Tabela 15 observam-se os dados sobre cada pico (tempo de retenção, intensidade e absorções no UV).

Figura 9: Perfil por CLAE/UV do EEEO e espectro UV do pico majoritário.

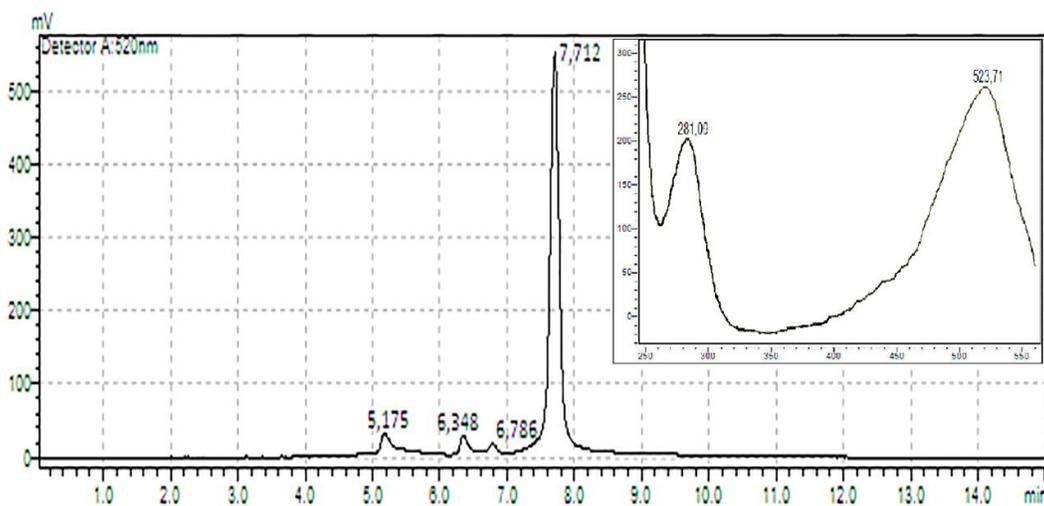


Tabela 15 - Tempos de retenção, intensidade e absorções no UV dos picos encontrados no perfil por CLAE/UV do EEEO

Pico	Tempo de retenção (min)	AUC	A (278-282 nm)	A (520-524 nm)
1	5,175	799315	0,020	0,030
2	6,348	364026	0,011	0,013
3	6,786	213009	0,006	0,008

4	7,712	6749535	0,205	0,254
---	-------	---------	-------	-------

A espécie *Euterpe oleraceae* é reconhecidamente rica em polifenóis, flavonoides e antocianinas (GALLORI *et al.*, 2004; SCHAUSS *et al.*, 2006; CHIN *et al.*, 2008; PACHECO-PALENCIA *et al.*, 2009). Tanto que amostras liofilizadas foram utilizadas para obtenção de padrões isolados de cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutinosídeo (GOUVEA *et al.*, 2012). Avula *et al.*, (2011) desenvolveram um método analítico para os principais constituintes antociânicos do fruto do açaí utilizando UPLC/HPLC e a ordem de eluição foi cianidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-rutinosídeo, pelargonidina-3-O-glicosídeo, cianidina e pelargonidina.

As principais antocianinas no açaí são cianidina 3-O-glicosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo (GALLORI *et al.*, 2004; LICHTENTHALER *et al.*, 2005; DEL POZO-INSFRAN; PERCIVAL; TALCOTT, 2006; SCHAUSS *et al.*, 2006b.; VERA DE ROSSO *et al.*, 2008; PACHECO-PALENCIA *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2010). Outras antocianinas foram encontradas em menores quantidades. Estas incluem peonidina-3-rutinosídeo e peonidina 3-glicosídeo que foram relatadas com 2 mg GAE (ácido gálico) /100 g e 4 mg GAE/100 g, respectivamente (SCHAUSS *et al.*, 2006a). Além disso, certas antocianinas tais como cianidina 3-arabinosil arabinosídeo, cianidina 3-arabinosídeo, cianidina 3-acetil hexose foram mencionados em outro estudo (POZO-INSFRAN *et al.*, 2004).

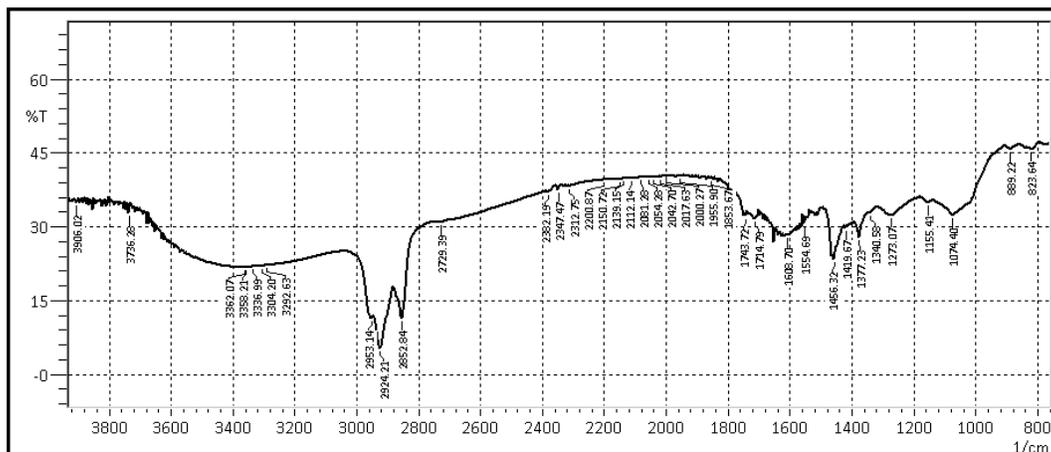
A absorção máxima na faixa visível para antocianinas é geralmente entre 502-528 nm. A natureza da substituição do açúcar não tem qualquer efeito relevante no espectro. A outra banda de absorção máxima cai na faixa de UV entre 270 e 282 nm (STÓJ; MALIK; TARGONSKI, 2006; GOUVEA *et al.*, 2012). Os espectros UV obtidos para cada um dos picos obtidos por HPLC para o extrato seco mostram os picos característicos das antocianinas a 278-282 nm e a 520-524 nm.

5.2.5.5 Perfil espectroscópico na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do EEEO

O espectro de infravermelho do EEEO pode ser visto na Figura 10. Nele observa-se uma banda com comprimento de onda de 3362,07 cm^{-1} associada à vibração do estiramento das ligações O-H. Apresenta ademais uma banda em 2929,99 cm^{-1} característica dos estiramentos das ligações C-H e em 1751,43 cm^{-1} característica de carbonila do grupo éster. Uma banda correspondente ao estiramento C-C dos anéis aromáticos é observada em 1616,41 cm^{-1} . Do mesmo jeito é observada uma banda em

1512,25 cm^{-1} correspondente à deformação axial da ligação C=C dos anéis aromáticos. O espectro também apresenta uma banda em 1440,88 cm^{-1} referente à deformação das ligações C–H e outra banda em 1026,17 cm^{-1} correspondente ao estiramento das ligações C–O de fenóis.

Figura 10: Espectro na região do infravermelho do EEEO.

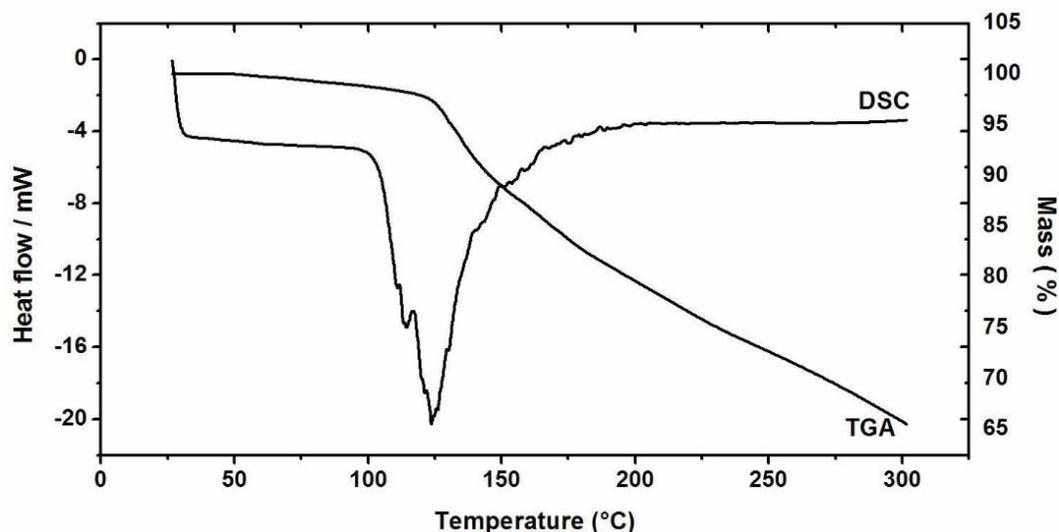


Todas estas bandas observadas coincidem com as relatadas por outros autores para diferentes extratos contendo antocianinas (AHMED; AMER; AL-BAHATE, 2014; TEXEIRA-NETO *et al.*, 2014). Do mesmo jeito as bandas observadas entre 1456-1419 cm^{-1} ; 1377-1340 cm^{-1} e 1150-889 cm^{-1} estão associadas à presença de monossacarídeos como glicose e galactose que estão comumente presentes na estrutura destes metabólitos (KACURAKOVA, MATHLOUTHI, 1996).

5.2.5.6 Perfil térmico do EEEO

Na Figura 11 pode-se observar a variação da massa do EEEO em função da temperatura (TG) entre 25-300°C à velocidade de aquecimento constante (5°C/min).

Figura 11: Perfil térmico (DSC/TGA) do EEEO.



Na curva TG, o primeiro evento térmico registrado à temperaturas entre 26-119°C mostrou uma perda de peso de 1,34% (0,108 mg), correspondendo à perda de água superficial, bem como as substâncias voláteis que podem estar presentes. Após a desidratação do EEEO, registrou-se a decomposição dos componentes orgânicos da amostra em temperaturas entre 119-216°C (-2,6637 mg, 32,88%) (ARAÚJO, 2006).

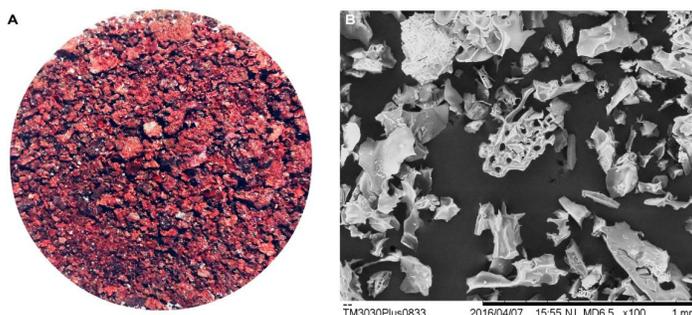
A escolha da TG reside no fato desta técnica ter despertado, nos últimos anos, o grande interesse dos pesquisadores e tecnólogos para estudos que envolvam a caracterização da droga de origem natural ou sintética, além de alimentos. É importante ressaltar que os resultados gerados conduzem a parâmetros relevantes no processamento industrial de fármacos e de medicamentos. Por exemplo, uma das potencialidades analíticas da TG é determinar os teores de umidade do material analisado e, por isso, é utilizada no controle biológico para o armazenamento. Além disso, podem ser utilizadas para a determinação do teor de cinzas como indicador da qualidade de sais minerais e possíveis adulterações do material com compostos inorgânicos, assim como, a obtenção de parâmetros cinéticos através de métodos de cálculos adequados (FELSNER; MATOS, 1998).

A pequena quantidade de amostra utilizada, a rapidez de resultados, a limpeza da técnica e a possibilidade de visualização do seu perfil termoanalítico, fazem dessas técnicas poderosas ferramentas no estudo de padronização das matérias-primas vegetais e ensaios de pré-formulação para o desenvolvimento tecnológico de formulações (ARAÚJO, 2006; SILVA JÚNIOR, 2006).

5.2.5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura do EEEO

A Figura 12 mostra o aspecto macroscópico (Figura 12A) e microscópico (por 100x) (Figura 12B) EEEO. É possível observar que o extrato aparece como um granulado grosseiro em pó (Figura 12A) com diferentes tons vermelhos. A microfotografia (Figura 12B) mostra um sólido com grande porosidade, com partículas de forma laminar. Pode-se observar também, grandes diferenças no tamanho de partícula.

Figura 12: Aspecto macroscópico (A) e microscópico (por MEV, 6B) do EEEO. A fotografia A foi obtida por máquina fotográfica Canon (Japão).



A identidade, pureza e qualidade de um extrato vegetal devem ser estabelecidas e, quando for possível, devem ser comparadas com um material de referência (USP, 2012). Em extratos vegetais sólidos de preparações de processamento de açaí, com uma consistência em pó, é comum observar os tons vermelhos, característicos das antocianinas (TEIXEIRA-NETO *et al.*, 2009). O processo de liofilização faz com que um material seja poroso e leve como observado na microfotografia 100x do extrato (11B), a grande variedade de tamanhos de partícula, característicos dos produtos liofilizados (THI *et al.*, 2016).

5.2.5.8 Determinação do teor de antocianinas totais do EEEO

O EEEO possui um teor de 2,81% de antocianinas totais. Cohen *et al.* (2006), quantificaram o teor de antocianinas totais em polpas de açaí de frutos oriundos de progênies selecionadas do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. Os resultados mostraram que entre as progênies de açaí há variações significativas no teor de antocianinas totais analisadas em sua polpa liofilizada, de 13,75 mg/100 g (progênie 23) a 228,77 mg/100 g (progênie 11).

5.2.5.9 Avaliação do sequestro de radicais por DPPH do EEEO

O EEEO mostra uma capacidade de sequestro de radicais com IC50 para DPPH de $31,5 \pm 2,31$ ppm. Se comparado com um outro extrato vegetal antioxidante como extrato fluido de *Tamarindus indica* L. que apresenta uma IC50 para DPPH de $44,36 \pm 3,72$ mg/mL o extrato de açaí mostra um resultado melhor (ESCALONA ARRANZ *et al.*, 2015). A presença de antocianinas e outros compostos polifenólicos no EEEO pode justificar as propriedades antioxidantes observadas.

5.2.5.10 Teste de toxicidade aguda oral do EEEO

A avaliação de toxicidade aguda trata-se de uma metodologia amplamente empregada, com o intuito de classificar substâncias quanto à sua capacidade de provocar danos agudos ao organismo, quando administradas em altas doses, especialmente a letalidade, podendo fornecer parâmetros de segurança para a saúde humana (VALADARES, 2006; ZATTA *et al.*, 2009).

O teste de toxicidade aguda por via oral foi realizado na dose de 2000 mg/Kg (dose superior à dose efetiva para ação antiinflamatória). Apesar de o protocolo OECD 423/2001 não requerer um grupo controle, os animais doseados com água filtrada foram incluídos no experimento, a fim de obter informação para os testes. Nenhum animal veio a óbito ou teve qualquer sinal de morbidade durante o estudo de 15 dias. Portanto, o EEEO se enquadra na categoria 5, com toxicidade letal aguda não classificada, por ser maior que 2000 mg/Kg ($DL_{50} > 2000$ mg). Indicando que quando administrado por esta via o extrato não apresenta toxicidade.

5.2.5.10.1 *Screening* hipocrático

O teste de *screening* hipocrático é um ensaio bastante útil e empregado na triagem preliminar de plantas, onde detecta atividades farmacológicas e toxicológicas através da avaliação do comportamento de animais após a administração de preparações a base de plantas com possível atividade no sistema nervoso central, permitindo assim, a seleção de espécies que apresentam resultados mais significativos (ALMEIDA *et al.*, 1999; LUCIO *et al.*, 2000; CUNHA *et al.*, 2009).

Segundo Malone e Robichaud (1983), observações comportamentais fornecem uma estimativa geral da toxicidade da substância no estado consciente e na disposição

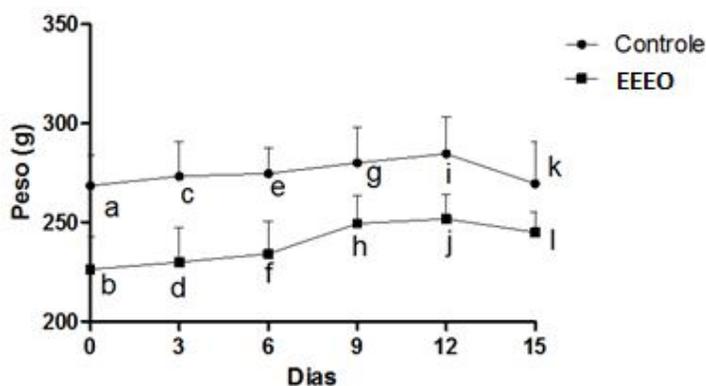
geral, na atividade e coordenação do sistema motor, nos reflexos e nas atividades do sistema nervoso central. De acordo com protocolo padrão para observação dos parâmetros de comportamento, é possível definir dosagens intermediárias às usadas no teste de atividade farmacológica para avaliação de toxicidade subcrônica. Durante este estudo, nenhum animal dos grupos (controle e EEEO) demonstraram mudanças comportamentais.

5.2.5.10.2 Avaliação ponderal

A toxicidade sistêmica pode se manifestar também, por meio da redução nos consumos de água e ração, alteração comportamental, apatia, má condição de pelagem e alteração da massa relativa dos órgãos (MELO, 2001; GONZÁLEZ; SILVA, 2003). Contudo, o peso corporal é um dos parâmetros mais empregados em avaliações toxicológicas para indicar o aparecimento, muitas vezes precoce, de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal (PIRES JÚNIOR *et al.*, 2012).

Assim, os animais foram pesados antes da administração (d0) e diariamente durante os 15 dias de observação. Apesar de, ser observada diferença estatística entre os grupos, não há implicação da influência do EEEO neste parâmetro, pois os animais já possuíam pesos diferentes desde o início do experimento, que se mantiveram durante todo o decorrer do período de observação. Estes resultados podem ser observados na figura 13.

Figura 13: Efeito do tratamento por via oral do grupo controle (água destilada) e tratado (EEE0 2000 mg/Kg) sobre o desenvolvimento ponderal (g) de ratas Wistar, observadas por 15 dias.

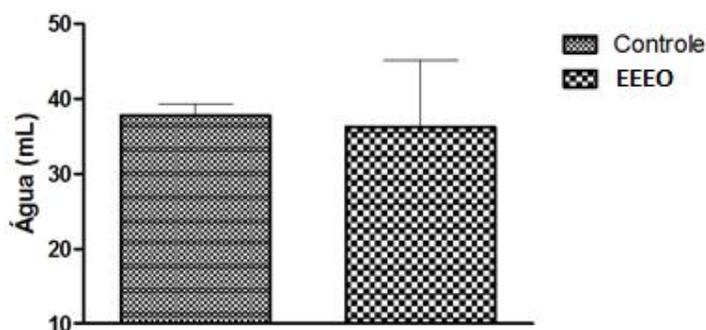


Os pontos representam a média \pm D.P. e valores com $p < 0,05$ estão indicados pelos índices ^a (em relação ao EEE0) e ^b (em relação ao Controle). Foi aplicado Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste t ($n=5$ /grupo).

5.2.5.10.3 Consumo de água e ração

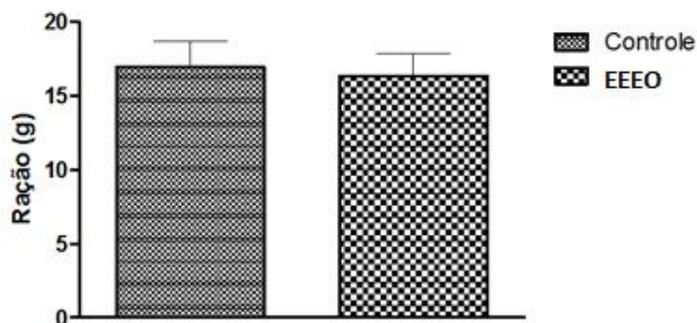
No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas no consumo de água e ração em ambos os grupos ($p > 0,05$) (Figura 14; Figura 15), demonstrando que os animais se alimentavam adequadamente, contribuindo assim, para o desenvolvimento ponderal observado na figura 13. Evidenciando a não influência do extrato nesses parâmetros.

Figura 14: Efeito do tratamento por via oral do grupo controle (água destilada) e tratado (EEEE 2000 mg/Kg) sobre o consumo de água (mL) de ratas Wistar, observadas por 15 dias.



Os pontos representam a média \pm D.P. e valores com $p < 0,05$ estão indicados pelos índices ^a (em relação ao EEE0) e ^b (em relação ao Controle). Foi aplicado Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste t ($n = 5/\text{grupo}$).

Figura 15: Efeito do tratamento por via oral do grupo controle (água destilada) e tratado (EEEE 2000 mg/Kg) sobre o consumo de ração (g) de ratas Wistar, observadas por 15 dias.



Os pontos representam a média \pm D.P. e valores com $p < 0,05$ estão indicados pelos índices ^a (em relação ao EEE0) e ^b (em relação ao Controle). Foi aplicado Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste t ($n = 5/\text{grupo}$).

5.2.5.10.4 Análise macroscópica dos órgãos

A análise do peso corpóreo avalia os possíveis efeitos tóxicos no organismo como um todo. No entanto, o peso dos órgãos e suas observações macro e microscópicas são

utilizadas para avaliar efeitos tóxicos específicos em algum sistema ou órgão específico (MANSON; KANG, 1994).

No d15, após a eutanásia foi realizada a necropsia e coletados o fígado, baço, coração, rins, pulmões e pâncreas dos animais tratados, assim como do grupo controle e, estes foram analisados macroscopicamente, não sendo evidenciadas alterações sugestivas de efeito tóxico que justificasse o estudo histopatológico dos órgãos coletados.

5.3 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA POLIMÉRICO NANOPARTICULADO CONTENDO EEEO

A nanobiotecnologia ganhou destaque rapidamente como uma importante área de pesquisa com potencial aplicação, tanto em diagnóstico quanto em terapêutica. Além disto, espera-se também que possa acelerar pesquisas biomédicas fundamentais (CHAN, 2006).

A utilização de sistemas poliméricos nanoparticulados, apresenta como uma das suas vantagens principais a sua polivalência de sistemas, os quais diversos agentes terapêuticos podem ser encapsulados, dispersos ou dissolvidos. Portanto, conforme as condições de preparo, sistemas com diferentes propriedades e características de liberação do fármaco associado podem ser desenvolvidos, assim como a proteção da droga pelo sistema (SAHOO; LABHASETWAR, 2003; FAHMY *et al.*, 2005), esta última sendo a propriedade mais visada neste trabalho.

Em função desta promissora estratégia de veiculação de fármacos e a carência de relatos científicos envolvendo formulações farmacêuticas que proponham prolongar a vida útil das antocianinas provenientes do açaí (compostos de estabilidade delicada), o presente trabalho visou o desenvolvimento de um sistema polimérico nanoparticulado contendo EEEO.

Qualquer que seja o método de preparo, os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas. Portanto, durante o tempo de armazenamento, pode ocorrer a agregação das nanopartículas no meio, resultando na formação de precipitados, assim como problemas de instabilidade química do polímero ou dos demais componentes da formulação, incluindo o fármaco (MOLPECERES *et al.*, 1997; SAEZ *et al.*, 2000).

Inicialmente, a primeira nanoformulação trabalhada com Eudragit®, EEEO e tween 80 (1:1:1) pelo método de nanoprecipitação, não obteve sucesso. Esta primeira tentativa resultou em um material de aspecto volumoso e muito aderente ao equipamento, de difícil

lavagem e de caracterização inviável. Portanto, buscou-se a melhor proporção entre os componentes, sendo esta 10:1:10, que resultou em uma nanodispersão.

A escolha do Eudragit® se dá primeiramente pela sua possibilidade de incorporação em outras formas farmacêuticas e devido o seu custo ser viável para transposição em escala industrial. Ademais, é bastante utilizado para obtenção de sistemas poliméricos nanoparticulados com resultados satisfatórios, inclusive com bioativos. A nanoprecipitação, também conhecida como método por deslocamento do solvente, é considerada uma das técnicas mais simples, econômica, reprodutível e rápida (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

5.3.1 Caracterização do sistema polimérico nanoparticulado contendo EEEO

O SPN foi caracterizado 24 h após seu preparo e seus resultados encontram-se apresentados na Tabela 16. A eficiência de encapsulação de antocianinas foi de $87,64 \pm 0,14\%$. Nota-se o pH da formulação levemente ácido, adequado para preservação das antocianinas presentes no EEEO e preparações tópicas contendo o SPN. O sistema apresentou-se estável após a avaliação de estabilidade por centrifugação, com tamanho das partículas, potencial zeta, índice de polidispersão e percentual de eficiência de encapsulação após 48 horas e 30 dias de seu preparo.

Tabela 16: Resultados físico-químicos da NP contendo EEEO.

Parâmetros físico-químicos	Nanodispersão
pH	$4,2 \pm 0,012$
Condutividade ($\mu\Omega$)	$- 0,486 \pm 0,026$
Potencial zeta (mV)	$+ 33,5 \pm 0,33$
Tamanho de partículas (d. nm)	$22,05 \pm 0,32$
Índice de polidispersão	$0,168 \pm 0,014$

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para a avaliação dos fatores que afetam o diâmetro das partículas de sistemas nanoestruturados. Geralmente, as nanopartículas, mesmo preparadas através de diversos métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 nm (MULLER *et al.*, 2000), porém, partículas com diâmetro médio de 60 a 70 nm (GOVENDER; RILEY; EHTEZAZI, 2000) ou até mesmo inferiores a 50 nm podem ser obtidas (SEIJO *et al.*, 1990).

A composição quali-quantitativa e o método de preparação das formulações são determinantes no diâmetro médio e na polidispersão das partículas (QUINTANAR-

GUERRERO *et al.*, 1996). Importante ressaltar que a presença de um polímero pode conduzir à diminuição de tamanho de partícula em relação à emulsão mediante um efeito estabilizador do mesmo ao redor das gotículas (LOSA *et al.*, 1993).

O potencial zeta é influenciado por alterações na interface com o meio dispersante, pela dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Ele configura o potencial de superfície das partículas. Um valor modular relativamente alto de potencial zeta é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (MOSQUEIRA *et al.*, 2000). Além disso, determinar o potencial zeta pode ser útil na elucidação do mecanismo de associação de fármacos às nanopartículas (CHASTEIGNER *et al.*, 1996).

Através da avaliação do pH em função do tempo, algumas informações importantes sobre a estabilidade de sistemas nanoparticulados podem ser obtidas. Por exemplo, a alteração do pH pode ser indício de degradação do polímero (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1996). Em outro caso, sobre a diminuição do pH de suspensões de nanocápsulas de poli (ácido metacrílico-co-metacrilato de metila) (Eudragit S90[®]), sendo monitorado durante os primeiros 45 dias após o preparo, inferiu-se uma relação com a dissociação dos grupos carboxílicos, presentes como grupos pendentes no polímero, que, em função do tempo, se posicionam na interface partícula/água devido ao relaxamento das cadeias do polímero (LOPES *et al.*, 2000).

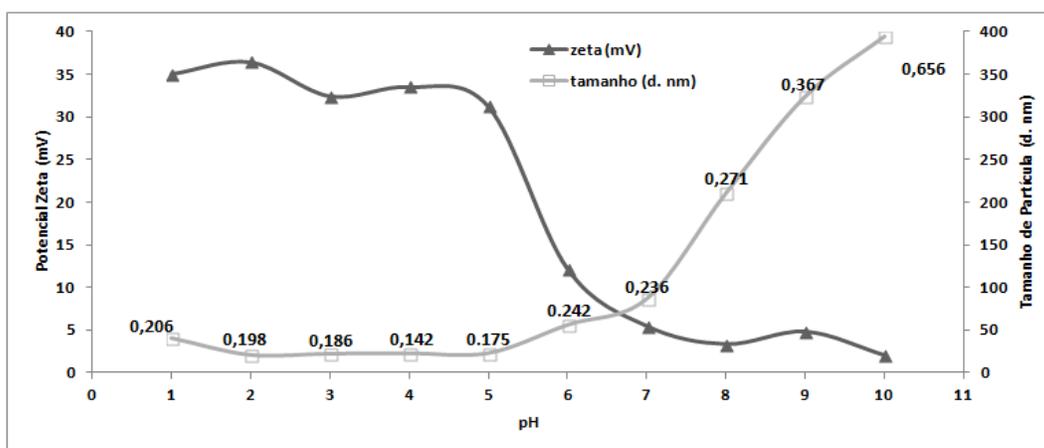
A determinação da quantidade de fármaco associada às nanopartículas é especialmente complexa devido ao seu tamanho reduzido, dificultando a separação da fração de fármaco livre da fração associada (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Uma técnica muito utilizada é a na qual a concentração de fármaco livre, presente na suspensão, é determinada no sobrenadante, após uma centrifugação. Por outro lado, determina-se a concentração total de fármaco pela completa dissolução das nanopartículas em um solvente adequado. Por fim, a concentração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada pela diferença entre ambas concentrações ultracentrifugação (TIYABOONCHAI *et al.*, 2001).

A ultrafiltração-centrifugação é outra técnica bastante empregada, inclusive de escolha neste trabalho, onde uma membrana é utilizada para separar parte da fase aquosa dispersante da suspensão coloidal. A concentração livre do fármaco é determinada no ultrafiltrado e a fração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada também pela subtração das concentrações total e livre (LOSA *et al.*, 1993).

A continuidade da caracterização do SPN se dá com uma avaliação da influência do pH sobre o potencial zeta e o tamanho de partículas. Na Figura 16 é apresentado o comportamento destes dos parâmetros frente a modificações do pH do meio. Em cada ponto é apresentado o valor do índice de polidispersão.

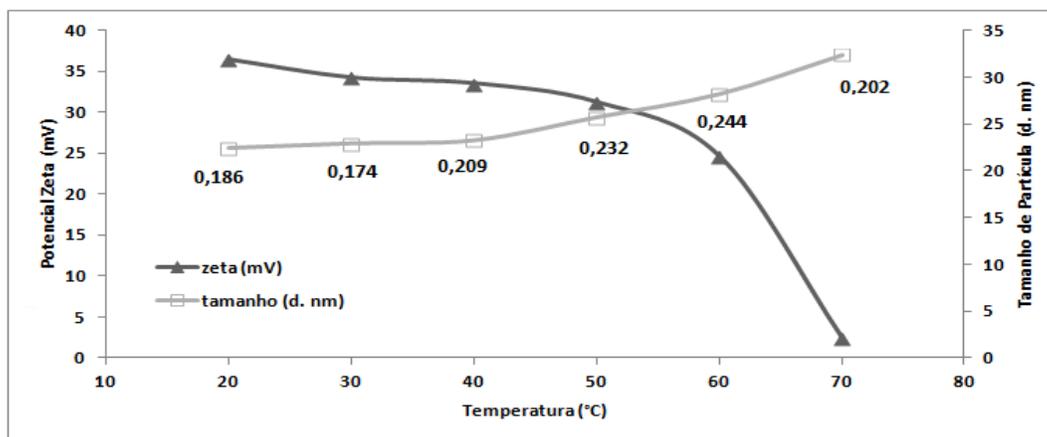
O SPN apresentou uma boa estabilidade no tamanho de partícula e índice de polidispersão em toda a faixa de pH ácido. O comportamento pode estar relacionado ao fato das antocianinas serem instáveis em meio básico, enquanto que a solubilidade do polímero é maior em meio neutro/básico (DEW *et al.*, 1982) desta forma, podendo comprometer a integridade do sistema. O potencial zeta do SPN apresentou um comportamento característico das formulações poliméricas desenvolvidas com Eudragit®, com caráter positivo.

Figura 16: Efeito do pH sobre o tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta



A temperatura é um fator que afeta notavelmente a estabilidade das substâncias, o mesmo acontece com os sistemas poliméricos nanoparticulados e as antocianinas. A Figura 17 apresenta a variação do potencial zeta e do tamanho de partículas. Em cada ponto é apresentado o índice de polidispersão. Uma leve diferença no tamanho das partículas e um alto decréscimo no valor do potencial zeta podem ser notados a partir de 60°C.

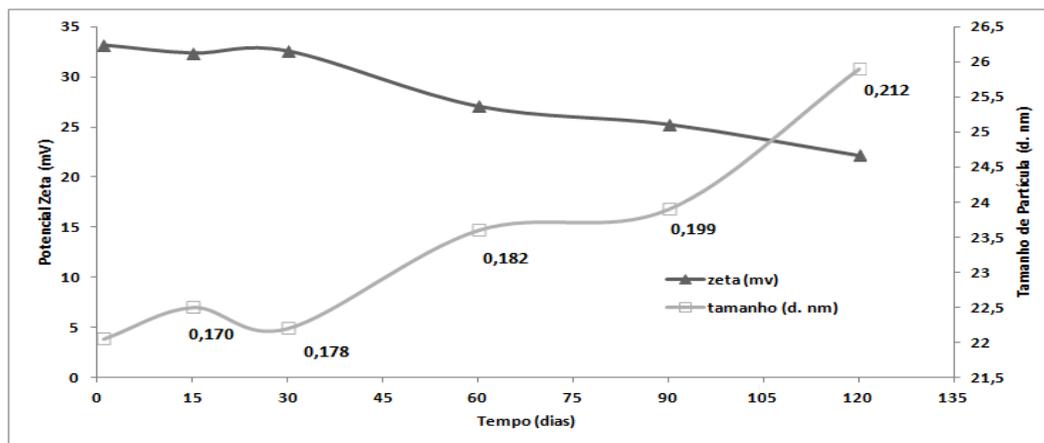
Figura 17: Influência da temperatura sobre o tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta.



O SPN também foi avaliado quanto à sua estabilidade após ser armazenado em diferentes condições experimentais por um tempo prolongado. Na Figura 18, observam-se os valores de tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta do SPN contendo EEEO após ser armazenado em temperatura ambiente ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) e protegido da luz.

Durante o período de 120 dias houve uma pequena diminuição na eficiência de encapsulação do SPN quanto ao teor de antocianinas, apresentando um valor de 82% deste parâmetro, com a primeira queda de valor somente após 60 dias de armazenamento. O pH manteve-se em 4,2 até o fim da análise.

Figura 18: Tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta do SPN contendo EEEO armazenado em temperatura ambiente protegido da luminosidade.

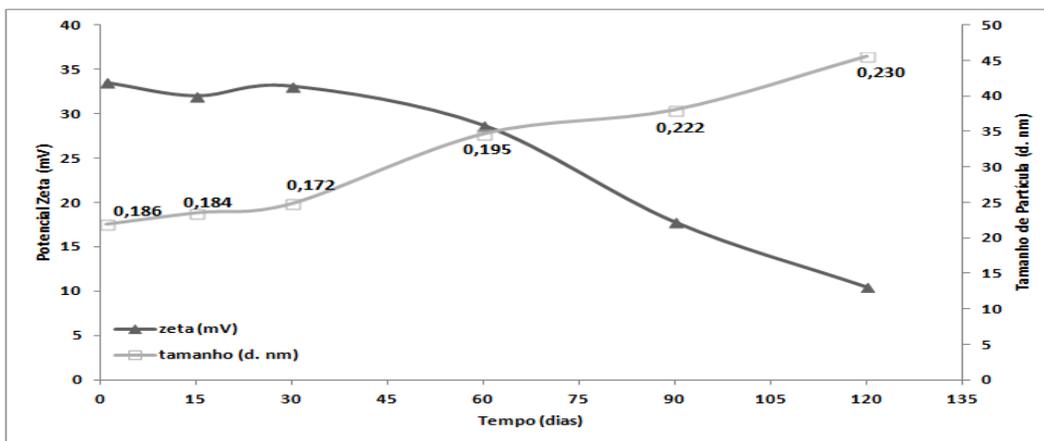


Quando o SPN contendo EEEO foi armazenado em temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2$) e exposto à luminosidade os valores de tamanho de partícula, potencial zeta e

eficiência de encapsulação tiveram uma variação inicial a partir de 60 dias. Ao final da análise foi encontrada uma porcentagem de 53% de eficiência de encapsulação quanto ao teor de antocianinas. O pH do sistema após a análise foi de 5,6.

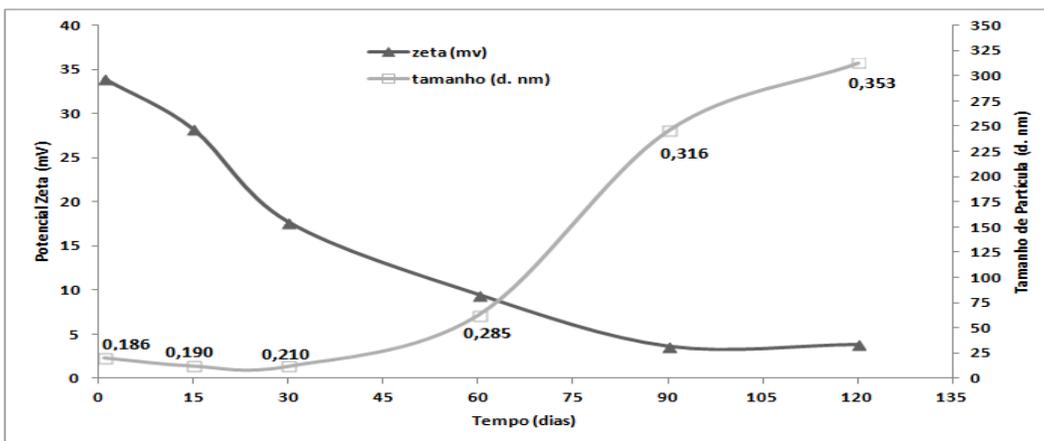
Na Figura 19 pode-se observar os valores de tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta do SPN contendo EEEO armazenado nas condições citadas.

Figura 19: Tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta do SPN contendo EEEO armazenado em temperatura ambiente e exposto à luminosidade.



Por fim, o SPN teve sua estabilidade avaliada frente a altas temperaturas em estufa (50 °C ± 2) por um período prolongado. Nesta situação observou-se uma grande mudança no tamanho de partículas e potencial zeta do sistema (Figura 20). Ademais, a porcentagem de eficiência de encapsulação de antocianinas caiu para 11% e o pH final foi de 5,4.

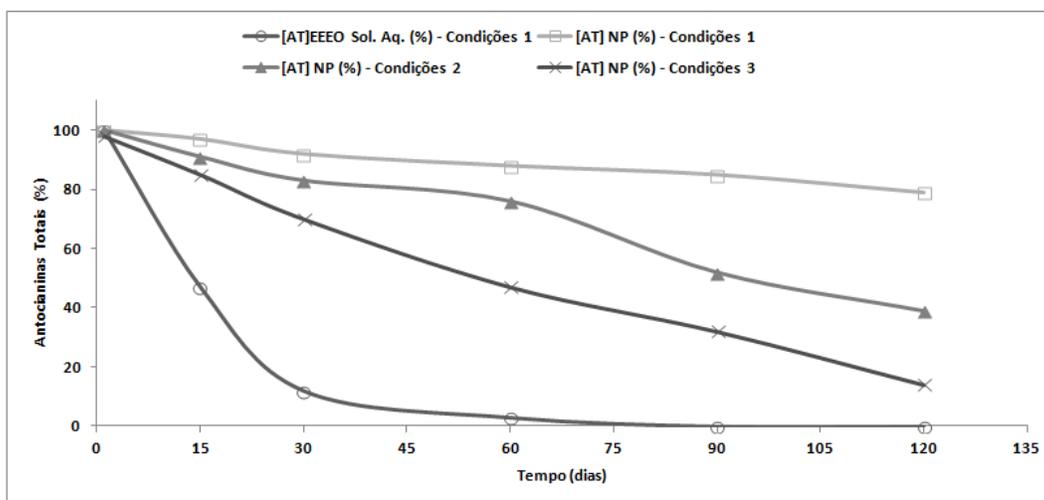
Figura 20: Tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta do SPN contendo EEEO armazenado em estufa (50 °C ± 2).



Os resultados evidenciam que condições de estresse térmico e luminoso por períodos prolongados são prejudiciais à estrutura do SPN. Portanto, condições de boas práticas de armazenamento devem ser observadas quanto à utilização desta formulação.

Foi efetuada uma comparação, pelo mesmo período, avaliando o teor de antocianinas totais do EEEO em solução aquosa com o SPN contendo o EEEO em temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2$) e protegido da luminosidade (condições 1), em temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2$) e exposto à luminosidade (condições 2) e por fim, exposto a uma temperatura de $50^{\circ}\text{C} \pm 2$ (condições 3), como pode ser visto na Figura 21.

Figura 21: Teor de antocianinas totais do EEEO em solução aquosa (condição 1) e do SPN contendo EEEO em três condições experimentais.



Pode-se observar que em condições de boas práticas de armazenamento o SPN contendo EEEO proporciona uma maior estabilidade para as antocianinas presentes no sistema. Os resultados mostram também uma drástica queda do teor destes compostos quando em solução aquosa.

As suspensões coloidais normalmente possuem tendência à estabilidade entre suas fases, por alguns meses após a preparação, onde a sedimentação é lenta para partículas submicrométricas, minimizado pelo movimento Browniano. Porém, após certo período, pode ocorrer a aglomeração das partículas e, conseqüentemente, a sedimentação. Vários fatores influenciam a estabilidade destas suspensões como, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativos adsorvidos. Ademais, a avaliação da estabilidade das formulações, sob diferentes

condições de armazenamento, é de fundamental importância (MAGENHEIM; BENITA, 1991).

O tamanho de partícula, o potencial zeta, o índice de polidispersão, o teor de fármaco associado e o pH são geralmente os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade dos sistemas poliméricos nanoparticulados (LACOUOLONCHE *et al.*, 1999).

5.3.2 Estudo da liberação *in vitro* de antocianinas totais pelo SPN após permeação em membrana sintética e biológica

No desenvolvimento de produtos nanotecnológicos é indicado empregar o procedimento de liberação *in vitro* para selecionar excipientes para as formulações, proporcionando uma atividade terapêutica adequada. Pode-se considerar que estes estudos proporcionam dados valiosos sobre as particularidades estruturais do veículo e a capacidade desse em liberar os fármacos (SATO *et al.*, 2007). Diversos autores indicam o uso de sistemas de difusão para determinar a liberação *in vitro* de formulações tópicas, como em cremes, géis, loções e sistemas transdérmicos (DOUCET *et al.*, 1998; CLEMENT; MAUGEL; MARTY, 2000).

Nos últimos anos, sistemas utilizando micro/nanopartículas para liberação de fármacos, foram desenvolvidos como uma das estratégias mais promissoras para alcançar o local específico de atuação (ALVES, 2006).

Tanto a liberação imediata, como a liberação sustentada têm sido relatadas para descrever o comportamento dos sistemas nanoestruturados. Para produtos tópicos, ambas as características são interessantes, a liberação imediata pode ser útil para um melhoramento da penetração de uma substância e a liberação sustentada é importante para substâncias ativas potencialmente irritantes em concentrações elevadas ou que precisem suprir a pele por um período prolongado de tempo (JENNING *et al.*, 2000).

Considerando a natureza longitudinal das observações dos níveis de permeação, a ferramenta para análise dos dados foi uma análise univariada (ANOVA), considerando testes de hipóteses dentro de cada um dos diferentes tempos. Os resultados desta análise são mostrados na Tabela 17.

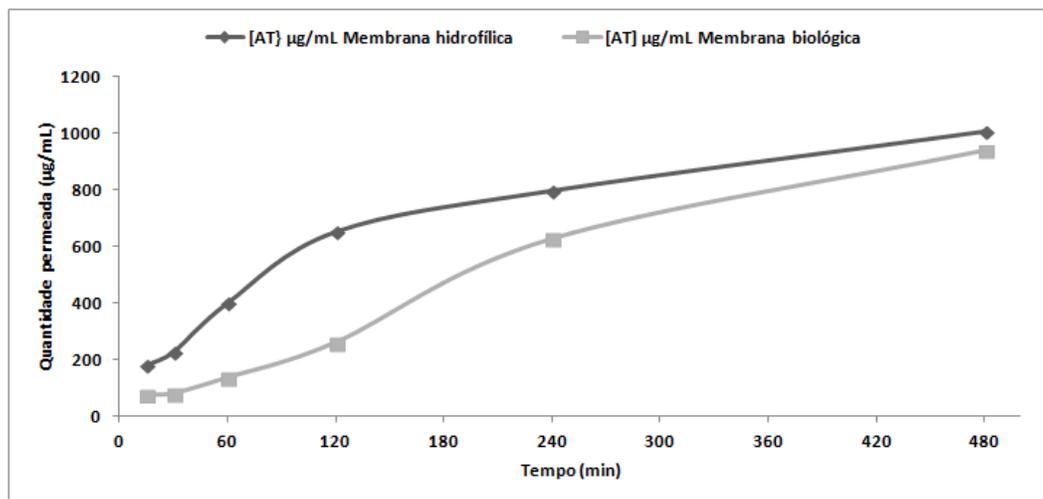
Tabela 17 - Efeitos da formulação sobre os níveis de permeação

Tempo (min)	Membrana Sintética ($\mu\text{g/mL}$)	Membrana Biológica ($\mu\text{g/mL}$)	<i>P</i> valor ^(a)
15	181,82	75,73	>0.05
30	229,09	80,91	>0.05
60	401,14	136,39	>0.05
120	652,13	260,8	<0.05
240	797,14	627,67	>0.05
480	1005,92	940,11	>0.05

^(a) *p* valores fornecidos por análise de variância (ANOVA)

Os perfis de difusão obtidos para antocianinas totais presentes no SPN contendo EEEO, pelo método do pH diferencial, seguem uma relação linear entre a massa cumulativa permeada e a raiz quadrada do tempo, figura 22. Por outro lado, a linearidade assumida não permite extrapolar os resultados para tempos infinitos, devido a instabilidade das curvas.

Figura 22: Perfis de permeação para antocianinas totais presentes no SPN contendo EEEO determinadas por pH diferencial. Membrana sintética (acetato de celulose), Membrana biológica (pele suína).



A taxa de liberação de um fármaco a partir de uma formulação depende das características físico-químicas do veículo e do fármaco (SANTOYO *et al.*, 1996). A composição do veículo em formulações tópicas influencia a liberação do ativo, alterando a

permeabilidade do estrato córneo ou aumentando a atividade termodinâmica do ativo (MOSER *et al.*, 2001).

No entanto, a administração tópica de fármacos em soluções e suspensões geralmente não produz bons resultados quanto à quantidade permeada, porque os solventes (principalmente voláteis) na maioria das vezes não facilitam o transporte de moléculas para camadas mais afastadas do estrato córneo. A proposta do estudo, é que o SPN contendo EEEO sirva como o princípio ativo de futuras formulações tópicas para aplicação como antioxidante.

Há alguns anos, Higuchi (1960; 1962), fez uma primeira abordagem a respeito da liberação de fármacos em pomadas. Inicialmente considerou que quando o fármaco está em suspensão na formulação, isto é, $C_0 \gg C_s$, sendo C_0 a concentração original de fármaco na formulação e C_s a concentração máxima solúvel, o tempo requerido para que toda a massa de fármaco possa se dissolver (M_{fd}) é proporcional a razão de solubilidade C_s/C_0 , conforme a expressão abaixo:

$$M_{fd}/M_0 = 1 - R/2, \quad \text{Equação (15)}$$

Onde M_0 é a massa original na preparação e R a razão entre C_s/C_0 .

Portanto se C_s do fármaco é relativamente pequeno a C_0 , o fármaco será liberado gradativamente em função do tempo. Por outro lado, se $C_s \gg C_0$ uma pequena fração de fármaco será liberado inicialmente durante o período em que o fármaco em suspensão será dissolvido. Higuchi (1961), também propõe que quando o fármaco não está em suspensão, ou seja, $C_0 < C_s$ a massa cumulativa permeada é dependente da raiz quadrada do tempo e independente de C_0 e C_s , conforme abaixo:

$$M_l / M_0 = 2 (DT)^2 / (\pi/L)^2 \quad \text{Equação (16)}$$

Onde M_l é a massa liberada e detectada na câmara receptora, D é o coeficiente de difusão do fármaco através do veículo e L é a espessura da camada de formulação aplicada.

A eficiência de penetração de fármacos na pele é avaliada por dois dados distintos: difusão através do veículo e permeabilidade pela membrana. Vários modelos de testes *in vitro* e *in vivo* são estudados objetivando uma maior aproximação das condições fisiológicas da pele. O uso de membranas artificiais não simula uma biológica, mas a

intenção é estabelecer uma relação compatível com a polaridade do sistema e avaliar o perfil de liberação das antocianinas presentes.

As membranas sintéticas são amplamente empregadas em estudos de liberação *in vitro* e são recomendadas pelo FDA por atenderem à diversas exigências, como não reagir com a formulação ou o meio receptor, serem permeáveis ao fármaco e não serem determinantes da taxa de liberação (SHAH *et al.*, 1998).

Entre os tipos de membranas biológicas, a que mais se aproxima, fisiologicamente, da pele humana é a pele suína. Ela é mais recomendada devido sua similaridade à pele humana, a facilidade de obtenção, a espessura da epiderme, a composição lipídica e a permeabilidade a diversos compostos (SARTORELLI *et al.*, 2000; SEKKAT *et al.*, 2002).

As vantagens dos métodos *in vitro* são que as condições de estudo podem ser controladas, ausência de interferentes biológicos, viabilidade de custo e facilidade de utilização (CHIEN, 2005). Os estudos *in vitro* são uma ferramenta muito valiosa e determinante na avaliação do comportamento de formulações de uso tópico, diante das inúmeras variáveis que comprometem o processo de fabricação (NOKHODCHI *et al.*, 2003).

Entende-se necessário avaliar a aplicabilidade deste sistema. Num primeiro momento, novos estudos *in vitro* devem ser realizados objetivando-se verificar se a associação parcial de antocianinas presentes no EEEO será capaz de otimizar a sua atividade antioxidante (PALUMBO *et al.*, 2002).

É importante enfatizar que estudos da atividade antioxidante de substâncias associadas a sistemas poliméricos nanoparticulados contendo extratos vegetais ou bioativos ainda são pouco explorados no campo da nanotecnologia. Através dos poucos trabalhos publicados, até o momento, realizados *in vitro* (PALUMBO *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2005; SHEA *et al.*, 2005; BALA *et al.*, 2006), acredita-se que possa ser uma área de pesquisa bastante promissora.

Em outro panorama, alguns estudos foram efetuados para o desenvolvimento de um método de secagem por aspersão (nebulização) para a obtenção de pós nebulizados contendo nanopartículas poliméricas utilizando como adjuvante o dióxido de silício (Aerosil 200[®]). Os produtos secos podem ser utilizados na obtenção de formas farmacêuticas sólidas, tais como cápsulas e comprimidos, o que é interessante sob o ponto de vista tecnológico e industrial (MULLER *et al.*, 2000).

Portanto, o desenvolvimento de novos sistemas microparticulados contendo SPN-EEEE, visando o controle da liberação oral de fármacos também configura uma

perspectiva futura em novos estudos além da possibilidade de formulações tópicas, objetivando-se manter o efeito antioxidante proporcionado pelo EEEO por mais tempo, bem como o aumento da biodisponibilidade oral de metabólitos de interesse.

5.4 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO DE COMPRIMIDOS CONTENDO EEEO

5.4.1 Obtenção e caracterização do EEEO por liofilização com adjuvantes

O EEEO, devido sua composição rica em açúcares e ácidos graxos e ser bastante higroscópico, não apresentou características farmacotécnicas favoráveis para compressão direta com os outros componentes da formulação. Para isso buscou-se uma liofilização com adjuvantes de secagem baseados no teor de sólidos do EEEO após evaporação do solvente orgânico em evaporador rotativo.

O processo de liofilização se mostra eficiente comparado com outros meios de desidratação, frente características como contração do produto, perda de voláteis, decomposição térmica, ações enzimáticas e desnaturação de proteínas (GARCIA, 2009).

Foram utilizados adjuvantes pertencentes ao granulado base (dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina) a fim de evitar qualquer incompatibilidade. O dióxido de silício coloidal, que apresenta elevada superfície específica, tem sido amplamente empregado- na obtenção de produtos secos a partir de soluções extrativas de diferentes espécies vegetais (DE SOUZA, 2000).

A celulose microcristalina é um adjuvante multiuso, que apresenta boas propriedades de fluxo e excelentes características de compressão direta. É um dos poucos materiais de enchimento que, além de produzir compactos coesos, age como um agente desintegrante (LACHMAN; LIEBERMAN, 2001). Além disso, é particularmente eficiente na granulação, pois permite a obtenção de um equilíbrio de água adequado tanto para a extrusão quanto para a esferonização (SIMÕES *et al.*, 2004).

Quanto às características organolépticas observou-se que o EEEO apresentou odor semelhante ao da secagem sem adjuvantes, coloração arroxeadada clara (como pode ser visto na Figura 23), e sabor característico. Em relação ao tamanho de partículas, foi classificado como pó semifino segundo a Farmacopeia Brasileira V edição (2010), onde partículas passam em sua totalidade pelo tamis de abertura nominal de malha de 0,355mm e no máximo 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 0,180mm.

A distribuição de tamanho de partícula dos materiais particulados afeta vários processos e parâmetros, como compressão, mistura, fluxo das partículas, peso, tempo de

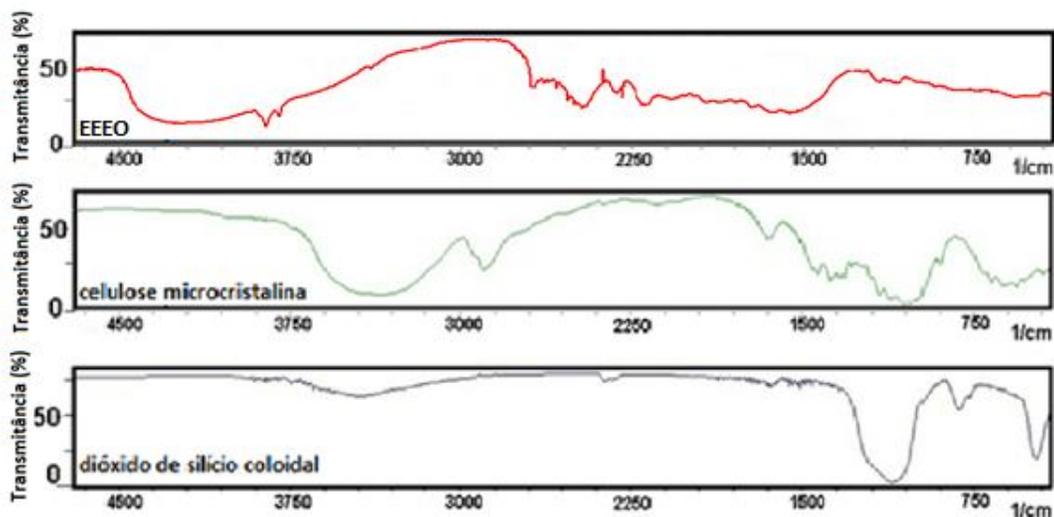
desintegração, dureza, friabilidade, velocidade de dissolução e biodisponibilidade (YAJIMA *et al.*, 1996).

Figura 23: EEEO seco com dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina



Na Figura 24 observam-se os espectros na região do infravermelho do EEEO (com adjuvantes de secagem), celulose microcristalina e dióxido de silício coloidal.

Figura 24: Espectros na região do infravermelho do EEEO, celulose microcristalina e dióxido de silício coloidal.



Observou-se no espectro de infravermelho do EEEO liofilizado com adjuvantes uma banda arredondada na faixa de de 3360 cm^{-1} associada ao estiramento das ligações O-H. Característica de estiramento das ligações C-H, observa-se um pico em 2932 cm^{-1} e em 1757 cm^{-1} relacionada à carbonila do grupo éster. Uma absorção correspondente ao estiramento C–C dos anéis aromáticos é observada em 1614 cm^{-1} . Nota-se também uma banda em 1515 cm^{-1} correspondente à deformação axial da ligação C=C dos anéis aromáticos. O espectro ainda apresenta uma banda em 1445 cm^{-1} referente à deformação

das ligações C–H e outra banda em 1027 cm^{-1} correspondente ao estiramento das ligações C–O de fenóis.

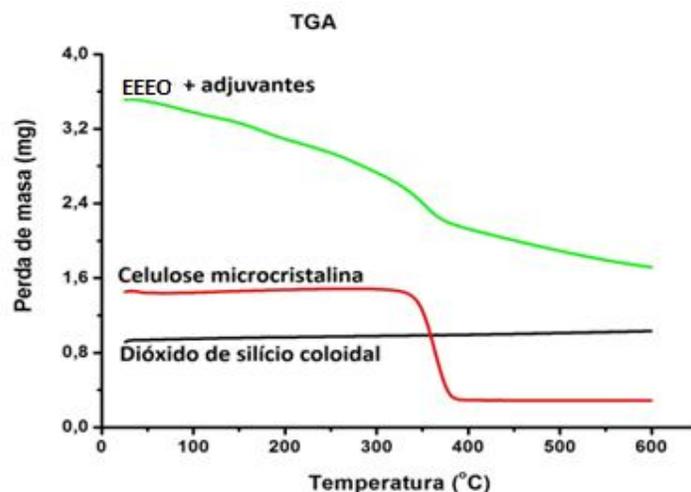
O espectro da celulose microcristalina mostrou um pico a 3342 cm^{-1} atribuído à ligação de hidrogênio intramolecular entre os grupos hidroxil em C-2 e C-6 dos anéis de piranose. O pico observado em 2899 cm^{-1} é característico para o estiramento de C-H alifático de hemicelulose e celulose. Em 1647 cm^{-1} foi relacionado com os grupos éster e acetil. Também exibe um pico a 1431 cm^{-1} atribuído às ligações simétricas de CH₂ em C-6. O pico a 1172 cm^{-1} é relacionado às vibrações no plano do grupo COH e aos movimentos das ligações beta-glicosídicas de C-O-C (1112 cm^{-1} e 1059 cm^{-1}). Outro pico observado a 891 cm^{-1} tem correspondência com o alongamento envolvendo C-O-C e C-C-H em C-5 e C-6. Uma característica espectral semelhante é referida na literatura para este excipiente (MARIÑO *et al.*, 2015)

Para o dióxido de silício coloidal, a banda a 1653 cm^{-1} é característica da vibração de flexão de moléculas de H₂O. A banda em 1107 cm^{-1} é geralmente atribuída às vibrações de alongamento assimétricas do grupo Si-O-Si. A banda a 809 cm^{-1} pode estar relacionada com vibrações e estiramento simétrico do grupo Si-O-Si, e a banda a 466 cm^{-1} é devido vibrações de dobragem do grupo O-Si-O. O espectro observado é semelhante ao obtido para dióxido de silício coloidal analisado por outros autores (MUSI *et al.*, 2011).

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica amplamente utilizada de análise de substâncias sólidas (BUGAY, 2001). Em determinadas situações diz respeito aos movimentos de torção, deformação, rotação e vibração dos átomos de uma molécula. Quando a radiação infravermelha incide sobre uma molécula, parte dela é absorvida, originando uma multiplicidade de vibrações que ocorrem simultaneamente, fornecendo um complexo espectro de absorção, que é característico dos grupos funcionais e da configuração geral do átomo presente na molécula (SILVERSTEIN, 1981).

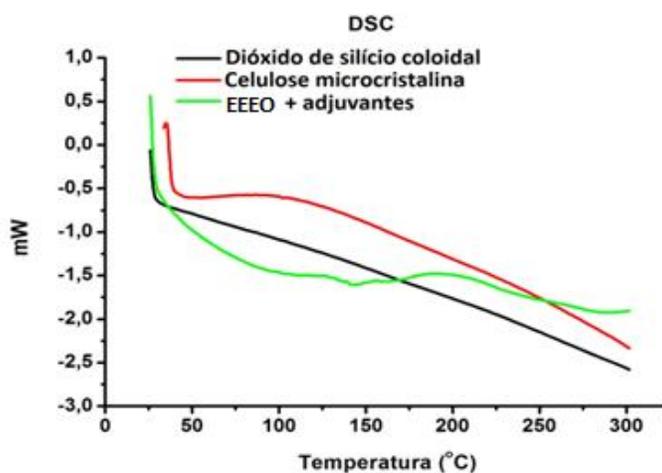
Na Figura 25 pode-se observar a variação da massa do EEEO e os adjuvantes empregados na liofilização como funções da temperatura (TG) entre 25-600°C, à velocidade de aquecimento constante (5°C/min). Para o EEEO dois eventos térmicos principais foram registrados. O primeiro entre 26-115,29°C com uma perda de massa de aproximadamente 2,46%, relacionada à perda de umidade residual e voláteis e o segundo a temperaturas entre 132-378°C, que pode estar relacionado com a decomposição térmica dos compostos orgânicos do EEEO e a combustão da celulose microcristalina presente. Ao final da análise, observou-se uma perda total de 42,6% da massa inicial da amostra. É relevante considerar que diferente do dióxido de silício coloidal, a celulose microcristalina possui caráter combustível.

Figura 25: Curvas TG para EEOO (com adjuvantes), celulose microcristalina e dióxido de silício coloidal.



O dióxido de silício coloidal apresenta um evento endotérmico na faixa de temperatura entre 25 e 135°C, representativo da liberação de água superficial. Após esse evento, o material mostra-se termicamente estável. Esses dados são corroborados pela curva TG, na qual pode ser visto um evento de perda de massa na mesma faixa de temperatura com uma variação de 2,6% do valor inicial. A fusão da celulose microcristalina se dá em 121,7 °C (36,6 kJ/mol). Observando as características individuais dos componentes na mistura pode-se afirmar que não houve alterações dos perfis térmicos das amostras, indicando que não há incompatibilidade entre as espécies.

Figura 26: Curvas DSC para EEOO (com adjuvantes), celulose microcristalina e dióxido de silício coloidal.



Neste estudo, os espectros na região do infravermelho e o perfil térmico foram obtidos a título de caracterização das amostras, e desta forma corroborar com o estudo

de secagem do material, que é parte importante do panorama de pré-formulação, podendo servir como suporte de informações sobre armazenamento e desenvolvimento de formulações.

Por fim, determinou-se o teor de antocianinas totais presente no EEEO com adjuvantes. O valor encontrado foi de 1,29% destes metabólitos. Após a obtenção e caracterização do EEEO com características farmacotécnicas adequadas, iniciou-se o desenvolvimento de comprimidos.

5.4.2 Desenvolvimento e caracterização do comprimido

Ao granulado base obtido misturou-se o EEEO liofilizado com adjuvantes. Esta mistura mostrou-se homogênea e cor característica. Para a escolha da formulação avaliaram-se as propriedades de fluxo e compactação. E após a compressão as propriedades de dureza, friabilidade, desintegração, peso médio, coeficiente de variação e desvio padrão foram avaliadas.

O granulado base foi desenvolvido pelo grupo de trabalho e caracterizado segundo suas propriedades físico-mecânicas (índice de Hausner e de compressibilidade, densidade bruta e compactada, velocidade de fluxo, ângulo de repouso e umidade residual), espectroscopia na região do infravermelho, difração de raio-X, distribuição do tamanho de partícula, determinação do conteúdo de silício e microscopia eletrônica de varredura. Manteve-se o sigilo das informações sobre produção e caracterização deste granulado, devido o mesmo estar em processo de patente, visando a proteção da propriedade intelectual.

O método de compressão direta foi utilizado por ser o mais indicado para comprimidos que possuem em sua composição fármacos termolábeis (JIVRAJ; LUIGI. THOMSON, 2000). Na Tabela 18 observa-se o perfil de compactação de cada uma das 4 formulações testadas. As formulações 1 e 2 mantiveram um volume constante, diferente das formulações 3 e 4 que tiveram seu volume diminuído com o aumento do número de golpes.

Tabela 18 - Perfil de compactação das formulações testadas

Formulação	Réplicas	No. de golpes/Volume				
		50	100	150	200	250
1	1	15	14,5	14,5	14,5	14,5
	2	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5
	3	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5
2	1	16	15,5	15	15	15

	2	1	15,5	15,5	15,5	15,5
	3	15,5	15,5	15	15	15
3	1	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5
	2	16,5	16,5	16	16	16
	3	17	17	16,5	16,5	16,5
4	1	17	17	16,5	16,5	16,5
	2	16,5	16,5	16	16	16
	3	17	16,5	16,5	16,5	16,5

A celulose microcristalina representa um diluente amplamente empregado em formulações de comprimidos por compressão direta devido sua excelente compactação, boa fluidez e capacidade de desintegração. No processo de compactação sofre deformação plástica, principalmente em forças compressionais relativamente baixas (KOTHARI; KUMAR; BANKER, 2002; ROWE; SHESKEY, 2003).

Possui elevada pureza química e baixo conteúdo de umidade, melhora a estabilidade química e a cor dos comprimidos resultantes. Os parâmetros que favorecem a elevada compactação da celulose microcristalina são a alta ductibilidade (deformação plástica), baixa fragilidade (propensão à fragmentação), baixa elasticidade (deformação reversível), alta viscoelasticidade (comportamento tempo-dependente) (DOELKER, 1993).

O amido de milho possui funções de compressibilidade, desintegração e agregação, melhorando o fluxo do pó e reduzindo problemas como comprimidos de baixa densidade e difícil dissolução. Ele é empregado associado à celulose microcristalina na compressão direta de fármacos (PRISTA; ALVEZ; MORGADO, 1995).

A lactose é um dos excipientes mais utilizados para compressão, pois se dissolve rapidamente, não é higroscópica, apresenta boa compressibilidade e baixa reatividade química (ALDERBORN, 2005). Ao contrário do que ocorre com a celulose, a lactose após sofrer extensa fragmentação, não influencia diretamente na resistência mecânica dos comprimidos (CURY *et al.*, 2007). Doelker (1993), verificou que a lactose como único diluente ou associada à celulose microcristalina, proporciona um tempo de desintegração muito rápido dos comprimidos.

O estearato de magnésio é um regulador de fluxo de escolha para comprimidos. Como é insolúvel em água, sua concentração na formulação deve ser controlada para não haver prejuízo da dissolução. É muito utilizado como lubrificante, pois é um material coesivo que facilita o fluxo ao evitar o espalhamento do pó durante o enchimento da matriz (SHAH; TAWAKKUL; KHAN, 2008). Já o dióxido de silício coloidal é um deslizante com grande área superficial e atua diminuindo a densidade aparente de pós empacotados e sua umidade (AULTON, 2005).

Ohta *et al.* (2003) compararam as estruturas geométricas de várias sílicas utilizadas como deslizantes e observaram que a dureza dos comprimidos depende da estrutura geométrica do deslizante utilizado e da presença/ausência de lubrificante. Pequenas partículas como as do Aerosil® 200 e Aerosil® 50 causam um efeito deletério sobre a dureza dos comprimidos sem lubrificante. Já em comprimidos produzidos com lubrificantes, a presença da sílica como deslizante promove um aumento da dureza.

O processo de compactação de pós e granulados resulta de uma sequência de eventos que se inicia com o rearranjo das partículas e aumento da densidade aparente do leito particulado, seguida por uma deformação elástica. Quando o limite elástico do material é excedido, ocorre uma deformação permanente plástica e/ou destrutiva, originando então novas ligações e consolidando o compacto (NARAYAN; HANCOCK, 2003).

Na Tabela 19 observa-se a análise da relação de velocidade de fluxo, tempo de fluxo, densidade bruta e de compactação, volume bruto e volume de compactação e o índice de compressibilidade de cada formulação testada para se ter indicações do comportamento mecânico do pó durante a compressão. (PRISTA; ALVEZ; MORGADO, 1995).

Tabela 19 - Análise das propriedades de fluxo, densidade e volume bruto e de compactação.

Formulação	Replicas	Vb (mL)	Vc (mL)	Db	Dc	tfluxo (s)	massa (g)	% C	Vfluxo
1	1	17	14,5	0,588	0,690	2,7	10	14,7059	7,3720
	2	16	14,5	0,625	0,690	2,3	10	9,3750	8,6541
	3	16,5	14,5	0,606	0,690	2,3	10	12,1212	8,6541
	M	16,5	14,5	0,606	0,690	2,43	10	12,0674	8,2267
	Dp	0,50	0	0,02	0	0,23	0	2,67	0,74
2	1	17,5	15	0,571	0,667	1,9	10	14,2857	10,4760
	2	17,5	15,5	0,571	0,645	2,5	10	11,4286	7,9618
	3	16	15	0,625	0,667	2,5	10	6,2500	7,9618
	M	17	15,2	0,589	0,659	2,3	10	10,6548	8,7999
	Dp	0,87	0,29	0,03	0,01	0,35	0	4,07	1,45
3	1	18	15,5	0,556	0,645	1,7	10	13,8889	11,7085
	2	18,5	16	0,541	0,625	1,8	10	13,5135	11,0580
	3	18,5	16	0,541	0,625	2	10	13,5135	9,9522
	M	18,33	15,83	0,55	0,63	1,83	10,00	13,64	10,91
	Dp	0,29	0,29	0,01	0,01	0,15	0,00	0,22	0,89
4	1	18,5	16,5	0,541	0,606	2,1	10	10,8108	9,4783
	2	19	16	0,526	0,625	2,2	10	15,7895	9,0475
	3	19	16	0,526	0,625	2	10	15,7895	9,9522
	M	18,83	16,17	0,53	0,62	2,10	10,00	14,13	9,49
	Dp	0,29	0,29	0,01	0,01	0,10	0,00	2,87	0,45

Dc = densidade compactação; Db = densidade bruta; Vb = volume bruto; Vc = volume compactação; tfluxo = tempo de fluxo; Vfluxo = velocidade de fluxo.

A densidade bruta é determinada a partir da somatória do volume ocupado por uma massa de pó conhecida e os espaços intersticiais que ocorrem quando esta é vertida em uma proveta e submetida somente à ação da gravidade. Essa característica serve de base na escolha do tipo de armazenamento, o recipiente de capacidade adequada, dentre outros fatores. A densidade de compactação está relacionada com o volume que o pó pode adquirir em uma proveta quando submetido ao empacotamento, o qual é diretamente influenciado pela forma e pelo tamanho das partículas (ALLEN JÚNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Quanto maior a diferença entre a densidade bruta e de compactação, melhor é o fluxo do pó e melhor a sua compressão (EHRHARDT; SCHINDLER, 1980). Na Tabela 18 as formulações 3 e 4 apresentam maior diferença entre as duas densidades, porém a formulação com melhor tempo de fluxo e compressibilidade foi a 3 (1,83s).

O índice de compressibilidade (índice de Carr) é respectivo ao grau de densificação do pó, avaliando de forma indireta a estabilidade espacial do material, que pode representar possíveis dificuldades na compressão (THOMAS; POURCELOT, 1993).

Segundo Carr (1965), valores acima de 20% indicam baixa capacidade de escoamento e compressão. Já os valores que se encontram abaixo apresentam melhor estabilidade e melhor compressão. Porém Wells (2005) afirma em seu trabalho que IC entre 5 e 15% indica ótimas propriedades de fluxo e sem dificuldades na compressão. Desta forma apenas as formulações 1, 2 e 3 se encaixam nos limites citados em ambos trabalhos, porém a que apresenta um desvio padrão menor é a formulação 3.

Na mesma tabela, observam-se também os valores da velocidade de fluxo, onde é possível destacar que as formulações com maior quantidade de estearato de magnésio têm uma velocidade de fluxo maior, o que pode ser justificada pelo aumento de deslizamento particular proporcionado pelo mesmo, devido a característica lamelar de suas partículas que facilita o escoamento. (SAUSEN, 2007). Após as análises das propriedades de fluxo e compactação de cada formulação, selecionou-se a que apresentou melhor desempenho para o desenvolvimento do comprimido (Formulação 3).

Na Tabela 20 é apresentado o perfil de compressão. Onde a espessura dos comprimidos diminui com o aumento da força de compressão.

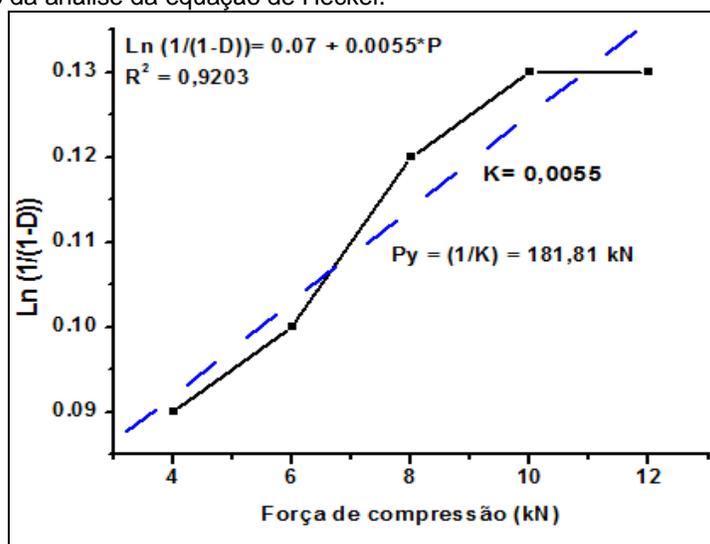
Tabela 20 - Perfil de compressão com as forças de compressão utilizadas

FC	Massa (mg)	Circunferência (mm)	Espessura (mm)
4	0,588	13	4,9
6	0,594	13	4,5
8	0,588	13	4
10	0,593	13	3,8
12	0,599	13	3,7

FC = força de compressão

A força de compressão usada causa uma deformação nas partículas. Se após a retirada da força o material volta ao seu volume inicial é dado o nome de deformação elástica, por ser reversível. Quando essa deformação não é reversível é considerada uma deformação plástica (MAARSCHALK; VAN DER; BOLHUIS, 1999). Na figura 27, pode-se observar o resultado da análise da equação de Heckel, que propõe que a redução da porosidade acontece com a aplicação de uma força.

Figura 27: Resultado da análise da equação de Heckel.



K = constante obtida pela equação $\ln(1/(1-D))$; P_y : pressão média de deformação.

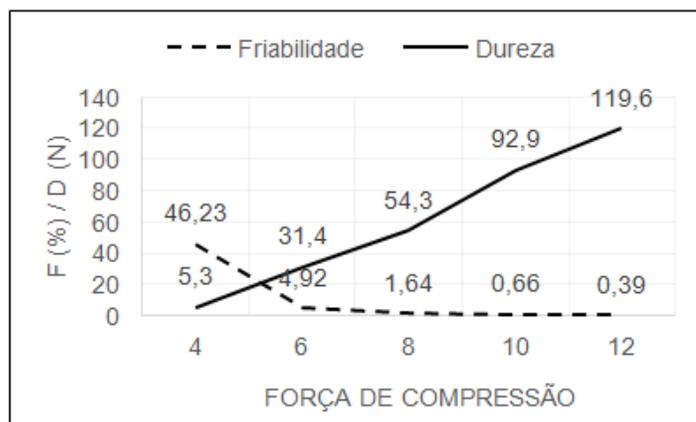
De acordo com os resultados da curva e o valor de P_y o tipo de deformação desta formulação é a deformação plástica. As deformações plásticas caracterizam-se pela manutenção da massa compactada, não ocorrendo recuperação do volume inicial quando encerrada a aplicação da força, isto é, são deformações permanentes (NARAYAN; HANCOCK, 2003).

Na fabricação de comprimidos é conveniente que haja uma deformação plástica, formando comprimidos com boa resistência mecânica. Quando os materiais são duros e

quebradiços eles fragmentam ao serem submetidos à compressão. Esses fragmentos gerados ajudam a preencher os espaços vazios (poros) existentes auxiliando na consolidação da formulação (REMITON, 2000).

Na figura 28 nota-se a relação entre a friabilidade e dureza dos comprimidos com a força de compressão. Esses são testes que avaliam a resistência mecânica do comprimido a rupturas, no teste de friabilidade observa-se a resistência dos comprimidos frente a abrasão e o de dureza à pressão (FARMACOPEIA BRASILEIRA V, 2010).

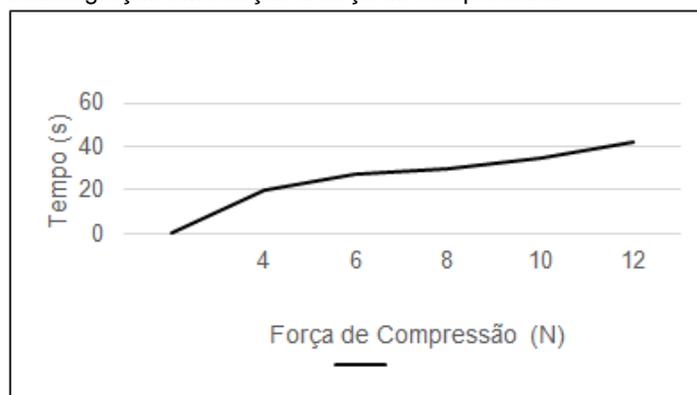
Figura 28: Relação entre dureza e friabilidade com a força de compressão.



De acordo com a Farmacopeia Brasileira V (2010), ao final do teste de friabilidade os comprimidos não devem apresentar ranhuras ou ter se partido, e a perda, para ser considerada aceitável, deve ser menor que 1,5%. Com o aumento da força de compressão, nota-se que esses comprimidos se tornaram mais duros e menos friáveis. A Farmacopeia Americana (USP, 2012), estabelece 1% como limite máximo para a friabilidade, portanto em ambos limites apresentados, apenas os comprimidos com força de compressão de 10 e 12 KN são aceitáveis.

O tempo de desintegração foi outro parâmetro avaliado de acordo com o que é preconizado na Farmacopeia Brasileira V (2010), onde comprimidos sem revestimento não devem ultrapassar o limite de 30 minutos para se desintegrarem. Na Figura 29, observa-se o tempo de desintegração em relação à força de compressão.

Figura 29: Tempo de desintegração em relação à força de compressão.



Nota-se que todos os comprimidos nas diferentes forças utilizadas estão dentro do limite pré-estabelecido, abaixo de 30 minutos. A desintegração ocorre de forma muito rápida, onde o comprimido com o maior tempo foi de 42 segundos. Este grande potencial desintegrante pode ser atribuído à composição e ao processo de compressão direta, que proporciona uma desintegração em partículas primárias, aumentando a área superficial para dissolução com uma liberação mais rápida do fármaco (SHANGRAW, 1989; SAUSEN 2007). Segundo Sheth, Bandelin e Shangraw (1980), comprimidos duros constituídos por celulose microcristalina desintegram rapidamente devido à rápida passagem de água (capilaridade) dentro do comprimido.

A Tabela 21 apresenta os valores de peso médio, desvio padrão e coeficiente de variação dos comprimidos de cada uma das forças de compressão. É possível observar que todos estão dentro do limite estabelecido pela Farmacopeia Brasileira V (2010), onde comprimidos com peso médio de 250mg ou mais não devem ultrapassar um limite de variação de 5% para mais ou para menos. Na prática é impossível conseguir que todos os comprimidos de um mesmo lote apresentem pesos rigorosamente iguais, mas devem ter pesos semelhantes e dentro dos padrões. (MOISÉS, 2006).

Tabela 21 - Análise de peso médio, coeficiente de variação e desvio padrão.

	F4	F6	F8	F10	F12
Peso médio	0,588	0,594	0,588	0,593	0,593
CV %	0,9	1,5	1,3	4,2	0,4
DP	0,004	0,004	0,005	0,014	0,001

CV = coeficiente de variação. DP = Desvio Padrão.

Os comprimidos produzidos com força de compressão de 12 KN foram os selecionados como formulação final. Apesar de apresentarem um valor alto de dureza,

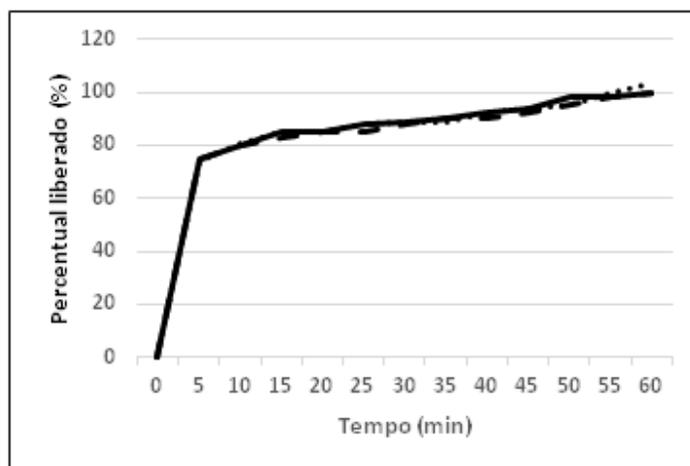
desintegraram-se em tempo adequado, possuíram valores de friabilidade e peso médio com desvio padrão e coeficiente de variação de acordo com a Farmacopeia Brasileira V (2010).

5.4.3 Desenvolvimento do perfil de dissolução dos comprimidos contendo EEEO

Segundo Dressman (1998) o teste de dissolução é um aspecto essencial a ser avaliado durante o desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Entre tantos testes que avaliam a resistência mecânica, o teste de dissolução é o que melhor apresenta *in vitro*, o possível comportamento do comprimido no organismo, tendo resultados com maior significância (LIMA *et al.*, 2005). Assim, possibilitando a quantificação de quanto foi liberado de substância ativa no meio de dissolução, para ser comparado com a quantidade que foi declarada (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Na figura 30 observa-se o perfil de dissolução dos comprimidos contendo EEEO, os resultados obtidos no teste mostram uma alta taxa de liberação logo no início, aos 5 minutos cerca de 75% das antocianinas presentes nos comprimidos já haviam sido liberadas.

Figura 30: Perfil de dissolução dos comprimidos contendo EEEO.



Diversas farmacopeias estabelecem diferentes critérios para o tempo de dissolução de fármacos (Tabela 22). Os comprimidos desenvolvidos neste trabalho possuem em sua composição 1,2% de antocianinas totais e cumprem com o requisito de dissolução das farmacopeias autorizadas no Brasil.

Tabela 22 - Valores referências de dissolução em farmacopeias.

Farmacopeias	Limite	Ano
Brasileira	Q + 5%	2010
Americana	85 a 115% (45 min)	2012
Britânica	90 a 110% (45min)	1999
Portuguesa	75% (45min)	2008

Kratz *et al.* (2008) fez um estudo com comprimidos com *Ginkgo biloba L.* Os resultados mostraram apenas 32,9% de liberação da substância ativa em 45 minutos. De Souza (2005) reportou um resultado onde comprimidos com droga vegetal seca de *Phyllanthus niruri*, teve um 75,70% de dissolução em 15 minutos. Comparando este estudo com outros trabalhos é possível destacar a ótima dissolução e liberação da substância ativa dos comprimidos aqui desenvolvidos.

A rápida desintegração do comprimido pode ter contribuído para liberação de antocianinas logo nos primeiros minutos de teste, pois o comprimido teve uma total desintegração aos 42 s e, aos 30 minutos do teste de dissolução 99% da concentração declarada de antocianinas já havia sido liberada.

O revestimento dos comprimidos pode configurar o próximo passo em estudos futuros, principalmente para buscar uma estabilidade maior das antocianinas presentes no EEE0.

As condições de extração do EEEO foram adequadas, com um teor de antocianinas e potencial de sequestro de radicais melhor que encontrados em outros estudos sobre açaí e espécies vegetais.

A extração de antocianinas é favorecida pelo volume de ácido acético pois é o único grupo de fenóis que reage bem a meios com acidez aumentada. Quanto maior o volume de ácido acético, maior o teor de antocianinas e menor o teor de outros compostos fenólicos.

O SPN desenvolvido no trabalho apresentou características de tamanho, potencial zeta, índice de polidispersão, eficiência de encapsulação e estabilidade interessantes, proporcionando maior proteção das antocianinas contra a degradação.

Houve liberação de antocianinas do SPN contendo EEEO no teste de permeação *in vitro* com membrana sintética (acetato de celulose) e membrana biológica (pele suína).

Ambas membranas utilizadas no estudo de permeação *in vitro* para avaliação da liberação de antocianinas do SPN contendo EEEO foram consideradas adequadas, podendo ser empregadas em outros estudos envolvendo novos extratos e/ou formulações.

A liofilização com adjuvantes do EEEO, voltada para o desenvolvimento de comprimidos, mostrou-se eficaz ao final do processo. Onde o teor de antocianinas manteve-se alto e as características farmacotécnicas adequadas para o processo de compressão.

A formulação desenvolvida para comprimidos apresentou boas propriedades de fluxo e de compactação. Apesar de ser um comprimido duro o tempo de desintegração e a friabilidade estão dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira V.

A dissolução foi rápida e a liberação de antocianinas praticamente imediata, demonstrando o grande potencial da formulação de comprimidos contendo EEEO.

ADOLFSSON, A.; CAMELLA, C.; NYSTRÖN, C. The effect of milling and addition of dry binder on the interparticulate bonding mechanisms in sodium chloride tablets. **Int J Pharm.**, v.160, p.160-195, 1998.

AHMED, J.K.; AMER, Z.J.A.; AL-BAHATE, M.J.M. Effect of chlorophyll and anthocyanin on the secondary bonds of polymethyl methacrylate (pmma). **IJTRA**, v.2, p.73-80, 2014.

ALAM, S.; KHAN, Z. I.; MUSTAFA, G.; KUMAR, M.; ISLAM, F.; BHATNAGAR, A.; AHMAD, J.F. Development and evaluation of thymoquinone-encapsulated chitosan nanoparticles for nose-to-brain targeting: a pharmacoscintigraphic study. **Int J Nanomedicine**, v.7, p.5705-5718, 2012.

ALASALVAR, C.; AL-FARSI, M.; SHAHIDI, F. Compositional characteristics and antioxidant component of cherry Laurel Varieties and Pekmez. **J Food Sci.**, v.70, n.1, p.47-52, 2005.

ALDERBORN G. Comprimidos e compressão. In: AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, p.410-411, 2005.

ALEXANDRE, D.; CUNHA, R. L.; HUBINGER, M.D. Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos. **Ciênc Tecnol Aliment.**, v.24, n.1, p.114-119, 2004.

ALLEN JÚNIOR, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2007.

ANAND, P.; NAIR, H.B.; SUNG, B.; KUNNUMAKKARA, A.B.; YADAV, V.R.; TEKMAL, R.R.; AGGARWAL, B.B. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. **Biochem Pharmacol**. v. 79, n. 3, p. 330-338, 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Arlington: Ed. Patrícia Cuniff, 2006.

ARAÚJO, A.A.S. **Análise térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de preparações farmacêuticas e novas especialidades de zidovudina**. 225f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo, 2003.

AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª Ed. São Paulo: Artmed, 2005.

ÁVILA, J.M.M.; TORALLES, R.P.; NEUJAHN, M.C.; CANTILLANO, R.F.F.; PERALBA, M.C.R., **Identificação por CCD e quantificação de compostos fenólicos, antocianinas, vitamina C e capacidade antioxidante em cultivares de morango do RS**. In: 8º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. Anais do 8º SLACA, 2009.

AVULA, B.; WANG, Y.H.; ALI, Z.; SMILLE, T.J.; KHAN, I.A. Quantitative determination of triperpene saponins and alkenated-phenolics from *Labisia pumila* using an LC-UV/ELSD method and confirmation by LC-ESI-TOF. *Planta Med.*, v.77, n.15, p.1742-1748, 2011.

AYROSA, A.M.I.B. Liofilização: ciência ou arte? **Rev Eng FAAP**, p.40-45, 2009.

AYROSA, A.M.I.B.; MAIZATO, M.J.; POLAKIEWICZ, B.; BEPPU, M.M.; PITOMBO, R.N.M. Estudo do comportamento higroscópico do pericárdio bovino liofilizado. **Matéria (Rio J.)**, v.12, p.313-321, 2007.

BALA, I.; BHARDWAJ, V.; HARIHARAN, S.; KHARADE, S.V.; ROY, N.; KUMAR, M.N.V.R. Sustained Release Nanoparticulate Formulation Containing Antioxidant-Ellagic Acid as Potential Prophylaxis System for Oral Administration. **J Drug Target.**, v.14, n.1, p.27-34, 2006.

BALASWAMY, K.; RAO, P.P.; NAGENDER, A.; SATYANARAYANA, A. Preparation of sour grape (*Vitis vinifera*) beverages and evaluation of their storability. **J Food Process Technol.**, v.2, n.3, p.1-4, 2011.

BHARALI, D.J.; SIDDIQUI, I.A.; ADHAMI, V.M.; CHAMCHEU, J.C.; ALDAHMAH, A.M.; MUKHTAR, H.; MOUSA, S.A. Nanoparticle Delivery of Natural Products in the Prevention and Treatment of Cancers: Current Status and Future Prospects. **Cancers**, v.3, n.4, p.4024-4045, 2011.

BHATTACHARYA, A.; BANU, J.; RAHMAN, M.; CAUSEY, J.; FERNANDES, G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. **J Nutr Biochem.**, v.17, p.789-810, 2006.

BHATTACHARYYA, S.S.; PAUL, S.; KHUDA-BUKHSH, A.R. Encapsulated plant extract (*Gelsemium sempervirens*) poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles enhance cellular uptake and increase bioactivity in vitro. **Exp Biol Med.**, v.235, n.6, p.678-688, 2010.

BILIA, A.R.; BERGONZI, M.C.; MORGENNI, F.; MAZZI, G.; VENCIERI, F.F. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. **Int J Pharm.**, v.213, p.199-208, 2001.

BOBBIO, F.O.; DRUZIAN, J.I.; ABRAO, P.A.; BOBBIO, P.A.; FADELLI, S. Identification and quantification of anthocyanins from the acai fruit (*Euterpe oleracea*) Mart. **Ciênc Tecnol Aliment.**, v.20, p.388-390, 2000.

BOGHANI, A. H.; RAHEEM, A.; HASHMI, S. I. Development and storage studies of blended papaya–aloe vera ready to serve (RTS) beverage. **J Food Process Technol.**, v.3, p.1-4, 2012.

BOWYER, P. K. Phenolics: a peek inside the Pandora's box of organic chemistry. **Aust. & New Zea. Grapegrower Winemaker Ann. Tech.**, n.461, p.67-70, 2002.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5. ed., 546p, 2010.

BROUILLARD, R. **Anthocyanins as Food Colors**, Academic Press, New York, 280p, 1982.

BUGAY, D.E. Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. **Adv Drug Delivery Rev**, v.48, p.43-65, 2001.

BYUN, Y.; HWANG, J.B.; BANG, S.H.; DARBY, D.; COOKSEY, K.; DAWSON, P.L.; PARK, H.J.; WHITESIDE, S. Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly 3-caprolactone (PCL) nanoparticle. **Food Sci Technol.**, v.44, n.1, p.24-28, 2011.

CABRITA, L.; FOSSEN, T.; ANDERSEN, M. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. **Food Chemistry**, v.68, n.1, p.101–107, 2000.

CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **J Pharm Sci.** v.85, n.5, p.530-536, 1996.

CALZAVARA, B.B.G. **As possibilidades do açazeiro no estuário amazônico**. Belém: FCAP.103f. (Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 5). 1972.

CARNEIRO, A.P.G.; SILVA, L.M.R.; FIGUEIREDO, R.W.; SOUSA, P.H.M.; MAIA, G.A. Efeito da Temperatura no Comportamento Reológico de Pó de Açai (*Euterpe oleracea*) Reconstituído. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v.14,n.4, p.241-245, 2012.

CARSTENSEN, J. T. **Drug stability: principles and practices**. 2. ed. New york: Dekker, 1995.

CARR, R. L. Classifying flow properties of solids. **Chemical Engineering**, v,72, n.2, 69-72, 1965.

CASTREJON, A.; EICHHOLZ, I.; ROHN, S.; KROH, L.; HUYSKENS-KEIL, S. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum L.*) during fruit maturation and ripening. **Food Chem.**, v.109, n.3, p. 564–572, 2008.

CAVALCANTE, P. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém: CEJUP, 271p, 1991.

CHAN, W.C. Bionanotechnology Progress and Advances. **Bio Blood Marrow Transplant.**, v.12, n.1, p.87-91, 2006.

CHASTEIGNER, S.; CAVÉ, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-PH.; PUISIEUX, F.; *Drug Dev. Res.* **1996**, 38, 116.

CHIEN, Y. W. **Novel Drug Delivery Systems**. 2ª ed., New York: Marcel Dekker Inc., p. 300-375, 2005.

CHIN, Y.W.; CHAI, H.B.; KELLER, W.J.; KINGHORN, A.D. Lignans and other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (Açai) with antioxidant and cytoprotective activities. **J Agric Food Chem.**, v.56, n.17, p.7759-7764, 2008.

CHOI, W.S.; LEE, S.E.; LEE, H.S.; LEE, Y.H.; PARK, B.S. Antioxidative activities of methanol extracts of tropical and oriental medicinal plants. **Hangug Nonghwahag Hoeji**, v.41, p.556-559, 1998.

CIRPANLI, Y.; ALLARD, E.; PASSIRANI, C.; BILENSOY, E.; LEMAIRE, L.; CALIS, S.; BENOIT, J.P. Antitumoral activity of camptothecin-loaded nanoparticles in 9L rat glioma model. **Int J Pharm.**, v.403, n.1-2, p.201-206, 2011.

CLEMENT, P.; LAUGEL, C.; MARTY, J.P. Influence of three synthetic membranes on the release of caffeine from concentrated W/O emulsions. **J Control Release**, v. 66, p. 243-254, 2000.

CLEWELL, A.; QURESHI, I.; ENDRES, J.; HORVÁTH, J.; FINANCSEK, I.; NEAL-KABABICK, J.; JADE, K.; SCHAUSS, A.G. Toxicological evaluation of a dietary supplement formulated for male sexual health prior to market release. **Regul Toxicol Pharmacol.**, v.57, n.1, p.55-61, 2010.

COHEN, K.O.; OLIVEIRA, M.S.P.; CHISTÉ, R.C.; PALLET, J.P.D.; MONTE, D.C. Quantificação do teor de antocianinas totais da polpa de açaí de diferentes populações de açaizeiro. **Embrapa Amazon. Orient**, 2006.

CONSTANT, P.B.L. **Extração, caracterização e aplicação de antocianinas de açaí (*Euterpe oleracea*, M.)**. 183f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

COOPER-DRIVER, G.A. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. **Phytochemistry**, v.56, n.3, p. 229–236, 2001.

CÓRDOVA-FRAGA, T.; DE ARAUJO, D.B.; SANCHEZ, T.A.; ELIAS J.JR.; CARNEIO, A.A.; BRANDT-OLIVEIRA, R.; SOSA, M.; BAFFA, O. *Euterpe oleracea* (açaí) as an alternative oral contrast agent in MRI of the gastrointestinal system: preliminary results. **Magn Reson Imaging.**, v.22, n.3, p. 389-393, 2004.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3.ed, v.3. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2000.

COSTA, A.G.V.; GARCIA-DIAZ, D.F.; JIMENEZ, P.; SILVA, P.I. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. **J Function Foods**, v.5, n.2, p.539-549, 2013.

CUNHA, L.C.; AZEREDO, F.S.; MENDONÇA, A.C.V.; VIEIRA, M.S.; PUCCI, L.L.; VALADARES, M.C.; FREITAS, H.O.G.; SENA, A.A.S.; LINO JUNIOR, R.S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Rev Bras Farmacogn.**, v.19, n.2^a, p.403-411, 2009.

CURY, B.S.F.; BUENO, J.H.F.; SILVA JÚNIOR, N.P.; CASTRO, A.D.; GREMIÃO, M.P.D. Influência das propriedades de granulados de lactose nas características físicas dos comprimidos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v.28, p.85-92, 2007.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, n.15, p.7313-7352, 2010.

DARNET, S.; SERRA, J.L.; RODRIGUES, A.M.C.; SILVA, L.H.M. A highperformance liquid chromatography method to measure tocopherols in assai pulp (*Euterpe oleracea*). **Food Res. Int.**, v.44, p.2107-2111, 2011.

DAS, J.; DAS, S.; SAMADDER, A.; BHADRA, K.; KHUDA-BUKHS, A.R. Poly (lactide-co-glycolide) encapsulated extract of *Phytolacca decandra* demonstrates better intervention against induced lung adenocarcinoma in mice and on A549 cells. **Eur J Pharm Sci.**, v.47, n.2, p.313-324, 2012.

DA SILVA, V.S.; DE ALMEIDA, G.H.T.; BARBOSA, F. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.): A Tropical Fruit with High Levels of Essential Minerals-Especially Manganese-and its Contribution as a Source of Natural Mineral Supplementation. **J Toxicol Environ Health A.**, v.77, p.80-89, 2014.

DA SILVA, L.C.; GARCIA, T.; MORI, M.; SANDRI, G.; BONFERONI, M.C.; FINOTELLI, P.V.; CINELLI, L.P.; CARAMELLA, C.; CABRAL, L.M. Preparation and characterization of polysaccharide-based nanoparticles with anticoagulant activity. **Int J Nanomedicine**, v.7, p.2975-2986, 2012.

DE BEM, G.F.; DA COSTA, C.A.; DE OLIVEIRA, P.R.; CORDEIRO, V.S.; SANTOS, I.B.; DE CARVALHO, L.C.; SOUZA, M.A.; OGNIBENE, D.T.; DALEPRANE, J.B.; SOUSA, P.J.; RESENDE, A.C.; DE MOURA, R.S. Protective effect of *Euterpe oleracea* Mart (açai) extract on programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during pregnancy. **J Pharm Pharmacol.**, v.66, n.9, p.1328-1338, 2014.

DE PAULA, I. C. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae – macela.** 194f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

DE SOUZA, K.C.B.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L.; GONZALEZ ORTEGA, G. The adjuvantes Aerosil and gelatin-sol-P influence on the technological characteristics of spray-dried powders from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. **Drug Dev Ind Pharm.**, v. 26, n. 3, p. 331-336, 2000.

DE SOUZA, M.O.; SILVA, M.; SILVA, M.E.; OLIVEIRA, R.P.; PEDROSA, M.L. Diet supplementation with açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, v. 26, n.7-8, p. 804-810, 2010.

DE SOUZA, T.P.; SPANIOL, B.; PETROVICK, P.R. Avaliação de comprimidos revestidos por película contendo alta concentração de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri*. **Acta Farm Bonaerense**, v.24, p.61-67, 2005.

DECKER, E.A. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of food to maximize oxidative stability. **Trends Food Sci Technol.**, v.9, p.6, p.241-248, 1998.

DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S.S.; TALCOTT, S.T. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. **J Agric Food Chem.**, v.54, p.1222-1229. 2006.

DEMBINSKA-KIEC, A.; MYKKANEN, O.; KIEC-WILK, B.; MYKKANEN, H. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. **Br J Nutr.**, v.99, p.109-117, 2008.

DEW, M.J.; HUGHES, P.J.; LEE, M.G.; EVANS, B.K.; RHODES, J. An oral preparation to release drugs in the human colon. **Br J Clin Pharmacol.**, v.14, p. 405-408, 1982.

DIAS, A.L.S.; ROZET, E.; CHATAIGNÉ, G.; OLIVEIRA, A.C.; RABELO, C.A.S.; HUBERT, P.; ROGEZ, H.; QUETIN-LECLERCG, J. A rapid validated UHPLC-PDA method for anthocyanins quantification from *Euterpe oleracea* fruits. **J Chromatogr B**, v.907, p.108-116, 2012.

DOELKER, E. Comparative compaction properties of various microcrystalline celluloses types and generic products. **Drug Dev Ind Pharm.**, v.19, n.17, p.2399-2471, 1993.

DOUCET, O.; FERRERO, L.; GARCIA, N.; ZASTROW, L. O/W emulsion and W/O/W multiple emulsion: physical characterization and skin pharmacokinetic comparison in the delivery process of caffeine. **Int J Cosmet Sci**, v.20, p.283-295, 1998.

DRESSMAN, J.B.; AMIDON, G.L.; REPPAS, C.; SHAV, V.P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms. **Pharm Res.**, v.15, n.1, p11-12, 1998,

EHRHARDT, L.; SCHINDLER, E. Pharmazeutische Granulate. **Pharm Ind.**, v. 41, n.12, p.96-103, 1980.

EISSENS, A.C.; BOLHUIS, G.K.; HINRICHS, W.L.J.; FRIJLINK, H.W. Inulin as filler-binder for tables prepared by direct compaction. **Eur J Pharm Sci.**, v.15, p.31-38, 2002.

ESCALONA ARRANZ, J.C.; PEREZ-ROSES, R.; RODRIGUES, A.J.; QUEVEDO, M. H.J.; MWASI, L.B.; CABRERA, S.O.; MACHADO-GARCIA, C.; FONG-LOREZ, O.; CASTILLO, A.A.; PUENTE-ZAPATA, E. Antioxidant and toxicological evaluation of a *Tamarindus indica* L. leaf fluid extract. **Nat Prod Res** n.30, p.1-6, 2015.

FACHAUX, J.M.; GUYOT-HERMANN, A.M.; GUYOT, J.C.; CONFLANT, P.; DRACHE, M.; VEESLER, S.; BOISTELLE, R. Pure paracetamol for direct compression. Part I. Development of sintered-like crystals of paracetamol. **Powder Technol.**, v.82, p.123-128, 1995.

FAHMY, T. M.; FONG, P.M.; GOYAL, A.; SALTZMAN, W.M. Targeted for Drug Delivery. **Nano today**, v.8, n.8, p.18-26, 2005.

FAVACHO, A.S.H.; OLIVEIRA, B.R.; SANTOS, K.C.; MEDEIROS, B.J.L.; SOUZA, P.J.C.; PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C.T. Anti-inflammtory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* oil. **Braz J Pharmacog**, v.21, n.1, p.105-114, 2011.

FELSNER, M.L.; MATOS, J.R. Análise da Estabilidade Térmica e Temperatura de Oxidação de Óleos Comestíveis Comerciais por Termogravimetria. **Anais Assoc Bras Quím.**, v.47, n.4, p.308-318, 1998.

FERREIRA, L. A.; LEITE, J. P. V. Desenvolvimento de formulações fitoterápicas. In: LEITE, J.P.V. Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Editora Atheneu, p. 206-251, 2008.

FLESCHHUT, J.; KRATZER, F.; RECHKEMMER, G.; KULLING, S.E. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*. **Eur J Clin Nutr**, v.45, n.1, p.7-18, 2006.

- FRANCIS, F. J. **Anthocyanins as food colourants**. The world of ingredients. n. 4, p. 16-18, 1996.
- FREGONESI, B.M.; YOKOSAWA, C.E.; OKADA, I.A.; MASSAFERA, G.; BRAGA COSTA, T.M.; PRADO, S.P.T. Polpa de açaí congelada: características nutricionais, físico-químicas, microscópicas e avaliação da rotulagem. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, n.3, p. 387-395, 2010.
- FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. **J Food Sci.**, v.33, n.1, p. 72, 1968.
- GABRIELSON, J.; LINDBERG, N.; LUNDTEDT, T. Multivariate methods in pharmaceutical applications. **J Chemom.**, v.16, n.3, p.141-160, 2002.
- GALLORI, S.; BILIA, A.R.; BERGONZI, M.C.; BARBOSA, W.L.R.; VINCIERI, F. F. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (açai palm). **Chromatographia**, v.59, p.739-743, 2004.
- GALOTTA, A.Q.A.; BOAVENTURA, M.A.D.; LIMA, L.A.R.S. Antioxidant and cytotoxic activities of açaí (*Euterpe precatoria* Mart.). **Quím Nova.**, v.39, n.6, 2008.
- GANDHI, A.; JANA, S.; SEM, K.K. In-vitro release of acyclovir loaded Eudragit RLPO (®) nanoparticles for sustained drug delivery. **Int J Biol Macromol.**, v.67, p.478-482, 2014.
- GARCIA, L. P. **Liofilização aplicada a alimentos**. 45p. Trabalho Acadêmico (Graduação Bacharelado em Química de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, Rio Grande do Sul, 2009
- GIUSTI, M. M.; SAONA, L. E. R.; WROLSTAD, R. E. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. **J Agric Food Chem**, v.47, n.11, p. 4631, 1999.
- GLASSMAN, S.F. **A revision of B.E. Dahlgren's index of american palms. Phanerogamarum monographiae**. Verlag Von J Cramer, 1 ed, 294p. 1972.
- GOMES, C.; MOREIRA, R.G.; CASTELL-PEREZ, E. Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped trans-Cinnamaldehyde and Eugenol for Antimicrobial Delivery Applications. **J Food Sci.**, v.76, n.2, p.16-24, 2011.
- GONNET, J. F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited-1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. **Food Chem.**, v.63, n.3, p.409-415, 1998.
- GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S. C. **Introdução à Bioquímica Clínica Animal**. Gráfica de Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 198p, 2003.
- GORDON, A.; CRUZ, A.P.G.; CABRAL, L.M.C.; DE FREITAS, S.C.; DIB TAXI, C.M.A.; DONANGELO, C.M.; MATTIETTO, R.A.; FRIEDRICH, M.; MATTA, V. M.; MARX, F. Chemical characterisation and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening. **Food Chem.**, v.133, p. 256-263, 2012.
- GOUVEA, A.C.M.S.; ARAUJO, M.C.P.; SCHUZL, D.F.; PACHECO, S.; GODOY, R.L.O.; CABRAL, L.M.C. Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-

rutinoside) isolation from freeze-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC. **Ciênc Tecnol Aliment.**, v.32, p.43-46, 2012.

GOTO, T.; KONDO, T. Structure and molecular stacking of anthocyanins flower color variation. **Angew. Chem. Int. Ed.** v.30, n.1, p.17-33, 1991.

GOVENDER, T.; RILEY, T.; EHTEZAZI, T.; GARNETT, M.C.; STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. **Int J Pharm.**, v.199, n.1, p.95-110, 2000.

GUYOT, J.C.; ARNAUD, P.; BECOURT, P.; CASSIERE, J.P.; CHULIA, D.; DUCHÊNE, D.; FERRAND, D.; GOUAIHARDOU, J.; LANGLOIS, C.; LEQUIEN, C.; MAFROID, F.; POURCELOT, Y.; RENOUX, R.; SEGOT, S.; TOURE, P. Commentaires relatifs aux méthodes générales d'analyse des formes orales solides récemment introduites dans les Références 124 pharmacopées française et européenne. Rapport d'une commission. SFSTP S.T.P. **Pharma Pratiques**, v.5, n.6, p. 482 – 494, 1995.

HAN, L.; FU, Y.; COLE, A. J.; LIU, J.; WANG, L. Co-encapsulation and sustained-release of four components in ginkgo terpenes from injectable PELGE nanoparticles. **Fitoterapia**, v.83, n.4, p. 721-731, 2012.

HARBONE, J. B. **Variation in and functional significance of phenolic conjugation in plants.** In: Biochemistry of Plant Phenolics. New York: Plenum Press, p.457-474, 1979.

HAUSCHILD, K.; PICKER-FREYER, K.M. Evaluation of a new coprocessed compound based on lactose and maize starch for tablet formulation. **AAPS J**, v.6, n.2, p.27-38, 2004.

HENDERSON, A.; GALEANO, G. **Euterpe, Prestoea, and Neonicholsonia (Palmae: Euterpeinae).** New York Botanical Garden. 90p, 1996.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea*) – A phytochemical and pharmacological assessment of the species health claims. **Phytochem Lett.**, v.4, n.1, p.10-21, 2001.

HERCULANO, F.E.B. **Produção industrial de cosméticos: o protagonismo da biodiversidade vegetal da Amazônia.** 146f. Tese (Doutorado de Gestão em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.

HIGUCHI, T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from cream and ointments. **J Soc Cosmet Chem.**, v.11, p. 85-97, 1960.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs is suspension. **J Pharm Sci.**, v.50, n.10, p 874-875, 1961.

HIGUCHI, T. Analysis of data on medicament release from ointment. **J Pharm Sci.**, v.51, p.802-804, 1962.

HILL, L.E.; TAYLOR, T. M.; GOMES, C. Antimicrobial Efficacy of Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped Cinnamon Bark Extract against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. **J. Food Sci.**, v. 78, n. 4, p. 626-632, 2013.

- HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chem.**, v.118, n.2, p.208-214, 2010.
- HOMMA, A.K.O; NOGUEIRA, O.L.; MENEZES, A.J.E.A.; CARVALHO, J.E.U.; NICOLI, C.M.L.; MATOS, G.B. Açai: novos desafios e tendências. **Amazônia: Ci. & Desen.**, v.1, p.7-23, 2006.
- HU, B.; PAN, C.; SUN, Y.; HOU, Z.; YE, H.; HU, B.; ZENG, X. Optimization of Fabrication Parameters To Produce Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles for Delivery of Tea Catechins. **J Agric Food Chem.** v.56, n.16, p.7451-7458, 2008.
- IKAWA, M.; SCHAPER, T.D.; DOLLARD, C.A.; SASNER, J. J. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Agric Food Chem.**, v.51, p.1811-1815, 2003
- JACKMAN, R.L.; YADA, R.I.; TUNG, M.A. A review: Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. **J. Food Biochem.**, v.11, p.279-308, 1987.
- JIVRAJ, M.; MARTINI, L.G.; THOMSON, C.M. An overview of the different excipients for the direct compression of tablets. **Pharm Sci Technol Today**, v.3, p.58-63, 2000.
- JONES, D.L. **Palms: throughout the world.** Washington: Smithsonian Institution. 1995.
- KACURAKOVA, M.; MATHLOUTHI, M. FTIR and laser-Raman spectra of oligosaccharides in water: characterization of the glycosidic bond. **Carbohydr Res**, v.284, p.145-157, 1996.
- KANG, J.; LI, Z.M.; WU, T.; JENSEN, G.S.; SCHAUSS, A.G.; WU, X. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chem.**, v.122, p.610-617, 2010.
- KARAKAYA, S. Bioavailability of Phenolic Compounds. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v.44, n.6, p.453-464, 2004.
- KHUDA-BUKHSH, A.R.; BHATTACHARYYA, S.S.; PAUL, S.; BOUJEDAINI, N. Polymeric nanoparticle encapsulation of a naturally occurring plant scopoletin and its effects on human melanoma cell A375. **J Chinese Integ Med.**, v.8, n.9, p.853-863, 2010.
- KUMARI, A., YADAV, S.K., PAKADE, Y.B., KUMAR, V.; SINGH, B.; CHAUDHARY, A.; YADAV, S.C. Nanoencapsulation and characterization of *Albizia chinensis* isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.82, n.1, p.224–232, 2011.
- KOTHARI, S.H.; KUMAR, V.; BANKER, G.S. Comparative evaluations of powder and mechanical properties of low crystallinity celluloses, microcrystalline celluloses, and powdered celluloses. **Int J Pharm.**, v.232, p.69-80, 2002.
- KRATZ, J.M; TERRAZAS, C.B.; MOTTA, M.J.; REGINATTO, F.H.; SIMÕES, C.M.O. Determinação da composição química e dos perfis de dissolução *in vitro* de

medicamentos à base de *Ginkgo biloba* disponíveis no mercado brasileiro. **Lat Am J Pharm.**, v.27, n.5, p.674-680, 2008.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Lacouste Gulbenkian, p. 899, 2001.

LACOULONCHE, F.; GAMISANS, F.; CHAUVET, A.; GARCÍA, M.L.; ESPINA, M.; EGEA, M.A. Stability and in vitro drug release of flurbiprofen-loaded poly-epsilon-caprolactone nanospheres. **Drug Dev Ind Pharm.**, v.25, n.9, p.983-993, 1999.

LAZCANO, C.A.; YOO, K.S.; PIKE, L.M. A method for measuring anthocyanins after removing carotenes in purple colored carrots. **Scientia Hortic.**, v.90, p.321-324, 2001.

LEE, H.S.; HONG, V. Chromatographic analysis of anthocyanins. **Chromatogr.**, v.624, p.221-234, 1992.

LICHTENTHALER, R.; RODRIGUES, R.B.; MAIA, J.G.S.; PAPGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Total oxidant scavenging capacity of the *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits. **Int J Food Sci Nutr.**, v.56, n.1, p.56-64, 2005.

LIMA, A.C.; MICHELIN, D.C.; SANTOS, M.R.C.; PAGANELLI, M.O.; IGNÁCIO, R.F.; CHAUD, M.V. Efeito da força de compressão e da umidade no perfil de dissolução de fármacos. **Saúde em Revista**, v.7, n.15, p.39-43, 2005.

LIN TAN, M., CHOONG, P.F.M., DASS, C.R. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. **Peptides**, v.31, n.1, p.184-193, 2010.

LOPES, E.C; POHLMANN, A.R.; BASSANI, V.; GUTERRES, S.S. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. Pharmazie, v.55, p.527-530, 2000.

LOSA, C.; MARCHAL-HEUSSLER, L.; ORALLO, F.; VILA JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Design of new formulations for topical ocular administration: polymeric nanocapsules containing metipranolol. Pharm Res., v.10, n.1, p.80-87,1993.

LUCIO, E.M.R.A.; ROSALEN, P.L.; SHARAPIN, N.; SOUZA BRITO, A.R.M. Avaliação toxicológica aguda e creening hipocrático da epilsopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Rev Bras Farmacogn.**, v.9, n.10, p.23-25, 2000.

LUO, H.; JIANG, B.; LI, B.; LI, Z.; JIANQ, B.H.; CHEN, Y.C. Kaempferol nanoparticles achieve strong and selective inhibition of ovarian cancer cell viability. **Int. J. Nanomedicine**, v.7, p.3951-3959, 2012.

MAARSCHALK, K.; VAN DER V.; BOLHUIS, G. K. Aprimoramento das propriedades de materiais para compressão direta. **Pharm.Technol.**, v.3, n.4-8, p.17-25, 1999.

MACIEL, R.L.; MOREIRA-CAMPOS, L.M.; SILVA, B.C.; BRANDÃO, M.G.L. Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de *Arnica lychnophora* em comparação com *Arnica montana*. **Rev Bras Farmacog.** v.16, n.1, p.99-104. 2006.

- MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticles characterization. A comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sci**, v.4, p. 221-241, 1991.
- MALCHER, E.S.L.T. **Influência da sazonalidade sobre a composição química e atividade antioxidante do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)**. 207f. Tese (Doutorado em Programa Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical) - Universidade Federal do Amapá, 2011.
- MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. The pharmacological evaluation of natura products - General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **J Ethnopharmacol.**, v.8, p.127-147, 1983.
- MANTOVANI, I.S.B.; FERNANDES, S.B.O.; MENEZES, F.S. Constituintes apolares do fruto do açaí (*Euterpe oleracea* M. – Arecaceae). **Rev Bra Farmacog.**, v.13, p.41-42, 2003.
- MARIÑO, M.; LOPES DA SILVA, L.; DURAN, N.; TASIC, L. Enhanced materials from nature: nanocellulose from citrus waste. **Molecules.**, v.20, n.4, p.5908-5923, 2015.
- MARKAKIS, P. Anthocyanins as food additives. In: MARKAKIS, P., Anthocyanins as Food Colors. New York: Academic Press, p.245-253, 1982.
- MATAIX, E.; CASTRO, M.D. Determination of anthocyanins in wine based on flow-injection, liquid-solid extraction, continuous evaporation and high-performance liquid chromatography-photometric detection” **J Chromatogr A**. v.910, p.225-263, 2001.
- MATHEUS, M.E.; DE OLIVEIRA, S.B.F.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V.P.; DE SOUSA, F. M.; FERNANDES, P.D. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. **Ethnopharmacol.**, v.107, n.2, p.291-296, 2006.
- MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Color stability and structural transformations of cyaniding 3,5-diglucoside and four 3-deoxyanthocyanins in aqueous solutions. **J Agric Food Chem.**, v.35, n.3, p.422-426, 1987.
- MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains**. Boca Raton: CRC Press, 362p, 1993.
- MCCARRON, P.A.; MAROUF, W.M.; QUINN, D.J.; FAY, F.; BURDEN, R.E.; OLWILL, S.A.; SCOTT, C.J. Antibody Targeting of Camptothecin-Loaded PLGA Nanoparticles to Tumor Cells. **Bioconjugate Chem.**, v.19, n.8, p.1561-1569, 2008.
- MEIRA, A. S. **Estudos de permeação/retenção cutânea *in vitro* empregando pele suína para comparação de desempenho de formulações semi-sólidas dermatológicas**. 45f. Trabalho de conclusão - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- MELO, F. B. **Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos**. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Escola de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

- MENEZES, E.M.S.; TORRES, A.T.; SRUR, A.U.S. Lyophilized acai pulp (*Euterpe oleracea*, Mart.) nutritional value. **Acta Amaz.**, v.38, p.311-316. 2008.
- MENEZES NETO, M.A. **Influência da disponibilidade de oxigênio sobre a germinação, crescimento e atividade das enzimas álcool desidrogenase e lactato desidrogenase em açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)**. 50f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1994.
- MIRANDA, M.A. **Efeito de flavonóides sobre a atividade enzimática de fosfatases in vitro e in vivo**. 124f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 2005.
- MISRA, R.; SAHOO, S. K. Coformulation of Doxorubicin and Curcumin in Poly-(D,L-lactide-co-glycolide) Nanoparticles Suppresses the Development of Multidrug Resistance in K562 Cells. **Mol Pharmaceutics**, v.8, p.852–866, 2011.
- MOISÉS, R.P. Tecnologia de produção de comprimidos. **Fármacos & Medicamentos** v.7, n.38, p.38-46, 2006.
- MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M.R.; CHACON, M.; BERGES, L.; GUZMAN, M.J. Stability of cyclosporine-loaded poly-sigma-caprolactone nanoparticles. **J Microencapsul.**, v.14, p.777, 1997.
- MONTEIRO, R.B.B. **Produção de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) em pó desengordurado através do processo combinado de desidratação e extração supercrítica**. Belém - UFPA, 2011.
- MONTGOMERY, C.; GEORGE, C.R. **Applied Statistics and Probability for Engineers**. 3 ed. Singapore: John Wiley & Sons, 2003.
- MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **Int J Pharm.**, v.385, n.1-2, p.113-142, 2010.
- MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **Eur J Pharma Biopharm.**, v.52, n.2, p.103-112, 2001.
- MOSQUEIRA, V.C.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly (D, L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **J Pharm Sci.**, v.89, n.5, p.614-626, 2000.
- MUKERJEE, A.; VISHWANATHA, J. K. Formulation, Characterization and Evaluation of Curcumin-loaded PLGA Nanospheres for Cancer Therapy. **Anticancer Res.**, v.29, p.3867-3876, 2009.
- MUÑIS-MIRET, N.; VAMOS, R.; HIRAOKA, M.; MONTAGNINI, F.; MENDENSOHN, R. O. The economic value of managing the acai palm (*Euterpe oleracea* mart) in the floodplains of the Amazon estuary, Para, Brazil. **For Ecol Manage**,v.87, p.163-173, 1996.
- MUSI, S.; FILIPOVI-VINCEKOVI, N.; SEKOVANI, L. Precipitation of amorphous SiO₂ particles and their properties. **Braz J Chem Eng.**, v.28, n.1, p.89-94, 2011.

MULLER, C.R.; BASSANI, V.L.; POHLMANN, A.R.; MICHALOWSKI, C.B. PETROVICK, P.R.; GUTERRES, S.S. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. **Drug Dev Ind Pharm.**, v.26, p.343, 2000.

MUTHU, M.S.; SINGH, S. Studies on biodegradable polymeric nanoparticles of risperidone: *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Nanomedicine (Lond)**, v.3, n.3, p.305-319, 2008.

NADA, A.H.; GRAF, E. Evaluation of vitacel M80K as new direct compressible vehicle. **Eur J Pharm Biopharm.**, v.46, p.347-353, 1998.

NAIR, K.L.; THULASIDASAN, A.K.; DEEPA, G.; ANTO, R.J.; KUMAR, G.S. Purely aqueous PLGA nanoparticulate formulations of curcumin exhibit enhanced anticancer activity with dependence on the combination of the carrier. **Int J Pharm.**, v.425, n.1-2, p.44-52, 2012.

NARAYAN, P.; HANCOCK, B.C. The relationship between the particle properties, mechanical behavior, and surface roughness of some pharmaceutical excipient compacts. **Mat Sci Eng A**, v.355, p.24-36, 2003.

NARAYANAN, S.; BINULAL, N.S.; MONY, U.; MANZOOR, K.; NAIR, S.; MENON, D. Folate targeted polymeric 'green' nanotherapy for cancer. **Nanotechnology**, v.21, n.28, p.1-13, 2010.

NASCIMENTO, R.J.S.; COURIL, S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S.P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Rev Bras Frut.**, v.30, p.498-502, 2008.

NINFALI, P.; MEA, G.; GIORGINI, S.; ROCCHI, M.; BACCHIOCCA, M. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. **Br J Nutr.**, v.93, n.2, p.257-266, 2005.

NOGUEIRA, O.L.; FIGUEIRÊDO, F.J.C.; MULLER, A.A. **Açaí**. 1th ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2005.

NOKHODCHI, A.; SHOKRI, J.; DASHBOLAGHI, A.; HASSAN-ZADEH, D.; GHAFOURIAN, T.; BARZEGAR-JALALI, M. The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. **Int J Pharm.**, v. 250, n.2, p. 359-369, 2003.

NOVELLO, A.A. **Extração de antocianinas dos frutos de açaí da mata atlântica (*Euterpe edulis* Martius) e sua atuação nas atividades antioxidantes e antiaterogênica em camundongos APOE -/-**. 80f. Dissertação (Nutrição). Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, 2011.

OHTA, K.M.; FUHI, M.; TAKEI, T.; CHIKAZAWA, M. Effect of geometric structure and surface wettability of glidant on tablet hardness. **Int J Pharm.**, v.262, p.75-82, 2003.

ODONNE, G.; BERGER, F.; STIEN, D.; GRENAND, P.; BOURDY, G. Treatment of leishmaniasis in the Oyapock basin (French Guiana): A K.A.P. survey and analysis of the evolutionary of phytotherapy knowledge amongst Wayãpi Indians. **J Ethnopharmacol.**, v.137, p.1228-1239, 2011.

OLIVEIRA, M.S.P.; LEMOS, M.A.; SANTOS, E.O.; SANTOS, V.F. Variação fenotípica em acessos de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) para caracteres relacionados à produção dos frutos. Belém: **Embrapa-CPATU**, 23p. (EmbrapaCPATU. Boletim de Pesquisa, 209).1998.

OLIVEIRA, A. B.; LONGHI, J. G.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. A **Normatização de fitoterápicos no Brasil/ Brazilian phytotherapeutic 131 regulamentation**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPR. p. 1-13, 2007.

PACHECO-PALENCIA, L.A.; DUNCAN, C.E.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial acai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chem.**, v.115, p.1199-1205, 2009.

PACHECO-PALENCIA, L.A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S.T. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **J Agric Food Chem.**, v.56, p.4631-4636, 2008.

PAGLIARUSSI, M.S.A. **Cadeia produtiva agroindustrial do açai: estudo da cadeia e proposta de um modelo matemático**. 65f. TCC, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2010.

PALUMBO, M.; RUSSO, A.; CARDILE, V.; RENIS, M.; PAOLINO, D.; PUGLISI, G.; FRESTA, M. Improved Antioxidant Effect of Idebenone-Loaded Polyethyl-2-Cyanoacrylate Nanocapsules Tested on Human Fibroblast. **Pharm Res.**, v.19, n.1, p.71-78, 2002.

PAUL, S.; BHATTACHARYYA, S.S.; BOUJEDAINI, N.; KHUDA-BUKHSH, A.R. Anticancer Potentials of Root Extract of Polygala senega and Its PLGA Nanoparticles-Encapsulated Form. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v.2011, p.1-13, 2011.

PHARMACOPOEIA, British. The department of health. **British Pharmacopoeia Commission, London. The Stationary Office**, 1999.

PIRES JÚNIOR, H.B.; BORGES, L.M.F.; DE SOUSA, L.A.D.; CUNHA, L.C.; LINO JÚNIOR, R.S.; MELO, D.F.A.; PEREIRA, M.E. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (MELIACEAE) em camundongos. **Rev UFG**, v.13, n.4, 2012.

PLAPIED, L.; DUHEM, N.; DES RIEUX, A.; PRÉAT, V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Curr Opin Colloid Interface Sci.**, v.16, n.3, p.228-237, 2011.

POMPEU, D. R.; BARATA, V. C. P.; ROGEZ, H. Impacts of refrigeration on the conservation of açai fruits (*Euterpe oleracea*). **Alim Nutr.**, v.20, n.1, p.141-148, 2009.

POMPEU, D.R.; SILVA, E.M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. **Bioresour Technol.**, v.100, p.6076–6082, 2009.

POOL, H.; QUINTANAR, D.; FIGUEROA, J. D.; MANO, C.M.; BECHARA, J.E.H.; GODÍNEZ, L.A.; MENDOZA, S. Antioxidant Effects of Quercetin and Catechin Encapsulated into PLGA Nanoparticles. **J Nanomater.**, v.2012, p.1-12, 2012.

PORTUGUESA, **Farmacopéia**. Edição Oficial. 2008.

PRABU, P.; CHAUDHARY, A.A.; DHARMARAJ, N.; KHIL, M.S.; PARK, S.Y.; KIM, H.Y. Preparation, characterization, in-vitro drug release and cellular uptake of poly(caprolactone) grafted dextran copolymeric nanoparticles loaded with anticancer drug. **J Biomed Mater Res.**, v.90, n.4, p.1128-1136, 2009.

PRANCE, G.T.; SILVA, M.F. **Arvores de Manaus**. Manaus, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 312p, 1975.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.1, p.199-478, 1995.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; FESSI, H.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly (D,L lactic acid) nanoparticles by an emulsification diffusion technique. **Int J Pharmacol.**, v.143, p.133-41, 1996.

RAO, J.P.; GECKELER, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control Parameters. **Prog Polym Sci.**, v.36, n.7, p.887–913, 2011.

RAVINDRAN, J.; NAIR, H.B.; SUNG, B.; PRASAD, S.; TEKMAL, R.R.; AGGARWAL, B.B. Thymoquinone poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles exhibit enhanced anti-proliferative, anti-inflammatory, and chemosensitization potential. **Biochem Pharmacol.**, v.79, n.11, p.1640-1647, 2010.

REIS, C.P.; NEUFELD, R.J.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v.2, n.1, p.8-21, 2006.

REMINGTON, S. **the science and practice of pharmacy**. 20.ed. Easton: Mack, p.1455, 2000.

REVILLA, E.; RYAN, J.M.; MARTIM-ORTEGA, G. Comparison of Several Procedures Used for the Extraction of Anthocyanins from Red Grapes. **J Agric Food Chem**, v.46, p.4592–4597, 1998.

RIBEIRO, J.C.; ANTUNES, L.M.; AISSA, A.F.; DARIN, J.D.; DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z.; BIANCHI, M.L.P. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutat Res.**, v.695, n.1, p.22-28, 2010.

RIBEIRO, A.F.; DE OLIVEIRA REZENDE, R.L.; CABRAL, L.M.; DE SOUSA, V.P. Poly-ε-caprolactone nanoparticles loaded with *Uncaria tomentosa* extract: preparation, characterization, and optimization using the Box-Behnken design. **Int J Nanomedicine**, v.8, n.1, p.431-442, 2013.

ROCHA, A.P.; CARVALHO, L.C.; SOUSA, M.A.; MADEIRA, S.V.; SOUSA, P.J.; TANO, T.; SCHINI-KERTH, V.B.; RESENDE, A.C.; SOARES DE MOURA, R. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascul Pharmacol.**, v.46, p.97-104, 2007.

RODRIGUES, G. V.; MARCHETTO, O. **Análises térmicas**. In: XVII Seminário — Aplicação da Técnica de Análise Térmica voltada para Institutos Acadêmicos e Industriais Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

ROGEZ, H. **Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação**. Belém: EDUFPA, 313p. 2000.

ROJANO, B.A.; VAHOS, I.C.Z.; ARBELÁEZ, A.F.A.; MARTÍNEZ, A.J.M.; CORREA, F.B.C.; CARVAJAL, L.G. Polyphenols and Antioxidant Activity of the Fruit Freeze-dried Palm Naidi (Colombian Açai) (*Euterpe oleracea* Mart.). **Rev Fac Nac Agron Medellín**, v.64, n.2, p.6213-6220, 2011.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S.C. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 4th.ed. London: Pharmaceutical Press, p.112, 2003.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chem.**, v.121, n.4, p.996-1002, 2010.

SAEZ, M.; GUZMAN, M.; MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M.R. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **Eur J Pharm Biopharm.**, v.50, p.379, 2000.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **J Saudi Chem Soc.**, v.18, n.2, p.85-99, 2013.

SAHOO, S.K.; LABHASETWAR, V. Nanotech Approaches to Drug Delivery and Imaging. **Drug Discov Today**, v.8, p.1112-1120, 2003.

SAMADDER, A.; DAS, S.; DAS, J.; PAUL, A.; KHUDA-BUKHSH, A.R. Ameliorative Effects of *Syzygium jambolanum* Extract and its Poly (lactic-co-glycolic) Acid Nano-encapsulated Form on Arsenic-induced Hyperglycemic Stress: A Multi-parametric Evaluation. **J Acupunct Meridian Stud.**, v.5, n.6, p.310-318, 2012.

SANNA, V.; SIDDIQUI, I.A.; SECHI, M.; MUKHTAR, H. Nanoformulation of natural products for prevention and therapy of prostate cancer. **Cancer Lett.**, v.334, n.1, p.142-151, 2013.

SANTOS, G.M.; MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M.; COSTA, J.M.C.; FIGUEIREDO, R.W.; PRADO, G.M. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açai (*Euterpe oleracea* Mart). **Arch Latinoam Nutr.**, v.58, p.187-192, 2008.

SANTOYO, S.; ARELLANO, A.; MARTIN, C.; YGARTUA, P. Enhancing effect of terpenes on the in vitro percutaneous absorption of diclofenac sodium. **Int J Pharma.**, v.130, n.1, p.141-145, 1996.

SARAF, A.S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v.81, n.7, p.680-689, 2010.

SARTORELLI, P.; ANDERSEN, H.R.; ANGERER, J.; CORISH, J.; DREXLER, H.; GÖEN, T.; GRIFFIN, P.; HOTCHKISS, S.A.M.; LARESE, F.; MONTOMOLI, L.; PERKINS, J.; SCHMELZ, M.; VAN DE SANDT, J.; WILLIAMS, F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environ Toxicol Pharmacol.**, v. 8, p.133-152, 2000.

SATO, M.E.O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I.F.; ZARONI, M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido fólico. **Rev Bras Ciênc Farm.**, v.43, n.2, p.195-203, 2007.

SAUSEN, T.R. **Desenvolvimento de comprimidos de clozapina obtidos pelo método de compressão direta**. 136f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de pós-graduação na área de ciências farmacêuticas, UFRS, Porto Alegre, 2007.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; DE CORDOVA, C.A.S.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; GUTERRES, S.S. Protective Properties of Melatoninloaded Nanoparticles against Lipid Peroxidation. **Int J Pharm.**, v.289, p.209-213, 2005.

SCHAUSS, A.G.; WU, X.; PRIOR, R.; OU, B.; PATEL, D.; HAUNG, D.; KABABICK, J. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry *Euterpe oleracea* Mart. (açai). **J Agric Food Chem.**, v.54, p.8598-8603, 2006a.

SCHAUSS, A.G.; WU, X.; PRIOR, R.L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; AGARWAL A.; JENSEN G. S.; HART A.N.; SHANBROM E. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (acai). **J Agric Food Chem.**, v.54, p.8604–8610, 2006b.

SEIJO, B.; FATTAL, E.; ROBLLOT-TREUPEL, L.; COUVREUR, P. Design of nanoparticles of less than 50 nm diameter: preparation, characterization and drug loading. **Int J Pharm.**, v.62, p.1-7, 1990.

SEKKAT, N.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Biophysical Study of Porcine Ear Skin *In Vivo* and its Comparison to Human Skin *In Vivo*. **J Pharm Sci.**, v.91, n.11, p.2376- 2381, 2002.

SHAH, R.B.; TAWAKKUL, M.A.; KHAN, M.A. Comparative evaluation of flow for pharmaceutical powders and granules. **AAPS Pharm Sci Tech.**, v.9, p.250–258, 2008.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Crit. Rev Food Sci Nutr.**, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SHANGRAW, R.F. In: **Pharmaceutical dosage forms: tablets**. New York: Marcel Dekker, v.1, p.195-246, 1989.

SHAO, J.; LI, X.; LU, X.; JIANG, C.; HU, Y.; LI, Q.; YOU, Y.; FU, Z. Enhanced growth inhibition effect of Resveratrol incorporated into biodegradable nanoparticles against glioma cells is mediated by the induction of intracellular reactive oxygen species levels. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.72, n.1, p.40-47, 2009.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Cytel, Santafé de Bogotá, p.145-157, 2000.

SHEA, T.B.; ORTIZ, D.; NICOLOSI, R.J.; KUMAR, R.; WATTERSON, A.C. Nanosphere-Mediated Delivery of Vitamin E Increases its Efficacy against Oxidative Stress Resulting from Exposure to Amyloid Beta. **J Alzheimers Dis.**, v.7, p.297-301, 2005.

SHETH, B.B.; BANDELIN, F.J.; SHANGRAW, R.F. In: **Pharmaceutical Dosage Forms: tablets**. New York: Marcel Dekker, v.1, p.109-185, 1980.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4ª ed. Porto Alegre: UFSC, p.223-259, 2004.

SILVA, J. J. M.; RÓGEZ, H. Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo bruto de açaí (*Euterpe oleracea*) na presença de compostos fenólicos puros ou de extratos vegetais amazônicos. **Quím Nova**, v.36, p.400-406, 2013.

SILVA, D.F.; VIDAL, F.C.; SANTOS, D.; COSTA, M.C.; MORGADO-DIAZ, J.A.; DO DESTERRO, S.B.N.M.; DE MOURA, R.S. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. **BMC Complement. Altern. Med.**, v.14, n.175, p.1-9, 2014.

SILVA JÚNIOR, J. O. C. **Obtenção e avaliação de forma farmacêutica semi-sólida fitoterápica contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytum officinale* L. (Confrei)**. Tese de doutorado / FCFRP- USP. 2006.

SILVA JÚNIOR, J.O.C.; VIEIRA, J.L.F.; BARBOSA, W.L.R.; PEREIRA, N.L. Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. **Rev Bras Farmacogn.**, v.16, p.161-167, 2006.

SOARES, M.H.F.B.; CAVALHEIRO, E.T.G. Aplicação de extratos brutos de quaresmeira e azaléia e da casca de feijão preto em volumetria ácido-base. Um experimento para cursos de análise quantitativa. **Quím Nova.**, v.24, p.408-411, 2001.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. **Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices**. *J Control Release*, v.70, n.1-2, p.1-20, 2001.

SOUSA, O.V.; OLIVEIRA, M.S.; CUNHA, R.O.; COSTA, B.L.S. ZANCANELLA, C.R.; LEITE, M.N. Avaliação da qualidade de matérias-primas de ruibarbo utilizadas em formulações farmacêuticas. **Rev Bras Farmacogn.**, v.13, p.30-33, 2003.

SPADA, P.D.; DANI, C.; BORTOLINI, G.V.; FUNCHAL, C.; HENRIQUES, J.A.; SALVADOR, M. Frozen fruit pulp of *Euterpe oleraceae* Mart. (acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. **J Med Food**, v.12, p.1084-1088, 2009.

STECANELLA, L.A.; TAVEIRA, S.F.; MARRETO, R.N.; VALADARES, M.C.; VIEIRA, M.S.; KATO, M.J.; LIMA, E.M. Development and characterization of PLGA nanocapsules of grandisin isolated from *Virola surinamensis*: in vitro release and cytotoxicity studies. **Rev Bras Farmacogn.**, v.23, n.1, p.153-159, 2013.

STÓJ, A.; MALIK, A.; TARGÓNSKI, Z. Comparative analysis of anthocyanin composition of juices obtained from selected species of berry fruits. **Pol J Food Nutr Sci**, v.15/56, n.4, p.401–407, 2006.

TANG, J.; XU, N.; JI, H.; LIU, H.; WANG, Z.; WU, L. Eudragit nanoparticles containing genistein: formulation, development, and bioavailability assessment. **Int J Nanomedicine**, v.6, p.2429–2435, 2011.

TAPIERO, H.; TEW, K.D.; BA N.; MATHÉ, G. Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies?. **Biomed Pharmacother.**, v.56, p.200-207, 2002.

TEIXEIRA-NETO, A.A.; SHIGUIHARA, A.L.; IZUMI, C.M.; BIZETO, M.A.; LEROUX, F.; TEMPERINI, M.L.; CONSTANTINO, R. A hybrid material assembled by anthocyanins from açai fruit intercalated between niobium lamellar oxides. **Dalton Trans.**, v.7, p.4136-4145, 2009.

TERASHITA, K.; IMAMURA, K. Preparation of antipyretic analgesic by direct compression and its evaluation. **Chem Pharm Bull.**, v.50, n.12, p.1542-1549, 2002.

TERCI, D.B.L. **Aspectos analíticos e didáticos de antocianinas extraídas de frutas**. 213f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 2004.

TERCI, D.B.L.; ROSSI, A.V. Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução?. **Quim Nova.**, v.25, p.684-688, 2002.

THI, N.D.; HWANG, E.S. Effects of drying methods on contents of bioactive compounds and antioxidant activities of black chokeberries (*Aronia melanocarpa*). **Food Sci Biotechnol.**, v.25, p.55-61, 2016.

THOMAS, C.; POURCELOT, Y. Preformulation of five commercial celluloses in drug development rheological and mechanical behavior. **Drug Dev Ind Pharm.**, v.19, n.15, p.1947-1964, 1991.

TIMBERLAKE, C.F.; BRIDLE, P. The anthocyanins. In: HARBORNE, J.B., MABRY, T.J., MABRY, H. The Flavonoids. New York, Academic Press, p. 216-266, 1975.

TIYABOONCHAI, W.; WOISZWILLO, J.; MIDDAUGH, R. Formulation and characterization of amphotericin B-polyethylenimine-dextran sulfate nanoparticles. **J Pharm Sci.**, v.90, n.7, p.902-914, 2001.

TOLEDO, A.C.O.; HIRATA, L.L.; BUFFON, M.C.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Rev Lecta**, v. 21, n.1/2, p. 7-13, 2003.

TORKANGERPOLL, K.; ANDERSEN, O.M. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. **Food Chem.**, v.89, n.3, p. 427, 2005.

UDANI, J.K.; SINGH, B.B.; SINGH, V.J.; BARRET, M.L. Effects of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters en a healthy overweight population: a pilot study. **J Nutri.**, v.12, p.10-45, 2011.

UHL, N.W.; DRANSFIELD, J. Genera Palmarum. A new classification of palms and its implications. In: BALICK, M.J., ed. The palm- tree of life: biology, utilization and conservation. Advances in Economical Botany, New York, v.6, p.1-19, 1986.

USP United States Pharmacopoeia. The official compendia of standard. 30th Edn. Arabswell: New York. 2012.

VALADARES, M.C. Avaliação de Toxicidade Aguda: Estratégias Após a “Era do Teste DL50”. **Rev Eletr Farm.**, v.3, n.2, p.93-98, 2006.

VANDRESEN, S.; QUADRI, M.G.N.; SOUZA, J.A.R.; HOTZA, D. Temperature effect on the rheological behavior of carrot juices. **J Food Eng.**, v.92, p.269–274, 2009.

VERA DE ROSSO, V.; HILLEBRAND, S.; MONTILLA, E.C.; BOBBIO, F.O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A.Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC) and acai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. **J Food Compos Anal.**, v.21, p.291–299, 2008.

VAUTHIER, C., BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. **Pharm Res.**, v.26, n.5, p.1025-1058, 2009.

VEIGA JR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas Mediciniais: Cura Segura?. **Quim Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Quim Nova**, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

VAN DE VEN, H.; VERMEERSCH, M.; MATHEEUSSEN, A.; VANDERVOORT, J.; WEYENBERG, W.; APERS, S.; COS, P.; MAES, L.; LUDWING, A. PLGA nanoparticles loaded with the antileishmanial saponin β -aescin: Factor influence study and in vitro efficacy evaluation. **Int J Pharm.**, v.420, n.1, p.122-132, 2011.

VON ELBE, J.H.E., SCHWARTZ, S.J. Colorantes. In: FENNEMA, O.R., Food Chemistry. 3.d. New York: Marcel Dekker, p.651-722, 1996.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis**. Editora Springer, 2^a ed., p. 196, Alemanha, 2001.

WELLS, J. Pre-formulação farmacêutica. In: AULTON, M. (Ed.). Delineamento de formas farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p.125-148., 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 235 Dermal absorption**, Geneve: WHO, 2006.

WROLSTAD, R. E. Anthocyanins. In: LAURO, G. J.; FRANCIS F. J. Natural Food Colorants-Science and Technology. New York: marcel Dekker, Inc., p. 237-252, 2000.

WU, J.S.; HO, H.O.; SHEU, M.T. A statistical design to evaluate the influence of manufacturing factors on the material properties and functionalities of microcrystalline cellulose. **Eur J Pharm Sci.**, v.12, p.417-425, 2001.

WU, T.H.; YEN, F.L.; LIN, L.T.; TSAI, T.R.; LIN, C.C.; CHAM, T.M. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **Int J Pharm.**, v.346, n.1-2, p.160-168, 2008.

XIE, C.; KANG, J.; BURRIS, R.; FERGUSON, M.E.; SCHAUSS, A.G.; NAGARAJAN, S.; WU X. Açai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Atherosclerosis**, v.216, n.2, p.327-333, 2011.

YAJIMA, T.; ITAI, S.; HAYASHI, H.; TAKAYAMA, K.; NAGAI T. Optimization of size distribution of granules for tablet compression. **Chem Pharm Bull**, v.44, p.1056-1060, 1996.

YEN, F.L.; WU, T.H.; TZENG, C.W.; LIN, L.T.; LIN, C.C. Curcumin Nanoparticles Improve the Physicochemical Properties of Curcumin and Effectively Enhance Its Antioxidant and Antihepatoma Activities. **J Agric Food Chem**. v.58, n.12, p.7376-7382, 2010.

YEN, F.L.; WU, T.H.; LIN, L.T.; CHAM, T.M.; LIN, C.C. Naringenin-Loaded Nanoparticles Improve the Physicochemical Properties and the Hepatoprotective Effects of Naringenin in Orally-Administered Rats with CCl₄-Induced Acute Liver Failure. **Pharm Res.**, v.26, n.4, p.893-902, 2009.

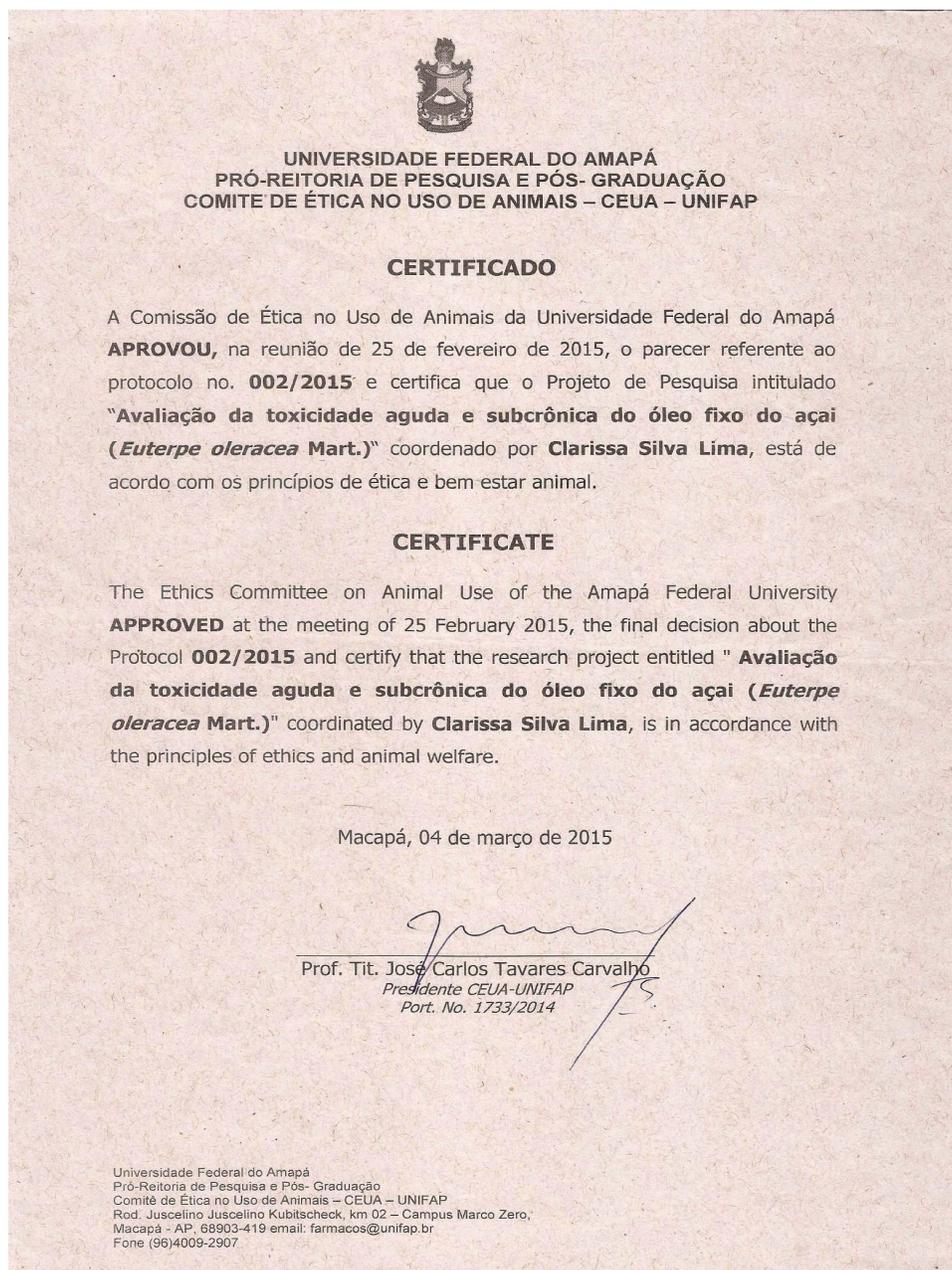
YIN, P.; WANG, Y.; QIU, Y.; HOU, L.; LIU, X.; QIN, J.; DUAN, Y.; LIU, P.; QIU, M.; LI, Q. Bufalin-loaded mPEG-PLGA-PLL-cRGD nanoparticles: preparation, cellular uptake, tissue distribution, and anticancer activity. **Int J Nanomedicine**, v.7, p.3961-3969, 2012.

YUSUF, M.; KHAN, R.A.; KHAN, M.; KAHMED, B. Plausible antioxidant biomechanics and anticonvulsant pharmacological activity of brain-targeted β -carotene nanoparticles. **Int J Nanomedicine.**, v.7, p.4311-4322, 2012.

YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; FILHO, D.F.S., YUYAMA, K.; VAREJÃO, M. J., FAVARO, D.I.T.; VASCONCELLOS, M.B.A.; PIMENTEL, S.A.; CARUSO, M.S.F. Physicochemical characterization of acai juice of *Euterpe precatoria* Mart. from different amazonian ecosystems. **Acta Amaz.**, v.41, n.4, p.545-552, 2012.

ZATTA, D.T.; PIMENTA, F.C.; TRESVENZOL, L.M.F.; FIUZA, T.S.; BARA, M.T.F.; CUNHA, L.C.; PUCCI, LL.; GARROTE, C.F.D.; OLIVEIRA, F.N.M.; PAULA, J.R. Estudo da Atividade Antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da Toxicidade Aguda das folhas da Jacaranda decurrens. **Latin Am J Pharm.**, v.28, n.4, p.485-489, 2009.

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética



Full Length Research Paper

***Euterpe oleracea* Mart. (açai): an old known plant with a new perspective**

Heitor Ribeiro da Silva^{1,2}, Daniele da Cruz de Assis², Ariadna Lafourcade Prada^{1,2}, Hady Keita², Jesus Rafael Rodriguez Amado² and José Carlos Tavares Carvalho^{2*}

¹Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Brazil.

²Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Curso de Farmácia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Brazil.

Received 17 October 2016; Accepted 9 December, 2016

The açai (*Euterpe oleracea* Mart) fruit pulp is extensively used in Brazil as food among other uses. The health benefits of açai are largely reported by the Amazon inhabitants. Nonetheless, just a few pharmacological and toxicological studies were made to probe the innocuousness and the safety of the use of this product. The aims of this work were to update knowledge about the chemical composition, pharmacological and toxicological studies of the fruits and to identify possible vacuum of knowledge in the use, evaluation, and characterization of *E. oleracea* Mart (Açai) as a promising Amazon superfruit. It was made a draw out internet revision, especially in databases as NCBI, SCOPUS, PUBMED, SCIELO, and ELSEVIER by using the keywords *E. oleracea*, açai, nutraceuticals and food supplementations. Also, it was looked for each one of the ethnobotanical uses reported for this plant species combined with the first keywords. A complete record of the chemical composition of this species was achieved. Just two studies in humans were found in the literature using the açai fruit pulp. There is no sufficient systematic evidence to assure that all of the ethnobotanical uses of this species are true. A great emptiness of scientific knowledge related to the real benefits of this plant species exist. There exist neither pharmaceutical forms nor standardized product derived from the açai fruit. Until now, the number of scientific studies that allow the validation of the ethnopharmacological practices, the innocuousness and the safety of the use of this plant fruit is insufficient.

Key words: *Euterpe oleracea*, açai, nutraceutical, food supplementation.

INTRODUCTION

Euterpe oleracea Mart (EOM), commonly known as açai, has long been used by the inhabitants of the Amazon. This is a plant with many beneficial health effects, which has been used in other countries of Europe, North

America and Middle-Eastern (Menezes et al., 2011). The increase of the interest in the international community for the açai was clearly related by Heinrich et al. (2010). They demonstrated by using an overall search for açai

*Corresponding author. E-mail: farmacos@unifap.br

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

**Estudo de permeação e liberação *in vitro* de antocianinas do extrato alcoólico dos frutos de açai (*Euterpe oleracea* Mart.) em nanodispersão polimérica de Eudragit®
RLPO**

Heitor Ribeiro da Silva^a, Daniele da Cruz de Assis^a, Jesus Rafael Rodríguez Amado^a, Ariadna Lafourcade Prada^a, Caio Pinho Fernandes^b, José Otávio Carrera Silva Junior^c, José Carlos Tavares Carvalho^{a*}.

^a Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S/N - Jardim Marco Zero, Macapá - AP, 68903-419, Brasil.

^b Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica e Fitoquímica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S/N - Jardim Marco Zero, Macapá - AP, 68903-419, Brasil.

^c Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica (NANOFARM), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Corrêa, 1 - Guamá, Belém - PA, 66075-110, Brasil.

heitor_ribeiro_silva@hotmail.com

assis_daniele@hotmail.com

jiribilla2009@gmail.com

ariadnalafu1977@gmail.com

caio_pfernandes@yahoo.com.br

carrera@ufpa.br

jctcarvalho@gmail.com

***Corresponding author.** Drugs Research Laboratory, Biological Sciences Department, Amapá Federal University, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S/N - Jardim Marco Zero, Macapá - AP, 68903-419, Brazil. Tel.: +55 96 4009-2907

E-mail address: jctcarvalho@gmail.com

ABSTRACT

**Physicochemical characterization and antioxidant evaluation of a new dry extract
from the fruits of *Euterpe oleracea* Mart. (açai)**

Heitor Ribeiro da Silva^a, Daniele da Cruz de Assis^a, Ariadna Lafourcade Prada^a, José Otávio Carrera Silva Junior^b, Roberto Messias Bezerra^c, Julio Cesar Escalona Arranz^d, José Carlos Tavares Carvalho^a, Jesus Rafael Rodríguez Amado^a

^a Drugs Research Laboratory, Biological Sciences Department, Amapá Federal University, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S/N - Jardim Marco Zero, Macapá - AP, 68903-419, Brazil.

^b Laboratório P&D Farmacêutico e Cosmético, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará.

^c Laboratório de Absorção Atômica e Bioprospecção, Universidade Federal do Amapá.

^d Departamento de Farmacia, Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n. Santiago de Cuba, Cuba

heitor_ribeiro_silva@hotmail.com

assis_daniele@hotmail.com

ariadnalafu1977@gmail.com

carrera@ufpa.br

messias@unifap.br

jcea1971@gmail.com

jctcarvalho@gmail.com

jjribilla2009@gmail.com

* Corresponding author. Drugs Research Laboratory, Biological Sciences Department, Amapá Federal University, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S/N - Jardim Marco Zero, Macapá - AP, 68903-419, Brazil. Tel.: +55 96 9 9902 2992

E-mail address: jjribilla2009@gmail.com

Abstract

Introduction



11/04/2017 870170023862
10:43



00.000.2.2.17.0305619.6

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 007451 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Fundação Universidade Federal do Amapá

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 34868257000181

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rod. Juscelino Kubitschek, KM-02 Jardim Marco Zero

Cidade: Macapa

Estado: AP

CEP: 68903419

País: Brasil

Telefone: 9640092803

Fax:

Email: nitt@unifap.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 8

Nome: HEITOR RIBEIRO DA SILVA

CPF: 78341908297

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: AVENIDA HENRIQUE GALÚCIO 1667 APARTAMENTO E, BAIRRO: CENTRAL

Cidade: MACAPÁ

Estado: AP

CEP: 68900-115

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 2 de 8

Nome: JOSÉ CARLOS TAVARES CARVALHO

CPF: 30876025220

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Servidor das demais carreiras de administração pública direta, autárquica e fundacional

Endereço: TRAVESSA ROSA DOS VENTOS, 75, BAIRRO: MUÇA

Cidade: MACAPÁ

Estado: AP

CEP: 68902-689

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 3 de 8

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 11/04/2017 às 10:43, Petição 870170023862