

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL INICIAÇÃO CIENTÍFICA

DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO SECO POR ASPERSÃO DE
BYRSONIMA JAPURENSIS (MALPIPHIACEAE) E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE INIBITÓRIA DA LIPASE PANCREÁTICA

Bolsista: Carolina Carvalho Pacheco

MANAUS

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO SECO POR ASPERSÃO DE
BYRSONIMA JAPURENSIS (MALPIPHIACEAE) E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE INIBITÓRIA DA LIPASE PANCREÁTICA
Pib-S/0015/2008

Bolsista: Carolina Carvalho Pacheco
Orientadora: Prof^a Dr^a Tatiane Pereira de Souza

MANAUS

2009

APRESENTAÇÃO

Neste trabalho são descritas as atividades realizadas no período que corresponde a agosto de dois mil e oito até julho de 2009.

O trabalho contém introdução, objetivos do estudo, revisão literária sobre o tema, descrição da metodologia empregada, resultados e discussão e a bibliografia consultada.

RESUMO

A espécie vegetal *Byrsonima japurensis* (Malpighiaceae), conhecida como saratudo ou muruci, é originária da Amazônia e desenvolve-se em terra firme, bosque primário e freqüentemente sobre solos arenosos. Destaca-se pelo grande uso na medicina popular para diferentes patologias. É utilizada pelos habitantes da região como antiinflamatório, no tratamento de feridas, como antitóxico, contra úlceras gástricas, regulador menstrual e estimulante do sistema imune e físico. Além disso, apresenta relatos de atividade antiagregante, antiespasmódica, inseticida, sedativo, diurético e sudorífero. Estudos realizados com extrato da casca do vegetal, nos laboratórios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas desta Instituição de ensino, demonstraram excelentes resultados de inibição da enzima lipase pancreática, indicando uma possibilidade de utilização de extratos da casca de *B. japurensis* como auxiliares no tratamento da obesidade. Sendo assim, o trabalho teve como objetivo desenvolver um produto seco por aspersão a partir de cascas de *B. japurensis* e avaliar a atividade inibitória da lipase pancreática. A matéria-prima vegetal, constituída por cascas de *B. japurensis*, foi caracterizada através da perda por dessecação, teor extrativo e análise granulométrica por tamisação. As soluções extrativas foram elaboradas seguindo um planejamento fatorial 2x3 onde foram avaliadas como variáveis independentes a relação droga:solvente (5 e 10%) e a concentração etanólica (20, 40 e 80%); e como dependentes o teor de resíduo seco e a inibição da lipase pancreática. Os resultados dos experimentos foram analisados estatisticamente através de ANOVA multivariada. Os resultados obtidos mostram que a solução extrativa possuindo 10% de droga vegetal e 40% de etanol apresentou melhor atividade inibitória da lipase pancreática e melhor teor de resíduo seco. A análise estatística mostra que apenas a proporção de droga vegetal apresentou significância na inibição da lipase, porém houve interação significativa entre ambos os fatores estudados. Os resultados permitem concluir que os extratos secos obtidos de *B. japurensis* apresentam um potencial inibitório da lipase pancreática, no entanto, considerando que os produtos secos elaborados a partir da solução extrativa com adjuvantes de secagem apresentaram perda de atividade, maiores estudos devem ser realizados a fim de otimizar uma solução extrativa para melhorar a estabilidade dos produtos secos e, confirmar se há incompatibilidade dos constituintes químicos com os adjuvantes farmacêuticos.

Palavras Chaves: *Byrsonima japurensis*, Produto seco, Inibidor da lipase

ABSTRACT

The specie *Byrsonima japurensis* (Malpighiaceae), known as saratudo or Muruci, comes from the Amazon is developing in the mainland, and often primary forest on sandy soils. It is great for use in folk medicine for different diseases. It is used by the inhabitants of the region as anti-inflammatory, to treat wounds, as antitoxic, against gastric ulcers, menstrual regulator and stimulating the immune system and physical. Besides ant platelet activity also present, antispasmodic, insecticide, sedative, diuretic and sudoriferous. Studies with extract of the bark of the plant, in the laboratories of the Faculty of Pharmaceutical Sciences of this institution of education, have shown excellent results in inhibition of pancreatic lipase enzyme, indicating a possibility use of extracts of the bark of *B. japurensis* as auxiliaries in the treatment of obesity. Thus, the study aimed to develop a dry product from bark of *B. japurensis* and evaluate the inhibitory activity of pancreatic lipase. The raw material of *B. japurensis* bark was characterized by loss of dry, content extraction and analysis of size particle. The extractives solutions were prepared following a 2x3 factorial using as independent variables the relationship drugs:solvent (5 and 10%) and ethanol concentration (20, 40 and 80%), and how dependent variables the dry residue and the inhibition of pancreatic lipase. The results of the experiments are analyzed statistically through multivariate ANOVA. The results show that the extractive solution obtained with 10% of vegetable drug and 40% of ethanol presented better inhibitory activity of pancreatic lipase and higher content of dry residue. The statistical analysis shows that only the proportion of vegetable drug showed significant inhibition of the lipase, but there was significant interaction between the factors studied. The results show that the dried extract obtained from *B. japurensis* have a potential inhibition of pancreatic lipase, however, considering that the dried products prepared from the extractive solution with adjuvants of drying showed loss of activity, more studies should be performed to optimize an extractive solution to improve the stability of dried products and confirm if there is incompatibility among chemical constituents and pharmaceutical adjuvants.

KEYWORDS: *Byrsonima japurensis*, Dry product, Inhibitor of lipase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição do gênero <i>Byrsonima</i>	13
Figura 2 - Fruto de <i>B.japurensis</i>	14
Figura 3 - Folha de <i>B. japurensis</i>	14
Figura 4 - Histograma de distribuição da matéria-prima vegetal	25
Figura 5 - Curva de retenção e passagem da matéria-prima vegetal	25
Figura 6 - Gráfico do resíduo seco das soluções extrativas.....	26
Figura 7 - Gráfico do rendimento das soluções extrativas	27
Figura 8 - Gráfico do rendimento da solução extrativa com adjuvantes.....	28
Figura 9 - Gráfico da porcentagem de inibição da lipase pancreática pelos extratos secos.....	29
Figura 10 - Gráfico da porcentagem de inibição da lipase pancreática pelos produtos secos por aspersão.....	30

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Caracterização da matéria prima vegetal.....	24
Tabela 2 - ANOVA do resíduo seco das soluções extrativas	27
Tabela 3 - ANOVA do percentual de Inibição da Lipase pelas soluções extrativas.....	29

SUMÁRIO

Apresentação	III
Resumo	IV
Abstract	V
Lista de figuras.....	VI
Lista de tabelas.....	VII
1. Introdução	10
2. Objetivos	12
3. Revisão bibliográfica.....	13
3.1. Espécie vegetal.....	13
3.2. Lipase pancreática	16
3.3. Spray drier.....	17
4. Metodologia	19
4.1. Material Vegetal	19
4.2. Obtenção da Matéria-Prima Vegetal	19
4.3. Caracterização Matéria-Prima vegetal	19
4.3.1. Determinação de perda por dessecação.....	19
4.3.2. Análise granulométrica por tamisação	20
4.3.3. Teor extrativo	20
4.4. Obtenção das soluções extrativas e dos extratos secos.....	21
4.4.1. Determinação de Resíduo Seco.....	21
4.4.2. Rendimento da operação de secagem.....	21
4.4.3. Avaliação da atividade de inibição da lipase pancreática	22
4.5. Desenvolvimento de produto seco por aspersão	22
4.5.1 Rendimento da operação de secagem	23
4.5.2. Avaliação da atividade de inibição da lipase pancreática	23
4.6. Análise Estatística	23
5. Resultados	24
5.1. Caracterização da Matéria-Prima Vegetal (MPV)	24
5.2. Obtenção das soluções extrativas e extratos secos.....	26
5.3. Produto seco por aspersão.....	28

5.4. Atividade de inibição da lipase pancreática	28
6. Conclusão.....	31
7. Cronograma.....	32
8. Referências.....	33

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo de desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003).

As plantas representaram, durante séculos, a única fonte de agentes terapêuticos. No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas (HOSTETTMAN et al., 2003).

A região amazônica abriga uma das mais fantásticas riquezas naturais do planeta constituindo-se numa preciosa biblioteca genética, na qual apenas uma pequena parte de seus componentes foi adequadamente estudada e cujos benefícios futuros ainda são desconhecidos.

A espécie vegetal *Byrsonima japurensis* (Malpighiaceae), originária da Amazônia, desenvolve-se em terra firme, bosque primário e freqüentemente sobre solos arenosos. Destaca-se pelo grande uso na medicina popular para diferentes patologias. É utilizada pelos habitantes da região como antiinflamatório no tratamento de feridas, como antitóxico e contra úlceras gástricas (REVILLA, 2000), além de apresentar também atividade antiagregante plaquetária. Sendo assim, as indicações populares e literatura existente, ainda que insipientes, sugerem esta espécie como bastante promissora para a investigação científica visando à comprovação de atividades biológicas e desenvolvimento de uma forma farmacêutica.

A transformação de soluções extrativas em extratos secos visa, além de sua concentração, a obtenção de um produto com melhores características tecnológicas. A

secagem por aspersão ou nebulização em spray-drier tem sido indicada, por pesquisas em desenvolvimento tecnológico realizadas durante os últimos anos, como uma das técnicas mais importantes na produção de pós que podem ser incorporados em formulações de comprimidos, granulados, cápsulas, pomadas (DE PAULA, et al., 1998; LINDEN, 1998; DE SOUZA et al., 2000).

O produto seco por aspersão é uma forma intermediária que pode ser utilizada para a produção de várias formas farmacêuticas, contudo, geralmente, não exhibe propriedades reológicas apropriadas, necessitando ser adicionado de adjuvantes farmacêuticos para melhorar suas características. Entretanto, o sucesso de um produto seco depende de considerações cuidadosas sobre as propriedades dos adjuvantes e condições de secagem (LIBERMAN & LACHMAN, 1989; SHAH et al., 1996; VOIGT, 2000).

A utilização de adjuvantes tecnológicos na secagem pode melhorar as condições de obtenção dos produtos secos, principalmente, no que se refere ao rendimento, propriedades reológicas e conservação frente à umidade (CASADEIBAIG et al., 1989). Porém, tanto a operação de secagem quanto a adição de adjuvantes podem interferir nas propriedades biológicas dos produtos obtidos (CARVALHO et al., 1997). Sendo assim, na elaboração desses produtos além das caracterizações tecnológicas e químicas é interessante o acompanhamento com ensaios farmacológicos a fim de garantir a manutenção da atividade biológica do vegetal.

2. OBJETIVOS

GERAL:

Desenvolver um produto seco por aspersão a partir de cascas de *Byrsonima japurensis* e avaliar a atividade inibitória da lipase pancreática

ESPECÍFICOS:

- Caracterizar a matéria-prima vegetal;
- Avaliar a influência de fatores extrativos sobre o teor de sólidos solúveis nas soluções extrativas e atividade inibitória da lipase pancreática;
- Obter um produto seco através da secagem por aspersão;
- Avaliar a influência de adjuvantes farmacêuticos sobre o rendimento da operação de secagem e atividade inibitória da lipase pancreática.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Espécie vegetal

A família Malpighiaceae compreende aproximadamente 60 gêneros e 1200 espécies, sendo que 50% encontram-se no Brasil. Os gêneros mais importantes da América meridional são *Malpighia* e *Byrsonima*. Várias espécies pertencentes ao gênero *Byrsonima* ocorrem no nordeste brasileiro, sendo algumas delas intensamente consumidas na forma de sucos, licores, geléias e doces. Folhas e cascas de algumas espécies de *Byrsonima* são usadas popularmente em disfunções gástricas, infecções cutâneas, picadas de cobra e ainda como antidiarréicos (AMARQUAYE et al., 1994).

O gênero *Byrsonima* compreende mais de 135 espécies de árvores e arbustos encontrados no Novo Mundo tropical e subtropical a partir do sul do México, sudeste da Flórida e do Caribe ao sudeste do Brasil (Figura 1).



Figura 1: Distribuição do gênero *Byrsonima*.

FONTE: <http://zipcodezoo.com/Key/Plantae/map.asp?taxon=13192257>

De modo geral, as plantas têm folhas inteiras, flores amarelas, carnudas e frutos comestíveis (Figura 2 e Figura 3).



Figura 2: Fruto da *B. japurensis*.

FONTE: http://www.inteligentesite.com.br/arquivos/amazoniadelivery/img_murici.jpg



Figura 3: Folha de *B. japurensis*.

FONTE: <http://fm2.fieldmuseum.org/vrrc/details/MALP-byrs-japu-ecu-2225523.jpg>

O gênero *Byrsonima* segue a seguinte classificação taxonômica (<http://www.zipcodezoo.com/Key/Plantae/map.asp?taxon=13192257>):

Domínio: *Eukaryota* Whittaker & Margulis, 1978 - eukaryotes

Reino: *Plantae* Haeckel, 1866

Subreino: *Viridaeplantae* Cavalier-Smith, 1981 - Green Plants

Filo: Tracheophyta Sinnott, 1935 Ex Cavalier-Smith, 1998 - Vascular Plants

Subfilo: Euphyllophytina

Infrafilo: Radiatopses Kenrick & Crane, 1997

Classe: Magnoliopsida Brongniart, 1843 - Dicotyledons

Subclasse: Rosidae Takhtajan, 1967

Superordem: Geraniae (Dumortier, 1829) Takhtajan, 1997

Ordem: Vochysiales Dumortier, 1829

Família: Malpighiaceae A.l. De Jussieu, 1789 - Barbados Cherry Family

Gênero: Byrsonima (bur-SO-nim-uh) - Byrsonima

As plantas dessa família são de grande utilização, porém pouco se sabe sobre sua constituição química. Os poucos trabalhos realizados reportam a presença, em geral, de flavonóides, triterpenos e esteróides. O gênero *Byrsonima* é típico de regiões alagadiças, de solos arenosos e cresce sob elevada incidência luminosa. São plantas geralmente arbóreas, com galhos retorcidos e porte médio, podendo chegar a cinco metros de altura. Como se encontra presente em várias regiões do Brasil, este gênero recebe nomes diferentes, dependendo da região de ocorrência, por exemplo, na região amazônica recebe o nome de “muruci” ou “sara-tudo” variando de acordo com a espécie, por exemplo, “sara-tudo de quintal”, “muruci da várzea”, “muruci da mata”, entre outros. A análise fitoquímica aponta a presença de taninos hidrolisáveis, antocioaninas, antocianidinas, chalconas, auronas, flavonóides catequínicos, triterpenos pentacíclicos livres e saponinas (ANDRADE & PEREIRA, 2007).

Estudo farmacológico, realizado “in vivo”, com extratos aquoso, alcoólico e hidroalcoólico envolvendo três espécies de plantas, entre elas a *Byrsonima japurensis* comprova a ação antiagregação plaquetária nas plantas. A espécie *Byrsonima japurensis* foi a que apresentou melhor resultado (acima de 80%), tanto para a casca interna quanto para a casca externa. Na prospecção fitoquímica preliminar da espécie *B. japurensis* foram encontrados flavonóides, taninos e fenóis, saponinas, bases quartenárias, flavononóis, catequinas e flavononas (GRAPIGLIA & PEREIRA, 2006).

3.2 Lipase pancreática

Lipases são enzimas que digerem gorduras, incluindo triacilglicerol e fosfolipídios. As lipases humanas incluem as pré-duodenal (lingual e gástrica) e as extra-duodenal (pancreática, hepática, lipoproteínas e a endotelial) lipases. Lipase pancreática (LP) (triacilglicerol acil hidrolases), a principal enzima lipolítica sintetizada e secretada pelo pâncreas, desempenha um papel fundamental na digestão eficiente dos triglicerídeos. Ela remove os ácidos graxos a partir da posição α e α' de uma dieta de triglicerídeos, produzindo β -monoglicerídeos e longa cadeia saturada e ácidos graxos poliinsaturados como produtos lipolíticos (BIRARI & BHUTANI, 2007). Sendo assim, a lipase pancreática degrada triacilgliceróis nas posições 1 e 3 sequencialmente para gerar 1,2-diacilgliceróis e 2-acilgliceróis. Ela é responsável pela quebra e absorção de gorduras nos intestinos (STEDWARDS, 2009). LP é responsável pela hidrólise de 50-70% do total de gorduras alimentares.

A estrutura tridimensional de LP humana foi determinada por cristalografia de raios-X. A principal estrutura da LP foi estabelecida através da análise de clones cDNA isolado de pâncreas do cDNA humano e foi encontrada uma única cadeia glicoprotéica de 449 aminoácidos. A proteína codificada mostra 86% e 68% de homologia com a LP de suínos e caninos, respectivamente. A cadeia polipeptídica se divide em duas unidades, o maior

domínio N-terminal, incluindo os resíduos 1-336 de aminoácidos e o domínio C terminal que contém os resíduos 337-449 de aminoácidos típicos do tipo b- sanduíche. O domínio N-terminal é o domínio catalítico e o domínio C-terminal liga a colipase, um co-fator requerido para atividade. Na estrutura da LP dos humanos His-263, Asp-176 e Ser-152 formam uma tríade, análogas às da serino proteases, representando o sitio lipolítico (BIRARI & BHUTANI, 2007; CASTRO, 2004).

Atividade enzimática tem mostrado ser diminuída após modificação química da Serina na posição 152 (Ser. 152), indicando assim que Ser. 152 é essencial para a atividade catalítica. LP exige uma outra proteína pancreática exócrina, a colipase, para plena atividade em condições fisiológicas. Colipase é secretada pelo pâncreas exócrino como uma molécula precursora, procolipase, que é processada para colipase madura por clivagem da procolipase pro-peptídica (APGPR). Pro-colipase liga-se exclusivamente ao domínio C-terminal da molécula da LP, sem induzir qualquer mudança conformacional (BIRARI & BHUTANI, 2007).

A inibição da LP é um dos mais amplamente estudados mecanismos para a determinação do potencial da eficácia dos produtos naturais como agentes antiobesidade (BIRARI & BHUTANI, 2007).

3.3 Spray drier

O “spray drier” (secador por aspersão) é um equipamento que permite a secagem de produtos em estado fluido (solução, suspensão ou pasta), convertendo em uma forma particulada seca pela aspersão do fluido em uma câmara de secagem aquecida (usualmente pelo ar). Há quatro etapas principais no processo de secagem por aspersão: (a) atomização da alimentação; (b) evaporação da umidade livre; (c) evaporação da umidade ligada; e (d) recuperação do produto - obtenção do produto seco (MASTERS, 1978).

A secagem por aspersão produz esferas relativamente uniformes apresentando a mesma proporção de compostos não voláteis que a alimentação líquida homogênea. Portanto, a mesma pode ser utilizada para preparar misturas complexas de sólidos que não podem ser produzidas por métodos mecânicos. A secagem por aspersão pode ocorrer de forma concorrente, contracorrente, ou como um processo de escoamento misto. A secagem concorrente expõe as gotas à maior temperatura do agente de secagem e, desta forma, uma rápida evaporação ocorre. Portanto, esta característica pode gerar produtos com baixa densidade de partículas. A secagem em contracorrente expõe as partículas que estão quase secas às temperaturas mais elevadas e, desta forma, produtos extremamente secos podem ser produzidos (MASTERS, 1978).

A otimização dos parâmetros de secagem como temperaturas de entrada e de saída e velocidade de fluxo de alimentação, concentração e tipo de adjuvante tecnológico, assim como os teores de resíduo seco do extrato fluído a nebulizar são fatores indispensáveis para obtenção de extratos secos com melhores características físico-químicas e aumento do rendimento da operação de secagem (GAUDY et al., 1991; PAULA et al., 1998).

O uso de adjuvantes tecnológicos influencia de maneira decisiva no aumento do rendimento do processo de secagem, além de contribuir positivamente sobre a recomposição em água do produto (LINDEN et al., 2000; SOUZA et al., 2000; SOARES, 2002). Os adjuvantes tecnológicos mais utilizados e citados na literatura são o dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcio e β -ciclodextrina (WOUESSIDJEWÉ & DUCHÊNE, 1994; TSAI, 1997). Extratos vegetais secos por aspersão têm sido utilizados como produtos finais e intermediários na obtenção de diferentes formas farmacêuticas (WENDEL & ÇELIC, 1998). Os produtos secos apresentam vantagens relacionadas com a homogeneidade de distribuição dos constituintes da preparação e maior estabilidade física (CASADEIBAG et al., 1989; GONZÁLEZ & SCHMIDT, 1995; SENNA et al., 1997).

4. METODOLOGIA

4.1. Material Vegetal

O material vegetal, constituído por cascas da espécie *Byrsonima japurensis*, foi obtido na comunidade do Purupuru, município do Careiro-Castanho, estado do Amazonas. A amostra coletada foi classificada taxonomicamente e identificada com o auxílio de botânicos do herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Foram preparadas exsiccatas, as quais foram depositadas neste herbário.

4.2. Obtenção da Matéria-Prima Vegetal

O material vegetal foi levado à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, até estabilização da umidade residual. Após a secagem, o material foi submetido à moagem em moinho de facas. O material moído resultante foi misturado, constituindo assim a matéria-prima vegetal.

4.3. Caracterização Matéria-Prima vegetal

O material vegetal foi caracterizado através dos ensaios descritos abaixo.

4.3.1. Determinação de perda por dessecação (F. Bras. IV, 1988).

Cerca de 0,5 g da matéria-prima vegetal, exatamente pesados, foram colocados em pesa-filtro, previamente tarado, e levados para a estufa a 105°C por um período de 2 horas. Em seguida, os pesa-filtros foram resfriados em dessecador por 20 minutos e pesados. Este procedimento foi repetido até peso constante.

4.3.2. Análise granulométrica por tamisação (VOIGT, 2000).

Cerca de 50 g da matéria-prima vegetal foi submetida à passagem através de tamises com abertura de malha de 1,00; 0,800; 0,710; 0,600; 0,500; 0,400; 0,330 e 0,250 mm. A tamisação foi realizada a 60 vibrações por segundo durante 15 minutos. As frações retidas nos tamises e coletor foram pesadas e os dados analisados por método gráfico. A partir das curvas de retenção e passagem foi calculado o diâmetro médio de partícula e o histograma de distribuição granulométrica.

4.3.3 Teor de extrativos (BUNDESVEREINIGUNG, 1986).

Cerca de 1g da matéria-prima vegetal, exatamente pesados, foi colocado em erlenmeyer adicionado de 100 ml de água destilada, pesado o conjunto, e submetido à extração por decocção durante 10 minutos. Após resfriamento, pesou-se novamente o conjunto reconstituindo-se a massa inicial com água destilada, filtrou-se desprezando os primeiros 20 ml do filtrado. Cerca de 20g do filtrado, foram pesados e colocados em pesa-filtro, previamente tarados, e evaporados à secura em banho-maria, com agitação ocasional. Após a evaporação, o pesa-filtro, contendo a amostra foi levado á estufa $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até peso constante. O resultado foi expresso pela média de três determinações e o teor extrativo foi calculado segundo abaixo.

$$\text{TE} = (\text{g} \times \text{FD} \times 100)/\text{m} - (\text{m} \times \text{pd}/100)$$

Onde; TE = teor extrativo (% , m/m); g = massa (g) do resíduo seco; FD = constante, igual a 5; m= massa da amostra inicial (g); pd = perda por dessecação da amostra (% , m/m).

4.4. Obtenção das soluções extrativas e dos extratos secos

As soluções extrativas foram elaboradas seguindo um planejamento fatorial 2x3 onde foram avaliadas como variáveis independentes a relação droga:solvente (5 e 10%) e concentração etanólica (20, 40 e 80%); e como dependentes o teor de resíduo seco e a inibição da lipase pancreática.

As soluções extrativas foram obtidas através de decocção sob refluxo por um período de 15 minutos. As soluções extrativas avaliadas foram secas através de secagem por aspersão em equipamento Mini Spray Dryer modelo MSD 1,0 da Labmaq, utilizando o bico de secagem número 1 (0,7 mm), fluxo de alimentação de 8 ml/min com temperatura de secagem de 120 °C.

4.4.1. Determinação de Resíduo Seco (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)

Aliquota de 20,0 ml da solução extrativa foi exatamente pesada, diretamente, em pesa-filtro, previamente tarado, e evaporada até a secura em banho-maria, sob agitação ocasional. Após evaporação da solução extrativa, o pesa-filtro contendo o resíduo foi levado à estufa 105 °C $\pm$ 2 °C até peso constante. A análise foi feita em triplicata.

4.4.2 Rendimento da operação de secagem

O rendimento foi obtido através da diferença entre a massa teórica de sólidos presente na solução extrativa (resíduo seco) e a massa do extrato seco obtido.

4.4.3. Avaliação da atividade de inibição da lipase pancreática

A avaliação de ação das soluções extrativas sobre inibição da lipase pancreática foi realizada através de ensaio “in vitro”, utilizando o KIT lipase liquiform da LABTEST (TSIJITA et al., 2006).

Foi utilizada solução obtida a partir de macerado de pâncreas extraído de ratos como fonte da enzima e Orlistat como substância padrão. Pesou-se 10 mg de cada extrato seco por aspersão e diluiu-se em 10 mL de dimetilsufóxido (DMSO). Em um tubo ependorf foi adicionado 160 µL da enzima lipase e 40 µL de cada extrato. A mistura foi incubada a 37 °C, por 30 minutos antes da realização da leitura da absorbância (Abs) medida no comprimento de onda de 550 nm, em equipamento Cobas Mira Plus. O cálculo foi realizando utilizando a equação abaixo:

$$\text{Inibição \%} = 100 - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100.$$

4.5. Desenvolvimento de produto seco por aspersão

O produto seco por aspersão foi produzido a partir de solução extrativa obtida com 10% de droga vegetal e 40% de etanol, através da incorporação na solução extrativa de 20% adjuvante farmacêutico, calculados a partir do teor de resíduo seco da solução extrativa.

A secagem foi realizada em Mini Spray Dryer modelo MSD 1,0 da Labmaq, utilizando o bico de secagem número 2 (1,0 mm), fluxo de alimentação de 8 ml/mim e temperatura de secagem de 120 °C.

Foram preparados três produtos secos por aspersão, utilizando os adjuvantes de secagem dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina e goma arábica. Os produtos secos por aspersão foram avaliados através do rendimento da operação de secagem e atividade inibitória da lipase pancreática.

4.5.1 Rendimento da operação de secagem

O rendimento foi obtido através da diferença entre a massa teórica de sólidos presente na solução extrativa (resíduo seco mais adjuvante) e a massa do produto seco por aspersão obtido.

4.5.2. Avaliação da atividade de inibição da lipase pancreática

A avaliação de ação do produto seco por aspersão sobre a inibição da lipase pancreática foi realizada através de ensaio “in vitro”, com a enzima lipase da Sigma L3126 obtida através do “porcine” pâncreas. Para esse procedimento, preparou-se uma solução do produto seco por aspersão na concentração de 1 mg/mL, realizando diluições sucessivas a partir dele. Para execução do teste, adicionou-se 20 µL da amostra e 80 µL da solução da enzima em microplaca com 96 poços. Incubou-se por 2 minutos a 37° C. Posteriormente, adicionou-se 200 µL do Tampão Tris pH 8,5. A leitura da absorbância foi realizada na leitora DTX 800 em comprimento de onda de 405 nm (Abs1). Adicionou-se 20 µL do reativo 4-nitrofenil palmitato da SIGMA e incubou-se por 20 minutos a 37° C. Fez-se novamente a leitura (Abs2). A partir das absorbâncias foram feitos os cálculos da porcentagem de inibição através da equação:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - [(Abs2 \text{ amostra} - Abs1 \text{ amostra}) / (Abs2 \text{ controle} - Abs1 \text{ controle})] \times 100$$

4.6. Análise Estatística (MONTGOMERY, 1991).

Os resultados dos experimentos foram expressos através de média aritmética e desvio padrão e os dados analisados estatisticamente através de ANOVA *two way* (dois fatores).

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização da Matéria-Prima Vegetal (MPV)

Na tabela 1 estão descritos os ensaios de caracterização da Matéria-prima vegetal.

Tabela 1: Caracterização da Matéria-Prima Vegetal

Ensaio	Resultados
	$X \pm s$
Perda por dessecação (g%)	$8,310281 \pm 0,309706$
Teor extrativo (g%)	$11,18645 \pm 0,333323$
Diâmetro médio de partícula (mm)	0,34 mm

Os ensaios realizados demonstraram que amostra apresentou perda por dessecação de 8,3% com valores muito próximos entre si, indicando que a operação de secagem foi eficiente em eliminar o conteúdo de umidade. Isso demonstra também, que a umidade residual está apropriada para o armazenamento, ou seja, abaixo de 14%, evitando, assim, o desenvolvimento de microorganismo que possam comprometer a estabilidade e contaminar os produtos elaborados a partir da MPV (LIST e SCHMIDT, 1989).

A análise do teor extrativo descreve a quantidade de sólidos solúvel presentes na matéria-prima vegetal e, também, a eficiência da água em extrair as substâncias presentes nas células vegetais (LIST e SCHMIDT, 1989). O Resultado encontrado de 11,18% demonstra que a matéria-prima vegetal estudada tem um teor extrativo baixo, principalmente, quando comparado com outra espécie vegetal, por exemplo, de *Phyllanthus niruri* que apresenta um teor extrativo de 31,29 % (DE SOUZA, 2004).

O ensaio de análise granulométrica é importante para identificação da distribuição de tamanho de partícula da matéria-prima vegetal, uma vez que a granulometria da matéria-prima-vegetal é um dos fatores de grande influência no processo extrativo, exigindo assim, uma padronização (LIST e SCMIDT, 1989; SIMÕES et al. 2003).

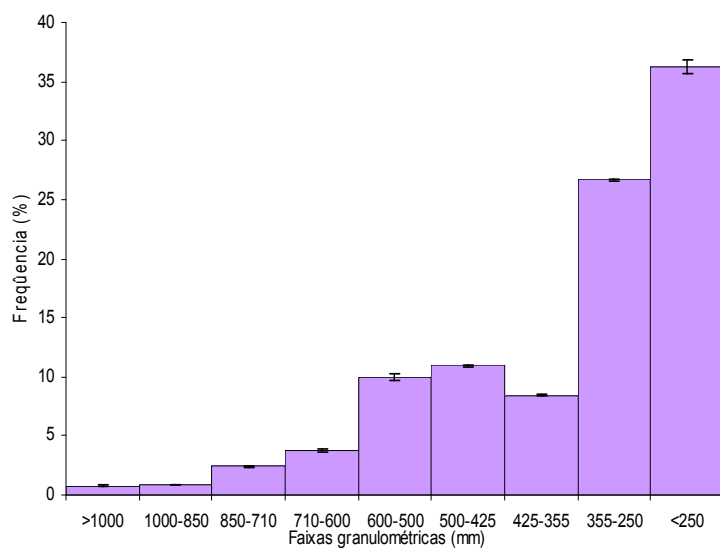


Figura 4: Histograma de distribuição da matéria-prima vegetal de *B. japurensis*

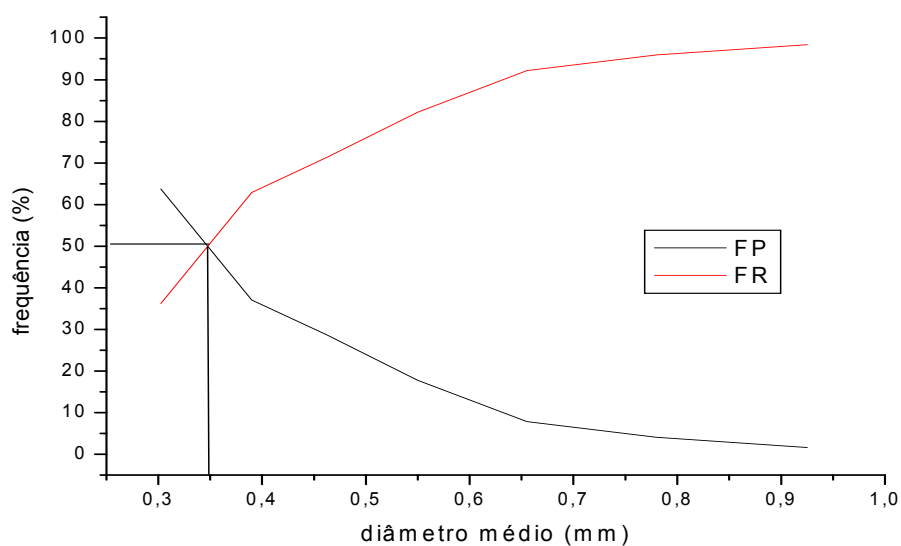


Figura 5: Curva de retenção e passagem da matéria-prima vegetal

O histograma de distribuição das partículas da matéria-prima vegetal (Figura 4) demonstra uma ampla faixa de distribuição granulométrica situada a partir de 0,600 mm. Na figura 5 pode-se observar que 50% das partículas estão nas duas últimas malhas de menor tamanho particular, justificando o diâmetro médio de 0.34 mm.

5.2 Obtenção das soluções extrativas e extratos secos

A quantidade de sólidos solúveis extraída da droga vegetal pelo solvente é determinada pelo teor de resíduo seco. Posteriormente, ele é utilizado para avaliação do rendimento operacional num processo de secagem da solução extrativa.

De acordo com a figura 6 pode-se observar que a solução extrativa com melhor resíduo seco foi a produzida com 10% de droga vegetal e 40% de Etanol.

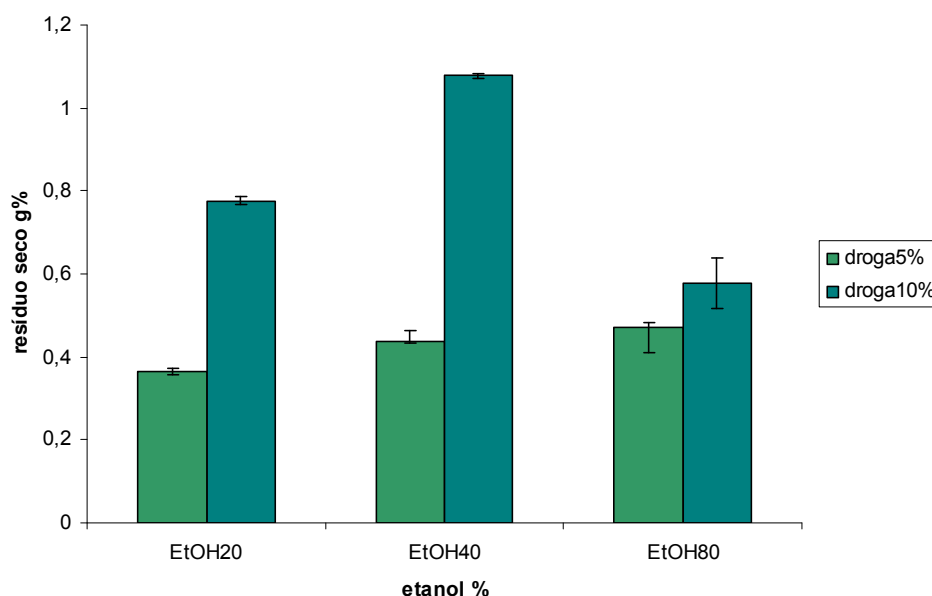


Figura 6: Gráfico do resíduo seco das soluções extrativas

A análise estatística dos resultados (Tabela 2) demonstrou que tanto a concentração de etanol como a proporção de droga vegetal são fatores altamente significantes, $p < 0,001$, sobre

o teor de resíduo seco das soluções extrativas. Além disso, há interação significativa entre os fatores.

Tabela 2: ANOVA do resíduo seco das soluções extrativas

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	<i>p</i>
A = Etanol(%)	0,182804	2	0,091402	115,215***	1,47E-08
B= Droga (%)	0,668646	1	0,668646	842,8505***	1,74E-12
Interação = AxB	0,216872	2	0,108436	136,6871***	5,53E-09
Erro	0,00952	12	0,000793		
Total	1,077841	17			

***significativo $\alpha < 0,001$

Com relação ao rendimento da operação de secagem, pode ser observado na figura 7, que todos os extratos secos apresentaram rendimento inferior a 40%, sendo o produzido a partir de uma solução extrativa com 10% de droga vegetal e 80% de etanol o com maior rendimento de secagem.

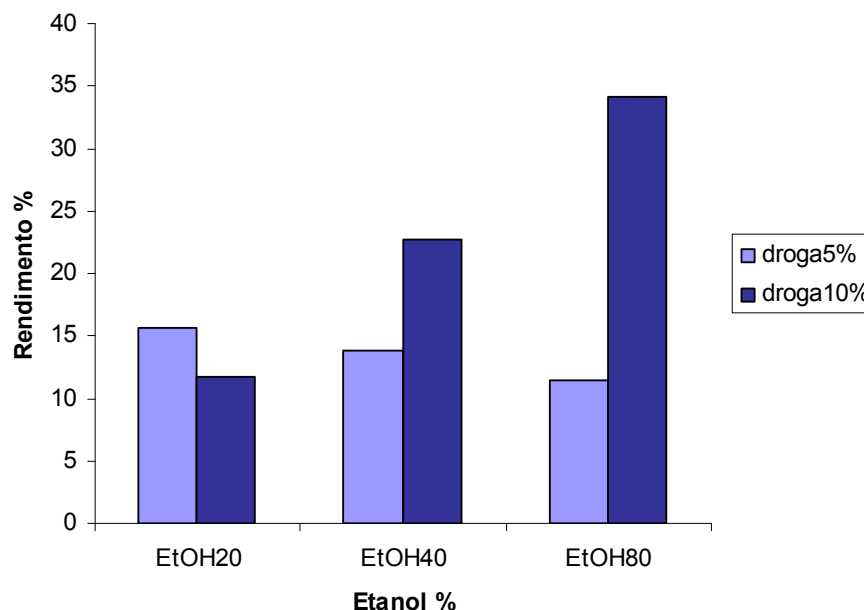


Figura 7: Gráfico do rendimento das soluções extrativas.

O baixo rendimento do extrato seco pode ser justificado pelo próprio processo de secagem, que gera perdas do produto seco e, pelo baixo teor de sólidos presentes na solução extrativa.

5.3 Produto seco por aspersão

O produto seco por aspersão foi obtido a partir da solução extrativa com maior teor de resíduo seco, ou seja, com 10% de droga vegetal e 40% de etanol, utilizando adjuvantes de secagem visando o aumento do rendimento da operação.

Na figura 8 estão descritos os rendimentos dos produtos secos obtidos com diferentes adjuvantes. Pode ser observado que a adição de adjuvante melhorou o processo de secagem, sendo a celulose microcristalina e a goma arábica a apresentarem melhores resultados.

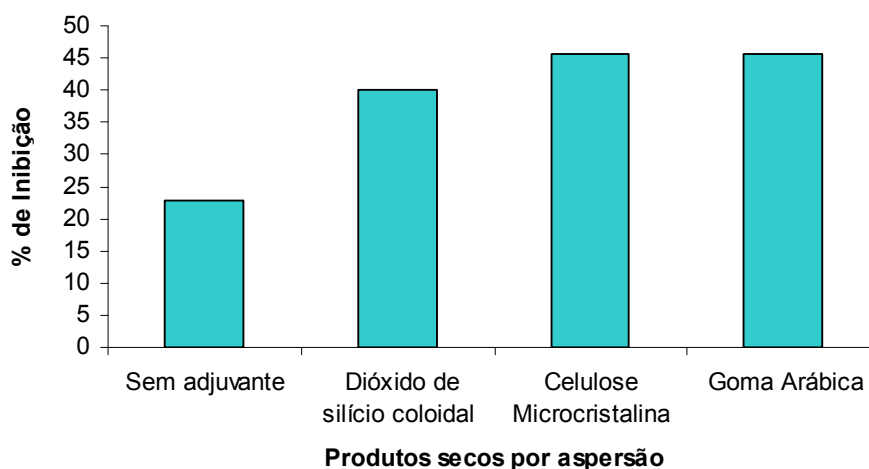


Figura 8: Gráfico do rendimento da solução extrativa com adjuvantes

5.4 Atividade de inibição da lipase pancreática

Os resultados da avaliação da atividade de inibição da lipase pancreática são mostrados na figura 9. Pode-se observar que a solução extrativa obtida com 10% de planta e 40% de etanol apresentou melhor porcentagem de inibição quando comparado com as outras soluções extrativas.

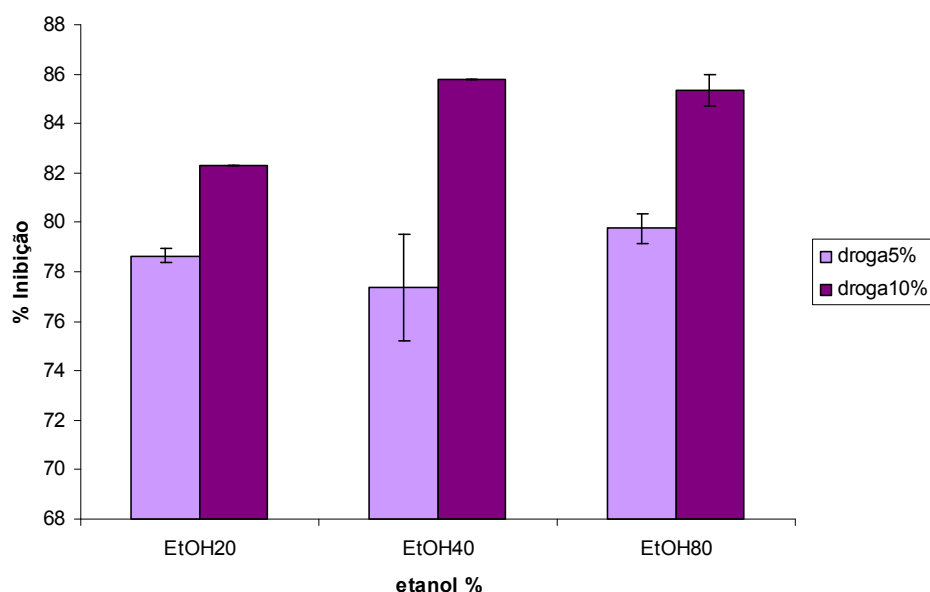


Figura 9: Gráfico da porcentagem de inibição da lipase pancreática pelos extratos secos

A análise estatística apresentada na tabela 3 mostra que de ambos os fatores estudados, apenas a proporção de droga vegetal apresentou significância ($\alpha < 0,01$) na inibição da lipase, porém houve interação significativa ($\alpha < 0,01$) entre ambos os fatores.

Tabela 3: ANOVA do percentual de Inibição da Lipase pelas soluções extrativas

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	p
A = Etanol(%)	8,391548	2	4,195774	4,672414	0,059782
B= Droga (%)	104,1047	1	104,1047	115,931***	3,79E-05
Interação = AxB	11,3642	2	5,6821	6,327586**	0,03327
Erro	5,387931	6	0,897989	4,672414	0,059782
Total	129,2484	11			

***significativo $\alpha < 0,01$ **significativo $\alpha < 0,05$

A figura 10 demonstra o percentual de inibição da lipase pelos produtos secos obtidos com diferentes adjuvantes farmacêuticos. Pode ser observado que, de modo geral, os produtos secos por aspersão tiveram a porcentagem de inibição inferior ao extrato seco obtido sem adjuvante.

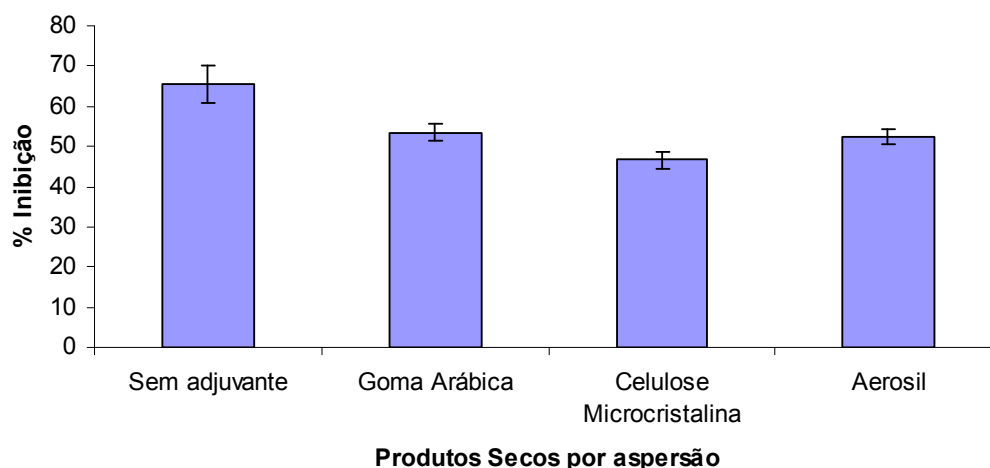


Figura 10: Gráfico da porcentagem de inibição da lipase pancreática pelos produtos secos por aspersão

A análise estatística dos resultados demonstrou que quando comparado o percentual de inibição do extrato seco sem adjuvante com os produtos secos elaborados com adjuvante, houve diferença estatística, $p = 0,022$. No entanto, entre os produtos secos não houve significância, $p = 0,192$, demonstrando que todos tiveram igual percentual de inibição. Embora o produto seco obtido com goma arábica tenha demonstrado, em termos numéricos, maior inibição.

O fato dos produtos secos terem apresentado menor inibição do que o extrato sem adjuvante pode ser indicativo de uma possível interação entre os componentes químicos do extrato e dos adjuvantes, resultando em uma perda de atividade.

No entanto, observa-se que o próprio extrato seco perdeu atividade, uma vez que quando avaliado pela primeira vez, imediatamente após a secagem, apresentou inibição de cerca de 86% (Figura 9) e quando avaliado quatro meses após armazenamento, mostrou uma inibição de cerca de 65% (Figura 10). Assim, não se pode afirmar se houve interação dos adjuvantes com o extrato ou a perda de atividade foi causada por estabilidade do próprio extrato.

6. Conclusão

A caracterização da matéria prima vegetal é um parâmetro utilizado para o controle de qualidade da espécie vegetal. Sendo assim, a perda por dessecação foi eficiente no processo de secagem, o teor extrativo mostrou baixa eficiência da água em extrair as substâncias presentes nas células vegetais e que através da análise granulométrica foi possível determinar o diâmetro médio das partículas.

Com relação à obtenção de soluções extrativas, a solução que apresentou melhor teor de resíduo seco e atividade de inibição da lipase foi a produzida com 10% de droga vegetal e 40% de etanol, indicando que essa solução pode ser utilizada para um desenvolvimento tecnológico.

Tanto a concentração de etanol como a proporção de droga vegetal são fatores altamente significantes sobre o teor de resíduo seco das soluções extrativas e há significativa interação entre os fatores.

Os produtos secos elaborados com adjuvantes apresentaram maior rendimento que o extrato sem adjuvante, sendo a Goma Arábica e a Celulose microcristalina os adjuvantes com melhores resultados.

A atividade de inibição da lipase pancreática estudada, demonstrou que a solução extrativa contendo 10% de droga vegetal e 40% de etanol apresentou maior porcentagem de inibição, cerca de 86%, indicando que esta espécie vegetal apresenta uma promissora atividade antiobesidade.

No entanto, os produtos secos por aspersão, obtidos com adjuvantes, apresentaram menor inibição enzimática, ou seja, perderam atividade, fato que pode ter sido causado por questões de estabilidade do próprio extrato ou interação com os adjuvantes.

8. REFERÊNCIAS

AMARQUAYE, A.; CHE, C. T.; BEJAR, E.; MALONE, M. H.; FONG, H. H. S. A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. *Planta Med.* 60: 85-86, 1994.

ANDRADE, D. S.; PEREIRA, M. M. Desenvolvimento e otimização de sistema cromatográfico para a caracterização de grupos de substâncias com potenciais efeitos farmacológicos de *Byrsonima japurensis* Mart. PIBIC. UFAM. 2007.

BIRARI, R. B.; BHUTANI, K. K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today*. 12: 879-881, 2007.

BUNDESVEREINIGUNG DEUTSCHER APOTHEKERVERBÄNDE (Hrsg.). Deutscher Arzneimittel – Codex. Frankfurt: Govi; Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1986a. v.1; *Codex – Probe 4*, 9., 1986.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc. Cult.*, 55: 37-39, 2003.

CARVALHO, E.L.S. *Desenvolvimento de extrato seco nebulizado de Maytenus ilicifolia Martius ex Reiss. (espinheira-santa)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. 1997. Dissertação de Mestrado.

CASADEBAIG J, JACOB M, CASSANAS G, GAUDY D, BAYLAC G, CASADEIBAG, J.L.; JACOB, M.; CASSANA, G.; GAUDY, D.; BAYLAC, G.; PUECH, A. Physicochemical and pharmacological properties of spray-dried powder from *Fraxinus excelsior* leaf extracts. *J. Ethnoph.* 26: 21-216, 1989.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quím. Nova*. 27: 146-156, 2004.

DE PAULA, I.C. *Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de Achyrocline satureioides (Lam.) DC. Compositae - marcela*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1997. Dissertação de Mestrado.

DE SOUZA, K.C.B; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. The Adjuvants Aerosil 200 and Gelita-Sol-P influence on the Technological Characteristics of Spray-dried Powders from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26: 331-336, 2000.

DE SOUZA, T.P. *Desenvolvimento tecnológico e otimização de formas farmacêuticas sólidas contendo alto teor de produto seco por aspersão de Phyllanthus niruri L. (Euphorbiaceae)*. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2004. Tese.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed., São Paulo: Atheneu, 1988.

GAUDY, D.; PUECH, A.; JACOB, M. Rôle de l'adjuvant dans l'optimization de la production d'un extrait sec vegetal nébulisé: "cas de l'extrait de Noix Vomique". *Pharm Acta Helv* 66: 5-10, 1991.

GONZÁLEZ, G.O.; SCHMIDT, P.C. Obtención de comprimidos conteniendo extractos atomizados de fl or de la pasión (*Passiflora incarnata* L.). *Acta Farm Bonaerense* 14: 173-180, 1995.

GRAPIGLIA, B. S.; PEREIRA, M. M. Caracterização da atividade antiagregante plaquetária das espécies vegetais *Calycophyllum*, *Spruceanum Benth.*, *Petiveria Alliacea L.* e *Byrsonima Japurensis A. Juss.* UFAM. 2006.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.; VIEIRA, P. *Princípios Ativos de Plantas Superiores*. São Carlos: EDUFSCAR, 2003. 152p.

JACOB, M.; SOETERANO, S.; PUECH, A.; DURU, C.; CAVAILLES, M.L.; PELLECUER, J. Contribution à l'étude de la stabilité de divers extraits végétaux secs. *Pharm Acta Helvetiae*, 59: 335-338, 1984.

LIBERMAN, H.A.; LACHMAN, I.; SCHWARTZ, J.B. (ed.) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*. 2 ed., New York: Marcel Dekker, 1989.

LINDEN, R. *Desenho estatístico de experimentos e metodologia de superfície de respostas aplicados à obtenção de formas farmacêuticas derivadas de Passiflora edulis*, Porto Alegre: Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1998. Dissertação de Mestrado.

LIST, P.H.; SCHIMDT, P.C. *Phytopharmaceutical Technology*. Boca Raton: CRC, 1989.

MASTERS, K. *Spray Drying*. 2 ed., New York: John Wiley, 1978.

MONTGOMERY, D.C. *Diseño y análisis de experimentos*. México: Iberoamérica, 1991.

PAULA, I.C.; ORTEGA, G.G.; BASSANI, V.L.; PETROVICK, P.R. Development of ointment formulations prepared with *Achyrocline satureioides* spray-dried extracts. *Drug Dev Ind Pharm.* 24: 235-241, 1998.

REVILLA, J. *Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis*. Ed. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico. SEBRAE/AM, 405p. , 2000.

SENNA, E.L.; PETROVICK, P.R.; ORTEGA, G.G.; BASSANI, V.L. Preparation and characterization of spray-dried powders from *Achyrocline satureioides* (Lam.) Dc extracts. *Phytother Res* 11: 123-127, 1997.

SHAH, N.H.; PATEL, C.I.; INFELD, M.H.; MARGOLIS, A.M.; MALICK, A. W. Effect of stearic acid particle size on surface characteristics of film-coated tablets. *Drug Develop. Ind. Pharm.* 22: 1097-1103, 1996.

SIMÕES, C. O. et al. *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003, pág. 821.

SOARES, L.A.L. *Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de Maytenus ilicifolia Mart. Ex. Reissek - Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final*. Porto Alegre, 279p., 2002. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SOUZA, K.C.B.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L.; ORTEGA, G.G. The adjuvants aerosil 200 and gelita-sol-p influence on the technological characteristics of spray-dried powders from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. *Drug Dev Ind Pharm* 26: 331-336, 2000.

STEDWARDS. Disponível em:
<<http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/Lipases/main.html>>.
Acessado em 20 de maio de 2009.

TSAI, T. Modification of physical characteristics of microcrystalline cellulose by codrying with α -cyclodextrins. *J Pharm Sci* 87: 117-122, 1997

TSUJITA, T; TAKAICHI, H.; TAKAKU, T.; AOYAMA, S.; HIRAKI, J. Antiobesity action of e-polylysine, a potent inhibitor of pancreatic lipase. *J. Lip. Resear.* 47: 1852 -1858, 2006.

VOIGT, R. *Pharmazeutische Technologie*. 7. überarb. Aufl., Berlin: Ullstein Mosby, 2000.

WENDEL, S.; ÇELIC, M. Uma visão geral sobre o uso da tecnologia de spray-drying. *Pharm Technol* 5: 31-43, 1998.

WOUESSIDJEWE, D.; DUCHÊNE, D. Ciclodextrinas: Realidade e possibilidades. *Cad. Farm.* 10: 7-13, 1994.