

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

OBTENÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS TÓPICAS PARA
O TRATAMENTO DE VULVOVAGINITES, CONTENDO
EXTRATO SECO DE *Endopleura uchi* (HUBER) CUATRECASAS
E ÓLEO DE *Bertholletia excelsa* H.B.K.

PATRÍCIA PRODORUTTI ALVES

MANAUS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

PATRÍCIA PRODORUTTI ALVES

OBTENÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS TÓPICAS PARA
O TRATAMENTO DE VULVOVAGINITES, CONTENDO
EXTRATO SECO DE *Endopleura uchi* (HUBER) CUATRECASAS
E ÓLEO DE *Bertholletia excelsa* H.B.K.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Tatiane Pereira de Souza

Co-orientador: João Vicente Braga de Souza

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A474o Alves, Patrícia Prodorutti
Obtenção de formas farmacêuticas tópicas para o tratamento de vulvovaginites, contendo extrato seco de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrecasas e óleo de *Bertholletia excelsa* H. B. K. / Patrícia Prodorutti Alves. 2019
195 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Tatiane Pereira de Souza
Coorientadora: João Vicente Braga de Souza
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Castanha-do-brasil. 2. Uxi-amarelo. 3. Antifúngico. 4. Formulações tópicas. 5. Estabilidade. I. Souza, Tatiane Pereira de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

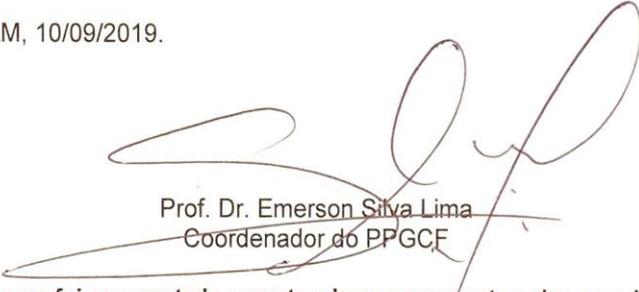
“Obtenção de formas farmacêuticas tópicas para o tratamento de vulvovaginites contendo extrato seco de *Endopleura uchi* (HUBER) Cuatrecasas e óleo de *Bertholletia excelsa* H. B. K”

DISCENTE: PATRÍCIA PRODORUTTI ALVES

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 10/09/2019.



Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGCF

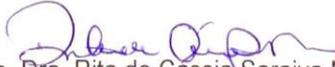
A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



Prof. Dra. Tatiane Pereira de Souza
Orientadora e presidente da banca



Prof. Dra. Ana Cláudia Alves Cortez
Membro externo (INPA)



Prof. Dra. Rita de Cassia Saraiva Nunomura
Membro interno (UFAM)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por estar comigo e guiando meus caminhos sempre;

Aos meus pais que tanto amo, Alice Ana Prodorutti Alves e André Rivadávia Alves, que sempre com muita força e trabalho investiram na minha educação, e hoje sigo o exemplo de respeito, responsabilidade e dedicação na profissão como farmacêutica;

À minha irmã, Ana Carolina Prodorutti Alves, que em todos os momentos foi meu abrigo;

Em especial ao meu marido e amigo, Diego Petry, o qual sempre me incentivou a seguir esse sonho, e sempre se dedicou, com muito amor, a me ajudar ao longo desta jornada;

À minha orientadora Profa. Dra. Tatiane Pereira de Souza, pelo apoio durante a realização desta pesquisa. Muito obrigado por me acolher como sua aluna e abrir as portas do Laboratório de Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica (LIDETEF), possibilitando que eu retornasse aos estudos após 11 anos da graduação. Seus ensinamentos e incentivos foram muito importantes para o meu crescimento profissional. Com certeza, tornou-se uma amiga que terá minha eterna admiração;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza que me acolheu com filha no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Obrigada pelas palavras de incentivo, pelo apoio e pelo carinho;

À Profa. Dra. Ana Cláudia Alves Cortez que também me recebeu tão bem e com tanto carinho no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Como os seus ensinamentos foram importantes para mim durante o mestrado. Obrigada pelos momentos de descontração e por sempre acreditar em mim;

Aos professores, Dr. Bruno Nicolau Paulino, Dr. Pedro Campelo, Dr. Émerson Silva Lima, Dr. Jesús Rafael Rodríguez Amado, Dra. Maria Katherine Santos de Oliveira, a Dra. Ellen Paes, Dra. Kátia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos Geraldi, e a Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura, que contribuíram com seus conhecimentos e reservaram um tempo para me auxiliar durante a pesquisa. A contribuição de vocês foi muito especial para o desenvolvimento deste trabalho;

À Doroth Couto pelo carinho e pela ajuda;

À equipe LIDETEF, que sempre permaneceu unida em todos os experimentos e contribuíram incansavelmente para o bom andamento desta pesquisa. Obrigada ao técnico Newton por ensinar e sempre estar disposto a ajudar, foi peça fundamental durante as análises, e sua contribuição foi muito importante em todas as etapas da pesquisa. Aos colegas e amigos, Ariadna, Fabrício, Fernanda, Juliana, Kamilla, Letícia, Serafim, Rodrigo, Sayuri e Jandiara.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas por toda a infraestrutura disponibilizada;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Minha eterna gratidão.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.” (Fernando Pessoa)

RESUMO

Duas plantas muito importantes da Amazônia Brasileira, *Bertholletia excelsa* H. B. K. (*B. excelsa*) e *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (*E. uchi*), têm despertado o interesse da comunidade científica para o desenvolvimento de fitoterápicos e fitocosméticos, devido ao potencial funcional e amplo uso pela medicina tradicional. O objetivo desta pesquisa foi a obtenção de duas formas farmacêuticas para uso tópico contendo extrato seco de *E. uchi* e óleo de *B. excelsa*, visando o tratamento e a prevenção de vulvovaginites. Na caracterização e controle de qualidade das matérias-primas vegetais, ambas apresentaram índices adequados aos preconizados pela legislação brasileira. Na etapa dos estudos tecnológicos foi realizado um planejamento fatorial para otimização e padronização da solução extrativa (SE) aquosa de *E. uchi*, cujos resultados demonstraram através da determinação do teor de polifenóis totais, sólidos totais e de bergenina, que o melhor método extrativo foi o realizado com 10% de relação droga:solvente (m/V) sob decocção por 5 minutos. A fim de verificar possíveis diferenças tecnológicas (rendimento e umidade) do extrato seco (ES), sem adição de adjuvantes, a secagem da SE foi realizada em dois equipamentos distintos, o leito de jorro (*fluidized bed drying*) e o *spray dryer*, sendo o leito de jorro mais apropriado, com rendimento operacional de 66,73% e umidade do ES de 4,16 g%. O ES apresentou atividade contra *C. albicans* (ATCC 90028), *C. Krusei* (ATCC 6258), *C. parapsilosis* (ATCC 90018) e *C. tropicalis* (ATCC 750). Foram avaliadas 9 formulações de sabonete líquido e 3 formulações de creme com diferentes concentração de ES de *E. uchi* e óleo de *B. excelsa*. Em ambos os casos apenas uma formulação apresentou viabilidade tecnológica e, ambas contendo 2% de ES e 2% de óleo. A análise da atividade antifúngica mostrou que as formulações foram mais eficazes contra *C. krusei* (sabonete líquido = CI50 de 25 µg/mL e creme CI50 de 50 µg/mL) e *C. parapsilosis* (sabonete líquido = CI50 de 25 µg/mL e creme CI50 de 25 µg/mL). Ambas as formulações foram analisados durante 30 dias para verificar a estabilidade quando armazenadas em diferentes temperaturas (5 °C; 25 °C e 40 °C), incluindo o ciclo de gelo-degelo. O estudo revelou que a formulação em creme se mostrou estável durante todo o período de armazenamento, em todas as condições testadas, por outro lado, a formulação em sabonete líquido demonstrou algumas instabilidades, indicando a necessidade de maior rigor e cuidados quanto ao seu armazenamento.

Palavras-chaves: Castanha-do-brasil; Uxi-amarelo; Antifúngico; Formulações tópicas; Estabilidade.

ABSTRACT

Two very important plants of the Brazilian Amazon, *Bertholletia excelsa* H. B. K. (*B. excelsa*) and *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (*E. uchi*), have aroused the interest of the scientific community for the development of phytotherapies and phytocosmetics, due to the functional potential and wide use by traditional medicine. The aim of this research was to obtain two topical dosage forms containing dry extract of *E. uchi* and *B. excelsa* oil, aiming at the treatment and prevention of vulvovaginitis. In the characterization and quality control of plant raw materials, both presented indices adequate to those recommended by Brazilian legislation. At the stage of the technological studies, a factorial design was carried out to optimize and standardize the aqueous extraction solution (SE) of *E. uchi*, whose results demonstrated by determining the content of total polyphenols, total solids and bergenin, that the best extraction method was performed with 10% drug: solvent ratio (m/v) under decoction for 5 minutes. In order to verify possible technological differences (yield and humidity) of the dry extract (ES), without the addition of adjuvants, the SE drying was performed in two different equipments, the fluidized bed drying and the spray dryer. The most appropriate spouted bed, with an operating yield of 66.73% and an ES humidity of 4.16 g%. The ES showed activity against *C. albicans* (ATCC 90028), *C. Krusei* (ATCC 6258), *C. parapsilosis* (ATCC 90018) and *C. tropicalis* (ATCC 750). Nine liquid soap formulations and three cream formulations with different concentrations of ES *E. uchi* and *B. excelsa* oil were evaluated. In both cases only one formulation showed technological feasibility and both containing 2% ES and 2% oil. Analysis of antifungal activity showed that the formulations were most effective against *C. krusei* (liquid soap = 25 µg/mL IC50 and 50 µg/mL IC50 cream) and *C. parapsilosis* (25 µg/mL IC50 = liquid soap and 25 µg/ml IC50 cream). Both formulations were analyzed for 30 days for stability when stored at different temperatures (5 °C, 25 °C and 40 °C), including the ice-thaw cycle. The study revealed that the cream formulation was stable throughout the storage period, under all conditions tested, on the other hand, the liquid soap formulation showed some instabilities, indicating the need for more rigor and careful storage.

Key words: Brazil nuts; Uxi-amarelo; Antifungal; Topical formulations; Stability.

LISTRAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da formação de partícula através de secagem por aspersão (<i>spray drying</i>).....	41
Figura 2 – Modelos de equipamentos utilizados para secagem por aspersão.....	43
Figura 3 – Estrutura química da bergenia.....	48
Figura 4 – Fluxograma apresentando as etapas da metodologia empregada nesta pesquisa.....	57
Figura 5 – Diagrama da viscosidade (Pa.s) em função da taxa de cisalhamento (s^{-1}) para o óleo de castanha-do-brasil a 25 °C.....	91
Figura 6 – Comportamento reológico do óleo de castanha-do-brasil a 25 °C.....	91
Figura 7 – Curva do comportamento reológico do óleo de castanha-do-brasil ajustado pelo modelo de Herschel-Bulkley.....	93
Figura 8 – Efeito do óleo de castanha-do-brasil sobre a viabilidade em linhagens de células MRC5.....	94
Figura 9 - Histograma do grau de divisão das cascas rasuradas de <i>E. uchi</i>	95
Figura 10 – Perda por dessecação durante a secagem das cascas rasuradas de <i>E. uchi</i>	96
Figura 11 - Histograma do grau de divisão das cascas cominuídas de <i>E. uchi</i>	98
Figura 12 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo reparametrizado para a resposta TS (%)......	102
Figura 13 - Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a quantidade de sólidos (%) na solução extrativas de <i>E. uchi</i> , em função da concentração de droga vegetal (m/v) e do tempo de decocção (min).....	103
Figura 14 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo reparametrizado para a resposta teor de PT (g%)......	105
Figura 15 - Superfície de resposta (C) e curvas de contorno (D) para a quantidade de PT (%) na solução extrativas de <i>E. uchi</i> , em função da concentração de droga vegetal (m/v) e do tempo de decocção (min).....	106

Figura 16 – Curva analítica da bergenina obtida da análise <i>intra-day</i>	107
Figura 17 - Cromatograma de um extrato obtido pelo método de decocção.....	107
Figura 18 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo reparametrizado para a resposta TS (g%).....	113
Figura 19 - Superfície de resposta (E) e curvas de contorno (F) para TS (g%) na solução extrativas de <i>E. uchi</i> , em função da concentração de droga vegetal (m/v) e do tempo de decocção (min).....	114
Figura 20 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo reparametrizado para a resposta PT (g%).....	115
Figura 21 - Superfície de resposta (G) e curvas de contorno (H) para PT (%) na solução extrativas de <i>E. uchi</i> , em função da concentração de droga vegetal (m/v) e do tempo de decocção (min).....	116
Figura 22 - Apresentação das diferentes temperaturas de saída (°C) conforme aumento da velocidade de alimentação (mL/min), nos equipamentos leito de jorro e <i>spray dryer</i>	119
Figura 23 - Fotomicrografia eletrônica de varredura do ES obtido por leito de jorro, com velocidade de alimentação de 3 mL/min. A – Aumento de 5.000 x; B – Aumento de 10.000 x.....	120
Figura 24 - Fotomicrografia eletrônica de varredura do ES obtido por leito de jorro, com velocidade de alimentação de 5 mL/min. C – Aumento de 10.000 x; D – Aumento de 30.000 x.....	121
Figura 25 - Fotomicrografia eletrônica de varredura do ES obtido por leito de jorro, com velocidade de alimentação de 7 mL/min. E – Aumento de 10.000 x; F e G – Aumento de 20.000 x.....	122
Figura 26 - Fotomicrografias eletrônicas de varredura do ES obtido por <i>spray dryer</i> , com velocidade de alimentação de 3 mL/min. H – Aumento de 5.000 x e I – Aumento de 20.000 x.....	123

Figura 27 - Fotomicrografias eletrônicas de varredura do ES obtido por <i>spray dryer</i> , com velocidade de alimentação de 5 mL/min. J – Aumento de 5.000 x e L – Aumento de 15.000 x.....	124
Figura 28 - Fotomicrografias eletrônicas de varredura do ES obtido por <i>spray dryer</i> , com velocidade de alimentação de 7 mL/min. M – Aumento de 15.000 x e L – Aumento de 20.000 x.....	124
Figura 29 - Histograma representando a atividade antioxidante celular do ES de <i>E. uchi</i> , através da inibição de ROS.....	128
Figura 30 - Histograma representando a atividade antioxidante celular da quercetina, através da inibição de ROS.....	129
Figura 31 - Representação do método de difusão em ágar com extrato seco de <i>E. uchi</i> (ES) e bergenina (BGN) contra a bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 29213. C- (controle negativo - água esterilizada) e C+ (controle positivo – oxacilina).....	131
Figura 32 - Efeito de diferentes concentrações do ES de <i>E. uchi</i> sobre a viabilidade em linhagem de células MRC5.....	132
Figura 33 - Avaliação organoléptica da formulação F5, com modificações na cor e no aspecto em temperaturas de resfriamento (5 °C) e temperatura de estufa (40 °C), a partir do período T3.....	138
Figura 34 - Representação do valores de pH para a formulação de sabonete íntimo F5, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.....	139
Figura 35 - Representação dos valores de pH para a formulação padrão de sabonete íntimo (Dermacyd®), determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C).....	140
Figura 36 - Representação do valores de densidade relativa para a formulação de sabonete íntimo F5, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.....	141
Figura 37 - Representação do valores de densidade relativa para a formulação padrão de sabonete líquido (Dermacyd®), determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.....	142

Figura 38 - Comportamento reológico da formulação F5 de sabonete íntimo a 25 °C.....	143
Figura 39 - Comportamento reológico do sabonete íntimo de referência comercial (Dermacyd®).....	143
Figura 40 - Comportamento reológico na relação entre a viscosidade (Pa.s) e a taxa de cisalhamento (s^{-1}) da formulação F5 de sabonete íntimo.....	147
Figura 41 - Relação entre o índice de consistência (Pa.s ⁿ) e os dias de análise para a formulação F5 de sabonete íntimo.....	148
Figura 42 - Representação das modificações ocorridas no ciclo 1 de congelamento/descongelamento da formulação F5. A – Aspecto de F5 24 horas após a manipulação; B – Aspecto de F5 com alterações da cor durante o ciclo 1.....	149
Figura 43 - Representação das características do sabonete íntimo Dermacyd®, o qual permaneceu inalterado visualmente durante os 4 ciclos de congelamento/descongelamento.....	149
Figura 44 - Comportamento reológico da formulação F5 de sabonete íntimo a 25 °C, durante os ciclos de congelamento e descongelamento.....	151
Figura 45 - Representação do valores de pH para a formulação de creme F11, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.....	155
Figura 46 - Representação do valores de pH para o creme comercial nistatina, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.....	156
Figura 47 - Representação do valores de densidade relativa para a formulação de creme F11, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.....	157
Figura 48 - Representação do valores de densidade relativa para o creme comercial de nistatina, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.....	158
Figura 49 - Comportamento reológico da formulação F11 de creme a 25 °C.....	159
Figura 50 - Comportamento reológico do creme de nistatina a 25 °C.....	159
Figura 51 - Comportamento reológico na relação entre a viscosidade (Pa.s) e a taxa de cisalhamento (s^{-1}) da formulação F11 de creme.....	162

Figura 52 - Relação entre o índice de consistência ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$) e os dias de análise para a formulação F11 de creme.....	163
Figura 53 - Representação das características macroscópicas da formulação de creme F11 nos ciclos de congelamento/descongelamento. A – Aspecto de F11 24 horas após a obtenção; B – Aspecto de F11 após o ciclo 4.....	163
Figura 54 - Representação das características macroscópicas do creme comercial de nos ciclos de congelamento/descongelamento. A – Aspecto inicial, antes dos ciclos; B – Aspecto do creme de nistatina após o ciclo 4.....	164
Figura 55 - Comportamento reológico da formulação F11 de creme a 25 °C, durante os ciclos de congelamento e descongelamento.....	165
Figura 56 - Comportamento reológico da do creme de nistatina a 25 °C, durante os ciclos de congelamento e descongelamento.....	166

LISTRA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores utilizados no screening de variáveis para a otimização do processo de extração de <i>E. uchi</i>	69
Tabela 2 - Matriz do delineamento experimental.....	69
Tabela 3 - Parâmetros de secagem para o equipamento leito de jorro.....	71
Tabela 4 - Valores utilizados no DCCR como uma estratégia sequencial direcionando para a otimização do processo de extração de <i>E. uchi</i>	73
Tabela 5 - Matriz do delineamento experimental DCCR.....	73
Tabela 6 - Parâmetros de secagem para os equipamentos: leito de jorro e <i>spray dryer</i>	74
Tabela 7 - Parâmetros de secagem para da SE com adjuvante em leito de jorro.....	80
Tabela 8 - Excipientes com suas funções, utilizados nesta pesquisa, em formulações de sabonetes líquidos.....	80
Tabela 9 - Excipientes com suas funções, utilizados nesta pesquisa, em formulações de cremes.....	81
Tabela 10 - Formulações obtidas com diferentes concentrações de excipientes, ES de <i>E. uchi</i> e óleo de <i>B. excelsa</i> para o desenvolvimento de um sabonete líquido.....	81
Tabela 11 - Formulações obtidas com diferentes concentrações de excipientes, ES de <i>E. uchi</i> e óleo de <i>B. excelsa</i> para o desenvolvimento de um creme para uso vaginal.....	82
Tabela 12 – Formulações qualitativas do produtos comerciais Nistatina creme ginecológico (Teuto) e sabonete íntimo Dermacyd® Femina, utilizados como padrões para as análises.....	83
Tabela 13 – Resultados da caracterização físico-química do óleo de castanha-do-brasil.....	89
Tabela 14 – Parâmetros de ajuste dos modelos reológicos para o óleo de castanha-do-brasil.....	92
Tabela 15 - Análise da variância do modelo de Herschel-Bulkley, conforme equação B	93
Tabela 16 - Análise da variância do modelo Lei da Potência, conforme equação A.....	93
Tabela 17 - Controle de qualidade das cascas rasuradas do caule de <i>E. uchi</i>	95

Tabela 18 - Resultados da caracterização farmacognóstica das cascas pulverizadas de <i>E. uchi</i>	97
Tabela 19 - Matriz do delineamento e resultados do <i>screening</i> para as respostas, TS - teor de sólidos (%), PT - teor de polifenóis totais (%) e TB - teor de berberina (µg/mL).....	101
Tabela 20 - Coeficientes de regressão para a resposta TS, onde: t(3) - valor <i>t</i> de Student para 3 graus de liberdade = 2,35. Parâmetros em vermelho são estatisticamente significativos ($p < 0,10$) para o modelo.....	102
Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA) para o teor de sólidos (TS).....	103
Tabela 22 - Coeficientes de regressão para a resposta teor de PT, onde: t(3) - valor <i>t</i> de Student para 3 graus de liberdade = 2,35. Parâmetros em vermelho são estatisticamente significativos ($p < 0,10$) para o modelo.....	104
Tabela 23 - Análise de variância (ANOVA) para a determinação de polifenóis totais (PT)..	105
Tabela 24 - Coeficientes de regressão para a resposta teor de TB, onde: t(3) - valor <i>t</i> de Student para 3 graus de liberdade = 2,35. Termos estatisticamente significativos ($p < 0,10$).....	108
Tabela 25 - Valores de pH para as SEs aquosas de <i>E. uchi</i>	109
Tabela 26 - Valores de pH para as SEs aquosas de <i>E. uchi</i>	109
Tabela 27 - Determinação da densidade relativa para as SEs aquosas de <i>E. uchi</i>	110
Tabela 28 - Determinação da densidade relativa para as SEs aquosas de <i>E. uchi</i>	110
Tabela 29 - Matriz do delineamento e resultados do DCCR para as respostas, TS - teor de sólidos (g%) e PT - teor de polifenóis totais (g%) nas soluções extrativas de <i>E. uchi</i>	111
Tabela 30 - Coeficientes de regressão para a resposta TS, onde: t(5) - valor <i>t</i> de Student para 5 graus de liberdade = 2,57. Parâmetros em vermelho são estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para o modelo.....	112
Tabela 31 - Análise de variância (ANOVA) para o teor de sólidos (TS).....	113
Tabela 32 - Coeficientes de regressão para a resposta teor de PT, onde: t(5) - valor <i>t</i> de Student para 5 graus de liberdade = 2,57. Parâmetros em vermelho são estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para o modelo.....	115
Tabela 33 - Análise de variância (ANOVA) para a quantidade de PT.....	116

Tabela 34 - Valores de rendimento para as operações de secagem em <i>spray dryer</i> e leito de jorro, através de diferentes velocidades de alimentação.....	118
Tabela 35 - Teores de umidade para as operações de secagem em <i>spray dryer</i> e leito de jorro, através de diferentes velocidades de alimentação.....	119
Tabela 36 - Valores de rendimento (%) e perda por dessecação (g%) para o PSA de <i>E. uchi</i> em leito de jorro.....	125
Tabela 37 - Teor de PT (%) e capacidade antioxidante do ES de <i>E. uchi</i>	127
Tabela 38 - Atividade antifúngica através da CI50 para as amostras de ES de <i>E. uchi</i> e bergenia. Leituras: a – 24 horas; e b – 48 horas.....	130
Tabela 39 - Análise organoléptica, determinação do pH e centrifugação das formulações de sabonete íntimo, no tempo T0.....	134
Tabela 40 - Continuação: análise organoléptica, determinação do pH e centrifugação das formulações de sabonete íntimo.....	134
Tabela 41 - Características organolépticas, da formulação F5, avaliadas nas condições de resfriamento (5 °C), temperatura ambiente (25 °C) e estufa (40 °C) como, normal, sem alteração (N); levemente modificada (M); e intensamente modificada (IM).....	137
Tabela 42 - Valores de pH para a formulação de sabonete íntimo F5, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.....	139
Tabela 43 - Valores de pH para a formulação padrão de sabonete íntimo (Dermacyd®), determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.....	139
Tabela 44 - Valores de densidade relativa para a formulação de sabonete íntimo F5, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.....	140
Tabela 45 - Valores de densidade relativa para a formulação padrão de sabonete íntimo (Dermacyd®), determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.....	141
Tabela 46 - Apresentação dos parâmetros para os modelos reológicos, Lei da Potência, Herschel-Bulkley e Regressão de Bingham na formulação F5.....	144

Tabela 47 - Análise de variância para o Modelo Lei da Potência, conforme equação A, para F5.....	145
Tabela 48 - Análise de variância para o Modelo de Herschel-Bulkley, conforme equação B, para F5.....	145
Tabela 49 - Análise de variância para o Modelo de Bingham, conforme equação C, para F5.....	146
Tabela 50 - Valores das áreas entre as curvas de tensão e taxa de cisalhamento (tixotropia), para F5, durante os períodos T1, T3 e T5, obtidos em diferentes temperaturas.....	147
Tabela 51 - Valores de pH e densidade relativa para a formulação de sabonete íntimo F5, determinados nos 4 ciclos de congelamento e descongelamento, a cada 24 horas.....	150
Tabela 52 - Resultados dos parâmetros do modelo Lei da Potência para a formulação F5, nos 4 ciclos de congelamento e descongelamento.....	151
Tabela 53 - Análise organoléptica, determinação do pH e centrifugação das formulações de creme F11, no tempo T0.....	153
Tabela 54 - Características organolépticas, da formulação F11, avaliadas nas condições de resfriamento (5 °C), temperatura ambiente (25 °C) e estufa (40 °C) como, normal, sem alteração (N).....	154
Tabela 55 - Valores de pH para a formulação de creme F11, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.....	155
Tabela 56 - Valores de pH para o creme comercial nistatina, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.....	156
Tabela 57 - Valores de densidade relativa para a formulação de creme F11, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.....	156
Tabela 58 - Valores de densidade relativa para a formulação comercial de nistatina, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.....	157

Tabela 59 - Apresentação dos parâmetros para os modelos reológicos, Lei da Potência, Herschel-Bulkley e Regressão de Bingham na formulação F11.....	160
Tabela 60 - Análise de variância para o Modelo Lei da Potência para F11.....	160
Tabela 61 - Análise de variância para o Modelo de Herschel-Bulkley para F11.....	161
Tabela 62 - Análise de variância para o Modelo de Bingham para F11.....	161
Tabela 63 - Valores das áreas entre as curvas de tensão e taxa de cisalhamento (tixotropia), para F11, durante os períodos T1 e T5, obtidos em diferentes temperaturas.....	162
Tabela 64 - Valores de pH e densidade relativa para a formulação de creme F11, determinados nos 4 ciclos de congelamento e descongelamento, a cada 24 horas.....	164
Tabela 65 - Atividade antifúngica através da CI50 para as formulações F5, F11 e respectivas bases com adjuvantes.....	167
Tabela 66 - Teor de PT (g%) e capacidade antioxidante das formulações de sabonete íntimo (F5) e creme (F11).....	168

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAPH = Dicloridrato de 2,2 Azobis (2-metilpropionamida)
- AGROFRUT = Cooperativa Agrofrutífera dos Produtos de Urucará
- ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC = Cepas padrão ATCCTM (*American Type Culture Collection*)
- BHI = *Brain Heart Infusion Agar* (Ágar cérebro-coração)
- °C = grau Celsius
- CCl₄ = Tetracloreto de carbono
- CI = Concentração inibitória
- CIM = Concentração inibitória mínima
- CLAE = Cromatografia líquida de alta eficiência
- CLSI = *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- COX-1 = Enzima ciclooxigenase-1
- COX-2 = Enzima ciclooxigenase-2
- cm = Centímetro
- CO₂ = Dióxido de carbono
- DCC = Delineamento composto central
- DCFH-DA = 2'7'-dicloro-fluoresceína-diacetato
- DIPs = Doenças inflamatórias pélvicas
- DMSO = Dimetilsulfóxido
- DP = Desvio padrão
- DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
- EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA = *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*
- EqAG = Equivalente de ácido gálico
- EROs = Espécies reativas de oxigênio
- ES = Extrato seco
- F_{calc} = F-valor calculado
- F_{tab} = F-valor tabelado
- g = Grama
- HepG2 = Células de hepatoma humano
- H. B. K. = Humboldt, Bonpland e Kunth

HPLC = *High performance liquid chromatography*
INPA = Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IST = Infecções sexualmente transmissíveis
Kg = Quilograma
Km = Quilômetro
KOH = Hidróxido de potássio
LIDETEF = Laboratório de Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica
N = Normalidade
Nº = Número
nm = Nanômetro
M = Molaridade
m = Metro
m³ = metros cúbicos
MeOH = Metanol
meq = Miliequivalente
MEV = Microscopia eletrônica de varredura
mg = Miligrama
mL = Mililitro
mm = Milímetro
mM = Milimolar
mm² = Milímetro quadrado
MPV = Matéria-prima vegetal
MRC5 = cultura de células humanas diplóides composta por fibroblastos
MRSA = *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*
MS = Ministério da Saúde
OH = Hidroxila
OMS = Organização Mundial de Saúde
Pa = Pascal (Sistema Internacional de Unidades)
Pa.s = Pascal-segundo (Sistema Internacional de Unidades)
PBS = Tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline*
PD = Perda por dessecação
PEG = Polietilenoglicol
PNPMF = Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos
ppm = Partes por milhão

pH = Potencial hidrogeniônico

PT = Polifenóis totais

RDC = Resolução da diretoria colegiada

RENAME = Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

RENISUS = Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS

ROS = Reactive Oxygen Species

rpm = Rotação por minuto

RPMI = Meio de cultura sintético, criado pelo *Roswell Park Memorial Institute*

s = Segundo

SE = Solução extrativa

SDH = Sorbitol desidrogenase

SUS = Sistema Único de Saúde

TE = Teor extrativo

TGP = Transaminase glutâmico-pirúvica

TS = Teor de sólidos

UBS = Unidade Básica de Saúde

UFAM = Universidade Federal do Amazonas

UFC = Unidade formadora de colônia

UVC = Radiação ultravioleta com comprimento de onda que varia entre 200-280 nm.

vs. = Preposição latina *versus*

µg = Micrograma

µL = Microlitro

µm = Micrômetro

µM = micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1 Plantas medicinais.....	29
2.2 Fitoterápicos.....	30
2.3 Fitocosméticos.....	32
2.4 Desenvolvimento de formas farmacêuticas para uso tópico.....	34
2.5 Extratos vegetais.....	38
2.5.1 Secagem por aspersão (spray drying).....	40
2.6 Descrição das matérias-primas utilizadas.....	43
2.6.1 <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrecasas.....	43
2.6.1.1 Usos terapêuticos.....	45
2.6.1.2 Estudos fitoquímicos das cascas de <i>Endopleura uchi</i>	46
2.6.2 <i>Bertholletia excelsa</i> H. B. K. (castanha-do-brasil).....	49
2.6.2.1 Óleo fixo de castanha-do-brasil.....	51
2.7 Sistema Reprodutor Feminino.....	52
2.7.1 Infecções vaginais ou vulvovaginites.....	54
3 OBJETIVOS.....	56
3.1 Objetivo geral.....	56
3.2 Objetivos específicos.....	56
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1 Reagentes.....	57
4.2 Equipamentos.....	58
4.3 Obtenção de tratamento dos materiais vegetais.....	59
4.3.1 <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrecasas.....	60
4.3.2 <i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K. (castanha-do-brasil).....	60
4.4 Caracterização físico-química do óleo de <i>Bertholletia excelsa</i>.....	61
4.4.1 Determinação do índice de acidez.....	61
4.4.2 Determinação do índice de peróxido.....	62
4.4.3 Determinação do índice de refração.....	62
4.4.4 Determinação da densidade relativa.....	63
4.4.5 Determinação da viscosidade aparente e comportamento reológico.....	63

4.4.6 Avaliação da citotoxicidade.....	64
4.5 Controle de qualidade da MPV <i>E. uchi</i> (cascas rasuradas).....	64
4.5.1 Análise granulométrica por tamisação.....	64
4.5.2 Perda por dessecação em balança de infravermelho.....	665
4.6 Caracterização farmacognóstica das cascas cominuídas de <i>E. uchi</i>.....	65
4.6.1 Análise granulométrica por tamisação.....	65
4.6.2 Determinação da perda por dessecação (PD).....	66
4.6.3 Determinação do teor extrativo (TE).....	66
4.6.4 Determinação de cinzas totais.....	67
4.6.5 Determinação de polifenóis totais (PT).....	68
4.7 Otimização do processo para obtenção da solução extrativa (SE) aquosa das cascas cominuídas de <i>E. uchi</i>.....	69
4.7.1 Screening de variáveis com repetições das interações.....	69
4.7.1.1 Determinação do Teor de Sólidos Solúveis (Resíduo Seco) – TS.....	70
4.7.1.2 Determinação de polifenóis totais (PT).....	70
4.7.1.3 Quantificação de bergenina.....	71
4.7.2 Caracterização físico-química das SEs obtidas de <i>E. uchi</i>	72
4.7.2.1 Determinação do pH.....	72
4.7.2.2 Determinação da densidade relativa.....	72
4.7.3 Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ² com repetições do ponto central.....	72
4.7.3.1 Determinação do TS.....	73
4.7.3.2 Determinação de PT.....	73
4.8 Preparação dos extratos secos (ES) de <i>E. uchi</i>.....	74
4.9 Caracterização dos extratos secos (ES) de <i>E. uchi</i>.....	74
4.9.1 Rendimento da operação de secagem.....	74
4.9.2 Perda por dessecação em balança de infravermelho.....	75
4.9.3 Determinação de PT.....	75
4.9.4 Atividade sequestrante do radical DPPH.....	75
4.9.5 Atividade sequestrante do radical ABTS.....	76
4.9.6 Avaliação da atividade antioxidante celular.....	77
4.9.7 Avaliação da atividade antifúngica.....	77
4.9.8 Determinação atividade antibacteriana.....	78

4.10 Morfologia das partículas dos ES.....	79
4.11 Avaliação da citotoxicidade.....	79
4.12 Obtenção do produto seco por aspersão (PSA).....	79
4.13 Desenvolvimento das formulações para uso tópico contendo ES de <i>E. uchi</i> e óleo de <i>B. excelsa</i>.....	80
4.13.1 Avaliação da pré-estabilidade e seleção das formulações.....	83
4.13.1.1 Avaliação das características organolépticas.....	83
4.13.1.2 Determinação do pH.....	83
4.13.1.3 Avaliação do comportamento frente à centrifugação.....	84
4.13.2 Avaliação da estabilidade preliminar.....	84
4.13.2.1 Avaliação das características organolépticas.....	84
4.13.2.2 Determinação do pH.....	85
4.13.2.3 Determinação do comportamento reológico.....	85
4.13.2.4 Determinação da espalhabilidade.....	85
4.13.2 Caracterização das formulações.....	86
4.13.3.1 Determinação do teor de PT.....	86
4.13.3.2 Atividade sequestrante do radical DPPH.....	87
4.13.3.3 Atividade sequestrante do radical ABTS.....	87
4.13.3.4 Avaliação da atividade antifúngica.....	88
4.14 Análise estatística.....	88
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
5.1 Caracterização físico-química do óleo de <i>B. excelsa</i>.....	89
5.2 Controle de qualidade da MPV <i>E. uchi</i> (cascas rasuradas).....	94
5.3 Caracterização farmacognóstica das cascas cominuídas de <i>E. uchi</i>.....	96
5.4 Otimização do processo para obtenção de SE aquosa das cascas cominuídas de <i>E. uchi</i>.....	100
5.4.1 <i>Screening</i> de variáveis com repetições das interações.....	100
5.4.1.1 Determinação do TS.....	101
5.4.1.2 Determinação do teor de PT.....	104
5.4.1.3 Quantificação de bergenina.....	106
5.4.2 Caracterização físico-química das SEs obtidas de <i>E. uchi</i>	109
5.4.3 Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ² com repetições do ponto central.....	111
5.4.3.1 Determinação do TS.....	112

5.4.3.2 Determinação de PT.....	114
5.5 Obtenção dos ES de <i>E. uchi</i>.....	117
5.5.1 Caracterização físico-química e morfológica dos ES de <i>E. uchi</i>	119
5.5.2 Avaliação da atividade biológica do ES de <i>E. uchi</i>	126
5.5.2.1 Determinação do teor de PT e atividade antioxidante.....	126
5.5.2.2 Atividade antimicrobiana.....	129
5.5.3 Avaliação da citotoxicidade.....	131
5.6 Desenvolvimento de formulações para uso tópico contendo ES de <i>E. uchi</i> e óleo de <i>B. excelsa</i>.....	132
5.6.1 Seleção das formulações de sabonete líquido íntimo.....	132
5.6.1.1 Avaliação da estabilidade preliminar da formulação de sabonete íntimo.....	137
5.6.1.2 Avaliação da estabilidade nos ciclos de congelamento-descongelamento.....	148
5.6.2 Seleção das formulações de cremes para uso vaginal.....	151
5.6.2.1 Avaliação da estabilidade preliminar do creme vaginal.....	154
5.6.2.2 Avaliação da estabilidade nos ciclos de congelamento-descongelamento.....	163
5.6.3 Avaliação da atividade biológica das formulações de sabonete íntimo e creme para uso vaginal.....	166
5.6.3.1 Atividade antifúngica.....	166
5.6.3.2 Teor de polifenóis e atividade antioxidante.....	167
6 CONCLUSÕES.....	169
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	170

1 INTRODUÇÃO

Com uma área que corresponde a 6,9 milhões de km² e que abrange nove estados brasileiros, a Amazônia é considerada a maior floresta tropical do mundo. Além de possuir um predominante clima quente e úmido, a Floresta Amazônica representa o bioma mais importante e necessário do planeta, pois é o abrigo de uma diversificada flora e de uma vasta fauna (CASTRO; ANDRADE, 2016). A biodiversidade da flora brasileira é muito extensa e boa parte desta é pouco conhecida ou pesquisada para fins medicinais (YUNES; PEDROSA; FILHO, 2001). O conhecimento e o uso correto dessas riquezas naturais contribuem para o desenvolvimento da Amazônia brasileira e o progresso econômico das populações locais. A Floresta Amazônica sempre foi o berço para plantas medicinais, as quais quando conservadas podem ser a base para solucionar diversas doenças (CASTRO; ANDRADE, 2016).

Por milênios, as plantas foram as bases fundamentais para muitos medicamentos e cosméticos, e permanecendo até hoje no mercado, ultrapassando as ideologias da indústria farmacêutica que investe em substâncias sintéticas (ATANASOV *et al.*, 2015). O uso de plantas para o tratamento de doenças é milenar, sendo uma das mais antigas formas da prática medicinal (POLITI, 2009). No começo da década de 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS) anunciou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam de plantas medicinais como único tratamento acessível aos cuidados em saúde (AKERELE, 1993). A procedência da maior parte de matérias-primas naturais é brasileira, onde existem aproximadamente 80 mil espécies de plantas, sendo os Estados Unidos e a Alemanha os maiores importadores destes insumos para a fabricação de medicamentos (GADELHA *et al.*, 2013).

No Brasil, o uso de plantas está baseado principalmente na cultura popular, e muitos destes vegetais dificilmente são transformados em fitoterápicos (TACON, 2012). Em alguns grupos étnicos e comunidades distantes das grandes cidades, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza a única solução para problemas de saúde, além do mais, em muitos destes lugares as plantas são comercializadas em mercados públicos e feiras livres (MACIEL *et al.*, 2002). Na região Amazônica, muitas vezes, o consumo de plantas medicinais ocorre sem estudo químico e comprovação da ação farmacológica, podendo este ato ser nocivo e causar efeitos tóxicos (MUNIZ, 2013). A toxicidade causada por plantas medicinais é um problema grave de saúde pública, pois além da falta de elucidação de muitas substâncias, as adulterações e interações sinérgicas com outras drogas vegetais, moléculas (fármacos) (incluindo medicamentos), englobam as consequências ruins (JUNIOR; PINTO, 2005).

Mas o conhecimento popular ainda é o que alimenta e beneficia muitas indústrias farmacêuticas, aumentando as chances destas em obterem novas entidades químicas e conseqüentemente novos produtos (FERREIRA; PINTO, 2010). No Brasil, as indústrias farmacêuticas são atuantes no desenvolvimento de fitoterápicos, com objetivos de diminuir custos da produção e tratamento, com oportunidade de inovação e diferenciação de produtos (GADELHA, 2006). Para ocorrer o avanço tecnológico sobre os fitoterápicos, estudos rigorosos sobre produção, controle de qualidade, novas metodologias de análise e descoberta de fármacos devem ser implantados. A literatura registra que desde algum tempo existe uma grande quantidade de pessoas que no seu dia-a-dia estão mais preocupadas com a saúde e qualidade de vida, e para isso, vem buscando alternativas nas plantas medicinais (GUERRA *et al.*, 2010).

Exemplo de plantas utilizadas tradicionalmente para fins medicinais são os do gênero *Sacoglottis* (Humiriaceae) predominantes nas Américas, principalmente em regiões tropicais, o qual é representado por nove espécies, entre elas *Sacoglottis uchi* Huber (sin. *Endopleura uchi*). Foi nesta espécie vegetal que ocorreu o isolamento de uma molécula denominada bergenina, inicialmente extraída do fruto, onde estudos farmacológicos evidenciaram que tal molécula contribui para o tratamento de doenças hepáticas, inflamatórias e infecciosas. De outro modo, há registros que a madeira desta árvore é empregada em construções civis e navais, e seus frutos são um alimento muito importante para os povos amazônicos (MAGALHÃES *et al.*, 2007; NUNOMURA *et al.*, 2009).

Outra espécie vegetal bastante conhecida na Amazônia, também muito utilizada para fins terapêuticos, é a *Bertholletia excelsa* H. B. K. (castanha-do-brasil), a qual possui sementes ricas em lipídeos (65-70%), sendo 60% do seu peso total constituída por óleo, além de proteínas (15-17%). A partir do conhecimento desta composição, o óleo da castanha-do-brasil passou a ser utilizado pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, principalmente através de formulações tópicas, visando contribuir para a hidratação e renovação da pele. Além disso, os ácidos graxos presentes neste óleo, como o oleico, o linoleico e o palmítico, apresentam uma inovação no combate a alguns microrganismos patógenos (ENRÍQUEZ, 2009; ROLIM, 2016).

A partir do conhecimento sobre as potenciais propriedades destas duas matérias-primas vegetais, *Endopleura uchi* (*E. uchi*) e *Bertholletia excelsa* (*B. excelsa*), este trabalho de pesquisa tem como finalidade otimizar a forma de extração de substâncias das cascas de *E. uchi* e investigar sua atividade biológica, assim como, averiguar sua segurança para o consumo. Consecutivamente, com o extrato de *E. uchi* e o óleo fixo de *B. excelsa*, obter diferentes formas farmacêuticas tópicas que apresentem promissoras características físico-químicas, para que

futuramente, as informações obtidas aqui sirvam como base no desenvolvimento tecnológico, viabilizando a criação de novos produtos e medicamentos que melhorem a qualidade de vida e bem-estar das mulheres, auxiliando no tratamento e prevenção de infecções, como as vulvovaginites.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

Planta medicinal é toda e qualquer planta (inteira ou partes) empregada para o tratamento e prevenção de doenças. O uso deste conhecimento é antigo e repassado de geração em geração, porém exerce um importante papel na medicina moderna, sendo fonte para diversos fármacos (GADELHA *et al.*, 2013). Muitos agentes terapêuticos comumente utilizados na alopatia e fitoterapia são derivados de diversas plantas medicinais, sendo que algumas, por muito tempo, o uso foi realizado de modo empírico e sem o conhecimento dos constituintes ativos (ATANASOV *et al.*, 2015).

No Brasil, os registros históricos descrevem a utilização de plantas medicinais com início a partir da época da colonização pelos portugueses em 1500, através dos padres jesuítas, devido aos primeiros contatos com os indígenas. Documentos históricos relatam que nos anos de 1630 a 1654, cientistas estrangeiros conseguiram descrever muitas drogas utilizadas pelos povos indígenas, produzindo um amplo conjunto de conhecimento sobre as plantas medicinais no continente Sul-americano (ULRIKE *et al.*, 2013).

A partir das informações coletadas naquela época, a população mundial, depende ou faz uso de alguma prática da medicina tradicional até os dias atuais, pois segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), esta prática está inserida nas necessidades básicas das pessoas e a utilização envolve desde a planta medicinal e seus extratos, até os princípios ativos de medicamentos (GADELHA *et al.*, 2013). No Brasil, em 2017, o Sistema Único de Saúde (SUS) disponibilizou fitoterápicos ou plantas medicinais para 2.160 Unidades Básicas de Saúde (UBS), onde 260 destas oferecem planta *in natura*, 188 a droga vegetal, 333 o fitoterápico manipulado, e 1.647 UBS disponibilizam o fitoterápico industrializado (ANVISA, 2019). Nas cidades amazônicas, é possível encontrar o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais em áreas urbanas, entretanto, nas áreas rurais, a manutenção da saúde destas comunidades ainda provém grande parte de produtos da natureza (FERREIRA, 2016).

O uso das plantas medicinais pelas comunidades costuma direcionar as primeiras informações sobre as propriedades terapêuticas de uma droga vegetal guiando para a avaliação fitoquímica e farmacológica. Após a identificação botânica da espécie em estudo, os constituintes químicos são obtidos através da preparação de extratos, delineando as etapas

seguintes para o desenvolvimento de um fitoterápico ou fitocosmético (MANFIO; BRUM JUNIOR, 2017). Quase que em sua totalidade, medicamentos apresentam um princípio ativo responsável pela ação farmacológica, enquanto que extratos vegetais possuem em sua composição, uma mistura de várias substâncias, ativas ou não, que podem atuar em diferentes alvos farmacológicos (FERREIRA; PINTO, 2010).

Na constante busca por estratégias investigativas de plantas medicinais, uma abordagem etnofarmacológica combina informações adquiridas em comunidades locais com pesquisas químico-farmacológicas desempenhadas em laboratórios especializados (SIMÕES *et al.*, 2003). Segundo Bruhn & Holmstedt (1982), etnofarmacologia é uma disciplina multi e interdisciplinar com objetivos exploratórios científicos sobre os agentes biológicos ativos, utilizados tradicionalmente e observados pelo homem. Porém, a droga vegetal ou o extrato padronizado devem cumprir os requisitos de qualidade preconizados, e a partir do momento da definição da formulação ideal, estudos pré-clínicos serão realizados para confirmar a segurança farmacológica e evidenciar ou não a toxicidade (MANFIO; BRUM JUNIOR, 2017).

2.2 Fitoterápicos

Conforme já citado, as plantas medicinais tornaram-se valiosas fontes de tratamento para diversas enfermidades a partir da descoberta de substâncias biologicamente ativas, conduzindo a perspectiva da saúde para uma medicina preventiva, voltada para um futuro com buscas por meios profiláticos através da natureza (MARTINS; GRAF; CASSETARI, 2016). Em geral, os benefícios das plantas medicinais são vistos como um conhecimento histórico, suplementar ao uso de medicamentos sintéticos, e com menor custo e fácil acesso (SANTOS *et al.*, 2011). Na medicina moderna, as plantas adquiriram um papel importante, pois além do emprego milenar na saúde humana, elas podem ser consideradas fontes de fármacos, os quais dificilmente seriam obtidos por síntese química (GADELHA *et al.*, 2013).

A partir disso, a área da medicina que utiliza plantas para o tratamento de doenças ou como agentes promotores de saúde, é denominada de fitoterapia (FALZON; BALABANOVA, 2017). Da mesma forma, o produto obtido da planta medicinal, ou de seus derivados, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa é denominado de Fitoterápico (BRASIL, 2011). Essa transformação de uma planta em medicamento sempre deve

ter como foco a preservação dos constituintes químicos e da integridade farmacológica do vegetal de modo a garantir a ação biológica e valorização do potencial terapêutico, assim como, certificar a segurança durante o uso (MARTINS; GRAF; CASSETARI, 2016).

A produção de fitoterápicos engloba o processamento do material vegetal para que o produto final contenha o marcador químico de referência na concentração pré-estabelecida para ação biológica (FALZON; BALABANOVA, 2017). A fitoterapia é uma modalidade da saúde e que vem crescendo nos últimos anos, principalmente como terapia alternativa para doenças como câncer, diabetes, aterosclerose e hipertensão (SANTOS *et al.*, 2015). Assim sendo, como todos os medicamentos sintéticos, os fitoterápicos são classificados e diferenciados com auxílio do conhecimento tradicional da eficácia, caracterizados pelos riscos à saúde e constância da qualidade (OLIVEIRA; ROPKE, 2016). A diversidade de substâncias encontradas em uma planta é o que difere um fitoterápico de um medicamento sintético (MELO; MURICY; SANTOS, 2012). Para garantir essas metas, o desenvolvimento de fitoterápicos necessariamente demanda de muitos estudos prévios, principalmente sobre os aspectos botânicos, agrônômicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos, além de muitas vezes demandar novas metodologias analíticas e tecnológicas (SIMÕES *et al.*, 2003).

No Brasil, a discussão sobre a regulamentação das plantas medicinais iniciou em 1986, na 8ª Conferência Nacional de Saúde, com uma abordagem na cura popular para o atendimento de pacientes na atenção básica de saúde (GADELHA *et al.*, 2013). Com iniciativas do governo para incentivar o uso de fitoterápicos no país, foi aprovada, em 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, por meio do Decreto nº 5.813 de 22 de Junho de 2006, aliando o poder da biodiversidade com melhorias na qualidade de vida da população (BUFAINO, 2013).

Em 2007, doze medicamentos fitoterápicos foram incluídos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), os quais foram inseridos no SUS. Já no ano de 2008, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), foi lançado para garantir o acesso seguro, o uso racional desta nova prática e manter o aproveitamento sustentável dos materiais vegetais para o desenvolvimento industrial e tecnológico (GADELHA *et al.*, 2013). Utilizando este ideal de expansão e inovação na área de fitoterápicos, foi divulgada, em 2009, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (RENISUS), abrangendo 71 plantas medicinais. No ano seguinte, o Ministério da Saúde estabeleceu por meio da Portaria MS nº 886, a Farmácia Viva, representando um modelo de farmácia no contexto da Assistência Farmacêutica Nacional, sem fins lucrativos, e com responsabilidades sobre o cultivo, a coleta,

o processamento, o armazenamento de plantas medicinais, além da manipulação e dispensação de fitoterápicos (RANDAL; BEHRENS; PEREIRA, 2016).

Outro sistema estratégico para ofertar a fitoterapia no SUS foi a publicação, em 2012, nos Cadernos de Atenção Básica, denominada de “Práticas Integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica”. Ainda neste âmbito, a RDC nº 18 de 2013 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apresentou as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais. Seguindo o mesmo contexto, a Resolução de Diretoria Coletiva (RDC) nº 26 de 2014, deliberou a respeito da distinção de medicamento fitoterápico e produtos tradicionais fitoterápicos, estabelecendo que, **produtos tradicionais fitoterápicos** são aqueles cuja, segurança e efetividade estão fundamentados na tradição do uso por período mínimo de 30 anos para condições clínicas brandas. Por outro lado, **medicamentos fitoterápicos** possuem segurança e eficácia, baseadas em evidências clínicas (TERRA JUNIOR; MALDONADO; ARNOBIO, 2015).

Portanto, as plantas fazem parte de um amplo processo que associa várias potencialidades e conhecimentos na formação de produtos, criando uma perspectiva de planejamento para o aproveitamento correto dos recursos naturais, garantindo estruturas e condições de vida para algumas comunidades. Os fitoterápicos englobam muitos setores do mercado nacional e internacional e se estabelecem como importantes para uma longa cadeia produtiva no Brasil e, por isso, sua atividade é gerenciada por políticas públicas específicas, as quais autorizam a sua reprodução e sua propagação (COSTA; NUNEZ; 2016).

2.3 Fitocosméticos

Cosmético é uma preparação com propriedades corretivas ou preventivas, capazes de proporcionar um equilíbrio físico-químico na pele sem afetar suas funções, sendo capazes também, de corrigir deficiências estéticas e diminuir o processo de envelhecimento cutâneo (VALFRÉ, 1990). O termo “cosméticos” é derivada da palavra grega *kosmeticos*, que significa ter habilidade ou poder na decoração; algo relativo a adorno (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998; SINDHURA; JAIN, 2018). São produtos que auxiliam para uma boa aparência estética, questão de alta relevância para a sociedade, a qual não está somente

relacionada com as mulheres, ou seja, muitos homens também utilizam diversos cosméticos (KOLE *et al.*, 2005).

Segundo o Regulamento Europeu (EC) nº 1223/2009, o conceito de cosmético é compreendido da seguinte forma:

[...] qualquer substância ou mistura, destinada a ser colocada em contato com partes externas do corpo humano (epiderme, cabelos, unhas, lábios e órgãos genitais externos), ou dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com objetivo exclusivo de limpá-los, perfumá-los, mudar a sua aparência, proteger e mantê-los em boas condições, ou corrigir odores do corpo.

Para a legislação brasileira, especificamente pela ANVISA, por meio da RDC nº 211, de 14 de julho de 2005, definem-se cosméticos como:

Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado.

Do mesmo modo, fitocosmético é definido como um cosmético que contém ativo natural, de origem vegetal, seja um extrato, óleo fixo ou óleo essencial, cuja ação define a atividade do produto (ISAAC *et al.*, 2008). A diferença destes produtos está na sua composição heterogênea e no seu modelo de fabricação, onde são utilizadas plantas frescas ou secas, partes ou inteiras dos vegetais e extratos (FERRARO *et al.*, 2015). Extratos bioativos utilizados em cosméticos possuem várias substâncias, como antioxidantes, vitaminas, proteínas, terpenóides, óleos fixos e óleos essenciais, capazes de agir nas funções biológicas da pele e no cuidado com o corpo (RIBEIRO *et al.*, 2015).

Fitocosméticos são produtos formulados com ingredientes cosméticos permitidos pela legislação local vigente e são conhecidos também, como cosméticos naturais. Os fitocosméticos mais encontrados são aqueles para os cuidados com a pele, cuidados com os cabelos, perfumes, óleos e sabonetes (SINDHURA; JAIN, 2018). Os ingredientes naturais que podem ser incorporados as formulações incluem um conjunto de substâncias extraídas de frutas, ervas, folhas, flores e minerais, porém sua eficácia dependerá da base a qual foi incorporado e ter ação comprovada por testes *in vitro* e *in vivo* (RIBEIRO *et al.*, 2015). O uso de extratos vegetais em cosméticos cresceu nos últimos anos, e sua utilização tem sido estimulada por diversos pesquisadores da área de cosmetologia. Mas é necessário cautela e vários estudos sobre a eficácia dos fitocosméticos, para obtenção de produtos com qualidade e segurança (SANTOS *et al.*, 2015).

Diversos efeitos ocasionados por algumas plantas em doenças de pele foram citados por Mantle; Gok; Lennard (2001), dentre eles estão, a cicatrização de feridas e tratamento de queimaduras, por formulações com *Aloe vera*; atividade bactericida e antifúngica; acne, herpes e escabiose, com o uso do óleo de *Melaleuca alternifolia*; atividade anti-inflamatória e alterações imunológicas que afetam a pele, como psoríase dentre outras. Segundo Kole *et al.* (2005), muitos extratos vegetais adicionados ao cosméticos possuem três tipos de antioxidantes botânicos, como carotenoides, flavonoides e polifenóis, agindo como protetores da pele e auxiliando no tratamento de inflamações cutâneas.

O controle de qualidade dos fitocosmético deve começar com a identificação da espécie vegetal, que pode ser realizada por avaliações macro e microscópicas. Além disso, controle na presença de cinzas, materiais estranhos, contaminantes e metais pesados, ajudam na produção de cosméticos seguros (SINDHURA; JAIN, 2018). O controle de insumos na composição de fitocosméticos deve ser rigoroso, pois alguns ingredientes podem agredir a pele, por meio de contaminação química ou microbiológica, elementos carcinogênicos e alergênicos (HERCULANO, 2013).

A diferença entre medicamento e cosmético é meticulosa, pois será determinada de acordo com o uso pretendido do produto, formando um pequeno limiar na divisão (JOSHI; PAWAR, 2015). Com isso, para a obtenção de uma forma farmacêutica constituída de matéria-prima vegetal, o planejamento de todo o manejo de produção é essencial, considerando também as especificações dos adjuvantes utilizados, e determinando as ações sequenciais de transformação (TOLEDO *et al.*, 2003). A formulação será desenvolvida como um fitoterápico ou fitocosmético, dependendo do interesse terapêutico ou necessidade do paciente, com ação local ou ação sistêmica (ALLEN JUNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2013).

2.4 Desenvolvimento de formas farmacêuticas para uso tópico

De um modo geral, para que ocorra a administração de agentes terapêuticos, eles necessitam ser incorporados a uma forma farmacêutica, sendo isso possível a partir de características como o estado físico de apresentação, propriedades dos constituintes ativos e o uso de adjuvantes farmacêuticos (TOLEDO *et al.*, 2003; DA CUNHA *et al.*, 2015; SIMÕES *et al.*, 2017). As formas farmacêuticas são formadas por uma ou mais substâncias ativas,

responsáveis pela resposta terapêutica, e por adjuvantes, os quais são substâncias que viabilizam a administração e que garantem a manutenção da qualidade do produto final (SIMÕES *et al.*, 2003). O desenvolvimento de formas farmacêuticas para obtenção de fitoterápicos e ou de fitocosméticos, deve preservar e valorizar o potencial químico e terapêutico da matéria-prima vegetal (MPV) (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Formulações para uso tópico podem exibir efeitos locais ou sistêmicos, sendo que, quando essas preparações são administradas, o principal alvo é a pele ou mucosas, e geralmente, apresentam-se como formas farmacêuticas semissólidas (cremes, pomadas, pastas e géis); pós, aerossóis e preparações líquidas (ALLEN JUNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2013). Incorporação em bases para fins cosméticos de extratos vegetais com atividade biológica e fisiológicas comprovadas, é uma tendência altamente difundida entre as indústrias farmacêuticas (BANOV *et al.*, 2006). Todavia, a escolha para a base adequada dependerá da afinidade com os princípios ativos, e que a junção destes, promova a estabilidade e o efeito farmacodinâmico do produto final (SOUZA; FERREIRA, 2010).

Crems, pomadas e géis são formas farmacêuticas destinadas à aplicações sobre a pele e olhos, ou utilizadas por via nasal, vaginal ou retal. Os produtos tópicos vaginais são usados para o tratamento de infecções vulvovaginais, contracepção e em condições de atrofia do endométrio (ALLEN JUNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2013). A administração de medicamentos pela via vaginal é muito importante devido a vantagem de evitar os efeitos de primeira passagem e baixa atividade enzimática; além de apresentar rica vascularização e uma grande área de permeação (GAFITANU *et al.*, 2016).

Preparações semissólidas existem em grande número, com diferentes formas de dosagem farmacêutica, sendo diferenciadas pela consistência e caráter reológico (NARDI-RICART *et al.*, 2018). Para obtenção de cremes e pomadas, as matérias-primas vegetais podem ser incorporadas a partir da forma sólida, como os extratos secos ou pós, e líquidas, como soluções extrativas (TOLEDO *et al.*, 2003). Este método de incorporação de preparações semissólidas pode ser exemplificado pelo estudo de Banov *et al.* (2006), que apresenta a padronização do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. em formulações para uso tópico, como creme e gel, mostrando a versatilidade deste tipo de extrato.

No cenário industrial, as formas farmacêuticas semissólidas são as principais escolhas para incorporação de extratos vegetais, sendo que possuem boa aceitação pelos consumidores, devido as agradáveis características sensoriais, além da boa permeação cutânea (BUHLER;

FERREIRA, 2008). Como exemplo destas preparações, destacam-se os cremes, os quais são definidos pela Farmacopeia Brasileira 6^a ed. (2019) como:

É a forma farmacêutica semissólida que consiste de uma emulsão, formada por uma fase lipofílica e uma fase hidrofílica. Contém um ou mais princípios ativos dissolvidos ou dispersos em uma base apropriada e é utilizada, normalmente, para aplicação externa na pele ou nas membranas mucosas.

Seguindo o conceito de cremes, para os autores PRISTA; ALVES; MORGADO (1996), emulsões são:

[...] sistemas heterogêneos constituídos por gotículas de um líquido disseminadas em um outro líquido com ele imiscível. A fase que se apresenta dividida constitui a fase interna e, o líquido que está ao redor das gotículas da fase dispersa representa a fase externa. Todas as emulsões contêm um terceiro componente, um agente emulsivo, que ajuda a tornar a emulsão mais estável pelo fato de interpor-se entre as fases imiscíveis retardando a separação das fases.

Conforme a natureza da fase externa (dispersante), as emulsões podem ser classificadas em: água e óleo (A/O), pois contém água como fase dispersa; e óleo em água (O/A), composta pela dispersão de material oleoso/graxo na fase aquosa (PIANOVSKI *et al.*, 2008). Isso permite a capacidade de incorporação de princípios ativos tanto hidrossolúveis como lipossolúveis, e a diminuição da irritabilidade cutânea de alguns fármacos (CASTELI *et al.*, 2008). Emulsões para fins cosméticos ou farmacêuticos, por serem sistemas complexos e polidispersos, podem conter diferentes tensoativos de natureza química diversa e outros aditivos (PIANOVSKI *et al.*, 2008).

Para o desenvolvimento de uma emulsão, o aspecto, as propriedades físicas e a estabilidade são requisitos fundamentais (MOSTEFA *et al.*, 2006). A instabilidade das emulsões são caracterizadas por fenômenos como cremação, floculação e coalescência (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Se as emulsões tornarem-se instáveis, mudanças nas características físico-químicas ocorrem (PIANOVSKI *et al.*, 2008). Mas estas variações podem ser verificadas através da determinação do pH, densidade, viscosidade, umidade, condutividade elétrica, tamanho da partícula, entre outros (BRASIL, 2010). Características reológicas devem ser avaliadas também, pois estão diretamente relacionadas ao enchimento e retirada do material de acondicionamento, bem como com a espalhabilidade e a aderência do produto sobre a pele (CORRÊA *et al.*, 2005).

No âmbito de produtos para uso exclusivo como cosméticos, o sabonete é um representante importante deste grupo, com função de limpeza da pele, e não deve provocar sensibilização ou irritação (ESCOBAR *et al.*, 2016). Sabonetes são os produtos mais antigos

utilizados pelo homem para higiene, com relatos de sua história que remetem cerca de 4.000 anos (CRONEMBERGER; PAULA; MEIRELLES, 2015). Há no mercado, várias formas de sabões, como em pó, barra e líquidos, destinados à limpeza, fornecendo ação detergente, e dissolvendo-se quando em contato com a água (BONADEO, 2010).

Com a evolução da indústria farmacêutica e cosmética e, diversas pesquisas, inúmeros sabonetes foram produzidos com o objetivo de obter produtos com características mais brandas e adequadas (CRONEMBERGER; PAULA; MEIRELLES, 2015). O público feminino foi o que mais exigiu adaptações priorizando a qualidade destes materiais, pelo fato de utilizarem mais produtos de higiene pessoal, sendo destes, alguns usados para prevenir doenças (GARCIA *et al.*, 2009). A utilização rotineira destes sabonetes líquidos para a higiene íntima feminina, tendem a manter o pH vaginal ácido, mantendo os órgãos genitais livres de infecções (BEZERRA *et al.* 2016). Esses sabonetes podem conter umectantes, opacificantes, corantes, perfumes, antioxidantes e antissépticos (HERNADEZ; MERCIER-FRESNEL, 2009). Produtos de limpeza podem conter alta detergência com a propriedade de dissolver a gordura na superfície da pele e mucosa, influenciando negativamente na hidratação, e muitas vezes causando sensibilidade na vulva (FARAGE; LENNON; AJAYI, 2011).

No Brasil, grande parte da população tem o hábito da higienização com sabonetes em barra, mas os sabonetes líquidos estão tomando lugar de destaque nas prateleiras de perfumarias (BEZERRA *et al.* 2016). Estes últimos possuem um custo mais elevado, o que pode explicar sua menor utilização (ESCOBAR *et al.*, 2016). Além disso, possuem indicações específicas, com propriedades que exigem comprovação de segurança e restrições de cuidado, desta maneira, sendo classificados pela ANVISA como produtos de grau 2 (BRASIL, 2015).

Para todos estes produtos, é desejável que eles mantenham seus atributos originais, ou seja, desde a fabricação até o final da sua validade (CRONEMBERGER; PAULA; MEIRELLES, 2015). Componentes da formulação, métodos de fabricação, formas de acondicionamento, condições do ambiente e transporte, são fatores que podem influenciar nas formulações, ou seja, são fatores extrínsecos e intrínsecos que podem comprometer a estabilidade de produtos farmacêuticos e cosméticos (BRASIL, 2004). Portanto, um protocolo de ensaios físico-químicos deve ser realizado após a fabricação, além do monitoramento da estabilidade organoléptica, avaliação microbiológica e testes de biodisponibilidade dos princípios ativos (SILVA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015).

2.5 Extratos vegetais

Para obter um produto fitoterápico ou fitocosmético, são necessárias determinadas etapas de transformação (SOUZA *et al.*, 2015). Seguindo este contexto, a complexidade das matrizes vegetais exige, principalmente, a padronização do processo extrativo (BAJEROVÁ *et al.*, 2014), controlando a técnica de extração e o grau de divisão do material vegetal (GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013). O termo “extrato” deriva do latim *extractus*, que expressa “coisa extraída de outra”, sendo que para este fim, diversos processos, métodos, tempo e solventes podem estar envolvidos (FRANZEN *et al.*, 2018).

Durante a técnica de extração, parâmetros como origem da planta, substância a ser extraída, o tipo do solvente e a temperatura de extração, devem ser cuidadosamente avaliados (COPPA *et al.*, 2017). Portanto, para produzir um produto final tecnologicamente viável e com preços acessíveis, todos os fatores já citados devem ser padronizados (CARDOSO *et al.*, 2017). Além disso, a padronização do método de extração também está relacionada ao rendimento da operação, eficácia e segurança (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

Com a escolha do melhor método extrativo, as substâncias são liberadas da matriz vegetal utilizando um líquido ou uma mistura de líquidos tecnologicamente adequados e seguros (SIMÕES *et al.*, 2003). De maneira geral, a composição de um extrato não obedece de modo qualitativo e quantitativo à composição da droga que lhe deu origem, mesmo que muitas vezes, durante as operações extrativas ocorra a eliminação de algumas substâncias sem interesse terapêutico ou algum material inerte, cujas presenças, poderiam diminuir a estabilidade do extrato (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996). Esta etapa da extração é a mais crítica durante a pesquisa com produtos naturais (COPPA *et al.*, 2017).

Para a garantia que, um produto vegetal ou extratos vegetais, altamente concentrados em substâncias ou grupos de substâncias específicas sejam obtidos, a otimização de metodologias de extração é uma ferramenta muito importante (PARMEZAN *et al.*, 2017). Para o manejo desta prática, é necessário o mínimo de experimentos, com planejamentos fatoriais completos, avaliando os efeitos e possíveis interações dos fatores (SOUZA *et al.*, 2009). Um planejamento experimental permite a inferência estatística e possibilita informações sobre o comportamento das respostas entre os níveis das variáveis em estudo, demonstrando a qualidade da reprodução, minimizando custos, demandas desnecessárias e desperdícios (GARDA; BADIALE-FURLONG, 2008).

Fatores que devem ser padronizados, e os quais podem afetar significativamente o rendimento dos extratos obtidos são, o tipo de solvente utilizado, como: água, etanol, metanol, entre outros (HAYOUNI *et al.*, 2007); temperatura e tempo de extração (FRANZEN *et al.*, 2018). O pH pode ser inserido neste contexto, pelo fato de que também auxilia na extração de determinadas moléculas (SIMÕES *et al.*, 2003; TACON, 2012). Os extratos vegetais podem ser obtidos através de extrações a frio, como turbolização, maceração e percolação; ou por meio de extrações a quente em sistemas abertos, utilizando métodos de infusão e decocção; ou por extração sob refluxo e extração em aparelho de *Soxhlet*, caracterizados como processos a quente em sistemas fechados (SIMÕES *et al.*, 2003).

Citando como exemplo, a decocção é um método extrativo em que a droga é colocada em contato com a água em ebulição, ou seja, a uma temperatura de 100 °C, apresentando como principal vantagem, a diminuição da carga microbiana do produto gerado (SOUZA; LIONZO; PETROVICK, 2006). A técnica de decocção é geralmente utilizada para drogas vegetais lenhosas ou muito compactas, onde cujos constituintes sejam solúveis a quente e suportem as condições de temperatura. De acordo com isso, o emprego dela torna-se restritivo para drogas que contêm essências, que se perderiam na volatilização, para substâncias oxidáveis ou hidrolisáveis pela ação do calor (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996).

Ainda, no que se refere à consistência e aparência dos extratos vegetais, eles podem ser classificados em extratos fluidos, extratos moles e extratos secos (SIMÕES *et al.*, 2017). Os extratos fluidos são apresentados como preparações líquidas, onde uma parte do extrato, em massa ou volume, corresponde a uma parte, em massa, da droga seca, utilizada na sua preparação. Por outro lado, os extratos moles ou espessos apresentam alta viscosidade ou consistência pastosa em temperatura ambiente, e são obtidos a partir dos extratos fluidos após evaporação parcial do solvente, com a adição ou não de adjuvantes (BRASIL, 2010).

No entanto, o que apresenta maiores vantagens frente aos demais, é o extrato seco, uma vez que oferece maior versatilidade tecnológica, melhor estabilidade, simples processo de transporte e armazenamento (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Extratos secos são preparações sólidas obtidas pela evaporação do solvente, ou seja, por meio da eliminação total da fase líquida, apresentando ao final, 95% de resíduo seco, calculados como porcentagem de massa, independentemente da técnica de secagem empregada (BRASIL, 2010). Geralmente, a comercialização de preparações provenientes de plantas ocorre sob a forma de extratos líquidos ou pós, estes últimos resultantes de algum processo de secagem e moagem da droga vegetal, ou da secagem do próprio extrato fluido (SOUZA *et al.*, 2008; AHMAD-QASEM *et al.*, 2016).

A secagem pode ser definida como uma operação utilizada para remoção do líquido de um material através da aplicação de calor (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Para este fim, são utilizados vários modelos de equipamentos e técnicas diferentes, os quais podem ser citados: leito de jorro (*fluidized bed drying*), liofilização e *spray dryer* (GALLO *et al.*, 2015). A escolha do tipo de secador que será empregado dependerá de alguns fatores, como: características da matéria-prima, facilidade de processamento, volume processado, características do produto final e custos (CATELAM, 2010). Nas preparações fitoterápicas, a forma sólida (pó), tem sido a preferida no âmbito industrial, seja para utilização na forma farmacêutica final ou como insumo para demais formas farmacêuticas sólidas, ou mesmo semissólida e líquida (SOUZA *et al.*, 2015).

2.5.1 Secagem por aspersão (*spray drying*)

A operação unitária secagem é amplamente utilizada na produção de fármacos e outros produtos farmacêuticos, com o objetivo de transferir simultaneamente o calor e a massa, acompanhada de transformações físico-químicas (PLA *et al.*, 2018). O processo de secagem é geralmente descrito como a remoção térmica de substâncias voláteis (umidade) para adquirir um produto sólido seco (AMBROSIO-UGRI; TARANTO, 2004).

Substâncias e ingredientes ativos provenientes de plantas atraíram grande interesse pelas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas, para a concepção de novos nutracêuticos, produtos alimentícios funcionais, fitoterápicos, fitocosméticos, conservantes naturais e antioxidantes (BENELLI *et al.*, 2015). A indústria de alimentos e a farmacêutica têm investido altos valores nos últimos anos para o desenvolvimento de produtos secos com vantagens tecnológicas em relação aos produtos líquidos (ARARUNA *et al.*, 2013). Estas vantagens são importantes, pois bioativos à base de plantas, principalmente extratos fluidos, sofrem rápida degradação devido à alguns fatores como, umidade, luz, temperatura e oxigênio (FANG; BHANDARI, 2010).

Por esses motivos, os extratos secos são considerados tecnologicamente viáveis para a produção em larga escala, devido ao fato de proporcionar maior estabilidade física, química e microbiológica das substâncias químicas neles presentes (SOUZA *et al.*, 2015). Assim como, menores custos de transporte e armazenamento são benefícios oferecidos pelo material seco

(BENELLI *et al.*, 2015; GALLO *et al.*, 2015). No entanto, há pesquisas demonstrando que a secagem pode afetar a atividade e a estabilidade dos componentes bioativos, devido a degradação química e enzimática, ou por causa da volatilização e decomposição térmica (DORTA; LOBO; GONZÁLEZ, 2012). Também, em geral, esses extratos secos são altamente sensíveis à umidade atmosférica, proporcionando maior higroscopicidade e ocasionando problemas na forma farmacêutica final (TONG *et al.*, 2008).

Entre os métodos de secagem, a técnica por aspersão (*spray drying*) é o destaque (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010), onde basicamente ocorre a transformação de um produto fluido para o estado sólido (pó), por meio da dispersão de gotículas do material líquido em uma corrente de ar aquecida, no interior de uma câmara de secagem (MASTERS, 1985). A desidratação das gotículas de líquidos atomizadas acontece a partir da superfície (Figura 1), conduzindo para a formação de uma camada externa de material seco. Por intermédio desta camada, o líquido situado no interior da gotícula propaga-se para o exterior (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

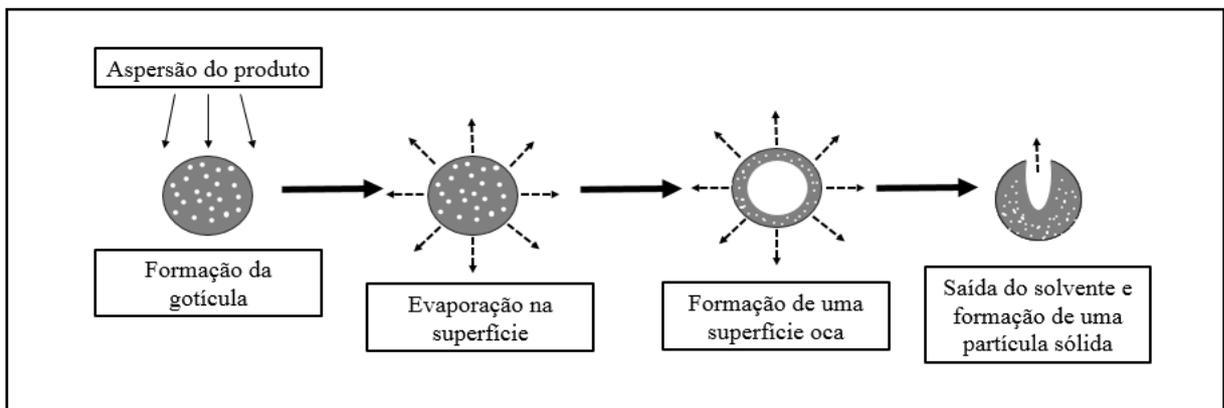


Figura 1 – Representação da formação de partícula através de secagem por aspersão (*spray drying*).
 FONTE: Adaptado de OLIVEIRA; PETROVICK (2010).

No processo de *spray drying* ocorre a geração de gotículas de soluções (aquosas ou orgânicas), suspensões ou emulsões, que são rapidamente transformadas em pó pela ação do ar quente (GONNISSEN *et al.*, 2008). A secagem por aspersão possui como característica importante, o processamento contínuo do material fluido, produzindo pequenos aglomerados com formato quase esférico (DONG *et al.*, 2018). Essa última afirmação é um parâmetro que influencia nas forças que as partículas exibem no fluxo dos fluidos e no empacotamento das partículas quando formam o pó (VEHRING, 2008). Aliás, outros parâmetros relacionados as condições operacionais, por exemplo, temperatura do ar de entrada, vazão de ar, atomização, inclusão ou não de adjuvante de secagem em relação ao resíduo sólido do extrato vegetal fluido,

interferem no rendimento do processo, nas propriedades físico-químicas do extrato seco (GALLO *et al.*, 2015), e diminuem a aderência das partículas na câmara de secagem (*sticking*) (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Já em relação ao tamanho de partícula do pó resultante, os fatores que influenciam são: viscosidade, teor de sólidos, tensão superficial do produto fluido a secar e fluxo de alimentação (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Para extratos derivados de plantas, o uso de adjuvantes pode ser útil no processo de secagem, quando há a necessidade de redução da formação de aglomerados e da higroscopicidade, podendo estes, afetar também as características de biodisponibilidade (SOUZA *et al.*, 2009). Podem ser utilizados como adjuvantes: ciclodextrinas, goma arábica, amido, dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcico, lactose, maltodextrina, entre outros (SILVA JUNIOR *et al.*, 2006). Estes adjuvantes, também denominados de aditivos de secagem, minimizam o efeito de “cola” do produto, impedindo a adesão dele na câmara do secador (TACON, 2012). Cargas eletrostáticas geradas pela passagem no sistema de alimentação, no bico atomizador ou pela fricção nas paredes da câmara e do ciclone, também podem permitir esta adesão. Porém, este efeito diminui durante o processo, após a passagem de várias camadas de pó (MURTOMAA *et al.*, 2004).

Existem vários equipamentos de secagem por atomização (aspersão), sendo os principais, o *spray dryer* e o leito de jorro (Figura 2) (SOUZA, 2003), porém a escolha dependerá do material a ser seco e das características pretendidas para o produto resultante (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Estes equipamentos operam com temperaturas de entrada relativamente baixas, com eficiência similar a outros secadores diretos, apresentando um produto seco com características homogêneas, e sendo adequados para produtos termossensíveis, como os extratos vegetais, pois o tempo de permanência do material na câmara de secagem é relativamente pequeno (MASTERS, 1985). Os extratos secos obtidos podem apresentar características físico-químicas diferentes, como a umidade residual, tamanho de partícula, estabilidade e solubilidade, características essas dependentes do tipo de produto a secar e das condições operacionais do processo (SOUZA *et al.*, 2015).

Spray dryer é amplamente utilizado em processos industriais que compreendam a secagem de gotículas líquidas. Podem ser produzidos por este equipamento pós finos (soltos) (SILVA *et al.*, 2012). Por outro lado, o leito de jorro tem como principal finalidade promover a secagem de materiais granulares, pastas e suspensões, granulação e revestimento de partículas; adicionalmente, extratos secos padronizados oriundos de extratos de plantas medicinais também podem ser produzidos por esta técnica (SOUZA, 2003). Para este último, o

uso do leito de jorro tem sido propagado devido a propriedade de alta taxa de circulação de partículas inertes e da uniformidade da temperatura (SILVA *et al.*, 2012). Na pesquisa de SOUZA (2003), a qual processos de secagem foram comparados, o processo em leito de jorro apresentou boa viabilidade técnica e econômica, tornando-se uma ótima alternativa frente ao *spray dryer*.

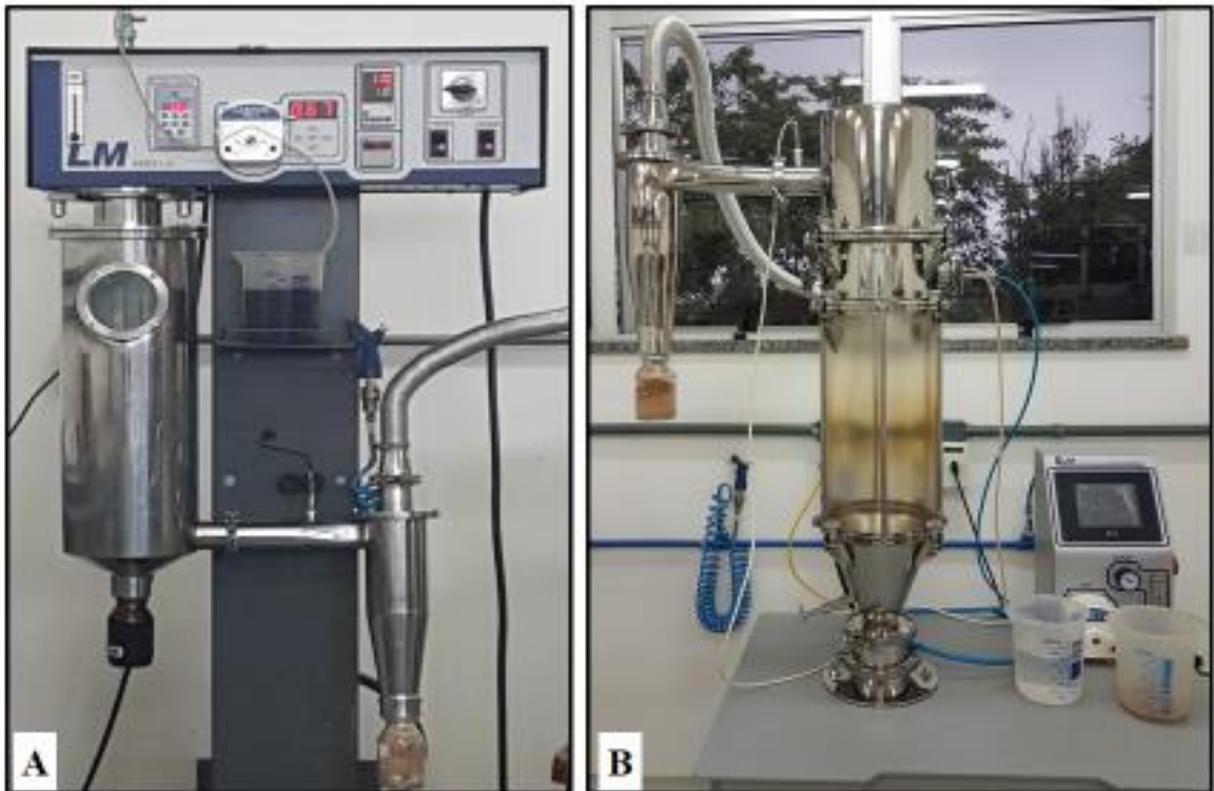


Figura 2 – Modelos de equipamentos utilizados para secagem por aspersão. **A:** *Spray dryer* – LM – MSDi 1.0 Labmaq do Brasil – LTDA; **B:** Leito fluidizado (leito de jorro) – FBD 1.0 Labmaq do Brasil – LTDA.
FONTE: Arquivo Pessoal.

2.6 Descrição das matérias-primas utilizadas

2.6.1 *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrecasas

Endopleura uchi (Huber) Cuatrecasas (*E. uchi*) é uma espécie brasileira encontrada na mata firme em estado silvestre (floresta primária), dissipada por toda a bacia amazônica, abrangendo desde o Peru, até os estados brasileiros, Pará e Amazonas (MARX *et al.*, 2002; SHANLEY; GAIA, 2004; POLITI *et al.*, 2010;). *E. uchi* pertence à família Humiraceae, sendo

esta, constituída por mais outros 7 gêneros, sendo eles, *Duckesia*, *Hylocarpa*, *Humiria*, *Humiriastrum*, *Sacoglottis*, *Shistostemon* e *Vantanea*. Além disso, esta família compreende quarenta e nove espécies, das quais oito ocorrem na América Tropical e uma na costa da África (CUATRECASAS, 1961).

Endopleura é uma palavra derivada do grego, *endon* (dentro), e *pleuron* (costela), devido ao fato das sementes contidas no endocarpo estarem organizadas em estruturas semelhantes a costelas (CARVALHO; MULLER; BENCHIMOL, 2007). Popularmente, esta planta é conhecida na Região Amazônica como: uxi, uchi, uchi-pucu, uxi-amarelo, uxi-liso, uxi-ordinário, cumatê e pururu (CUATRECASAS, 1961; SCHULTES, 1979). Um estudo aperfeiçoado deste vegetal foi realizado por José Cuatrecasas, botânico espanhol, que verificou algumas características diferentes na espécie *Sacoglottis uchi*, anteriormente descrita por Jacques Huber, principalmente na antera (porção terminal do estame das flores) e no endocarpo. A partir disso, criou um novo gênero *Endopleura* para a espécie *uchi*, sendo constituída apenas por um grupo, ou seja, monotípica, e com sinonímia *Sacoglottis uchi* (Huber) (CUATRECASAS, 1961; CAVALCANTE, 1996).

A madeira desta espécie é muito utilizada na construção civil e naval, na marcenaria e carpintaria, principalmente para a fabricação de laminados (SOUZA; MAGLIANO; CAMARGOS, 1997). As cascas desta árvore são usadas pela população da sua região de abrangência, na forma de chá (maceração), pela medicina tradicional, para combater inflamações, tumores, infecções uterinas, artrite, colesterol e diabetes, sendo amplamente comercializadas em feiras e mercados (CORREA, 1984; POLITI *et al.*, 2010). Os frutos desta espécie também são muito apreciados, podendo ser consumidos em polpas, vinhos e óleos, diversificando as formas de preparação da culinária local (SHANLEY; GAIA, 2004; SILVA; TEIXEIRA, 2015).

As árvores de *E. uchi* ocorrem sob baixas densidades nas florestas não manejadas, sendo que na mata, 9 árvores por hectare podem ser encontradas (SHANLEY; MEDINA, 2005). São árvores que apresentam coloração cinza pálida na parte exterior do caule, e avermelhada na parte interna. Elas podem alcançar 25 a 35 m de altura, quando bem desenvolvidas (POLITI *et al.*, 2011). O uxizeiro possui tronco reto, cilíndrico, que pode ter até 1 m de diâmetro, e com cascas espessas (CARVALHO; MULLER; BENCHIMOL, 2007). Devido ao avanço do desmatamento nas florestas tropicais da Amazônia, a população destas árvores já é considerada reduzida (MARX *et al.*, 2002).

As folhas dos uxizeiros são coriáceas, possuem margens serrilhadas e ápice acuminado, no formato elíptico-oblongas e um pecíolo longo, que varia de 1 a 2,3 cm. As veias são opacas e formam um retículo visível. Quando a planta é jovem, as folhas apresentam cor avermelhada, e na fase que está madura, as folhas mudam de coloração para verde escuro (CUATRECASAS, 1961).

Normalmente as flores do uxizeiro aparecem no final do período chuvoso, entre os meses de junho e julho (MARX *et al.*, 2002). A maioria dos uxizeiros produzem frutos em todos os anos, porém a quantidade produzida pode variar (SHANLEY; MEDINA, 2005). Os frutos amadurecem no período de dezembro até junho, caindo nos meses de fevereiro a maio (CAVALCANTE, 1996; SHANLEY; MEDINA, 2005). O fruto do uxizeiro apresenta peculiaridades como: epicarpo liso e com coloração verde-amarelada ou parda-escuro quando maduro, composto por uma dupla camada de 5 a 7 cm de comprimento, e 3 a 4 cm de diâmetro, com peso entre 50 e 70 g. É um alimento apreciado e conhecido na Região Amazônica, principalmente como fonte de subsistência para algumas comunidades rurais (SHANLEY; LUZ; SWINGLAND, 2002).

Segundo pesquisa realizada por Becker *et al.* (2018), o fruto uchi, pode ser considerado fonte de lipídios, proteínas, carboidratos, vitamina C e minerais, como cobre, magnésio, ferro e zinco. Os ácidos graxos identificados na polpa deste fruto são principalmente o ácido oleico (7,38%) e ácido palmítico (3,78%) (MARX *et al.*, 2002). Sendo assim, o fruto de *E. uchi* pode ser considerado um alimento funcional, pois além destes nutrientes, outros estudos demonstraram a presença de carotenoides com atividade pró-vitamina A, como o β -caroteno (MAGALHÃES *et al.*, 2007).

2.6.1.1 Usos terapêuticos

E. uchi é uma planta que merece destaque pela área científica, pois além de ter uma importância econômica e nutricional para a população da Amazônia brasileira, ela pode ser transformada em um medicamento fitoterápico (TACON, 2012). Afirmção que pode ser justificada pelo uso das cascas desta planta com finalidades terapêuticas, principalmente por comunidades do interior do estado do Amazonas e ribeirinhas, onde curandeiros, parteiras e

especialistas em drogas vegetais detêm o conhecimento sobre a preparação e a administração (CARVALHO; MULLER; BENCHIMOL, 2007; SANTOS *et al.*, 2012).

Pedrollo *et al.* (2016) realizaram um levantamento de plantas medicinais utilizadas em cinco comunidades ribeirinhas as margens do Rio Jauaperi, entre os estados de Roraima e Amazonas. Nesta busca, 119 espécies botânicas foram registradas, e entre elas a *E. uchi* foi bastante citada, com descrição do uso das cascas do caule e sementes para o tratamento de dores de estômago, disenteria, doenças que acometem o fígado, anemia, como regulador menstrual e para hemorragias. Do mesmo modo, Santos *et al.* (2012), observou práticas terapêuticas empregadas em comunidades da bacia do Rio Unini no estado do Amazonas, e encontrou muitos relatos sobre *E. uchi* administrada para dismenorrea, metrorragia e cálculos renais. Na maioria dos casos, não há identificação das doses que devem ser administradas, e tão pouco da quantidade de cascas utilizadas para a preparação dos chás.

Mas longe destas localidades interioranas, em cidades maiores, as cascas de *E. uchi* são amplamente comercializadas em mercados e feiras, com indicação de uso na forma de chá, para atuar como anti-inflamatório, principalmente inflamações uterinas, miomas, ovários policísticos, artrite, hipercolesterolemia e diabetes (CORREA, 1984; REVILLA, 2001). Também podem ser atribuídas a extratos aquosos e frações clorofórmicas obtidas das cascas, a atividade antioxidante e ação anti-inflamatória (MUNIZ, 2013). Além de outras indicações exploradas pelos pesquisadores, sendo a ação antimicrobiana, sobretudo contra *Candida albicans*, a mais estudada (POLITI *et al.*, 2011; TACON, 2012).

Quanto aos efeitos tóxicos desta planta, basicamente para a infusão das cascas, alguns testes foram realizados, sendo que não ocorreu citotoxicidade em fibroblastos da córnea de coelhos (SIRC, CCL-60), com valores de sobrevivência de 100%, e na avaliação da toxicidade oral aguda em camundongos (*Mus musculus*) machos, as doses administradas não geraram sinais de toxicidade sistêmica, como alterações fisiológicas ou comportamentais, tampouco, mortes em nenhum dos 20 animais utilizados (POLITI *et al.*, 2010; POLITI *et al.*, 2011).

2.6.1.2 Estudos fitoquímicos das cascas de *E. uchi*

Assim como a *E. uchi*, diversas espécies de plantas possuem fins terapêuticos, onde muitas substâncias são extraídas e utilizadas na produção de medicamentos, ou os extratos são usados no tratamento de enfermidades (CELIK, 2012). Essas substâncias são metabólitos secundários produzidos pelas plantas, divididas em grupos de acordo com sua estrutura química, as quais algumas também podem ser tóxicas para o ser humano (DAI; MUMPER, 2010).

Uma triagem fitoquímica a partir das cascas de *E. uchi* revelou a predominância de dois triterpenos pentacíclicos (ácido masilínico e metil maslinato), e duas substâncias derivadas do ácido gálico (bergenina e dimetil-bergenina) (LUNA, 2000). Nunomura *et al.* (2009) identificou a bergenina como maior constituinte das cascas de *E. uchi*. Inicialmente, a bergenina estava sendo isolada somente do fruto, de modo semelhante ao que ocorria com outras plantas medicinais, como a *Bergenia crassifolia*, *Mallotus philippinensis*, *Corylopsis spicata*, *Caesalpinia digyna*, *Mallotus japonica*, *Humiria balsamifera* e *Sacoglottis gabonensis* (SILVA; TEIXEIRA, 2015).

Na caracterização do extrato aquoso liofilizado, também das cascas do caule, outros constituintes químicos foram identificados, por meio de uma triagem fitoquímica, como a presença de açúcares redutores, glicosídeos cardíacos, purinas, lactonas sesquiterpênicas, outras lactonas e taninos (PINHEIRO; ROSARIO, 2006). Do mesmo modo, outros estudos fitoquímicos, através de fracionamento cromatográfico, revelaram, a partir do extrato bruto em etanol das cascas de *E. uchi*, uma mistura de esteroides formada por β -sitosterol (75,5%) e estigmasterol (24,5%), do triterpeno pentacíclico 3-oxo-friedelina, do triterpeno pseudotaraxasterol (CASTRO, 2013). A bergenina também foi isolada nos galhos e folhas de *E. uchi*, além do triterpeno friedelina (MUNIZ, 2013).

A bergenina, marcador químico desta espécie, é descrita como um C-glicosídeo do 4-O-metil ácido gálico, caracterizada por conter três grupos hidroxila (OH) e dois grupos hidroxila fenólicos, onde estes são potencialmente ativos (SILVA; TEIXEIRA, 2015). Ela é composta por três anéis de seis membros: um anel aromático, um anel glucopiranosose e um anel δ -lactona (Figura 3) (YE; SUN; PAN, 2004). Esta estrutura da molécula da bergenina favorece a formação de seis ligações de hidrogênio intermoleculares e uma intramolecular gerando uma extensa rede de ligações de hidrogênio para a formação do cristal (RASTOGI; RAWATA,

2008). Algumas propriedades desta molécula são importantes destacar, sendo que, ela sofre degradação em pH neutro (cerca de 82,7%) e alcalino, deste modo, sendo muito estável em pH ácido (1.0, 3.0 e 5.0). A bergenina é fracamente solúvel a 25 °C e altamente solúvel em temperaturas acima de 60 °C. Por fim, ela apresenta boa estabilidade a 75% de umidade relativa e 40 °C de aquecimento (FREITAS, 2013).

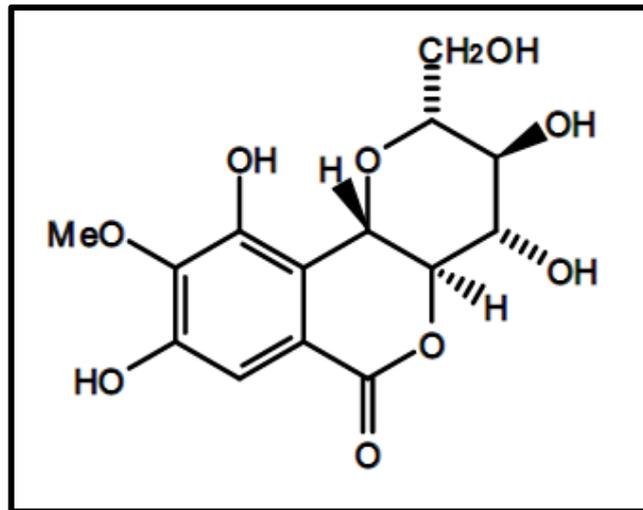


Figura 3 – Estrutura química da bergenina.
 FONTE: Adaptado de NUNOMURA *et al.*, 2009.

Na determinação da ação anti-hepatotóxica da bergenina isolada de *Mallotus japonicus*, os resultados demonstraram atividade reduzida da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e do sorbitol desidrogenase (SDH), liberadas pelos hepatócitos intoxicados com tetracloreto de carbono (CCl₄) (KIM *et al.*, 2000). Já em pesquisa realizada com a bergenina identificada e isolada do extrato metanólico das cascas de *E. uchi*, a ação anti-inflamatória foi testada pela medida da concentração inibitória (CI) de três enzimas: COX-1 e COX-2 (ciclooxigenases) e fosfolipase A2. A bergenina inibiu seletivamente a COX-2, tornando-se alvo para o tratamento da inflamação com segurança gastrointestinal (NUNOMURA *et al.*, 2009). A inibição do crescimento de microrganismos, principalmente leveduras como *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii*, também pode ser atribuída a bergenina (SILVA *et al.*, 2009).

A caracterização farmacocinética das substâncias é primordial durante o desenvolvimento de medicamentos. Isso ocorreu com a bergenina, onde doses de 11,25 mg/kg, administradas por via intravenosa em Ratos Wistar, foram utilizadas para determinar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Por meio do plasma destes ratos, os pesquisadores observaram que a bergenina foi amplamente distribuída e eliminada com

velocidade moderada (SHI; SHI; MENG, 2006). Em outro estudo, foi administrada, dose única, 22,5 mg/kg de bergenina por via oral em ratos, e após análise do plasma, os resultados não foram satisfatórios, indicando que a bergenina é facilmente degradada no sistema digestivo, incluindo metabolismo rápido e má absorção, com eliminação de 33 minutos (QIN *et al.*, 2007).

2.6.2 *Bertholletia excelsa* H. B. K. (castanheira-do-brasil)

A castanheira (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) é considerada uma espécie nativa da Amazônia, a qual foi descrita por Humbolt, Bonpland, e posteriormente por Kunth (FERREIRA *et al.*, 2016). A castanheira é uma árvore tropical e nativa da América do Sul, onde sua área de distribuição abrange países como, Brasil, Peru, Colômbia, Venezuela e Equador (YANG, 2009). Esta árvore possui característica dominante e de grande porte, sendo seu *habitat* restrito a regiões não inundáveis (regiões de terra firme) (MORI, 1990).

Nas florestas, as castanheiras não são encontradas individualmente, mas sim, disseminadas em grupos, denominados de bosques ou castanhais, com 50 a 100 indivíduos, sendo que, a distância entre cada conjunto pode ser de aproximadamente 1 km (WADT; KAINER; GOMES-SILVA, 2005; JR SHEPARD; RAMIREZ, 2011). Conhecidas como as espécies arbóreas mais longevas, maiores e hiperdominantes da Amazônia, elas desempenham papel vital na manutenção deste ecossistema (THOMAS; ATKINSON; KETTLE, 2018).

Quanto a classificação botânica, a *B. excelsa* pertence à família Lecythidaceae, uma das famílias de árvores ecologicamente mais importantes em áreas não inundáveis, porém com bom desenvolvimento nos *habitat* secundários, como por exemplo, em regiões de regeneração após queimadas (MORI, 1990). As castanhas, sementes destas árvores, são conhecidas e apreciadas internacionalmente, razão pela qual, a denominação castanha-do-brasil foi criada pelo Ministério da Agricultura do Brasil, a partir do Decreto 51.209 de 18/09/1961. Porém, popularmente, ela pode ser denominada como: castanha-do-pará, amendoeira-da-américa, castanha-mansa, castanheira e castanheira-verdadeira (LIMA, 2014).

A castanheira atinge até 50 m de altura, apresentando uma copa dominante, com ramos somente nas extremidades; um tronco liso e com coloração acinzentada. Suas folhas são descritas como lâminas coriáceas de base aguda e margens onduladas, verde-escuras na parte

superior e pálidas na inferior, levemente aveludadas. As flores possuem pétalas brancas, grandes e côncavas (COELHO, 2013; FERREIRA *et al.*, 2016). Estas flores aparecem somente nas estações chuvosas e ficam abertas por algumas horas ao nascer do sol, caindo na mesma tarde (WADT; KAINER; GOMES-SILVA, 2005).

Para garantir a produção de frutos, a castanheira depende da ação de agentes polinizadores, principalmente as abelhas médias e grandes (CHAVES, 2007). A maturação destes frutos ocorre por um período de 14 meses, os quais caem, anualmente, durante a estação chuvosa (WADT; KAINER; GOMES-SILVA, 2005). O ouriço, nome designado ao fruto, é composto por duas camadas esféricas lenhosas, onde a externa é de espessura fina e a interna assemelha-se a uma cápsula (pixídio), medindo de 8 a 16 cm de diâmetro. Os ouriços pesam entre 0,5 a 5 kg e são constituídos por 10 a 25 sementes. Uma árvore pode produzir de 63 a 216 frutos por estação (SIMÕES, 2014).

As sementes dos ouriços são comestíveis e denominadas de amêndoas, sendo encontradas em tamanhos variados, de 4 a 7 cm, e peso entre 4 a 10 g. A casca que as envolve é bastante dura e rugosa (SIMÕES, 2014). No sudoeste da Amazônia, a coleta e a queda dos ouriços acontece principalmente nos meses de janeiro e fevereiro (WADT; KAINER; GOMES-SILVA, 2005). Castanheiras maduras podem fornecer de 250 a 500 kg de amêndoas por ano (YANG, 2009).

No Brasil, a castanha-do-brasil é considerada uma das mais importantes sementes oleaginosas e atrai interesses de vários segmentos industriais. Inúmeros modelos de transformação e processamento estão sendo avaliados para melhorar a produtividade desta matéria-prima para obter um melhor custo-benefício (SANTOS *et al.*, 2012). Além disso, estas sementes são valiosas também para muitas pesquisas científicas, devido ao seu potencial biológico e pelo elevado teor de nutrientes, principalmente os nutrientes essenciais (FERREIRA *et al.*, 2016).

O interesse por esta semente oleaginosa está associado à utilização de seus constituintes bioativos, como por exemplo, o selênio, e por seus níveis de ácidos graxos essenciais, os quais podem apresentar capacidade antioxidante, podendo ser aproveitados para elaboração de medicamentos e cosméticos, assim como, em produtos que auxiliem na medicina preventiva (SANTOS, 2012). Além disso, as castanhas-do-brasil são apresentadas como ótimas fontes de nutrientes, incluindo fibras, proteínas, magnésio, fósforo, tiamina, niacina, vitamina E, vitamina B6, cálcio, ferro, potássio, zinco e cobre (YANG, 2009).

As amêndoas são constituídas majoritariamente por óleo (60-70%) e proteína (17%). Porém, quando comparada ao amendoim e castanha-de-caju, as castanhas-do-brasil apresentam o menor teor de proteína, mas a maior relação de proteína:gordura (1:4). As proteínas presentes na castanha-do-brasil são ricas em aminoácidos, permitindo melhor absorção de selênio e outros minerais. O selênio fortemente ligado a proteínas pode ser armazenado em plantas, o que justifica a forma com que o selênio é encontrado nestas amêndoas, onde 96% deste mineral estão ligados a proteínas (CARDOSO *et al.*, 2017; SHANG *et al.*, 2017). Contudo, fatores como: tipo de solo, umidade, pH e maturidade das árvores, podem afetar a quantidade de selênio nas amêndoas (YANG, 2009).

2.6.2.1 Óleo fixo de castanha-do-brasil

Óleos vegetais são formados por uma mistura complexa de ácidos graxos saturados e insaturados, sendo que, quanto maior a proporção de ácidos graxos saturados, maior é a estabilidade do óleo (KONUSKAN; ARSLAN; OKSUZ, 2019). De acordo com a ANVISA, RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005, óleos vegetais e gorduras vegetais podem conter pequenas quantidades de outros lipídios, como fosfolipídios, constituintes insaponificáveis e ácidos graxos livres.

A Floresta Amazônica possui um patrimônio amplo em plantas oleaginosas, cuja exploração comercial é muito importante para o local. Os ácidos graxos encontrados nas principais oleaginosas da Amazônia apresentam alto nível de instauração, dentre os quais se destacam o ácido oleico e o ácido linoleico (KONUSKAN; ARSLAN; OKSUZ, 2019). A presença de ácidos graxos poli-insaturados e vitaminas encontradas nos óleos vegetais desempenham um papel fundamental na saúde humana, sobretudo na prevenção de doenças (SERRA *et al.*, 2019).

O óleo da castanha-do-brasil apresenta boa proporção de ácido graxo insaturado (75,6%), sendo este, comparado pela quantidade, com o azeite de oliva (83%). O alto conteúdo de ácido oleico (29 a 34,55%) e ácido linoleico (37,53 a 42,80%) propiciam interessantes efeitos terapêuticos, tanto para a indústria de cosméticos, quanto para a indústria de medicamentos (CHUNHIENG *et al.*, 2008; QUEIROGA *et al.*, 2009). Este óleo pode ser extraído de diversas formas, dentre elas, citam-se: extração a frio, comumente realizada por prensas hidráulicas ou

mecânicas; extração sólido-líquido, com a utilização de solventes combinados ou isolados, e extração por fluido supercrítico (SANTOS *et al.*, 2012).

O complexo lipídico deste óleo causa um sensorial agradável e suave na pele quando usado em alguns cosméticos ou outro produto farmacêutico, e também preenche as lacunas da camada córnea, assim como, promove a formação de um filme que impede a evaporação excessiva de água, proporcionando ação emoliente e hidratante (ARAÚJO *et al.*, 2007). Devido a esta composição química, o óleo da castanha-do-brasil possui amplas aplicações nas áreas de cosméticos, perfumarias e produtos farmacêuticos (ALVAREZ; RODRÍGUEZ, 2000). Nestas indústrias de cosméticos, os óleos são empregados em formulações como veículos funcionais ou constituintes da fase oleosa em emulsões, destacando que, o ácido oleico é amplamente utilizado na preparação de sabões, sabonetes e emulsões, garantindo as propriedades umectantes e emolientes destes produtos (MATOS; DOURADO; PEREIRA, 2015). Outras propriedades biológicas também podem ser atribuídas ao óleo, quando adicionado principalmente a formulações de sabonetes, como por exemplo, prevenir o crescimento microbiano, exercer atividade anti-inflamatória e auxiliar no controle de erupções cutâneas (ZUBAIR *et al.*, 2018).

Como óleos vegetais são ricos em compostos hidrofóbicos, eles podem agir também como inibidores competitivos da enzima tirosinase, atuando na cadeia da síntese de melanina, podendo tornar-se um ótimo clareador da pele (MONTAZ *et al.*, 2008). Além do que, a presença de substâncias antioxidantes como o selênio, aceleram a atividade da glutathione peroxidase, provocando um aumento na concentração desta enzima, que reduz o número de peróxidos, protegendo as membranas celulares, os ácidos nucleicos e as proteínas contra a degradação dos radicais livres (ARAÚJO *et al.*, 2007).

Do mesmo modo, é possível encontrar a vitamina A, que participa do processo de crescimento, reprodução e formação da pele, agindo principalmente nas unhas e cabelos; e a vitamina E, que previne a peroxidação dos fosfolipídios da membrana e capta elétrons excedentes dos radicais livres, oxidando-os e protegendo a membrana celular. Estas vitaminas quando incorporadas através do óleo em uma forma farmacêutica específica para o cuidado com a pele, pode reduzir rugas e diminuir marcas ou manchas desagradáveis no rosto (ARAÚJO *et al.*, 2007). A vitamina E impede a distribuição dos radicais livres no organismo humano, bloqueando o rompimento das membranas celulares, e conseqüentemente protegendo o DNA celular, evitando distúrbios imunológicos e o envelhecimento precoce (CHUNHIENG *et al.*, 2008).

2.7 Sistema Reprodutor Feminino

A anatomia do aparelho reprodutor feminino compreende um conjunto de órgãos internos (dois ovários, duas tubas uterinas ou trompas de Falópio, útero e vagina), interligado com órgãos externos que formam a vulva (monte do púbis, lábios maiores e menores, clitóris, bulbo do vestíbulo e as glândulas vestibulares maiores) (BEZERRA *et al.*, 2016). Os órgãos internos são constituídos por uma estrutura básica, a qual contém uma parede de músculo liso, mucosa no revestimento interno e uma camada externa de tecido conjuntivo frouxo de sustentação. Alterações cíclicas ocorrem e são normais neste sistema devido à influência de hormônios ovarianos, estrogênio e progesterona, liberados durante o ciclo menstrual (YOUNG *et al.*, 2007).

A vagina humana abrange do colo do útero à vulva, e é uma estrutura que apresenta extrema elasticidade (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2017). Sua mucosa consiste de duas camadas: um epitélio escamoso estratificado, que varia na espessura durante o ciclo menstrual, cerca de 200-400 μm ; e outro é o tecido conjuntivo (também denominado de estroma), com aproximadamente 2,5 a 3 mm de espessura (KATZ; YUAN; GAO, 2016). A vagina não apresenta glândulas na sua estrutura, sendo lubrificada por muco oriundo da cérvix uterina e transudado derivado da rede vascular. As células do epitélio vaginal produzem glicogênio, por ação dos estrogênios, sendo ele convertido em ácido lático, com atuação da flora bacteriana, mantendo o equilíbrio do pH (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2017).

Em mulheres saudáveis, a microbiota vaginal é composta majoritariamente por lactobacilos, garantindo a defesa no local pelo metabolismo do glicogênio, inibindo o crescimento e proliferação de outros microrganismos, principalmente os patogênicos (TABILE *et al.*, 2016). No entanto, recentes estudos, evidenciaram que além do glicogênio, os lactobacilos dependem adicionalmente da α -amilase para se desenvolverem e exercerem seu papel de proteção (NASIOUDIS *et al.*, 2015). O pH vaginal depende também do balanço entre os íons H^+ e HCO_3^- (GIRIBABU; KARIM; SALLEH, 2018). A faixa de pH normal ou ideal ocorre entre 4 a 5,5 (WEISBERG *et al.*, 2005). Durante a menopausa, alterações do fluido vaginal são aparentes, onde ocorre aumento do pH, devido aos baixos níveis de estrogênio, diminuindo o conteúdo de glicogênio, predispondo a vagina à infecções (MIRMONSEF *et al.*, 2014; PANDA *et al.*, 2014). Secreções vaginais geralmente acontecem durante o período menstrual e em algumas etapas do ciclo de vida feminino, porém em alguns casos esta secreção pode ser um sinal patológico da paciente (TABILE *et al.*, 2016).

2.7.1 Infecções vaginais ou vulvovaginites

Infecções vaginais compreendem cerca de 70% das queixas de mulheres em consultas ginecológicas, sendo que, as principais identificadas são: a vaginose bacteriana (na maioria das vezes ocasionada por *Gardnerella vaginalis*), candidíase vulvovaginal (principalmente *Candida albicans*), e tricomoníase (*Trichomonas vaginalis*) (ANDRADE *et al.*, 2014). Nos atendimentos realizados na atenção primária de saúde, pacientes com alguma destas infecções representam a maioria das consultas médicas, sendo que a prevalência ocorre em mulheres com idade entre 20 e 30 anos (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2017).

Durante a idade reprodutiva, a infecção que mais ocorre no trato genital inferior é a vaginose bacteriana, afetando milhões de mulheres anualmente em todo o mundo, sendo caracterizada pela substituição da microbiota vaginal predominante em lactobacilos, por colonização de bactérias patogênicas (KALRA *et al.*, 2007). Além da *Gardnerella vaginalis*, outras bactérias podem causar este tipo de infecção, como no caso de *Streptococcus pyogenes* (64% dos casos) e *Haemophilus influenzae* (16% dos casos). 4,6% das queixas clínicas são causadas por *Neisseria gonorrhoeae*, conhecida como agente de infecções sexualmente transmissíveis (IST) (DAVAL-COTE *et al.*, 2013). A faixa ótima de pH vaginal para crescimento da *Gardnerella vaginalis* fica entre 6,0 e 6,5, tornando difícil também a sua fixação nas células do epitélio (AROUTCHEVA *et al.*, 2001). O tratamento de primeira escolha para vaginose bacteriana é o metronidazol, o qual pode ser administrado por via oral ou vaginal, com duração de 7 a 10 dias (BAHAMONDES *et al.*, 2011).

A candidíase vulvovaginal é uma infecção da vulva e da vagina, ocasionada por várias espécies de leveduras do gênero *Candida* spp., tornando-se patogênicas sob determinadas mudanças no ambiente vaginal (TABILE *et al.*, 2016). Mudanças no pH, na microbiota vaginal, e até fatores endógenos do hospedeiro, podem desencadear a doença (BOATTO *et al.*, 2007). Esta infecção é estimada como sendo a segunda maior causa de vaginite, após a vaginose bacteriana, e embora a maioria esteja relacionada a *Candida albicans*, outras espécies de *Candida* são responsáveis por 50% das leveduras encontradas em isolados de pacientes (PFALLER; DIEKEMA, 2004). Em um levantamento com 82 isolados de *Candida* obtidas de pacientes com vulvovaginites, as espécies mais encontradas foram: *Candida albicans* (41,5%), *Candida famata* (15,8%), *Candida tropicalis* (13,4%) e *Candida parapsilosis* (11%) (SHIRKHANI *et al.*, 2016).

Fatores de virulência como formação de tubo germinativo, troca fenotípica, adesinas, formação de biofilme e produção de enzimas hidrolíticas, contribuem para a patogênese da candidíase (CUTLER, 1991). As manifestações clínicas mais comuns para esta forma de vaginite são: leucorreia, prurido, placas esbranquiçadas, edema, eritema na vulva e vagina (BOATTO *et al.*, 2007). Agentes antifúngicos triazólicos têm sido a primeira linha para o tratamento de candidíases vaginais, porém sua suscetibilidade *in vitro* não é preditiva do sucesso terapêutico, e a resistência a essas drogas também podem estar envolvidas na ineficácia da terapia, sobretudo em casos recorrentes (MARTINS *et al.*, 2012).

O uso de antibióticos, diabetes, gravidez, uso de contraceptivos orais, uso de roupas justas, uso de absorventes, deficiências imunológicas específicas e hábitos de higiene inadequados, são os fatores que podem desencadear a candidíase (ROSA; RUMEL, 2004). A higiene íntima feminina serve para remover o excesso de resíduos, e conseqüentemente, prevenir infecções. Contudo, os efeitos de uma higiene imprópria e suas conseqüências, não são relatados frequentemente. Produtos para higiene íntima feminina são largamente encontrados atualmente, com alta diversidade de produtos como, sabonetes líquidos, loções, lenços e absorventes; porém todos devem ser usados corretamente para que não causem malefícios a saúde das mulheres (RUIZ *et al.*, 2019). Mas poucos estudos existem até o momento para avaliar os efeitos dos sabonetes íntimos sobre os sintomas da vulvovaginite (GUINOT *et al.*, 2019).

Os medicamentos da classe dos azóis são os mais comuns para o tratamento da candidíase vulvovaginal. O alvo deles é a via biossintética do ergosterol, sendo este um importante componente da membrana celular de *C. albicans* (BHATTACHARYA; SOBEL; WHITE, 2016). Além de medicamentos por via oral, outras terapias podem ser implantadas para o tratamento tópico da candidíase, como supositórios e cremes vaginais (DANBY *et al.*, 2012). O manejo das pacientes com este tipo de infecção é difícil devido as poucas opções de medicamentos disponíveis e devido à resistência cruzada de *C. albicans* ao itraconazol e fluconazol, agentes antifúngicos de primeira escolha (DAMKE *et al.*, 2011). Outras recomendações para as pacientes com vulvovaginites, concomitante com a terapia antimicrobiana, são os produtos para a higiene íntima, que podem causar alívio dos sintomas (GUINOT *et al.*, 2019). Com isso, novas pesquisas são necessárias para melhorar a escolha terapêutica para vulvovaginites causadas por leveduras de todas as espécies de *Candida*, assim como, novas formulações de produtos os quais estes microrganismos não sejam resistentes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Obter duas formas farmacêuticas para uso tópico contendo extrato seco de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrecasas e óleo de *Bertholletia excelsa* H. B. K., visando o tratamento e a prevenção de vulvovaginites.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar, por metodologias físico-químicas, as matérias-primas vegetais;
- Aplicar planejamentos experimentais para otimizar o método de obtenção do extrato líquido de *E. uchi*;
- Caracterizar as soluções extrativas aquosas de *E. uchi*;
- Verificar a influência de técnicas de secagem por aspersão (*spray drying*) e leito de jorro (*fluidized bed drying*) na obtenção de extrato seco de *E. uchi*;
- Caracterizar o extrato seco de *E. uchi* obtido;
- Estudar a atividade citotóxica de ambas as espécies vegetais;
- Quantificar o marcador químico (bergenina) nos extratos secos de *E. uchi* obtidos;
- Quantificar polifenóis e analisar a atividade antioxidante do extrato seco de *E. uchi*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos secos de *E. uchi* contra cepas de *Candida* e contra a bactéria *Staphylococcus aureus*;
- Desenvolver formulações para uso tópico utilizando ambas as espécies vegetais;
- Avaliar a estabilidade por 30 dias das formulações obtidas através de análises organolépticas e testes físico-químicos;
- Testar a atividade antifúngica das formulações obtidas;
- Avaliar a atividade antioxidante das formulações obtidas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Na ilustração abaixo, seguem as etapas do processo desta pesquisa:

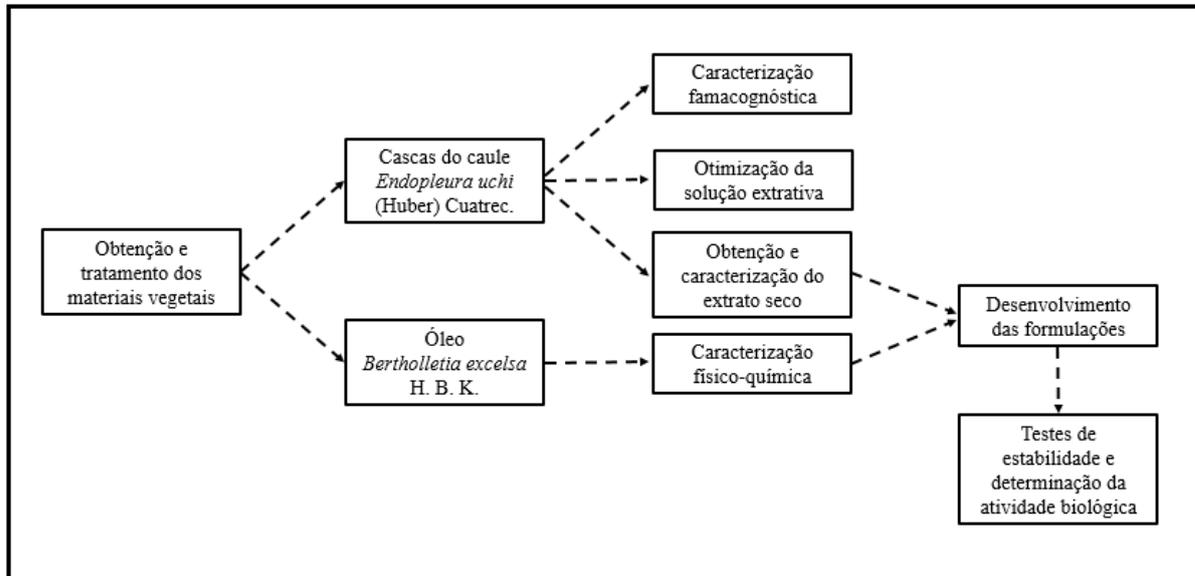


Figura 4 – Fluxograma apresentando as etapas da metodologia empregada nesta pesquisa.

FONTE: O Autor.

4.1 Reagentes

- Ácido acético;
- Ácido fórmico;
- Ácido sulfúrico;
- Meio Ágar HIMEDIA[®];
- Alamar Blue[®];
- Amido solúvel;
- Biftalato de potássio;
- Caldo Sabouraud-dextrose;
- Carbonato de sódio;
- Clorofórmio;

- Dimetilsulfóxido (DMSO);
- Etanol;
- Éter etílico;
- *Folin & Ciocalteu's phenol*;
- Iodeto de potássio;
- Meio de cultura RPMI;
- Metanol grau HPLC;
- Padrão bergenina- pureza 98% - CN Lab. Nutrition®;
- Persulfato de potássio;
- Solução de Alamar Blue®;
- Tiosulfato de sódio;
- Fenolftaleína;
- Hidróxido de sódio;
- Meio de cultura BHI BD®;
- Meio sólido de ágar Muller Hinton;
- Polissorbato 80 (Tween™ 80);
- Solução salina 0,85%

4.2 Equipamentos

- Agitador eletromagnético Bertel®;
- Balança analítica Shimadzu® - Modelo AUY-220;
- Balança de umidade digital/infravermelho Shimadzu® - Modelo MOC 120H;
- Banho-maria Quimis® modelo 0334 M-28;
- Câmara climática ethik®;

- Cartucho SEP-PAK® C₁₈ Cartridge;
- Centrífuga Centribio®;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Thermo Scientific™;
- Estufa de ar circulante Solab® SL 102;
- Filtro à vácuo;
- Forno mufla 220V;
- Leito fluidizado (leito de jorro) – FBD 1.0 Labmaq do Brasil – LTDA;
- Leitor de microplacas Multimode Detetor Beckman® DTX 800;
- Manta aquecedora Nova Instruments®;
- Medidor de pH Hanna Instruments®;
- Moinho de facas Tecnal®;
- Picnômetro;
- Prensa hidráulica;
- Refratômetro de Abbé;
- Reômetro Brookfield® Modelo R/S +;
- *Spray dryer* – LM – MSDi 1.0 Labmaq do Brasil – LTDA;
- Viscosímetro Brookfield® Digital Modelo DV-II + Pró;

4.3 Obtenção e tratamento dos materiais vegetais

De acordo com a Lei da Biodiversidade (lei 13.123/2015), esta pesquisa foi cadastrada sob o código A95A37 no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

4.3.1 *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrecasas

O material vegetal utilizado foi constituído por cascas secas e rasuradas de *E. uchi*, adquiridas comercialmente na loja de Produtos Naturais Dr. Juan Revilla, as quais foram coletadas pela Associação dos Trabalhadores Rurais de Eirunepé, da comunidade de Três Unidos, localizada a 10 km abaixo do Município de Eirunepé, no Estado do Amazonas, à margem direita do Rio Juruá, durante os meses de julho até novembro, época do ano com poucas chuvas na Região Norte do Brasil. A identidade botânica do material vegetal foi comprovada através da exsicata nº 276857 depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

O material vegetal ao chegar ao laboratório foi avaliado o teor de umidade, através de perda por dessecação a fim de verificar a necessidade de secagem adicional antes da cominuição. Posteriormente, esse material foi submetido à secagem em estufa de ar circulante, sob temperatura de 40 ± 2 °C durante 3 dias, com o objetivo de retirar a umidade da amostra para um armazenamento adequado e favorecer o processo de moagem e extração, assim como, impedir a degradação microbiológica.

4.3.2 *Bertholletia excelsa* H. B. K. (castanha-do-brasil)

As amêndoas da *Bertholletia excelsa* H. B. K. obtidas a partir das suas sementes com cascas foram adquiridas comercialmente através da Cooperativa Agrofrutífera dos Produtos de Urucará (AGROFRUT), situada na Rua Dona Doquinha, nº 247, bairro de Aparecida, Município de Urucará, no Estado do Amazonas.

As sementes foram higienizadas com água e cloro ativo a 200 ppm durante 20 minutos e colocadas em estufa de ar circulante, à temperatura de 60 °C por 12 horas. Em seguida, foi executada a operação de descascamento das sementes para retirada das amêndoas, através de uma prensa manual e com auxílio de um alicate ou uma faca comum. Nesta etapa, foram selecionadas as amêndoas que apresentaram coloração branca leitosa e sem odor característico de óleo rançoso. Posteriormente, estas amêndoas foram colocadas novamente em estufa de ar circulante à 60 ± 2 °C por 36 horas.

A extração do óleo fixo de castanha-do-brasil foi realizada a partir da amêndoa inteira, por prensagem mecânica, e logo em seguida, o óleo foi filtrado por filtração à vácuo.

4.4 Caracterização físico-química do óleo de *Bertholletia excelsa*

As análises do óleo de castanha-do-brasil foram realizadas de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz 4ª edição (2008).

4.4.1 Determinação do índice de acidez

Esse método fornece uma avaliação do processo de decomposição do óleo por meio da alteração de concentração dos íons hidrogênio. Para isso, em um erlenmeyer com 2 g da amostra (homogênea e líquida) adicionou-se 25 mL da solução de éter-álcool (2:1) neutra. Em seguida, foram acrescentadas duas gotas do indicador fenolftaleína para a titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 M padronizada até o aparecimento de uma coloração rósea, a qual permaneceu por 30 segundos. Os resultados foram expressos em mg KOH/g, através do seguinte cálculo:

$$\text{Índice de Acidez} = \frac{v \times f \times 5,610}{P}$$

Onde:

v = n° de mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 M padronizada;

P = n° de g da amostra.

4.4.2 Determinação do índice de peróxido

Pesou-se 5 g do óleo da castanha-do-brasil em um erlenmeyer de 250 mL. Adicionou-se, nestas amostras, 30 mL de solução de ácido acético-clorofórmio (3:2 v/v) e 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Após repouso de um minuto, acrescentou-se 30 mL de água e efetuou-se a titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,1 N padronizada até desaparecimento da coloração amarela. Logo então, adicionou-se 0,5 mL de solução indicadora de amido, continuando-se a titulação até o completo desaparecimento da coloração azul. Preparou-se uma prova em branco, sob as mesmas condições e titulação. O índice de peróxido foi calculado conforme equação abaixo:

$$\text{Índice de peróxido} = \frac{(A - B) \times N \times f \times 1000}{P}$$

Sendo que:

A = nº de mL da solução de tiosulfato de sódio 0,1 N gasto na titulação da amostra;

B = nº de mL da solução de tiosulfato de sódio 0,1N gasto na titulação do branco;

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio;

f = fator de correção da solução de tiosulfato de sódio padronizada;

P = nº de g da amostra.

4.4.3 Determinação do índice de refração

Ajustou-se previamente o refratômetro de Abbé com água para calibração. Em seguida, algumas gotas do óleo foram colocadas no prisma inferior e aguardou-se até a amostra atingir a temperatura do aparelho. Realizaram-se três leituras para determinação da média do índice de refração.

4.4.4 Determinação da densidade relativa

Adicionou-se cuidadosamente o óleo no picnômetro de vidro de 25 mL e pesou-se. A densidade relativa foi calculada (d_{25}^{25}) determinando a razão entre a massa da amostra líquida (o óleo) e a massa da água, ambas a 25 °C. O resultado foi expresso pela média de três determinações através do cálculo:

$$\frac{A - B}{C} = \text{densidade relativa a } (25/25) \text{ } ^\circ\text{C}$$

Onde:

A = massa do recipiente contendo óleo;

B = massa do recipiente vazio;

C = massa da água à temperatura de 25 °C.

4.4.5 Determinação da viscosidade aparente e comportamento reológico

As análises reológicas do óleo foram realizadas através do viscosímetro Brookfield Digital DV-II + pró, com variação da velocidade de 0 a 120 rpm (curva ascendente) e de 120 a 0 rpm (curva descendente), em intervalos de 10 segundos e 20 pontos para leitura. O *spindle* utilizado foi SC-34. A curva da viscosidade vs. a taxa de cisalhamento foi obtida a temperatura de $25 \pm 0,1$ °C.

4.4.6 Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada em linhagens de fibroblastos (MRC-5). Esse teste foi feito através do ensaio Alamar Blue®. As células foram semeadas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células/poço em microplacas de 96 poços. As células foram tratadas com o óleo nas concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, em triplicata. Após 24 horas de tratamento, 10 µL da solução de Alamar Blue® 0,4% foi adicionada em cada poço das placas, e após 3 horas de incubação na placa com MRC-5, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de microplacas Elisa (DTX800 Beckman e Coulter). A doxorubicina (5 µg/mL) foi utilizada como controle positivo (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994).

4.5 Controle de qualidade da MPV *E. uchi* (cascas rasuradas)

4.5.1 Análise granulométrica por tamisação

Cerca de 50 g da MPV foram submetidas à passagem através de tamises com abertura de malha 1 mm; 0,850 mm; 0,710 mm; 0,600 mm; 0,500 mm; 0,425 mm; 0,355 mm e 0,250 mm. A tamisação ocorreu em um agitador mecânico, utilizando 60 vibrações por segundo, durante 15 minutos. Após esse tempo, as amostras retidas em cada tamis foram pesadas e analisadas. O ensaio foi realizado em triplicata (BRASIL, 2010).

Os percentuais retidos foram determinados de acordo com a equação abaixo, e expressos graficamente por meio de histograma para verificar a granulometria e a classificação do tamanho das cascas rasuradas.

$$\% \text{ Retida pelo tamis} = \frac{P1}{P2} \times 100$$

Onde:

P1 = Peso da amostra retida em cada tamis (em gramas);

P2 = Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas).

O diâmetro médio foi obtido através da equação descrita por Allen Junior; Popovich; Ansel (2007), conforme equação seguinte:

$$D_m = \frac{\sum(\% \text{ retida} \times \text{abertura média do tamis})}{100}$$

Onde:

D_m = Diâmetro médio.

4.5.2 Perda por dessecação em balança de infravermelho

O procedimento foi realizado no dia do recebimento da MPV e diariamente durante o processo de secagem em estufa. Foi pesado cerca de 1 g das cascas rasuradas e distribuídas uniformemente no coletor do alumínio contido dentro do aparelho. A análise ocorreu sob temperatura de 105 °C e em triplicata (BRASIL, 2010).

4.6 Caracterização farmacognóstica das cascas cominuídas de *E. uchi*

4.6.1 Análise granulométrica por tamisação

Este teste foi realizado conforme descrito no **item 4.5.1**.

4.6.2 Determinação da perda por dessecação (PD)

Para este método gravimétrico, foi pesada 1 g das cascas pulverizadas da MPV e transferidas para pesa-filtros chatos previamente dessecados nas mesmas condições empregadas para esta determinação. Agitou-se os pesa-filtros tampados para distribuir a amostra de maneira uniforme. Após isso, eles foram colocados em estufa por 2 horas, sob uma temperatura de $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Decorrido este tempo, os pesa-filtros foram retirados da estufa e resfriados em dessecador por 30 minutos, e pesados. Toda a operação foi repetida, porém com tempo de secagem de 1 hora, até obtenção de peso constante. O procedimento foi executado em triplicata e a porcentagem de perda por dessecação foi definida conforme cálculo a seguir (BRASIL, 2010).

$$PD = \frac{P_u - P_s}{P_a} \cdot 100$$

Em que:

P_a = Peso inicial da amostra;

P_u = Peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação;

P_s = Peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

4.6.3 Determinação do teor extrativo (TE)

Foram pesadas 1,5 g da MPV cominuída e submetidas à extração com 150 mL de água, sob decocção, por 10 minutos. Após resfriamento e recomposição do volume evaporado, o produto foi filtrado, desprezando-se os primeiros 20 mL. Em seguida, 20 g do restante filtrado foram colocados em pesa-filtros previamente tarados, e evaporados por completo em banho-maria, agitando-se ocasionalmente. Os pesa-filtros contendo o resíduo foram transferidos para uma estufa com temperatura de $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, aonde permaneceram por 2 horas. Após foram colocados em dessecador por 30 minutos para resfriamento e pesados. O procedimento foi

repetido até peso constante dos pesa-filtros, com intervalos de 1 hora de secagem em estufa (BUNDESVEREINIGUNG, 1986).

O resultado foi expresso pela média de três determinações, sendo TE calculado segundo equação abaixo:

$$TE = \frac{g \cdot FD \cdot 100}{m - \left(m \cdot \frac{PD}{100}\right)}$$

Onde:

TE = Teor de extrativos (% m/m);

g = massa (g) do resíduo seco;

FD = Fator constante (7,5);

m = massa (g) da amostra;

PD = Perda por dessecação da amostra (% m/m).

4.6.4 Determinação de cinzas totais

Esta determinação foi executada com 3 g da amostra cominuída colocadas em cadinhos de porcelana, as quais foram submetidas ao fogo até completa combustão (ausência de fumaça), apresentando cinzas brancas ou ligeiramente acinzentadas. Em seguida, os cadinhos foram transferidos para um forno mufla e incinerados a temperatura de 550 °C por 3 horas. Transcorrido este tempo, os cadinhos foram retirados, resfriados em dessecador por 30 minutos e pesados. Este método foi repetido até peso constante e em triplicata (INSTITUDO ADOLFO LUTZ, 2008; BRASIL, 2010).

A determinação foi realizada através do seguinte cálculo:

$$CT(\%) = \frac{P2 - P1}{P3} \times 100$$

Sendo:

CT = Porcentagem de cinzas totais

P1 = Peso do cadinho após a calcinação e esfriamento (tara do cadinho);

P2 = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador;

P3 = Peso inicial da amostra.

4.6.5 Determinação de polifenóis totais (PT)

Inicialmente, foram pesadas 0,750 g das cascas moídas de *E. uchi* e transferidas para um balão de fundo redondo com 150 mL de água destilada. A preparação foi mantida em decocção por 10 minutos, e em seguida, resfriada a temperatura ambiente. Posteriormente o conteúdo foi colocado em um balão volumétrico de 250 mL, completado o valor, deixando em repouso para decantar o material sólido. Em seguida, a solução foi filtrada, desprezando os primeiros 50 mL, e o restante constituiu a amostra a ser analisada (Adaptado de BRASIL, 2010).

A concentração de PT foi quantificada usando 10 µL do filtrado numa concentração de 1 mg/ml, em microplaca, adicionando 50 µL de *Folin & Ciocalteu's phenol* 10% e incubados no escuro por 8 minutos a temperatura ambiente. Logo após esse tempo foi adicionado 270 µL de solução saturada de carbonato de sódio 0,4% e incubado novamente por 3 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura na absorvância em 620 nm no leitor de microplaca (Multimode Detetor DTX 800 da Beckman). O teor fenólico da amostra foi expressa em porcentual comparados com padrão ácido gálico e também como µg equivalente a ácido gálico (µg EqAG) quando comparado à diluição consecutiva do padrão (KIM; PARK; KIM, 2013).

$$PT(\%) = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100$$

4.7 Otimização do processo para obtenção da solução extrativa (SE) aquosa das cascas pulverizadas de *E. uchi*

As SEs foram obtidas através de extração a quente por decocção sob refluxo, utilizando como solvente a água, com variação da quantidade de MPV e tempo de decocção. A otimização da extração foi realizada seguindo os planejamentos fatoriais descritos abaixo.

4.7.1 *Screening* de variáveis com repetições das interações

Para avaliar a influência de específicos fatores sobre as propriedades da solução extrativa aquosa, foi executado um *screening* de variáveis com repetições das interações, onde foram estudados dois fatores em dois níveis. Este experimento avaliou o teor de sólidos (TS), o teor de PT, e a quantidade de bergenina, em função da relação droga:solvente (fator X₁), com dois níveis denominados baixo (-) e alto (+), e tempo de decocção (fator X₂), também em dois níveis, baixo (-) e alto (+), com duas repetições dos experimentos, conforme descrito na Tabela 1 e Tabela 2, totalizando 8 ensaios.

Fatores	Unidade	Níveis	
		-1	+1
X ₁ - Relação droga:solvente	% (m/v)	5	10
X ₂ - Tempo de decocção	min	5	20

Tabela 1 – Valores utilizados no screening de variáveis para a otimização do processo de extração de *E. uchi*.

Ensaio	Relação droga:solvente	Tempo de decocção
1	-1	-1
2	-1	-1
3	+1	-1
4	+1	-1
5	-1	+1
6	-1	+1
7	+1	+1
8	+1	+1

Tabela 2 – Matriz do delineamento experimental.

Após término do processo extrativo, foi realizada uma filtração grosseira do extrato líquido, e logo em seguida, foi executada a filtração fina à vácuo.

4.7.1.1 Determinação do Teor de Sólidos Solúveis (Resíduo Seco) – TS

Foram transferidos 20 mL das SE, exatamente pesados, para pesa-filtros previamente tarados, e evaporadas até secura em banho-maria. Após isso, os resíduos foram dessecados em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 2 horas. Em seguida, colocados em um dessecador para esfriar por 30 minutos e pesados. O processo foi repetido até peso constante, de 1 em 1 hora, e em triplicata. O TS foi calculado em porcentagem sobre a massa do volume da SE pesado inicialmente (BRASIL, 2010).

4.7.1.2 Determinação de PT

A determinação de PT foi quantificada usando 10 μL da solução em uma concentração de 1 mg/ml, em microplaca, adicionando 50 μL de *Folin & Ciocalteu's phenol* 10% e incubados no escuro por 8 minutos a temperatura ambiente. Logo após esse tempo foi adicionado 270 μL de solução saturada de carbonato de sódio 0,4% e incubado novamente por 3 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura na absorbância em 620 nm no leitor de microplaca. O teor fenólico da amostra foi expresso em porcentual comparados com padrão ácido gálico (KIM; PARK; KIM, 2013).

$$\text{PT(\%)} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100$$

4.7.1.3 Quantificação de bergenina

As oito SE obtidas foram previamente secas em leito de jorro, sob os parâmetros descritos na Tabela 3, para viabilizar o teste de quantificação.

Parâmetros	Condições
	Leito de jorro
Temperatura de entrada	110 °C
Δ de temperatura de saída	89 °C - 90 °C
Vazão de ar de secagem	1,5 m ³ /min
Pressão do ar comprimido	30 L/min
Bico do pulverizador	1,0 mm
Velocidade de alimentação	7 mL/min

Tabela 3 – Parâmetros de secagem para o equipamento leito de jorro.

Logo, foram pesados 10 mg de cada extrato seco (ES) e dissolvidos em 5 mL de água destilada, e em seguida, submetidos a um pré-tratamento em cartucho SEP-PAK C₁₈ Cartridge. Em cada coluna, além das amostras, foram adicionados 5 mL de metanol (MeOH). Posteriormente, a solução resultante foi homogeneizada, e cada extrato foi diluído em metanol para obter uma concentração de 1 mg/mL.

A quantificação de bergenina foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por meio de um cromatógrafo da marca Thermo ScientificTM, modelo Finnigan Surveyor, com detector UV-Vis (PDA Plus Detector), injetor ACCELA 600 Pump automático e software LC Solutions.

O método utilizado foi adaptado de Nunomura *et al.* (2009), sendo empregado análise em modo isocrático, utilizando coluna C-18 Shim-PACK CLS-ODS (280 mm x 4 mm, e 5 μ m de tamanho de partícula). Como fase móvel foram utilizados 15% metanol grau HPLC em 1% de ácido fórmico (pH = 2). Para a preparação da curva analítica padrão, foi utilizado o padrão bergenina em solução a partir da concentração de 100 μ g/mL, sendo diluída até a concentração de 6,25 μ g/mL, resultando em 5 concentrações. Este padrão foi analisado no comprimento de onda UVC de 272 nm, com injeção de 50 μ L de cada amostra em triplicata.

4.7.2 Caracterização físico-química das SEs obtidas de *E. uchi*

4.7.2.1 Determinação do pH

Esta determinação foi realizada com alíquotas de 10 mL das SEs e medidas em triplicata pelo pHmetro previamente calibrado com soluções tampão de pH 7,01 e 4,01 (BRASIL, 2010).

4.7.2.2 Determinação da densidade relativa

Foi utilizado picnômetro de vidro limpo e seco, com capacidade de, no mínimo, 25 mL que tenha sido previamente calibrado. A calibração consiste na determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água a 25°C. A amostra de SE foi transferida para o picnômetro e ajustada a temperatura para 25°C. Em seguida foi obtido o peso da amostra através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa foi calculada (d_{25}^{25}) determinando a razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 25°C (BRASIL, 2010). O resultado foi expresso pela média de três determinações.

4.7.3 Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² com repetições do ponto central

Para maior certeza de se alcançar o objetivo, foi necessário mais de um planejamento fatorial, como uma estratégia sequencial de planejamentos em direção à condição desejada. Com isso, foi executado um delineamento composto central rotacional 2², incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos (RODRIGUES, 2009). Os níveis utilizados e as análises experimentais deste planejamento estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente, permanecendo os mesmos fatores citados anteriormente, sobre o TS e PT, como respostas.

Variáveis	Unidade	Níveis				
		-1,41	-1	0	+1	+1,41
X ₁ - Relação droga:solvente	% (m/v)	3,96	5	7,5	10	11,04
X ₂ - Tempo de decocção	min	2,93	5	10	15	17,07

Tabela 4 – Valores utilizados no DCCR como uma estratégia sequencial direcionando para a otimização do processo de extração de *E. uchi*.

Ensaio	Relação droga:solvente	Tempo de decocção
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Tabela 5 – Matriz do delineamento experimental DCCR.

4.7.3.1 Determinação do TS

A determinação para TS foi realizada conforme descrito no **item 4.7.1.1** desta pesquisa.

4.7.3.2 Determinação de PT

A quantificação de PT foi realizada conforme descrito no **item 4.7.1.2** desta pesquisa.

4.8 Preparação dos extratos secos (ES) de *E. uchi*

A solução extrativa (SE) aquosa, preparada com 10% (m/v) de droga vegetal por método extrativo de decocção pelo tempo de 5 minutos, foi submetida ao processo de secagem por aspersão, utilizando dois equipamentos distintos, o *spray dryer* e o leito de jorro (*fluidized bed*). A secagem por aspersão foi realizada sem adjuvantes, em condições delimitadas experimentalmente para cada equipamento, conforme Tabela 6. Para uniformizar o processo, foram testados em ambos os equipamentos, diferentes fluxos (vazão/velocidade de alimentação), sendo eles: 7 mL/min, 5 mL/min e 3 mL/min. Por fim, os extratos secos foram caracterizados e avaliados pelo rendimento, umidade e morfologia, com objetivo de escolher o método mais adequado para dar continuidade aos estudos tecnológicos a fim de viabilizar o desenvolvimento das formulações de uso tópico, principalmente para a etapa de incorporação dos extratos nos cremes e sabonetes líquidos.

Parâmetros	Condições	
	Leito de jorro	<i>Spray dryer</i>
Temperatura de entrada	110 °C	110 °C
Δ de temperatura de saída	96 °C - 102 °C	86 °C - 95 °C
Vazão de ar de secagem	1,5 m ³ /min	3,8 m ³ /min
Pressão do ar comprimido	30 L/min	30 L/min
Bico do pulverizador	1,0 mm	1,2 mm

Tabela 6 – Parâmetros de secagem para os equipamentos: leito de jorro e *spray dryer*.

4.9 Caracterização físico-química dos ES de *E. uchi*

4.9.1 Rendimento da operação de secagem

O rendimento operacional foi determinado pela pesagem dos extratos secos obtidos em leito de jorro e *spray dryer*, por diferentes velocidades de alimentação, conforme equação abaixo:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{W}{Rt} \times 100$$

Onde:

W = Massa do extrato seco (g);

Rt = Rendimento teórico.

4.9.2 Perda por dessecação em balança de infravermelho

Foi pesado cerca de 0,5 g de extrato seco e distribuídos uniformemente no coletor do alumínio contido dentro do aparelho. A análise ocorreu sob temperatura de 105 °C e em triplicata (BRASIL, 2010).

4.9.3 Determinação de PT

A quantificação de PT foi realizada conforme descrito no **item 4.7.1.2** desta pesquisa.

4.9.4 Atividade sequestrante do radical DPPH

O teste foi realizado em microplacas com 96 poços e em quadruplicata. Foi preparada uma solução de 0,05 µg/mL de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) em etanol. 30 µL do extrato seco dissolvido em água, e o padrão ácido gálico na concentração de 1 mg/mL, foram adicionados a cada um dos poços da microplaca para contato com a solução de DPPH. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e no escuro, com leitura realizada em 492 nm no leitor de microplaca. Os cálculos de porcentual de inibição (inibição %) foram realizados baseando-se na absorbância do controle (ácido gálico) e utilizando o programa Excel®. Para valores de inibição acima de 50%, foram realizadas até 8 diluições consecutivas com o objetivo de obter os valores de CI₅₀, calculados pelo programa *GraphPad Prism*, versão 6.0 (BURITS; BUCAR, 2000).

$$\% \text{ inibição} = 100 - (\text{AbsA}/\text{AbsC}) \times 100$$

Sendo que:

AbsA = Absorbância da amostra;

AbsC = Absorbância do controle (ácido gálico).

4.9.5 Atividade sequestrante do radical ABTS

A fim de determinar a atividade antirradical ABTS•, inicialmente, foi preparada a solução de ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico)) 0,7 mM em 5 mL de água deionizada e 5 mL de persulfato de potássio 2,4 mM. Em seguida, incubou-se a mistura reacional em temperatura ambiente na ausência de luz por 12 horas para obtenção de uma solução oxidada de tonalidade azul esverdeada. Antes de plaquear, o ABTS oxidado foi diluído (1:5 v/v) com água deionizada, após isso, incubou-se por 15 minutos na ausência de luz à temperatura ambiente e realizou-se a leitura no leitor de microplaca em 620 nm. Os resultados foram expressos em porcentual de inibição e a CI₅₀ foi calculada através do programa *GraphPad Prism* 6.0. O padrão utilizado foi o ácido gálico e as análises foram realizadas em quadruplicata (SHANTY; MOHANAN, 2017).

$$\% \text{ inibição} = 100 - (\text{AbsA}/\text{AbsC}) \times 100$$

Sendo que:

AbsA = Absorbância da amostra;

AbsC = Absorbância do controle (ácido gálico).

4.9.6 Avaliação da atividade antioxidante celular

Esta avaliação baseia-se na detecção da produção de ROS intracelular utilizando o composto fluorescente: 2'7'-dicloro-fluoresceína-diacetato (DCFH-DA). Nesta técnica, foram utilizadas células de fibroblastos da linhagem MRC5, que foram semeadas na concentração de 6×10^4 células/poço, em microplacas de 96 poços, onde foi adicionado 100 μL de meio de crescimento nos poços das placas e incubados por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com PBS. Em seguida, foi preparada uma solução a 25 μM de DCFH-DA dissolvida em tampão Hank's e o extrato foi adicionado juntamente com essa solução de acordo com as concentrações estabelecidas. Foram adicionados 100 μL dessa diluição aos poços da placa e foram incubados durante 60 minutos a 37 °C e 5% de CO_2 . Posteriormente, os poços foram lavados novamente com PBS, e logo em seguida foi preparada uma solução de AAPH a 600 μM dissolvida em tampão Hank's, 100 μL dessa solução foi adicionada aos poços e em seguida foi realizada a leitura da placa com a fluorescência mensurada imediatamente no comprimento de onda de excitação 485 nm e de emissão 520 nm durante 60 minutos em intervalos de 5 minutos. Os controles com e sem DCFH-DA foram preparados e submetidos a processos análogos. Quercetina foi utilizada como controle positivo da atividade antioxidante (WOLFE; LIU, 2007).

4.9.7 Avaliação da atividade antifúngica

Esta análise foi realizada conforme a Norma M27-A3 que descreve a metodologia de referência para ensaios de determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica, estabelecida pela CLSI, 2008 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), utilizando microdiluição em caldo, através da concentração inibitória mínima (CIM). A solução estoque de antifúngico Anfotericina B foi preparada previamente através da diluição em dimetil sulfoxido (DMSO). Para esta determinação, as colônias utilizadas foram subcultivadas por 24 horas em uma temperatura de 37 °C em ágar Sabouraud dextrose por 48 horas. As cepas testadas foram de *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida Krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 90018) e *Candida tropicalis* (ATCC 750). As colônias foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril (0,85%) e agitada durante 15 segundos. A densidade celular

foi ajustada, após contagem em câmara de Neubauer, para uma concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, sendo posteriormente transferido o volume inicial para um novo tubo contendo 10 mL de meio RPMI 1640.

O teste foi realizado em placas de microdiluição estéreis, descartáveis, com múltiplos poços (96 poços em formato de U). Inicialmente foram transferidos, para esta placa, 100 µL do meio RPMI-1640, a seguir, 100 µL de cada solução com o extrato seco (amostra-teste), aplicadas em duplicata e diluídas, onde a fileira nº 1 continha a maior concentração da amostra-teste (16 µg/mL) e a fileira nº 10 a menor concentração (0,03 µg/mL). Por fim, foram adicionados 100 µL do inóculo fúngico. Os poços controle de crescimento contendo 100 µL de meio estéril, isento de amostra-teste, foram inoculados com 100 µL das suspensões concentradas dos inóculos. A fileira nº 12 da placa de microdiluição é usada para efetuar o controle da esterilidade apenas com meio isento de amostras-testes. As placas de microdiluição foram incubadas a 37 °C durante 24 e 48 horas, observando presença ou ausência de crescimento visível para leitura visual da concentração inibitória mínima (CIM), tendo como comparação o crescimento nos poços do controle positivo. O valor de CIM de anfotericina B foi definido como a menor concentração capaz de inibir completamente (100%) o crescimento fúngico.

4.9.8 Determinação atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do ES de *E. uchi* foi determinada através da metodologia de difusão em ágar com adaptações do CLSI (2009a). A cepa da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foi inoculada em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubada a 37 °C durante 24 horas. Com este inóculo, a turvação foi ajustada até 0,5 da Escala de McFarland em solução salina estéril 0,85%. A solução estoque foi preparada com ES dissolvido em água destilada. Após incubação, com um swab, uma amostra de bactérias em solução salina foi transferida para placas de Petri com meio sólido de ágar Muller Hinton. Neste meio de cultura foram feitos poços com a capacidade de 100 µL, onde foi inserido o ES em dissolvido em água (3,2 mg/mL). As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Foi verificada a presença ou ausência de halos de inibição nos poços com a amostra. O controle positivo foi a oxacilina na concentração de 100 µg/mL.

4.10 Morfologia das partículas dos ES

A análise da morfologia de partículas dos ES obtidos pelas diferentes técnicas de secagem foi realizada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde inicialmente, os ES em contato com o suporte metálico (Stub) foram cobertos com ouro e, em seguida, avaliados através de microscópio eletrônico de varredura utilizando o equipamento Tescan® modelo VEGA3, em aumentos de 5.000, 10.000; 15.000, 20.000 e 30.000 vezes, para a obtenção das imagens.

4.11 Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada em linhagens de fibroblastos (MRC5). Esse teste foi feito através do ensaio Alamar Blue®. As células foram semeadas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células/poço em microplacas de 96 poços e tratadas com o ES diluído em água, nas concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL (triplicata). Após 24 horas de tratamento, 10 µL da solução de Alamar Blue® 0,4% foi adicionada em cada poço, e após 3 horas de incubação da placa com MRC5, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de microplacas Elisa (DTX800 Beckman e Coulter). A doxorrubicina (5 µg/mL) foi utilizada como controle positivo (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994).

4.12 Obtenção do produto seco por aspersão (PSA)

Para aperfeiçoar o ES selecionado, principalmente nas características referentes ao rendimento, estabilidade e incorporação nas formulações pretendidas, foi utilizado como adjuvante de secagem o polissorbatato 80 (Tween™ 80), na proporção de 5% (m/v), calculado sobre o resíduo seco da SE. A mistura com SE e adjuvante foi homogeneizada com agitador

magnético, por 5 minutos, a 300 rpm, e sob temperatura ambiente (25 °C). A secagem foi realizada no leito de jorro, nas condições descritas na Tabela 7.

Parâmetros	Condições
Temperatura de entrada	110 °C
Δ de temperatura de saída	94 °C - 95 °C
Vazão de ar de secagem	1,5 m ³ /min
Pressão do ar comprimido	30 L/min
Bico do pulverizador	1,0 mm
Velocidade de alimentação	7 mL/min

Tabela 7 – Parâmetros de secagem para da SE com adjuvante em leito de jorro.

4.13 Desenvolvimento das formulações para uso tópico contendo ES de *E. uchi* e óleo de *B. excelsa*

Foram desenvolvidas formulações de cremes e sabonetes líquidos, com a finalidade de avaliar o melhor conjunto de excipientes (bases) capazes de manter a estabilidade e a atividade biológica do ES e do óleo (agentes ativos). As bases para formulações tópicas foram determinadas de acordo com suas funções, conforme descrito nas Tabelas 8 e 9.

Excipientes	Função
Cocoamido propil betaína	Tensoativo anfótero
Dietanolamina de ácido graxo de coco (Amida 90®)	Tensoativo não-aniônico
Edetato dissódico (EDTA)	Agente sequestrante/quelante
Hidroxietilcelulose	Agente espessante
Lauril éter sulfato de sódio	Tensoativo aniônico
Metilparabeno	Conservante
Propilenoglicol	Solvente orgânico
Propilparabeno	Conservante

Tabela 8 – Excipientes com suas funções, utilizados nesta pesquisa, em formulações de sabonetes líquidos.

Excipientes	Funções
Álcool cetílico	Emulsificante
Álcool cetosteárico	Emulsificante
Ácido esteárico	Agente de consistência
Lanolina anidra	Emoliente
Metilparabeno	Conservante
Monoestearato de glicerila	Emulsificante
Propilenoglicol	Solvente orgânico
Propilparabeno	Conservante
Trietanolamina	Estabilizante
Vaselina líquida	Umectante

Tabela 9 – Excipientes com suas funções, utilizados nesta pesquisa, em formulações de cremes.

Para ambas formas farmacêuticas, foram incorporados o ES de *E. uchi* e óleo de *B. excelsa* nas concentrações de 1 até 3% (m/v), adicionando ou associando excipientes, assim obtendo 9 formulações para o sabonete líquido (F1 a F9) e, 3 formulações para o creme (F10 a F12), de acordo com as Tabelas 10 e 11.

Excipientes	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
EDTA % (p/v)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Água q.s.p	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Lauril éter sulfato de sódio % (p/v)	20	25	30	35	40	40	40	40	40
Dietanolamina de ácido graxo de coco (Amida 90®) % (p/v)	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Cocoamido propil betaína % (p/v)	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Óleo de <i>B. excelsa</i> % (v/v)	2	2	2	2	2	2	2	1	2,5
Hidroxietilcelulose % (p/v)	-	-	-	-	-	2	-	-	-
PEG 6000 % (p/v)	-	-	-	-	-	-	2	-	-
Metilparabeno % (p/v)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Propilparabeno % (p/v)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Propilenoglicol % (v/v)	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
ES de <i>E. uchi</i> % (p/v)	2	2	2	2	2	2	2	2,5	2,5

Tabela 10 – Formulações obtidas com diferentes concentrações de excipientes, ES de *E. uchi* e óleo de *B. excelsa* para o desenvolvimento de um sabonete líquido.

A preparação do sabonete líquido ocorreu inicialmente, com a solubilização do EDTA com água, em um cálice. Após isso, adicionou-se lauril éter sulfato de sódio, dietanolamina e cocoamido propil betaína e óleo de *B. excelsa*, aonde foram agitados até mistura e formação da

emulsão. Em seguida foram incorporados os conservantes (metil e propilparabeno), anteriormente solubilizados em propilenoglicol. Quando necessário, hidroxietilcelulose ou PEG 6000 foram solubilizados sob aquecimento (± 60 °C) para incorporação nesta fase da formulação. Por fim, o ES de *E. uchi* foi levigado com água, e quando solubilizado, adicionado ao restante da formulação.

No caso do creme para uso vaginal, foram preparadas separadamente a fase hidrofílica (água, EDTA, proprilenoglicol e trietanolamina), e a fase lipofílica (álcool cetosteárico, ácido esteárico, álcool cetílico, monoestearato de glicerila, vaselina líquida, lanolina anidra e óleo de *B. excelsa*). As fases foram aquecidas, sob temperatura de ± 70 °C, e misturadas com agitação constante. Após homogeneização, foram adicionados os conservantes (metilparabeno e propilparabeno). O ES de *E. uchi* foi levigado com água em um gral com pistilo e incorporado na formulação.

Excipientes	F10	F11	F12
EDTA % (p/v)	0,1	0,1	0,1
Trietanolamina % (v/v)	10	10	10
Propilenoglicol % (v/v)	1,2	1,2	1,2
Água destilada q.s.p.	100	100	100
Álcool cetosteárico % (p/v)	0,7	0,7	0,7
Ácido esteárico % (p/v)	6	6	6
Álcool cetílico % (p/v)	0,8	0,8	0,8
Monoestearato de glicerila % (p/v)	6	6	6
Vaselina líquida % (v/v)	10	10	10
Lanolina anidra % (p/v)	1	1	1
Óleo de <i>B. excelsa</i> % (v/v)	1	2	3
Metilparabeno % (p/v)	0,15	0,15	0,15
Propilparabeno % (p/v)	0,05	0,05	0,05
ES de <i>E. uchi</i> % (p/v)	1	2	3

Tabela 11 – Formulações obtidas com diferentes concentrações de excipientes, ES de *E. uchi* e óleo de *B. excelsa* para o desenvolvimento de um creme para uso vaginal.

O objetivo deste estudo de bases galênicas foi para desenvolver um sabonete líquido para uso íntimo, e um creme para administração por via vaginal, que auxiliassem no tratamento de infecções do trato geniturinário feminino. Com a finalidade de conhecer quais parâmetros de qualidade as formulações deveriam apresentar, foram analisados também, produtos comerciais, utilizados como referência, sendo eles: sabonete íntimo Dermacyd® Femina (Sanofi) e o creme para uso vaginal Nistatina 25.000 UI/g (TEUTO). Para melhor comparação,

a composição dos produtos, de acordo com as respectivas bulas, estão descritas qualitativamente na Tabela 12.

Nistatina creme ginecológico	Dermacyd® Femina sabonete íntimo
Água	Ácido láctico
Álcool cetosteárilico	Ácido fosfórico
Essência de alfazema	Água
Metilparabeno	Diesterato glicólico
Polissorbato 60	Hidroxietilcelulose
Polissorbato 80	Hidróxido de sódio
Propilenoglicol	Lauril éter sulfato de sódio
Propilparabeno	Metilparabeno
Trolamina	Monoetanolamida de cocomida

Tabela 12 – Formulações qualitativas do produtos comerciais Nistatina creme ginecológico (Teuto) e sabonete íntimo Dermacyd® Femina, utilizados como padrões para as análises.

4.13.1 Avaliação da pré-estabilidade e seleção das formulações

4.13.1.1 Avaliação das características organolépticas

Foram observadas a cor e a homogeneidade das formulações (GARCIA *et al.*, 2009).

4.13.1.2 Determinação do pH

Esta determinação foi realizada com alíquotas das formulações e medidas em triplicata pelo pHmetro previamente calibrado com soluções tampão de pH 7,01 e 4,01 (BRASIL, 2010).

4.13.1.3 Avaliação do comportamento frente à centrifugação

Foram pesadas 5 g de cada formulação e submetidas à centrifugação com rotação de 3.000 rpm durante 30 minutos. As amostras aprovadas neste teste, foram submetidas aos testes de estabilidade (BRASIL, 2004).

4.13.2 Avaliação da estabilidade preliminar

A duração deste estudo foi de 30 dias, onde as formulações (creme e sabonete líquido) foram submetidas a condições de estresse, visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade. Empregou-se condições extremas de temperaturas, sendo que, as amostras acondicionadas em embalagens de vidro, foram colocadas em estufa ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), em refrigerador ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), sob temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e, em ciclos alternados de resfriamento e aquecimento (24 horas a $-5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, e 24 horas a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para periodicidade das avaliações, foram determinados os seguintes tempos: 48 h (após o dia de preparo – T1), 4, 7, 15 e 30 dias (T2, T3, T4, e T5, respectivamente).

4.13.2.1 Avaliação das características organolépticas

Para determinar parâmetros de aceitação do produto pelo consumidor e para verificar instabilidades, foram avaliadas mudanças no aspecto, na cor e no odor, em comparação ao primeiro dia de obtenção das formulações, classificando a cor e o aspecto da formulação como, normal (N), modificada (M), ou intensamente modificada (IM) (BRASIL, 2004).

4.13.2.2 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada de maneira similar ao **item 4.13.1.2** desta pesquisa, para todos os dias e temperaturas já citadas.

4.13.2.3 Determinação do comportamento reológico

A reologia foi determinada em um reômetro (Brookfield Modelo R/S+) utilizando *spindle* cone/placa C50-1. As leituras foram realizadas em todos os períodos do teste e para todas as temperaturas, incluindo os ciclos de resfriamentos e congelamentos. As amostras armazenadas a 5 °C e 40 °C foram mantidas à temperatura ambiente (± 25 °C) antes das leituras. O tempo de análise foi de 120 segundos para a curva ascendente e 120 segundos para a curva descendente, sob um gradiente de cisalhamento de 0 a 100 1/s, totalizando 60 pontos.

4.13.2.4 Determinação da espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi realizada para a formulação de creme, através de uma placa-molde circular de vidro, com diâmetro de 20 cm, espessura de 0,3 cm e com orifício central de 1,3 cm de diâmetro. Sob esta placa foi posicionado um papel milimetrado. Cada amostra foi introduzida no orifício central da placa. Em seguida, sobre a amostra foram colocadas placas de vidro, com pesos já estabelecidos, sequencialmente após 1 minuto, e em cada período, a superfície abrangida pela amostra foi calculada. Os resultados foram expressos pela espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado, a temperatura ambiente (± 25 °C), conforme equação abaixo:

$$E_i = d^2 \times \pi \div 4$$

Onde:

E_i = espalhabilidade da amostra para peso (mm^2);

d = diâmetro médio (mm).

A espalhabilidade máxima foi considerada como o ponto onde a adição de peso não ocasionou alterações significativas nos valores e, esse esforço limite correspondeu ao peso que resultou na espalhabilidade máxima (BORGHETTI; KNOST, 2006).

4.13.3 Caracterização das formulações

4.13.3.1 Determinação do teor de PT

Foram pesados 10 μg das amostras de sabonete líquido e de creme, sendo ambas solubilizadas com 1 mL de uma solução contendo água e filtradas em papel filtro. A concentração de PT foi quantificada usando 10 μL desta solução, em microplaca, adicionando 50 μL de *Folin & Ciocalteu's phenol* 10% e incubados no escuro por 8 minutos a temperatura ambiente. Logo após esse tempo foi adicionado 270 μL de solução saturada de carbonato de sódio 0,4% e incubado novamente por 3 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura na absorbância em 620 nm no leitor de microplaca. O teor fenólico das amostras foi expresso em percentual comparados com padrão ácido gálico e também como μg equivalente a ácido gálico (μg EqAG) quando comparado à diluição consecutiva do padrão (KIM; PARK; KIM, 2013).

$$\text{PT(\%)} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100$$

4.13.3.2 Atividade sequestrante do radical DPPH

O teste foi realizado em microplacas com 96 poços e em quadruplicata. Foi preparada uma solução de 0,05 µg/mL de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) em etanol, 30 µL dos formulações de sabonete líquido e creme dissolvidas em água, padrão ácido gálico na concentração de 1 mg/mL foram adicionados a cada um dos poços da microplaca e colocadas em contato com a solução de DPPH. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e no escuro, com leitura realizada em 492 nm no leitor de microplaca. Os cálculos de porcentual de inibição (inibição %) foram realizados baseando-se na absorbância do controle (ácido gálico) e utilizando o programa Excel[®]. Quando o porcentual de inibição foi maior a 50%, foram realizadas até 8 diluições consecutivas para obtenção dos valores de CI₅₀, calculados pelo programa GraphPad Prism[®], versão 6.0 (BURITS; BUCAR, 2000).

$$\% \text{ inibição} = 100 - (\text{AbsA}/\text{AbsC}) \times 100$$

4.13.3.3 Atividade sequestrante do radical ABTS

A fim de determinar a atividade antirradical ABTS•, uma alíquota das formulações de sabonete líquido e creme foram solubilizadas em água destilada. Inicialmente, foi preparada a solução de ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) 0,7 mM em 5 mL de água deionizada e 5 mL de persulfato de potássio 2,4 mM. Em seguida, incubou-se a mistura reacional em temperatura ambiente na ausência de luz por 12 horas para obtenção de uma solução oxidada de tonalidade azul esverdeada. Antes de plaquear, o ABTS oxidado foi diluído (1:5) com água deionizada, após isso, incubou-se por 15 minutos na ausência de luz à temperatura ambiente e realizou-se a leitura no leitor de microplaca em 620 nm. Os resultados foram expressos em porcentual de inibição e a CI₅₀ foi calculada através do programa GraphPad Prism[®] 6.0. O padrão utilizado foi o ácido gálico e as análises foram realizadas em quadruplicata (SHANTY; MOHANAN, 2017).

$$\% \text{ inibição} = 100 - (\text{AbsA}/\text{AbsC}) \times 100$$

4.13.3.4 Avaliação da atividade antifúngica

A determinação para TS foi realizada conforme descrito no **item 4.9.7** desta pesquisa, com modificações.

As formulações de sabonete líquido e creme, foram aplicadas em duplicata e, anteriormente, diluídas em água:DMSO 10%.

4.14 Análise estatística

Os resultados foram expressos através da média e desvio padrão, assim como, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Os dados foram processados e analisados com o auxílio do software Excel®, Statistica® 6.0 Sigma, GraphPad Prism® versão 6.0 e Protimiza Experimental Design®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química do óleo da *B. excelsa*

Os resultados encontrados para a caracterização do óleo da *B. excelsa*, conforme Tabela 13, demonstram que o óleo extraído por prensa hidráulica estava em condições adequadas de qualidade para utilização neste estudo.

Análises	Média ± DP	Requisito
Índice de acidez (mg KOH/g)	1,17 ± 0,14	Máximo 4,0
Índice de peróxido (meq/Kg)	9,50*	Máximo 15,0
Índice de refração	1,4685*	-
Densidade relativa (d_{25}^{25})	0,9139*	-
Viscosidade aparente (Pa.s)	62*	-

Tabela 13 – Resultados da caracterização físico-química do óleo de castanha-do-brasil. DP - Desvio padrão. *DP < 0,001.

Uma das principais formas de deterioração do óleo, percebida pelas modificações na fração lipídica, podem ser ocasionadas por fatores como luz, calor e contaminação microbiana, que aceleram a decomposição dos triacilgliceróis, promovendo a rancidez, onde, em muitos casos, é acompanhada pela liberação de ácidos graxos (SILVA, 2014).

O teor de ácidos graxos livres, expresso em termos de índice de acidez, encontrado para o óleo da castanha-do-brasil obtido neste estudo através de prensagem (1,17 mg KOH/g) está de acordo com a resolução da ANVISA, RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005), que define como limite máximo 4,0 mg KOH/g para óleos vegetais. Do mesmo modo, o valor para o índice de peróxido obtido (9,50 meq/Kg) está abaixo do requisito proposto pela legislação supracitada, estabelecida com o máximo de 15,0 meq/Kg. Estes dois parâmetros indicam que no óleo não ocorreu alterações enzimáticas ou oxidativas significativas durante o processamento da matéria-prima (SERRA *et al.*, 2019). Na pesquisa realizada por Silva (2014) com óleo extraído da amêndoa da castanha-do-brasil seca, o resultado para o índice de acidez (2,48 mg KOH/g) também está em conformidade com a legislação brasileira e, segundo a autora, o bom índice pode ser explicado pela redução da umidade das castanhas no decorrer do processamento, além da seleção e classificação de acordo com a qualidade.

Para Santos *et al.* (2012), o índice de peróxido detecta o estágio inicial da oxidação, determinando a concentração de hidroperóxidos capazes de oxidar o iodeto de potássio. Neste estudo, através da avaliação de diferentes métodos de extração do óleo da castanha-do-brasil, o maior valor encontrado foi para o óleo removido por prensa hidráulica (4,057 meq/kg) em comparação as extrações com solventes, porém estava dentro do limite preconizado. O mesmo ressalta que características do processo de extração lipídica da castanha-do-brasil podem interferir na estabilidade do óleo.

Por conseguinte, os valores obtidos para o índice de refração (1,4685) e densidade relativa (0,9139) estão próximos aos encontrados por Santos *et al.* (2012) na caracterização do óleo, sendo, respectivamente, 1,456 e 0,9116. Essa semelhança ocorre também na caracterização realizada por Rolim (2016), o qual encontrou para o índice de refração o valor de 1,4695 e para densidade, 0,9116.

O índice de refração e a densidade são específicos para cada tipo de óleo, estando relacionado com o grau de saturação das ligações que o compõem e comprimento das cadeias. É uma medida que pode apresentar interferências pelo conteúdo de ácidos graxos livres, nível de oxidação e tratamento térmico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Porém, para Santos *et al.* (2012), os diferentes processos de extração analisados (prensa hidráulica, extração por Soxhlet com éter de petróleo, hexano, e extração supercrítica de dióxido de carbono (CO₂)) não alteraram os valores da densidade do óleo de castanha-do-brasil.

O valor de viscosidade aparente determinado neste estudo para o óleo de castanha-do-brasil foi de 62 Pa.s, resultado elevado quando comparado ao alcançado por Rolim (2016) (52 Pa.s), onde ambos os óleos foram extraídos através de prensa hidráulica. Porém, de acordo com os resultados apresentados por Yalcin, Toker e Dogan (2012), estes valores para viscosidade do óleo da castanha-do-brasil são característicos dos óleos vegetais. No trabalho destes autores, destaca-se a viscosidade do azeite de oliva (61,20 Pa.s), a qual pode ser comparada a viscosidade do óleo de castanha-do-brasil pois os mesmos são constituídos por uma similar proporção de ácidos graxos insaturados.

Na figura 5, apresentando um diagrama com a viscosidade (Pa.s) em função da taxa de cisalhamento (1/s) do óleo de castanha-do-brasil, não observa-se a variação nos valores de viscosidade conforme aplicação de maiores taxas de cisalhamento. Para taxas de cisalhamento acima de 30 s⁻¹, a viscosidade do óleo apresenta-se constante. A mesma observação foi demonstrada por Brock *et al.* (2008) para o óleo de milho, analisado a uma temperatura de 20 °C, onde para taxas de cisalhamento menores que 5 s⁻¹, eles indicam um comportamento de

fluido não newtoniano, ou classificam como fluido de Bingham. Mas com viscosidade constante em função de taxas de cisalhamento acima de 5 s^{-1} , o comportamento é específico de um fluido newtoniano.

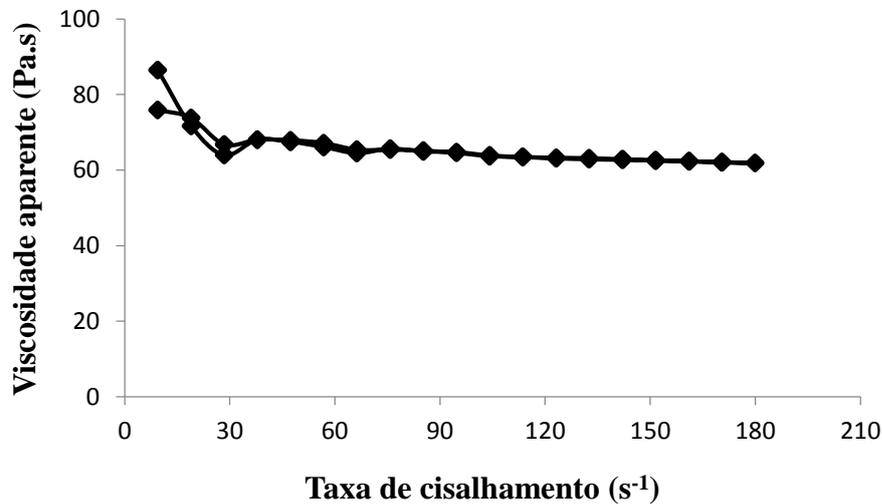


Figura 5 – Diagrama da viscosidade (Pa.s) em função da taxa de cisalhamento (s^{-1}) para o óleo de castanha-do-brasil a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

A avaliação do reograma com tensão de cisalhamento (Pa) sendo diretamente proporcional a taxa de cisalhamento (s^{-1}) (Figura 6) determina que o comportamento reológico do óleo extraído da castanha-do-brasil é newtoniano. Além disso, não foi observado neste diagrama região de histerese, pois em sistemas newtonianos, as curvas ascendentes e descendentes se sobrepõem perfeitamente (LAHOUD; CAMPOS, 2010).

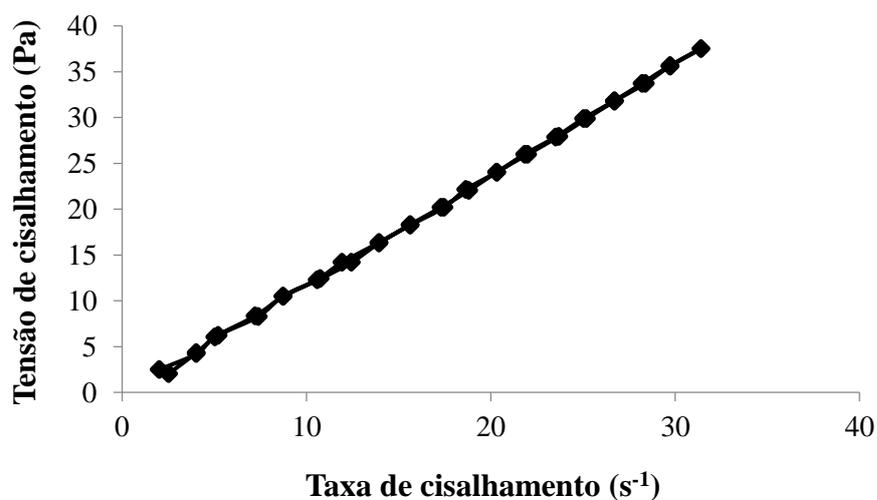


Figura 6 – Comportamento reológico do óleo de castanha-do-brasil a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

As características deste tipo de fluxo foram definidas por meio de modelos matemáticos da lei da potência (conhecido também como Modelo de Ostwald de Waale)^A e o Modelo de Herschel-Bulkley^B, conforme equações abaixo:

$$A \quad \sigma = k \cdot \dot{\gamma}^n$$

$$B \quad \sigma = k \cdot \dot{\gamma}^n + \sigma_0$$

Onde:

σ = Tensão de cisalhamento (Pa);

$\dot{\gamma}$ = Taxa de cisalhamento (s^{-1});

k = Índice de consistência ($Pa \cdot s^n$);

n = Índice de comportamento; e

σ_0 = Tensão residual (Pa).

As curvas de escoamento foram ajustadas aos dois tipos de modelos reológicos propostos acima e ambas foram avaliadas através da determinação dos parâmetros e análise da variância. Mas de acordo com os parâmetros dos modelos (Tabela 14), ambos apresentaram valor para índice de comportamento igual a 1 ($n = 1$) (grandeza adimensional) reforçando o fato de que o óleo apresenta comportamento newtoniano (ARAUJO, 2008). Um índice de comportamento menor que 1 ($n < 1$), subdivide o fluxo não newtoniano em pseudoplástico; ao contrário, $n > 1$, subdivide para um comportamento dilatante (GOTSCHLICH, 2011).

Modelo	Parâmetros	Valores
Lei da Potência	K ($Pa \cdot s^n$)	1,06
	n	1,03
Modelo de Herschel-Bulkley	K ($Pa \cdot s^n$)	0,81
	n	1,00
	σ_0 (Pa)	0,49

Tabela 14 – Parâmetros de ajuste dos modelos reológicos para o óleo de castanha-do-brasil.

De acordo com a análise da variância (Tabela 15) o modelo de Herschel-Bulkley foi o que melhor descreveu o comportamento reológico do óleo de castanha-do-brasil, demonstrando melhor coeficiente de determinação (R^2) e $F_{calc} > F_{tab}$. Porém o Modelo Lei da Potência também apresentou bons resultados e alto R^2 (Tabela 16), sendo que esta equação equivale matematicamente ao modelo Herschel-Bulkley, com a adição de mais um parâmetro, a tensão residual (σ_0).

Modelo	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	p-valor
Modelo de Herschel-Bulkley	Regressão	6037,272	3	2012,424	26,81	<0,05
	Resíduos	0,623	15	0,042		
	Total	6037,895	18			
	Total (Corr.)	1276,267	17			

Tabela 15 – Análise da variância do modelo de Herschel-Bulkley, conforme equação B.
 $R^2 = 99,95\%$; $F_{Tab3;15;0,05} = 3,29$

Modelo	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	p-valor
Lei da Potência	Regressão	8437,895	2	4218,947	38,45	<0,05
	Resíduos	1,067	16	0,067		
	Total	8438,962	18	-		
	Total (Corr.)	1865,543	17			

Tabela 16 – Análise da variância do modelo Lei da Potência, conforme equação A.
 $R^2 = 99,94\%$; $F_{tab2;16;0,05} = 3,63$

Na figura 7 pode-se observar o ajuste do modelo de Herschel-Bulkley.

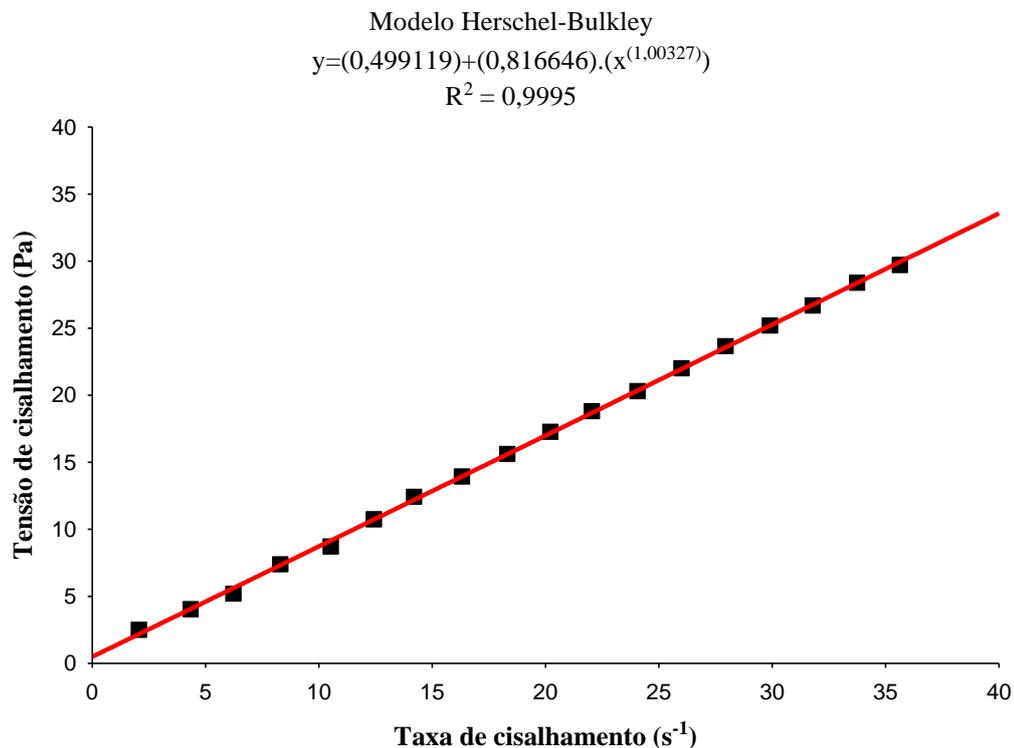


Figura 7 – Curva do comportamento reológico do óleo de castanha-do-brasil ajustado pelo modelo de Herschel-Bulkley.

O óleo da castanha-do-brasil obtido por prensagem das amêndoas tem sido empregado no enriquecimento de alimentos industrializados, em fórmulas de cosméticos, e na produção de substâncias biosurfactantes (COSTA *et al.*, 2006). Desta forma, é importante a determinação

da citotoxicidade do óleo, a fim de verificar a possível toxicidade e danos ao consumidor, porém não foram encontradas informações sobre esta análise na literatura. Os estudos pesquisados informam sobre a toxicidade da ingestão da castanha-do-brasil através das suas sementes por contaminação microbiana, aflatoxinas e selênio, um dos minerais encontrados em grande quantidade nas castanhas (BERNO; POETA; JÚNIOR, 2010).

Na figura 8 há a representação da avaliação da viabilidade celular do óleo de castanha-do-brasil utilizado nesta pesquisa. Conforme histograma, a menor concentração de óleo (6,25 µg/mL) não apresentou citotoxicidade, indicando a faixa de concentração segura para ensaios posteriores.

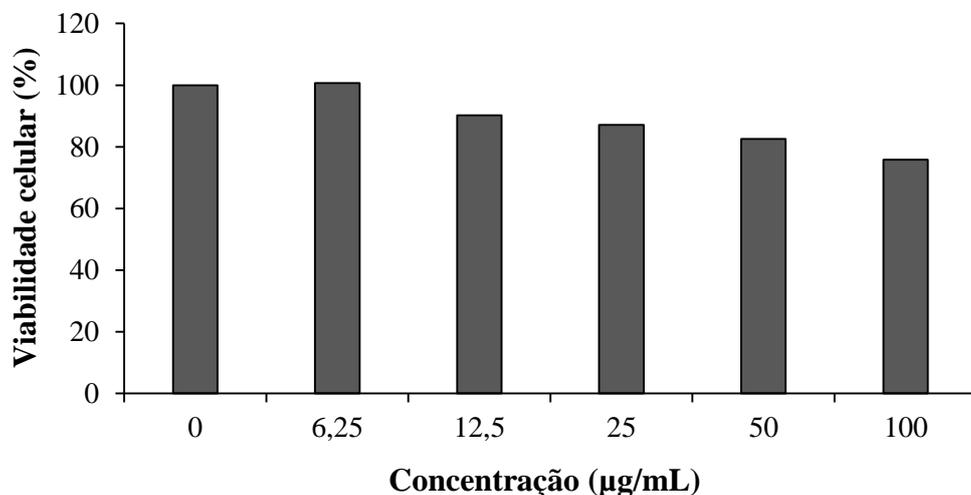


Figura 8 – Efeito do óleo de castanha-do-brasil sobre a viabilidade em linhagens de células MRC5.

5.2 Controle de qualidade da MPV *E. uchi* (cascas rasuradas)

O controle de qualidade é determinado por um conjunto de critérios que caracterizam a matéria-prima, estabelecendo parâmetros que possam permitir que o produto final tenha as suas propriedades garantidas (FARIAS, 2004). Este controle envolve desde a obtenção da planta, cultivo e a colheita, até mesmo, a forma com que ela é desidratada, avaliação da morfologia e extração (OLIVEIRA; BARRETTA, 2007). Neste contexto, antes de proceder com os demais ensaios, foi verificada a granulometria com determinação do diâmetro médio das cascas rasuradas, e a umidade foi avaliada no recebimento e após secagem adicional em estufa, obtendo valores que estão descritos na Tabela 17. Com isso, a MPV foi identificada com o número de lote 4, auxiliando para o controle interno do Laboratório de Inovação e

Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica (LIDETEF), da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Ensaio	<i>E. uchi</i> lote 4
	Média ± DP
Diâmetro médio (mm)	0,71 ± 0,02
Umidade inicial (g%)	11,96 ± 0,77
Umidade final (g%)	7,25 ± 0,25

Tabela 17 – Controle de qualidade das cascas do caule rasuradas de *E. uchi*.

O conhecimento da distribuição granulométrica das cascas rasuradas é útil para indicação da necessidade ou não da cominuição como procedimento prévio as etapas seguintes do processamento, os quais necessitam de homogeneidade do tamanho de partículas. Na Figura 9, a distribuição granulométrica foi unimodal, indicando que não haviam outras partes da planta, como folhas e galhos, neste lote (BARNI; FILHO; COUTO, 2009). O grau de divisão ou a granulometria de pós é expresso pela referência à abertura nominal da malha do tamis utilizado. Com isso, nesta distribuição e conforme o diâmetro médio das cascas, as cascas rasuradas podem ser classificadas com partículas ou pó grosso, pois o material passou em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de 1,70 mm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 μm (BRASIL, 2010). A granulometria é um parâmetro que define a área de contato disponível para a interação com o solvente na preparação de extratos (ALVES *et al.*, 2010). Assim sendo, para melhorar a homogeneidade granulométrica do pó, visando padronizar a etapa de extração e garantir a qualidade dos produtos derivados, as cascas rasuradas foram moídas através de um moinho de facas.

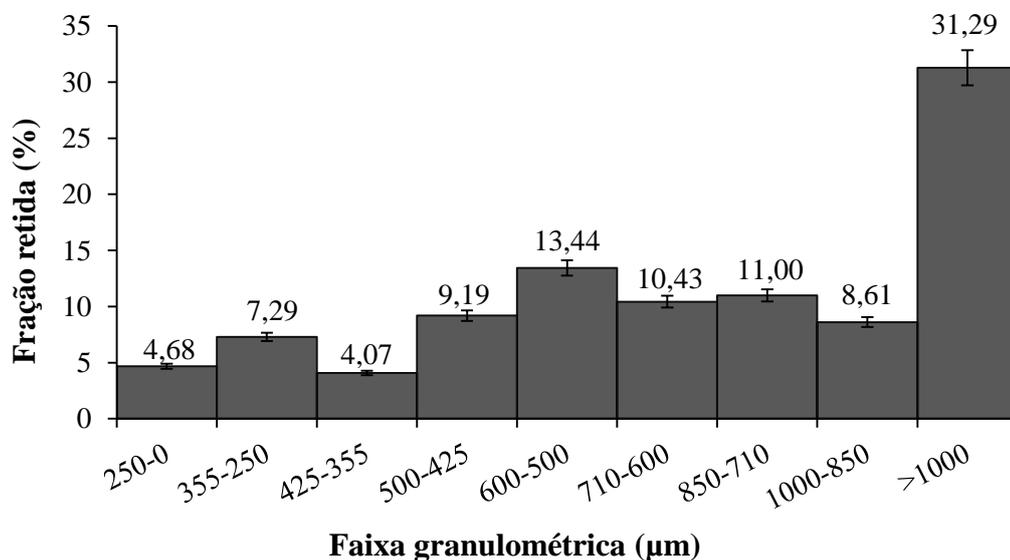


Figura 9 – Histograma do grau de divisão das cascas rasuradas de *E. uchi*.

A determinação da umidade presente nas drogas vegetais também compõe os índices de qualidade da sua preparação e conservação (ALVES *et al.*, 2010). Para diferentes Farmacopeias, o teor máximo de umidade varia entre 8 e 14%. Porém para a Farmacopeia Brasileira 5ª ed., o limite aceitável para drogas vegetais varia entre 6 e 15% nas diferentes monografias (ANVISA, 2014). O protocolo de secagem estabelecido pelo LIDETEF indica que a droga vegetal deve ficar em estufa de ar circulante com temperatura de 40 °C por 7 dias. Entretanto, como o material vegetal apresentou umidade inicial dentro da faixa ideal (11,96 g%), ou seja, foi previamente seco, não foi necessário manter a MPV por longo tempo em estufa.

Deste modo, a droga vegetal foi acompanhada diariamente para verificar a sua perda por dessecação e até onde um valor constante foi encontrado (Figura 10). Assim, ao final, a MPV apresentou umidade de 7,25 g%, um valor dentro da faixa ideal encontrado nas monografias da Farmacopeia Brasileira, mas sem especificações exclusivas para a planta em estudo *E. uchi*, uma vez que a mesma ainda não possui monografia descrita em nenhuma farmacopeia.

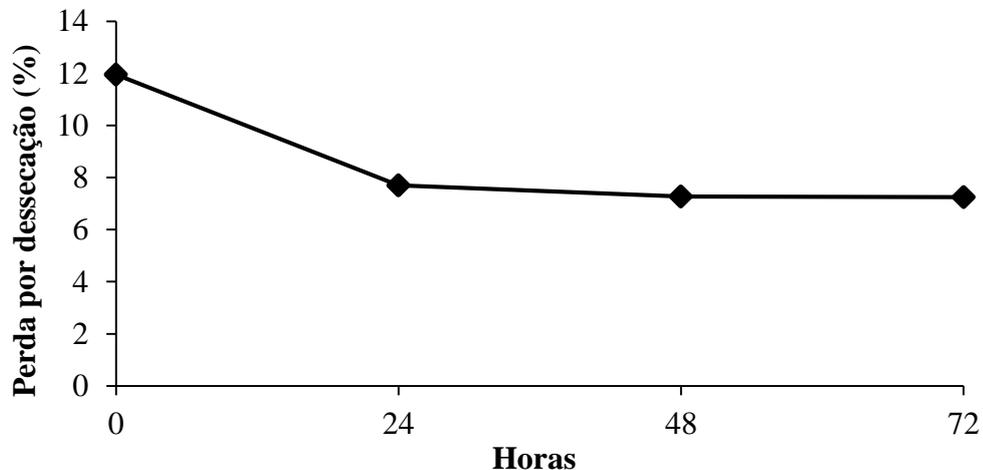


Figura 10 – Perda por dessecação durante a secagem das cascas rasuradas de *E. uchi*.

5.3 Caracterização farmacognóstica das cascas cominuídas de *E. uchi*

A caracterização farmacognóstica das cascas cominuídas serve como uma etapa para o controle de qualidade das plantas medicinais, sendo fundamental para garantir a autenticidade, a estabilidade e a segurança, tanto para as drogas vegetais, como para seus preparados (COUTO

et al., 2009). Desta forma, com critérios estabelecidos para avaliar a qualidade de insumos farmacêuticos de origem vegetal, a garantia da eficácia do produto final pode ser alcançada, principalmente considerando que estas matérias-primas possuem grande complexidade de composição e variações ligadas ao cultivo e colheita (BARNI; FILHO; COUTO, 2009).

Para iniciar o processo extrativo, a operação de moagem é essencial para reduzir o tamanho das partículas do material em estudo, adequando o tamanho da MPV e viabilizando as etapas de produção de uma forma farmacêutica (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Após isso, a análise farmacognóstica foi realizada e os resultados organizados na Tabela 18.

Ensaio	<i>E. uchi</i> lote 4
	Média ± DP
Diâmetro médio (mm)	0,31*
Perda por dessecação (g%)	7,01 ± 0,24
Teor de extrativos (g%)	11,77 ± 0,42
Cinzas totais (g%)	4,48 ± 0,12
Polifenóis totais (g%)	1,59 ± 0,08
Polifenóis totais (µg EqAG)	23,66 ± 0,66

Tabela 18 – Resultados da caracterização farmacognóstica das cascas pulverizadas de *E. uchi*.

*DP < 0,001.

Após a operação de moagem, o tamanho das cascas de *E. uchi* diminuíram consideravelmente. Mas em contrapartida, o tamanho obtido está de acordo com a literatura específica, a qual recomenda que para favorecer a operação de extração o diâmetro das partículas de MPV deve estar entre 0,2 – 0,8 mm, sendo que, tamanhos abaixo deste limiar podem dificultar a etapa de filtração, assim como, comprometer a extração pela formação de aglomerados, impedindo a penetração do solvente/líquido extrator. O mesmo pode ocorrer com tamanhos de partícula maiores, acima do estabelecido (VOIGT; BORNSCHEIN, 1982). Politi (2009) e Lima (2018) também calcularam o diâmetro médio das cascas cominuídas desta planta, e determinaram, respectivamente, os tamanhos de 0,268 mm e 0,350 mm, margem essa que contempla o valor alcançado neste estudo.

Para iniciar a próxima fase que é a extração, o grau de divisão do material vegetal influencia diretamente nesta operação. Em partes de plantas, como o caule, os tecidos deste órgão são compactados, o que dificulta a penetração dos solventes, razão esta que quanto mais rígido for o material, menor deve ser sua granulometria (VASCONCELOS *et al.*, 2005). Após a moagem, a partir da faixa granulométrica (Figura 11), as cascas foram descritas como pó moderadamente grosso, onde as partículas passaram quase em sua totalidade pelo tamis com

abertura nominal de malha de 710 μm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250 μm (BRASIL, 2010), apresentando diâmetro médio de 310 μm , ou seja, a moagem da MPV é fundamental para viabilizar maior eficiência no processo extrativo e assim alcançar um ótimo rendimento na extração dos constituintes químicos de interesse (ALVES *et al.*, 2010).

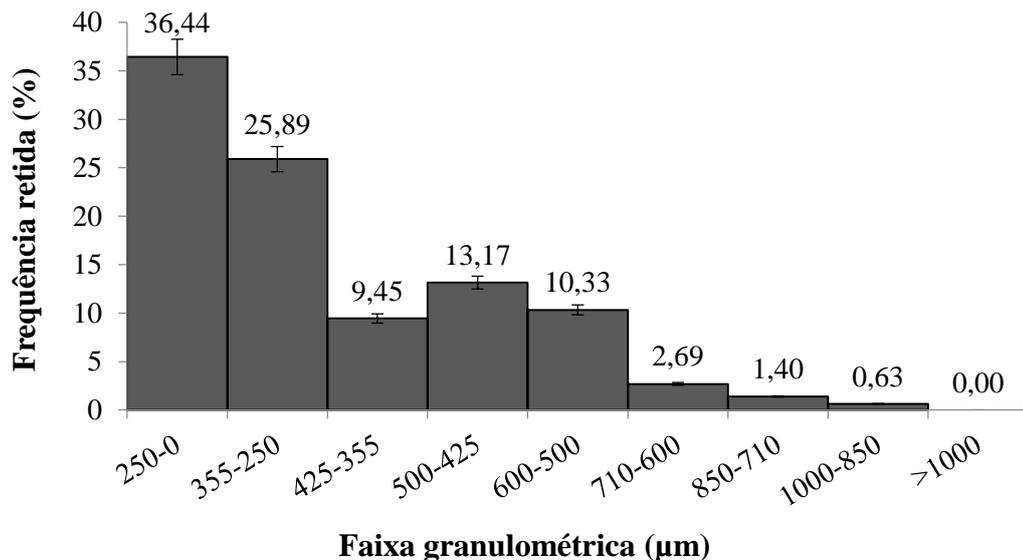


Figura 11 - Histograma do grau de divisão das cascas cominuídas de *E. uchi*.

A perda por dessecação indica o teor de material volátil encontrado no vegetal, sendo um índice de qualidade e conservação da droga (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2006). A presença de excessivas quantidades de água em MPV promove o crescimento de microrganismos, degradação por hidrólise e atividade enzimática, ocasionando deterioração dos constituintes de interesse farmacêutico (COUTO *et al.*, 2009). Do ponto de vista tecnológico, o conhecimento sobre a quantidade de água na MPV é essencial, pois este participa dos cálculos de rendimento durante a produção (POLITI, 2009). A umidade das cascas cominuídas não aumentou com o processo de moagem, indicando que as operações preliminares foram efetivas, permanecendo de acordo com as normas farmacopeicas.

Por outro lado, o teor de extrativos é um indicativo da quantidade de substâncias extraíveis, ou seja, solúveis em específico sistema solvente e que promove a seleção da melhor forma de extração (POLITI, 2009). Extrações com solventes orgânicos (éter, acetona, benzeno e etanol, por exemplo) retiram do material lenhoso, resina, ésteres, ácidos graxos, ceras e materiais corantes. Quando a água é utilizada na operação, ocorre a extração de açúcares,

polissacarídeos, sais inorgânicos e algumas substâncias fenólicas (BROWNING, 1967). Este lote de *E. uchi* apresentou 11,77 g% de teor de extrativos, valor condizente com índices encontrados em estudos similares. Muniz (2013) obteve teor de extrativos das cascas de *E. uchi*, também coletadas no período de seca, na proporção de 9,90 g%, através do extrato aquoso. No caso da pesquisa de Oliveira (2017), a água não foi um bom líquido extrator, pois obteve 8,79 g% de teor de extrativos. Entretanto, na preparação aquosa preparada por Nunomura *et al.* (2009), o teor encontrado foi de 13,30 g%. Porém, é preciso salientar que todas essas diferenças nos teores encontrados também podem estar relacionados aos fatores edafoclimáticos de origem e coleta da droga vegetal, bem como, a própria técnica utilizada para a determinação do teor extrativo presente na droga vegetal.

A análise de cinzas totais permite quantificar os resíduos não voláteis inorgânicos, em particular, cloretos, carbonatos e diversos tipos de óxidos, a partir da incineração da planta (ALVES *et al.*, 2010). Estas substâncias podem estar presentes como constituintes fisiológicos da droga vegetal, ou como contaminantes, como por exemplo, areia e terra, indicando má higienização e processamentos precários (GUIZZO *et al.*, 2015). Ainda, esta determinação em amostras processadas é um teste de pureza para verificar a identificação do produto vegetal (RODRIGUES *et al.*, 2015). Para isso, o teor de 4,48 g% para cinzas totais encontrado na amostra de cascas cominuídas de *E. uchi*, permite afirmar que a MPV possui boa procedência e qualidade. Para esta planta em questão, não existem valores preconizados na literatura, porém, Almeida *et al.* (2003) estabelece que teores de cinzas entre 5 – 10% demonstram abundância de elementos minerais nas plantas.

Por fim, a quantificação de polifenóis totais torna-se imprescindível, pois estes compostos são apontados como os responsáveis pelas atividades farmacológicas de várias espécies vegetais, ou seja, a verificação dos constituintes fenólicos é requisito importante para a padronização da droga vegetal (COUTO *et al.*, 2009). Substâncias fenólicas apresentam em sua estrutura um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas, radical este que pode ser substituído ou encontrado nas formas de ácidos carboxílicos, ésteres e glicosídeos (BRAVO, 1998). Os compostos fenólicos estão associados a atividade antioxidante, onde dependendo da sua estrutura química, a ação da molécula como agente redutor pode ser determinada, atuando pela velocidade de inativação do radical livre, ou pela reatividade com outros antioxidantes, e por quelação de metais (NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009). Nesta pesquisa, o teor de polifenóis encontrados na MPV foi de 1,59 g%, ou seja, 23,66 µg EqAG, demonstrando a existência destes metabólitos nas cascas de *E. uchi*, porém não é um valor elevado quando

comparado ao estudo de Lima (2018) que analisou dois lotes de cascas cominuídas de *E. uchi*, encontrando 8,78 g% e 6,93 g% para polifenóis totais.

5.4 Otimização do processo para obtenção de SE aquosa das cascas cominuídas de *E. uchi*

5.4.1 *Screening* de variáveis com repetições das interações

No comércio popular da Região Norte, é recomendado o uso de *E. uchi* através da preparação das cascas juntamente com água em ebulição por alguns minutos. Este chá é indicado para o tratamento de diversas enfermidades, sobretudo para o tratamento de miomas e inflamações (POLITI, 2009). Mesmo citando que esta planta é muito conhecida por seus efeitos terapêuticos e importância econômica regional, ainda existem poucos estudos de referência, que determinem sua real eficácia, posologia e segurança. Para isso, foram executados planejamentos fatoriais, com o objetivo de otimizar o método extrativo, caracterizando o uso tradicional e melhorando a forma de preparo, a fim de auxiliar no caminho da descoberta dos benefícios de *E. uchi* e viabilizar a obtenção de um produto com propriedades reprodutíveis.

Quando um extrato é padronizado, ocorre o estabelecimento de uma relação ideal entre a droga vegetal e o extrato, assim como, a relação entre o extrato e o seu marcador, garantindo a concentração ideal dos princípios ativos em preparações fitoterápicas e fitocosméticas (ISAAC *et al.*, 2008). Otimizar uma solução extrativa requer o conhecimento de suas propriedades físico-químicas e tecnológicas, e os fatores que as influenciam (SOARES *et al.*, 1998).

Uma técnica estatística que tem sido efetiva para avaliar, comparar e otimizar processos através dos efeitos de seus componentes, é conhecida como planejamento experimental fatorial. Neste, a metodologia é representada por um modelo construído a partir de combinações, de onde as respostas são analisadas (ROMO-CÁRDENAS *et al.*, 2019). Desta forma, foi escolhido um planejamento fatorial 2^2 , para estudar as variáveis (X_1 – Relação droga:solvente, e X_2 – Tempo de decoção) que representam as principais propriedades de uma extração, com níveis máximo e mínimo, almejando estabelecer condições ótimas para esses fatores no processo. Este

desenho estatístico foi selecionado para esta primeira análise, pois se trata de um experimento pequeno, em termos de estimação do resíduo, e a repetição dos ensaios nos quatro pontos fatoriais garante uma maior confiabilidade dos repostas. Os resultados são apresentados na Tabela 19.

Ensaio	Droga vegetal	Tempo de extração	Variáveis dependentes		
	X ₁	X ₂	TS (g%)	PT (g%)	TB (µg/mL)
1	-1	-1	0,36	1,82	39,79
2	-1	-1	0,38	1,69	43,16
3	+1	-1	0,62	1,47	44,89
4	+1	-1	0,59	1,53	44,58
5	-1	+1	0,43	1,55	39,59
6	-1	+1	0,38	1,47	42,94
7	+1	+1	0,64	1,22	39,36
8	+1	+1	0,60	1,12	43,93

Tabela 19 – Matriz do delineamento e resultados do *screening* para as respostas, TS - teor de sólidos (g%), PT - teor de polifenóis totais (g%) e TB - teor de bergenia (µg/mL).

5.4.1.1 Determinação do TS

Com base na Tabela 19, é possível observar que os maiores valores de TS encontrados (0,64 g% e 0,62 g%) estão relacionados a maior quantidade de droga vegetal (10 g). Esta análise é útil na previsão do rendimento teórico de um produto seco produzido, e de modo geral, a quantidade de sólidos em dispersão inferiores a 10% (m/v), podem afetar o bom rendimento no método de secagem por *spray drying* (LOCH-NECKEL *et al.*, 2018). Na maioria das vezes, também, quanto maior o teor de sólidos, maior a probabilidade de extração dos ativos de interesse (TACON, 2012).

Executando a análise estatística dos resultados para a determinação do TS a partir da solução extrativa de *E. uchi*, foi possível estimar os efeitos de cada fator e o efeito de interação. A Tabela 20 fornece dados sobre os coeficientes de regressão para cada parâmetro, revelando quais são estatisticamente significativos, sendo destacados em vermelho. A significância de cada coeficiente foi definida pelo *p*-valor e pelo teste de *t*-Student, sendo que, quanto menor o valor de *p* e maior a magnitude do valor *t* obtido em relação ao *t* tabelado, e mais significativo o coeficiente representa.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t(3)	p-valor
Média	0,50	0,01	54,36	0,0000
X ₁	0,11	0,01	12,27	0,0003
X ₂	0,01	0,01	1,28	0,2686
X ₁ . X ₂	0,00	0,01	-0,53	0,6223

Tabela 20 – Coeficientes de regressão para a resposta TS, onde: t(3) - valor *t* de Student para 3 graus de liberdade = 2,35. Parâmetros em vermelho são estatisticamente significativos ($p < 0,10$) para o modelo.

Para a resposta TS, somente o termo linear da variável X₁ foi estatisticamente significativo, ao nível de significância (10%). Após a análise dos coeficientes de regressão, com estes termos foi possível montar um modelo reparametrizado ou modelo reduzido, representado pela equação abaixo:

$$TS (g\%) = 0,50 + 0,11 x_1$$

A Figura 12 descreve os valores observados experimentalmente e os valores previstos pelo modelo ajustado, observando-se uma boa concordância entre a variável independente X₁, quantidade de droga vegetal (cascas cominuídas de *E. uchi*) e a resposta estimada de TS.

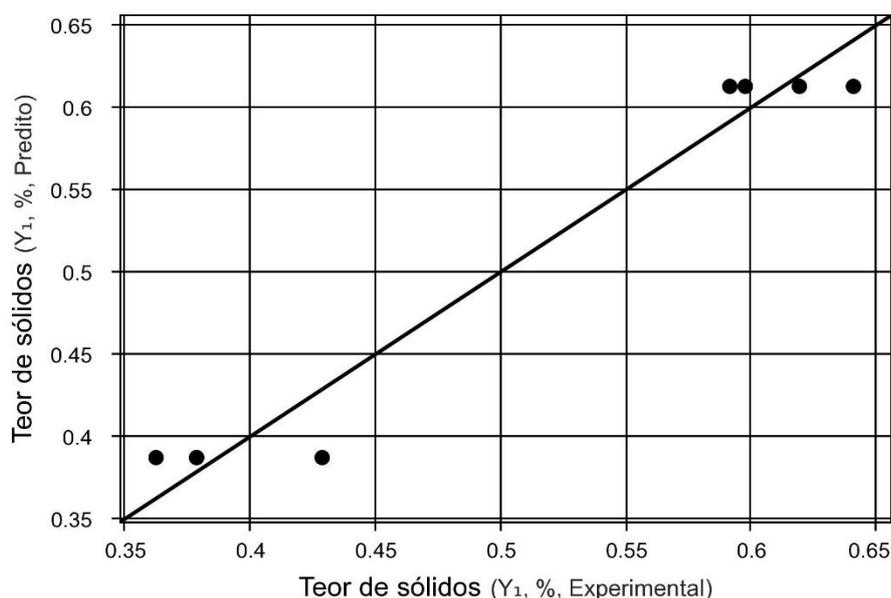


Figura 12 – Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo reparametrizado para a resposta TS (g%).

Com a avaliação dos coeficientes de regressão do modelo ajustado, é necessário verificar a análise de variância (ANOVA). Com base na Tabela 21, os resultados indicam uma boa porcentagem de variação 96,21% e F calculado (152,20) superior 40 vezes ao F tabelado. O valor de R² sugere que este modelo é apropriado para a avaliar a quantidade de sólidos totais na solução extrativa.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p -valor
Regressão	0,1	1	0,1	152,2	0,0002
Resíduos	0,0	6	0,0		
Falta de ajuste	0,0	2	0,0		
Erro puro	0,0	4	0,0		
Total	0,1	7		$F_{\text{calc}}:F_{\text{tab}} = 40,26$	

Tabela 21 – Análise de variância (ANOVA) para o teor de sólidos (TS).
% variação (R^2) = 96,21; $F_{1;0;10} = 3,78$.

Por meio da ANOVA, a superfície de resposta (Figura 13) pode ser gerada, permitindo verificar que a proporção da droga vegetal teve influência linear, onde maiores quantidades significam maior TS. O tempo de decocção não influenciou na resposta gerada, fato que permite um processo extrativo mais rápido. Neste caso ainda, o solvente pode interferir na geração de resíduo seco, pois o solvente com polaridade adequada exerce maior impacto sobre este parâmetro, sendo que, constituintes majoritários (taninos, saponinas e açúcares), de algumas espécies, podem ser altamente solúveis em solventes hidroalcoólicos (VASCONCELOS *et al.*, 2005). No entanto, a água foi selecionada como solvente de extração devido a conformidade com o uso popular e por ser adequada na extração de substâncias fenólicas.

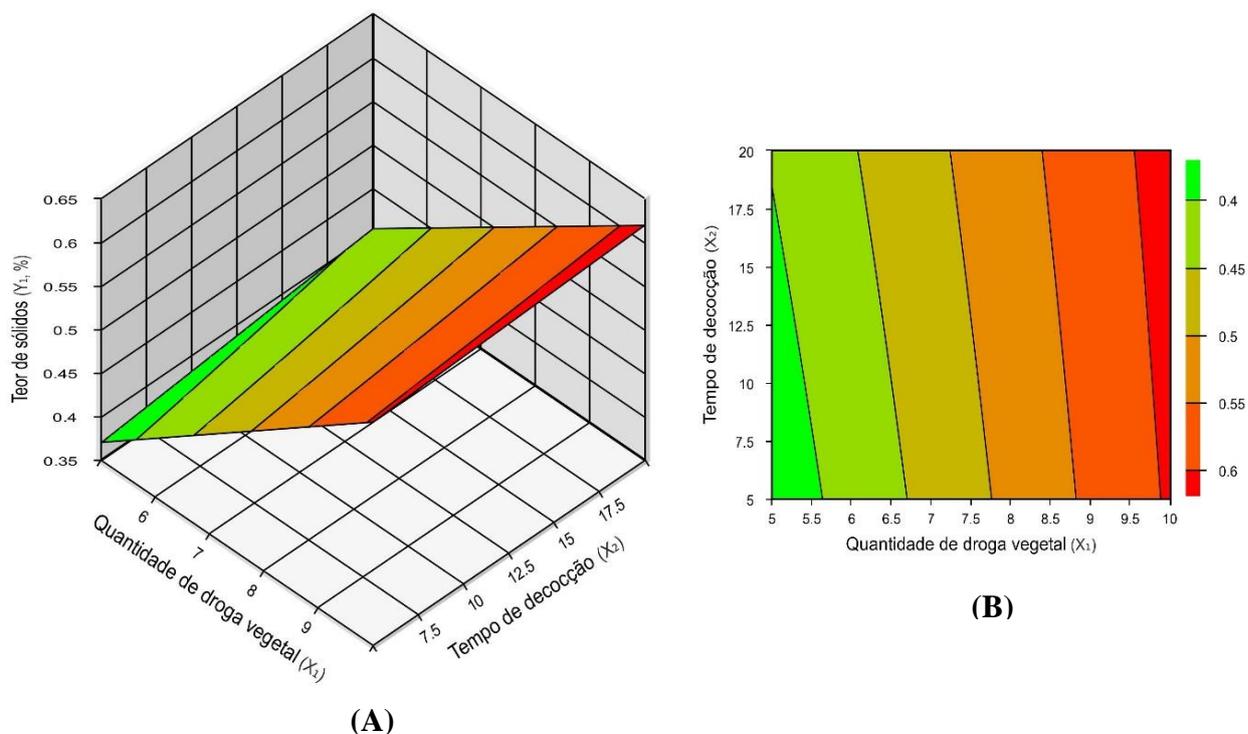


Figura 13 – Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a quantidade de sólidos (g%) na solução extrativas de *E. uchi*, em função da concentração de droga vegetal (m/v) e do tempo de decocção (min).

5.4.1.2 Determinação do teor de PT

Novamente, avaliando a Tabela 19, nos experimentos de 1 a 8, observa-se que conforme a quantidade de droga vegetal e o tempo de decocção, o teor de PT variou de 1,12 g% (10 g e 20 min) a 1,82 g% (5 g e 5 min). Com isso, é plausível afirmar que independentemente da metodologia de extração, foram encontrados substâncias fenólicas na solução extrativa, porém houve diferenças de teor conforme mudanças na quantidade de droga vegetal e no tempo de decocção.

Os fenólicos são definidos, quimicamente, como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, além dos seus grupos funcionais, com estruturas variáveis e multifuncionais (LEE *et al.*, 2005). Eles englobam moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização, na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas, conformações que influenciam na solubilidade e propriedades físico-químicas (ANTOLOVICH *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2009). A quantificação de polifenóis em plantas representa o início das investigações sobre a funcionalidade e atividade biológica das mesmas, os quais podem ser extraídos de diversas estruturas vegetais por intermédio de sistemas aquosos, ou solventes aceto etílicos e alcoólicos (IMEH; KHOKHAR, 2002; SOUSA *et al.*, 2007).

De acordo com os coeficientes de regressão estimados (Tabela 22), os termos lineares desta resposta para quantidade de cascas cominuídas de *E. uchi* em relação a droga vegetal e ao tempo de extração, foram estatisticamente significativos, de forma isolada. O efeito da interação entre estas duas variáveis apresentou resultado oposto ($p > 0,10$).

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t(3)	p-valor
Média	1,48	0,02	62,07	0,0000
X ₁	-0,15	0,02	-6,21	0,0034
X ₂	-0,14	0,02	-6,04	0,0038
X ₁ . X ₂	-0,02	0,02	-0,81	0,4628

Tabela 22 – Coeficientes de regressão para a resposta teor de PT, onde: t(3) - valor *t* de Student para 3 graus de liberdade = 2,35. Parâmetros em vermelho são estatisticamente significativos ($p < 0,10$) para o modelo.

Com os dados estatisticamente significativos, formam o modelo expresso pela equação a seguir:

$$PT (g\%) = 1,48 - 0,15 x_1 - 0,14 x_2$$

Este modelo reparametrizado demonstra boa correlação entre as variáveis independentes, de acordo com a observação da Figura 14.

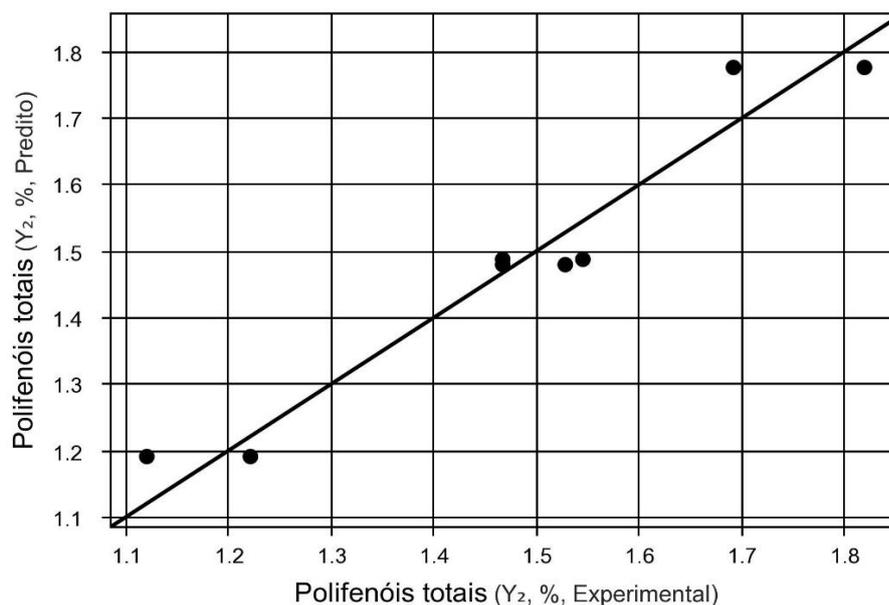


Figura 14 – Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo reparametrizado para a resposta teor de PT (g%).

A ANOVA (Tabela 23) apresenta uma variação explicada de 94,16% e F calculado quase 11 vezes maior em comparação ao F tabelado, sendo altamente significativo. Assim sendo, os parâmetros ajustados são considerados adequados, satisfazendo os requisitos para a construção da superfície de resposta e curvas de níveis (Figura 15).

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p -valor
Regressão	0,3	2	0,2	40,30	0,00082
Resíduos	0,0	5	0,0		
Falta de ajuste	0,0	1	0,0		
Erro puro	0,0	4	0,0		
Total	0,4	7		$F_{\text{calc}}:F_{\text{tab}} = 10,66$	

Tabela 23 – Análise de variância (ANOVA) para a determinação de polifenóis totais (PT).
% variação (R^2) = 94,16; $F_{2;0,10} = 3,78$.

A partir da análise da superfície de resposta e das curvas de contorno verifica-se o efeito negativo com o aumento da quantidade de MPV e do tempo de extração, sobre a quantidade de PT. Os maiores teores são encontrados nas faixas de 5% de droga vegetal em relação ao solvente água, e em 5 min de extração sob decocção. Tacon (2012) encontrou o mesmo efeito, onde a maior porcentagem de planta também resultou em menores teores de fenóis. Quanto menor a quantidade de MPV, ou seja, quanto maior a relação do solvente para a quantidade de droga

vegetal, o teor de polifenóis pode melhorar, pois assim, os efeitos da saturação são minimizados (PINELO *et al.*, 2005). Tempos maiores de extração e alta temperatura, no caso 100 °C aumentam a oxidação dos compostos fenólicos, diminuindo o rendimento destes no extrato (DAI; MUMPER, 2010). Mas esta última informação pode variar conforme o alvo das substâncias fenólicas pretendidas e o tipo de extração, pois Parmezan *et al.* (2017), não encontrou diferenças estatísticas na quantidade PT em relação aos tempos de 5 min e 10 min de extração e quantidade de droga vegetal padronizada de 50 mg.

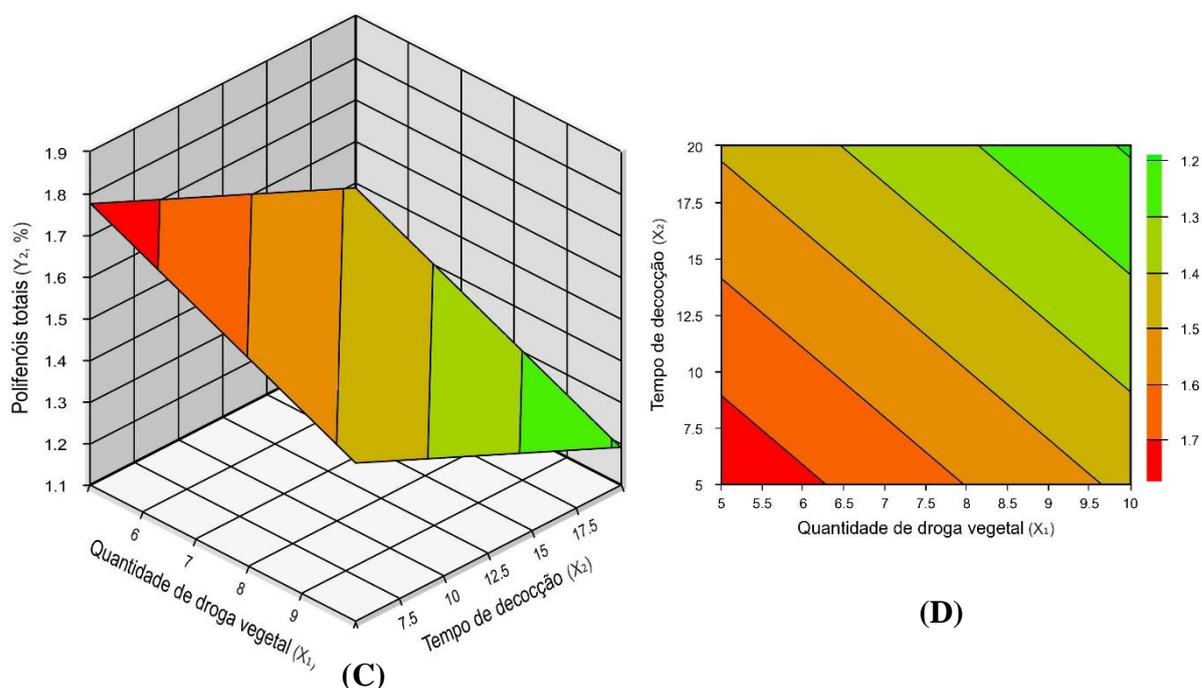


Figura 15 – Superfície de resposta (C) e curvas de contorno (D) para a quantidade de PT (g%) na solução extrativas de *E. uchi*, em função da concentração de droga vegetal (m/v) e do tempo de decocção (min).

5.4.1.3 Quantificação de bergenina

A bergenina é derivado do ácido gálico e sua degradação ocorre facilmente em solução básica (LU; WANG, 2003). Os cinco grupos hidroxila (OH), presentes na bergenina, são considerados potencialmente ativos (NAZIR *et al.*, 2011). Isso faz com que o interesse por esta substância aumente, principalmente após demonstrações de uma ampla variedade de atividades biológicas (YU *et al.*, 2009). Na planta *E. uchi*, a bergenina é a substância majoritária encontrada, considerada, por isso, como marcador químico (MAGALHÃES *et al.*, 2007).

O teor de bergenina foi calculado com base na concentração presente em cada extrato, sendo este dado obtido através da curva padrão de bergenina (Figura 16). A curva analítica obtida por regressão linear do gráfico das médias das áreas, resultantes de três análises, *versus* concentração, apresentou excelente coeficiente de linearidade ($R^2 = 0,9983$).

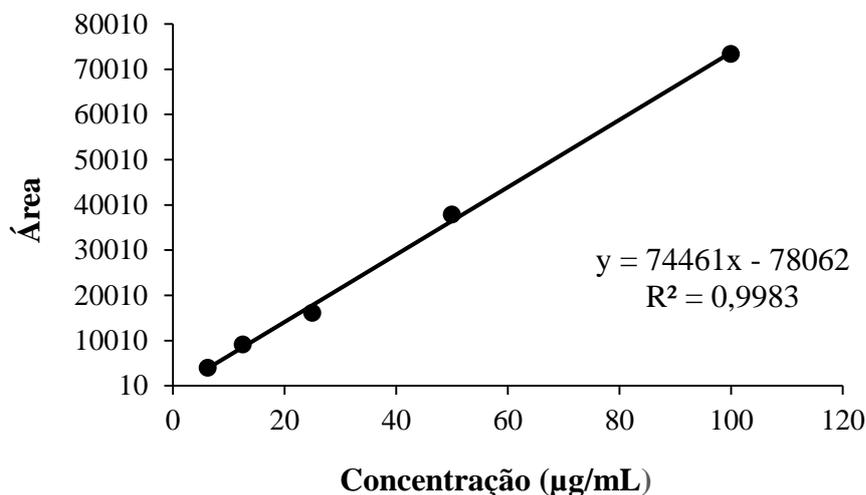


Figura 16 – Curva analítica da bergenina obtida da análise *intra-day*.

A Figura 17 demonstra um exemplo de perfil cromatográfico dos extratos obtidos, onde observa-se um pico simétrico e característico da bergenina, com tempo de retenção de aproximadamente 16 minutos.

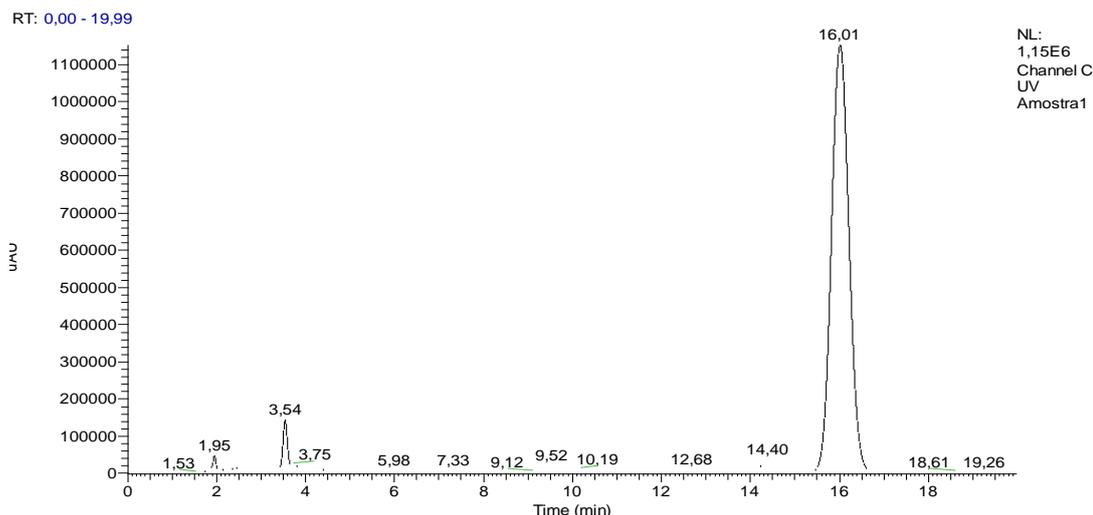


Figura 17 – Cromatograma de um extrato obtido pelo método de decocção.

Portanto, a quantificação de bergenina é muito importante neste estudo, principalmente na otimização da extração, podendo interferir na eficiência da formulação final. Como pode ser observado na Tabela 19, para o rendimento de bergenina foram encontrados valores de 39,36 µg/mL a 44,89 µg/mL, valores estes mínimo e máximo respectivamente, para os 8 tratamentos.

Neste intervalo não houve importantes variações, ou seja, os valores encontrados estão muito próximos. Deste modo, nenhuma variável foi estatisticamente significativa para esta resposta, segundo a Tabela 24.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t(3)	p-valor
Média	42,28	0,83	51,25	0,0000
X ₁	0,91	0,83	1,10	0,3319
X ₂	-0,82	0,83	-1,00	0,3739
X ₁ . X ₂	-0,72	0,83	-0,87	0,4321

Tabela 24 – Coeficientes de regressão para a resposta teor de TB, onde: t(3) - valor *t* de Student para 3 graus de liberdade = 2,35. Termos estatisticamente significativos ($p < 0,10$).

Com esta avaliação, não é possível determinar o efeito linear, quadrático ou interação entre as variáveis, sendo assim, é inviável estabelecer um modelo para a determinação de bergenina e sua representação por meio de uma superfície de resposta. Em contrapartida, este resultado é bom, pois mesmo não havendo grandes variações nas repetições e entre os experimentos, ele indica que, independentemente das quantidade de droga vegetal e do tempo de decocção, altas quantidades de bergenina ainda serão encontradas.

Além do mais, as porcentagens obtidas estão em conformidade com Lima (2018), o qual obteve 36,20% de bergenina para o extrato proveniente também de solução aquosa. Tacon (2012) encontrou valores próximos, mas menores, na faixa de 32,24% a 36,76% de bergenina, com extratos das cascas de *E. uchi*, através de um solvente hidroetanólico, utilizando da mesma ferramenta estatística, o planejamento fatorial. Esta mesma autora, demonstrou também que, a temperatura e o tempo de extração não modificaram a quantidade deste marcador químico. Mas para as duas formas de extração, por maceração e por ultrassom, quanto maior a porcentagem de droga vegetal, menor o rendimento de bergenina, o que ratifica o resultado do teor de PT, que também é maior utilizando menor proporção de droga vegetal. Muniz (2013), ao analisar os extratos aquosos das cascas de *E. uchi*, os quais apresentaram menor teor extrativo, e ao comparar com extratos metanólicos, avaliou que os teores de bergenina foram semelhantes entre um processo e outro. Esses resultados confirmam a utilização de água como bom líquido extrator na obtenção de soluções extrativas de *E. uchi*, além de ser um solvente barato, é capaz de extrair teores elevados de bergenina.

5.4.2 Caracterização físico-química das SEs obtidas de *E. uchi*

Integrar a avaliação físico-química e os parâmetros fitoquímicos, é importante para a obtenção e processamento de extratos vegetais oriundos de qualquer planta (MENDEZ *et al.*, 2011). Para alcançar os objetivos desta etapa do projeto e almejar produtos de qualidade, as caracterizações físico-químicas são essenciais, principalmente quando se obtém uma solução extrativa, processo intermediário na prospecção de fitoterápicos e fitocosméticos.

Na Tabela 25 e 26 encontram-se os dados experimentais relacionados ao pH das SEs obtidas na 1ª e 2ª replicatas do planejamento fatorial. Constata-se que os valores de pH são próximos entre si para todas as SEs, porém não houve diferenças estatísticas pela ANOVA, $p = 0,1311$. Isso pode ser esclarecido pelas menores diferenças de pH da água destilada usada para extração ou pela quantidade de MPV pesada. Ao mesmo tempo, nestes resultados há evidências que, quanto menor a quantidade de droga vegetal e menor o tempo de decocção, maior é o valor de pH.

Soluções extrativas	Dados experimentais - pH	
	Média ± DP	
1ª Replicata	Água destilada	SEs
SE 5%/5 min	6,50 ± 0,02	4,90 ± 0,03
SE 10%/5 min	6,04 ± 0,01	4,74 ± 0,04
SE 5%/20 min	6,57 ± 0,02	4,67 ± 0,03
SE 10%/20 min	6,66 ± 0,02	4,46*

Tabela 25 – Valores de pH para as SEs aquosas de *E. uchi*. *DP < 0,001.

Soluções extrativas	Dados experimentais - pH	
	Média ± DP	
2ª Replicata	Água destilada	SEs
SE 5%/5 min	6,73 ± 0,06	4,69 ± 0,01
SE 10%/5 min	6,22 ± 0,01	4,56 ± 0,01
SE 5%/20 min	6,31 ± 0,03	4,56 ± 0,02
SE 10%/20 min	6,55 ± 0,02	4,50 ± 0,01

Tabela 26 – Valores de pH para as SEs aquosas de *E. uchi*.

Com valores de pH para o extrato líquido abaixo de 4,90 e utilizando água destilada com pH acima de 6,04, é sugestivo para estas soluções a presença de substâncias ácidas, como fenóis e bergenina. A princípio, solventes aquosos ou com maiores concentrações de água conduzem a extratos mais enriquecidos em polifenóis e taninos, que apresentam características

ácidas (ARDISSON *et al.*, 2002). Outro fator que pode explicar a acidez das SEs é que as plantas são constituídas por diversos ácidos minerais orgânicos combinados sob a forma de sais, ésteres, lactonas, lipídeos, essências, resinas e proteínas (GUIZZO *et al.*, 2015).

Na Tabela 27 e 28 estão os resultados encontrados para as densidades relativas das SEs, com valores próximos a densidade da água (0,9991 a 25 °C), o que era esperado, pois é o mesmo solvente utilizado na extração.

SEs	Dados experimentais - Densidade relativa
	Média ± DP
1ª Replicata	
SE 5%/5 min	0,9985*
SE 10%/5 min	0,9966*
SE 5%/20 min	0,9972*
SE 10%/20 min	0,9970*

Tabela 27 – Determinação da densidade relativa para as SEs aquosas de *E. uchi*.

*DP < 0,001.

SEs	Dados experimentais - Densidade relativa
	Média ± DP
2ª Replicata	
SE 5%/5 min	0,9987*
SE 10%/5 min	0,9978*
SE 5%/20 min	0,9982*
SE 10%/20 min	0,9978*

Tabela 28 – Determinação da densidade relativa para as SEs aquosas de *E. uchi*.

*DP < 0,001.

Com estes dados e os valores de resíduo seco, é possível obter a massa teórica de sólido totais presentes nas SEs, desta maneira, auxiliando no cálculo do rendimento da operação de secagem (LIMA, 2018). As variações observadas na densidade relativa entre uma solução e outra pode estar relacionada a quantidade de resíduos secos e a diferentes concentrações de água nos extratos, ou seja, nas diferentes relações entre droga vegetal e solvente (ARDISSON *et al.*, 2002). Em misturas, a densidade é uma propriedade da composição destas, sendo muito importante no controle de qualidade por apresentar relação com a concentração das soluções (CÉSAR; DE PAOLI; ANDRADE, 2004).

5.4.3 Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² com repetições do ponto central

Uma vez que, no planejamento fatorial anterior, o *screening* revelou que a quantidade de TS apresentou efeito linear, que os teores de PT eram comprometidos negativamente com o aumento da concentração de droga vegetal e do tempo de extração, e para a bergenina, marcador químico, não houve interferência das variáveis, mesmo individualmente e com interação, assim optou-se, por fazer um outro delineamento experimental, porém completo. Método este, definido como estratégia sequencial de planejamentos, afim de traçar um caminho para a condição desejada, ou seja, a condição ótima, conquistando o objetivo de minimizar a quantidade de cascas de *E. uchi* sem perder a qualidade, com um custo do produto final (formulação de creme ou sabonete líquido) competitivo no mercado.

Nesta situação, o ideal como alternativa foi adicionar ao fatorial 2², pontos axiais, sendo 2 x 2 = 4 ensaios nos pontos axiais ($\alpha = \pm 1,41$) e mais repetições dos pontos centrais, totalizando 3, executando uma operação estatística com avaliação do erro puro, promovendo condições experimentais ideais. Os valores limítrofes das variáveis foram estabelecidos anteriormente pelo *screening design*. No DCCR os fatores X₁ (relação droga:solvente) e X₂ (tempo de decocção) permaneceram para análise de duas respostas, TS (g%) e PT (g%), onde os dados alcançados são encontrados na Tabela 29.

Ensaio	Droga vegetal	Tempo de extração	Variáveis dependentes	
	X ₁	X ₂	TS (g%)	PT (g%)
1	-1	-1	0,41	1,53
2	+1	-1	0,66	1,95
3	-1	+1	0,40	1,66
4	+1	+1	0,63	2,02
5	-1,41	0	0,33	1,19
6	+1,41	0	0,70	2,50
7	0	-1,41	0,55	2,11
8	0	+1,41	0,58	1,98
9	0	0	0,51	1,92
10	0	0	0,54	2,02
11	0	0	0,48	1,90

Tabela 29 – Matriz do delineamento e resultados do DCCR para as respostas, TS - teor de sólidos (g%) e PT - teor de polifenóis totais (g%) nas soluções extrativas de *E. uchi*.

5.4.3.1 Determinação do TS

Considerando os dados da Tabela 29, observa-se novamente que quanto maior a quantidade de MPV, maior é a porcentagem do TS, variando entre 0,33 g% a 0,70 g%, esta última maior que o encontrado no delineamento anterior. Porém não são teores altos quando comparados com os obtidos através de outro solvente, no caso, com misturas de água:etanol, e diferentes métodos de extração, onde o TS variou de 1,14% a 5,11% para uma extração por maceração; e na técnica de ultrassom, o valores obtidos foram de 0,76% a 4,46% (TACON, 2012). Na Tabela 30, a análise para definição dos parâmetros significativos estatisticamente, conduz para um modelo matemático predito.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p-valor
Média	0,51	0,01	35,68	0,0000
X ₁	0,13	0,01	14,35	0,0000
X ₁ ²	0,00	0,01	-0,04	0,9726
X ₂	0,00	0,01	0,11	0,9157
X ₂ ²	0,02	0,01	2,29	0,0708
X ₁ . X ₂	-0,01	0,01	-0,53	0,6202

Tabela 30 – Coeficientes de regressão para a resposta TS, onde: t(5) - valor *t* de Student para 5 graus de liberdade = 2,57. Parâmetros em vermelho são estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para o modelo.

A variável X₁ foi a que apresentou termo estatisticamente significativo, destacada em vermelho. Dessa maneira, o resultado assemelha-se ao alcançado no *screening* e comprovando que mesmo com um planejamento mais amplo, os termos quadráticos não são significativos estatisticamente, e que o TS está ligado diretamente a concentração da droga vegetal. Deste modo, na busca pela faixa ideal para extração, foi gerada a equação do modelo reparametrizado, conforme a seguir:

$$TS (g\%) = 0,53 + 0,13 x_1$$

Uma das condições quando o modelo é reparametrizado e do delineamento estatístico utilizado na análise da variância é que os erros de ajustamento sejam independentes e normalmente distribuídos. Na Figura 18, não há muitos pontos distantes da reta, apresentando evidências que as pressuposições do modelo estão satisfeitas.

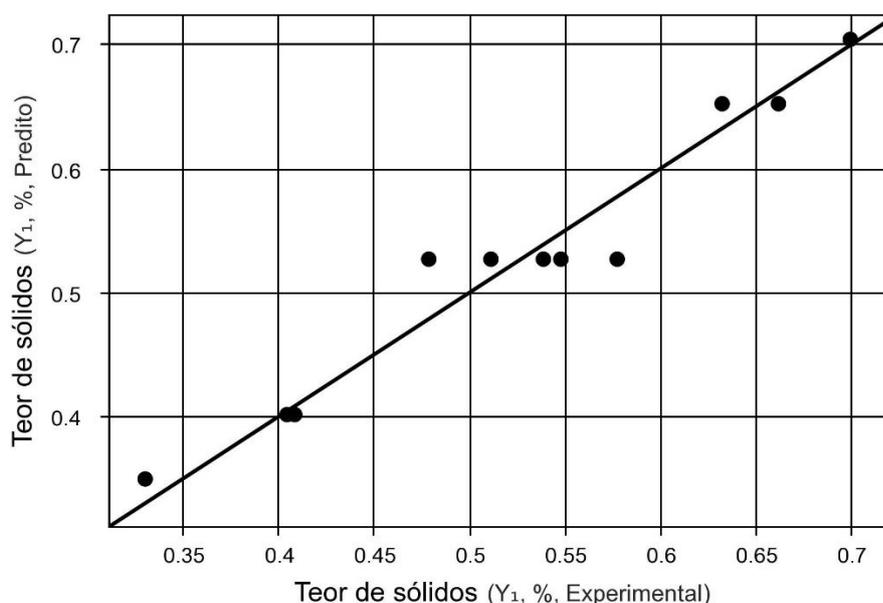


Figura 18 – Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo reparametrizado para a resposta TS (g%).

A Tabela 31 com ANOVA demonstrou um modelo ajustado para as respostas do processo de extração. A porcentagem de variação R^2 (94,89%), continua excelente, mesmo com o descarte dos dados não significativos. Esta modificação aumentou os graus de liberdade dos resíduos que, por sua vez, diminuiu o valor do quadrado médio. Logo, a relação entre o quadrado médio da regressão e do resíduo aumenta, aumentando o F calculado, para um limiar 32 vezes maior que o F tabelado. Neste caso, foi determinado que o efeito da interação entre X_1 e X_2 não foi significativo, mas individualmente, como efeito principal, a quantidade de droga vegetal exerce papel de destaque no TS.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p -valor
Regressão	0,1	1	0,1	167,30	0,0000
Resíduos	0,0	9	0,0		
Falta de ajuste	0,0	7	0,0		
Erro puro	0,0	2	0,0		
Total	0,1	10		$F_{calc}:F_{tab} = 32,67$	

Tabela 31 – Análise de variância (ANOVA) para o teor de sólidos (TS).
% variação (R^2) = 94,89; $F_{1;0,05} = 5,12$.

A Figura 19 apresenta graficamente, por superfície de resposta, a influência da porcentagem de planta (X_1) sobre o TS, de forma proporcional, destacando que o tempo de decocção não foi significativo ($p > 0,05$) e não interferiu nesta resposta. Este gráfico permite verificar que com quantidades de *E. uchi* entre 10 g e 11,65 g, e tempo entre 5 min e 17,20 min, os TS não variaram expressivamente (0,68 g% a 0,74 g%). Com as curvas de contorno é

possível definir que o ponto ótimo para este parâmetro está em 10 g de droga vegetal e em 5 min de extração sob decocção.

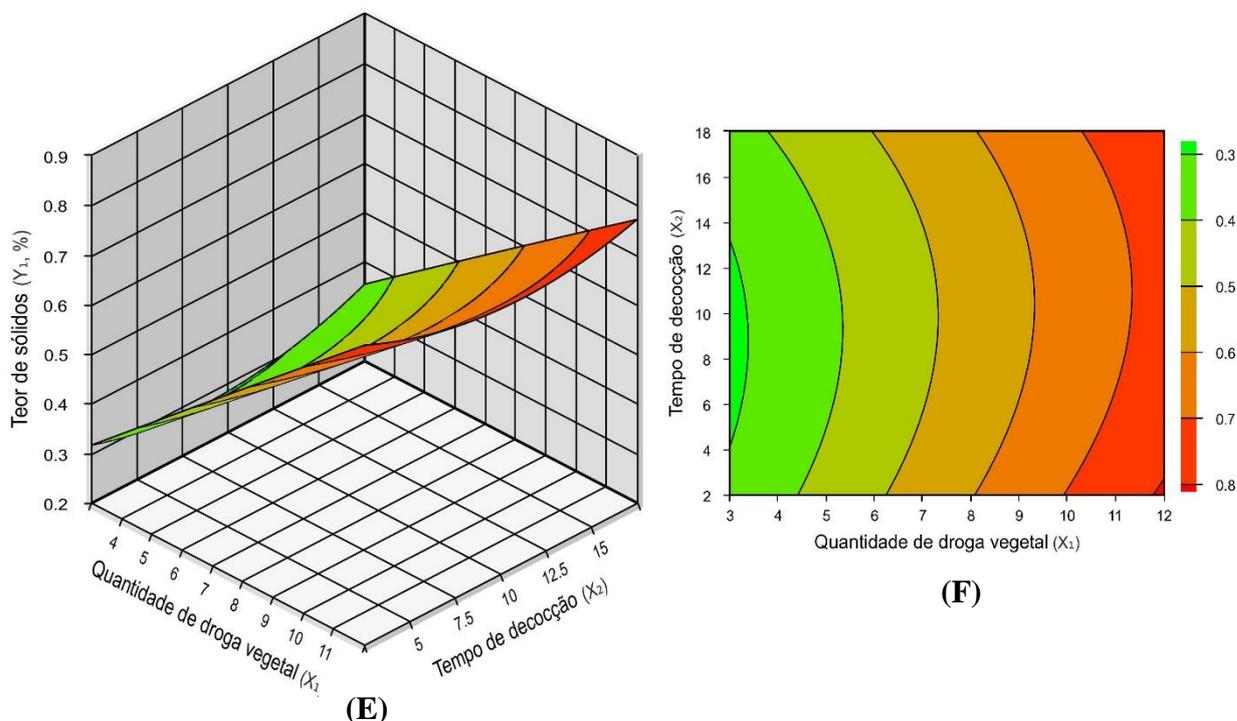


Figura 19 – Superfície de resposta (E) e curvas de contorno (F) para TS (g%) na solução extrativas de *E. uchi*, em função da concentração de droga vegetal (m/v) e do tempo de decocção (min).

5.4.3.2 Determinação de PT

Conforme Tabela 29, o teor de PT foi alterado de 1,19 g% para 2,50 g%, conforme diferenças nos fatores, ao contrário dos resultados determinados no *screening*. No atual delineamento, constata-se que na mudança do nível menor (-1,41, -1) para os níveis mais altos (+1,41, +1), os teores de polifenóis aumentam, fato este que não ocorreu no *screening*. Desta maneira, os planejamentos fatoriais realizados, serviram para construir modelos que descrevessem o relacionamento funcional entre as variáveis dependentes e as variáveis independentes (X_1 e X_2).

De acordo com Robards (2003), a extração com alta temperatura e tempo mais prolongado, promove a melhor solubilidade do soluto. Em contrapartida, os constituintes fenólicos deste material vegetal podem sofrer oxidação ou serem hidrolisados. Um exemplo disso, ocorre com as antocianinas, que possuem temperatura de extração, para um bom

rendimento, entre 20 e 50 °C, sendo de conhecimento que, temperaturas acima de 70 °C provocam sua degradação (DAI; MUMPER, 2010). Através da Tabela 32 verifica-se qual a relação funcional entre estas variáveis, ou seja, de que maneira o teor de PT depende da quantidade de droga vegetal e do período de decocção.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p-valor
Média	1,95	0,12	16,1	0,0000
X ₁	0,33	0,07	4,44	0,0068
X ₁ ²	-0,09	0,09	-1,02	0,3546
X ₂	0,00	0,07	0,01	0,9893
X ₂ ²	0,01	0,09	0,13	0,9004
X ₁ . X ₂	-0,01	0,10	-0,13	0,9007

Tabela 32 – Coeficientes de regressão para a resposta teor de PT, onde: t(5) - valor *t* de Student para 5 graus de liberdade = 2,57. Parâmetros em vermelho são estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para o modelo.

O ponto quantitativo que exerceu influência sobre o teor de PT foi o X₁ linear, apresentando agora um limite para a extração destes compostos. Mas isso foi um ótimo resultado, pois demonstrou que quantidades de droga vegetal acima de 11 g e tempos de extração maiores que 15 min, provocam a degradação dos compostos fenólicos. A partir da variável preditora estatisticamente significativa, foi possível gerar uma equação para ajuste do modelo:

$$PT (g\%) = 1,89 + 0,33 x_1$$

A Figura 20 mostra que alguns pontos do delineamento não se ajustaram ao modelo proposto acima, no entanto o modelo predito está em conformidade com o experimental.

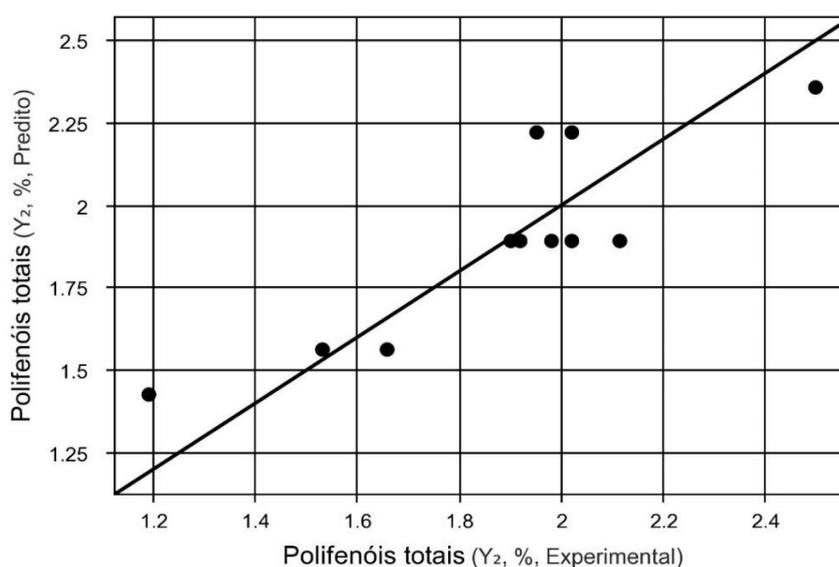


Figura 20 – Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo reparametrizado para a resposta PT (g%).

A partir da Tabela 33, a ANOVA permite identificar pelo coeficiente de correlação (R^2) que, para este modelo, a variação da quantidade de droga vegetal explica apenas 75,94% da variação inerente ao teor de PT, além do mais, o F calculado foi 5 vezes maior que o F tabelado. A análise da variância enfatiza que a quantidade de droga vegetal ainda interfere na extração de polifenóis, mas a variação foi menor neste DCCR.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p -valor
Regressão	0,9	1	0,9	28,40	0,00048
Resíduos	0,3	9	0,0		
Falta de ajuste	0,3	7	0,0		
Erro puro	0,0	2	0,0		
Total	1,1	10		$F_{\text{calc}}:F_{\text{tab}} = 5,54$	

Tabela 33 – Análise de variância (ANOVA) para a quantidade de PT.

% variação (R^2) = 75,91; $F_{1;0,05} = 5,12$.

Logo, é possível então, construir a superfície de resposta e curvas de contorno, as quais estão respectivamente nas Figuras 21 G e H. Na curva de resposta, assim como na avaliação das respostas para PT, observa-se que a região ótima de extração ocorre entre 10 g e 11,90 g de droga vegetal e com 2,80 min até 5,45 min de decocção. Deste modo, os níveis intermediários foram que mais se adequaram para este delineamento onde, para o início de uma pesquisa de desenvolvimento de formulações foi analisada a menor proporção de planta, a facilidade e rapidez do processo extrativo.

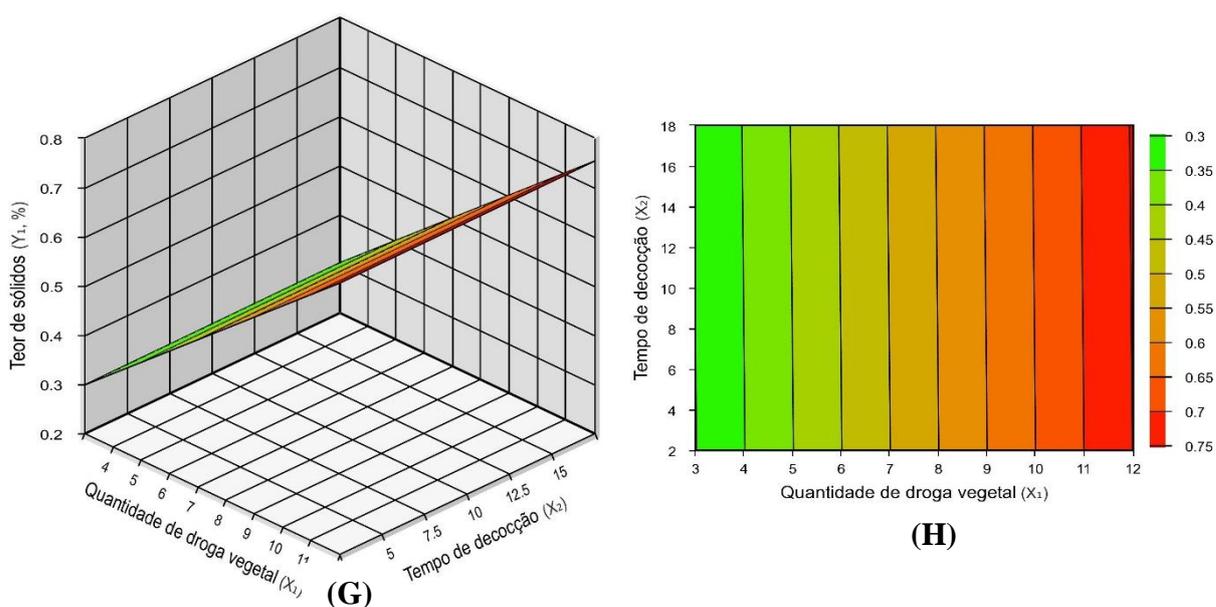


Figura 21 – Superfície de resposta (G) e curvas de contorno (H) para PT (%) na solução extrativas de *E. uchi*, em função da concentração de droga vegetal (m/v) e do tempo de decocção (min).

5.5 Obtenção dos ES de *E. uchi*

A técnica de *spray drying* é o método mais empregado na indústria farmacêutica, sendo definida como a transformação de um material do seu estado fluido para partículas secas (OLIVEIRA; BOTT; SOUZA, 2006). Neste processo de secagem por aspersão, a solução é atomizada para entrar em contato com o ar quente da câmara de secagem, levando a evaporação do solvente, e gerando partículas secas, as quais serão separadas por um fluxo de ar (SARALA *et al.*, 2012). Os ES por aspersão podem ser utilizados como produtos finais e intermediários na obtenção de várias formas farmacêuticas (VASCONCELOS *et al.*, 2005). Várias tecnologias de secagem e equipamentos podem ser usados na produção de ES, como por exemplo, a liofilização, o *spray dryer* e o leito de jorro (OLIVEIRA; BOTT; SOUZA, 2006). Estes distintos equipamentos de secagem podem originar produtos com propriedades físico-químicas diferentes, principalmente quanto à umidade residual, tamanho de partícula, estabilidade e solubilidade (SOUZA *et al.*, 2015).

Com o intuito de verificar as diferenças entre os métodos de secagem em *spray dryer* e leito de jorro, algumas características do ES foram avaliadas, assim como o rendimento da operação de secagem. Além do mais, diferentes velocidades de alimentação, ou seja, velocidades de entrada da solução extrativa no equipamento para secagem por atomização foram analisadas, verificando a sua interferência no produto final.

Na Tabela 34, os valores de rendimento operacional para ambos os processos são apresentados, obtendo-se bons resultados. Em nenhum dos equipamentos o material seco ficou aderido em grandes proporções na câmara de secagem ou no ciclone de recolhimento do pó. Observa-se que na operação de secagem por leito de jorro, nas velocidades de alimentação de 5 mL/min e 7 mL/min, os rendimentos foram maiores, ou seja, obteve-se mais ES quando comparado ao equipamento *spray dryer*. Menores valores de perda durante a secagem foram também encontrados por Oliveira; Bott e Souza (2006), onde a operação foi analisada sob temperaturas de entrada iguais, afirmando que o leito de jorro pode ser uma alternativa viável para a produção de extratos secos a partir de plantas medicinais.

Fluxo de alimentação (mL/min)	Rendimento (%)	
	Leito de jorro	<i>Spray dryer</i>
3	51,35	51,98
5	58,16	53,53
7	66,73	49,51

Tabela 34 – Valores de rendimento para as operações de secagem em *spray dryer* e leito de jorro, através de diferentes velocidades de alimentação.

Estes dados representam uma das diferenças entre um equipamento e outro, pois a escolha da velocidade de alimentação é que determina a evaporação do líquido presente nas gotículas atomizadas, antes que elas entrem em contato com as paredes da câmara de secagem (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). No caso do *spray dryer*, quanto maior a velocidade de alimentação, menor foi o rendimento, definindo que neste equipamento, fluxos menores são melhores para a formação de partículas sólidas. Em contrapartida, no leito de jorro, o rendimento aumentou na proporção do aumento da velocidade de alimentação, o que pode ser específico para esta técnica. Uma explicação para estas diferenças pode estar relacionada a informação que, velocidades de alimentação excessivas conduzem à diminuição da temperatura do ar de saída e ao acúmulo de material no equipamento. No leito de jorro, essa temperatura no fluxo de 3 mL/min foi de 102 °C, e 96 °C para no fluxo de 7 mL/min. Já para o *spray dryer*, a temperatura de saída foi mais baixa, de 90 °C para o fluxo menor, e 86 °C para a velocidade maior, conforme demonstrado na Figura 22. O fato do maior fluxo de alimentação resultar em maior rendimento operacional é um ponto positivo, uma vez que significa que o processo de secagem será realizado com mais rapidez.

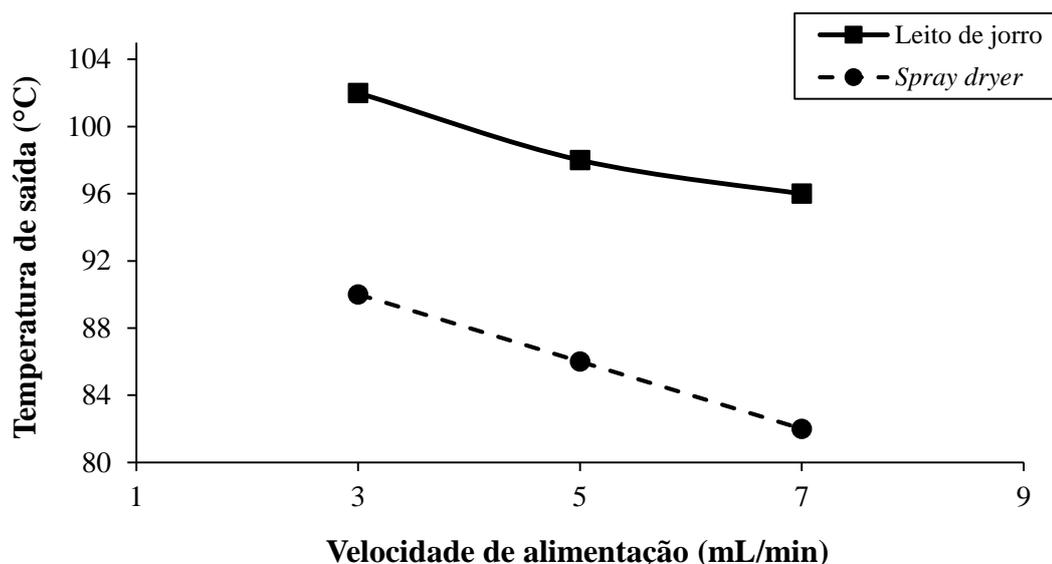


Figura 22 – Apresentação das diferentes temperaturas de saída (°C) conforme aumento da velocidade de alimentação (mL/min), nos equipamentos leito de jorro e *spray dryer*.

5.5.1 Caracterização físico-química e morfológica dos ES de *E. uchi*

Outra propriedade avaliada foi a umidade dos ES, através da perda por dessecação. Observa-se na Tabela 35, que a porcentagem de umidade nos ES obtidos do leito de jorro são menores que os ES obtidos pelo *spray dryer*. Somente os ES com fluxo de 3 mL/min do *spray dryer*, e os fluxos de 5 e 7 mL/min do leito de jorro, apresentaram teor de umidade abaixo de 5%, valor ideal conforme estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010).

Fluxo de alimentação (mL/min)	Perda por dessecação (% m/m)	
	Média ± DP	
	Leito de jorro	<i>Spray dryer</i>
3	5,61 ± 0,07	4,14 ± 0,05
5	4,27 ± 0,08	6,06 ± 0,58
7	4,16 ± 0,05	6,08 ± 0,17

Tabela 35 – Teores de umidade para as operações de secagem em *spray dryer* e leito de jorro, através de diferentes velocidades de alimentação.

Estes teores de umidade, confirmam que cada equipamento de secagem possui suas especificações, e que estas interferem no produto final que são os ES. Segundo Jangan; Thorat (2010), o aumento da temperatura do ar e o fluxo do ar, proporcionaram a redução do valor da atividade de água nos pós de gengibre. Verifica-se também que no *spray dryer*, menores

velocidades de alimentação facilitam a saída do solvente, reduzindo o teor de umidade. O contrário ocorreu no leito de jorro, pois como o material é altamente higroscópico, conforme o extrato fica mais tempo no processo de secagem, mais água ele adsorve. Além disso, os teores de umidade inferiores no leito de jorro podem ser justificados, pela maior residência dos materiais na câmara de secagem, comum nesse tipo de secador (OSORIO-REVILLA; ELÍAS-SERRANO; GALLARDO-VELÁZQUEZ, 2004). Zhang *et al.* (2010), por meio de um planejamento experimental para otimização da secagem de extratos, consideraram que o fator temperatura do ar de saída foi altamente significativo sobre a umidade residual do produto seco. Mesmo trabalhando com temperatura de entrada (110 °C), superior a temperatura de ebulição da água (solvente) nos dois equipamentos, a temperatura de saída e a velocidade de alimentação influenciaram no teor de umidade dos ES.

Por fim, para escolher a técnica de secagem mais adequada, foi realizada a análise da morfologia das partículas dos ES. As Figuras de 23 a 25 mostram as fotomicrografias provenientes dos ES obtidos pelo leito de jorro, por diferentes velocidades de alimentação.

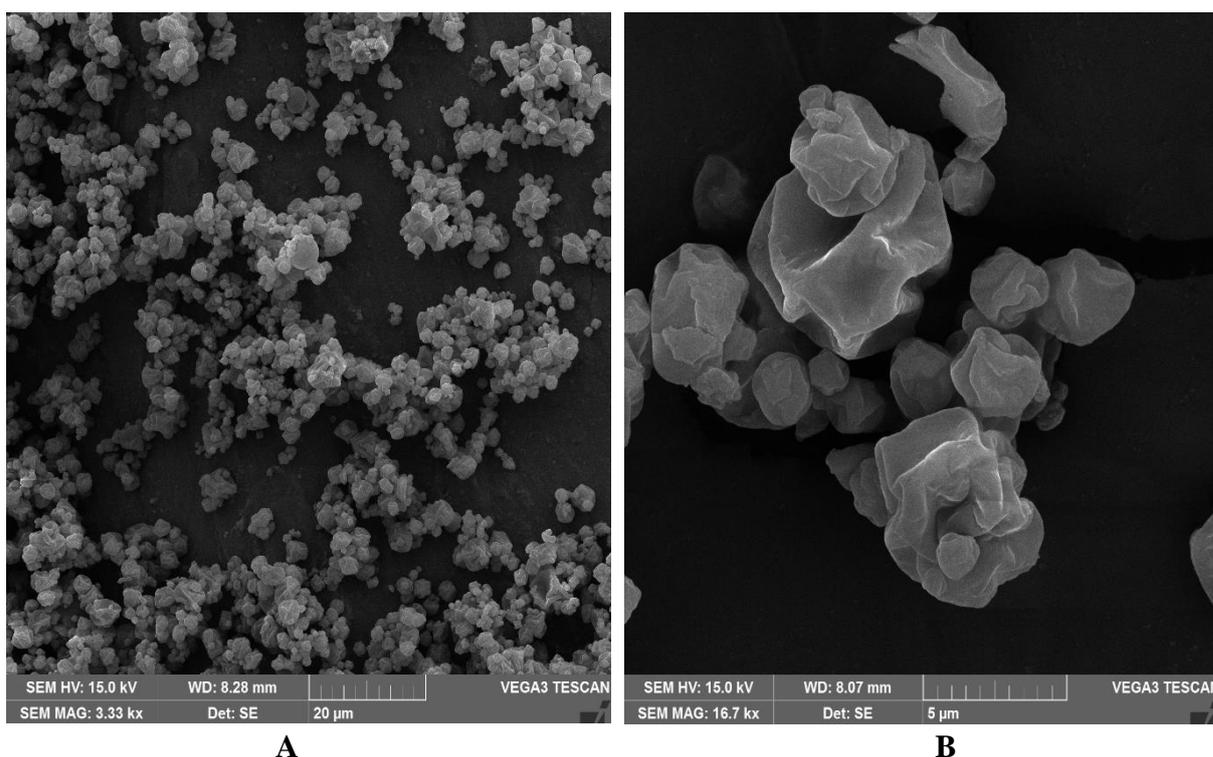


Figura 23 – Fotomicrografia eletrônica de varredura do ES obtido por leito de jorro, com velocidade de alimentação de 3 mL/min. A – Aumento de 5.000 x; B – Aumento de 10.000 x.

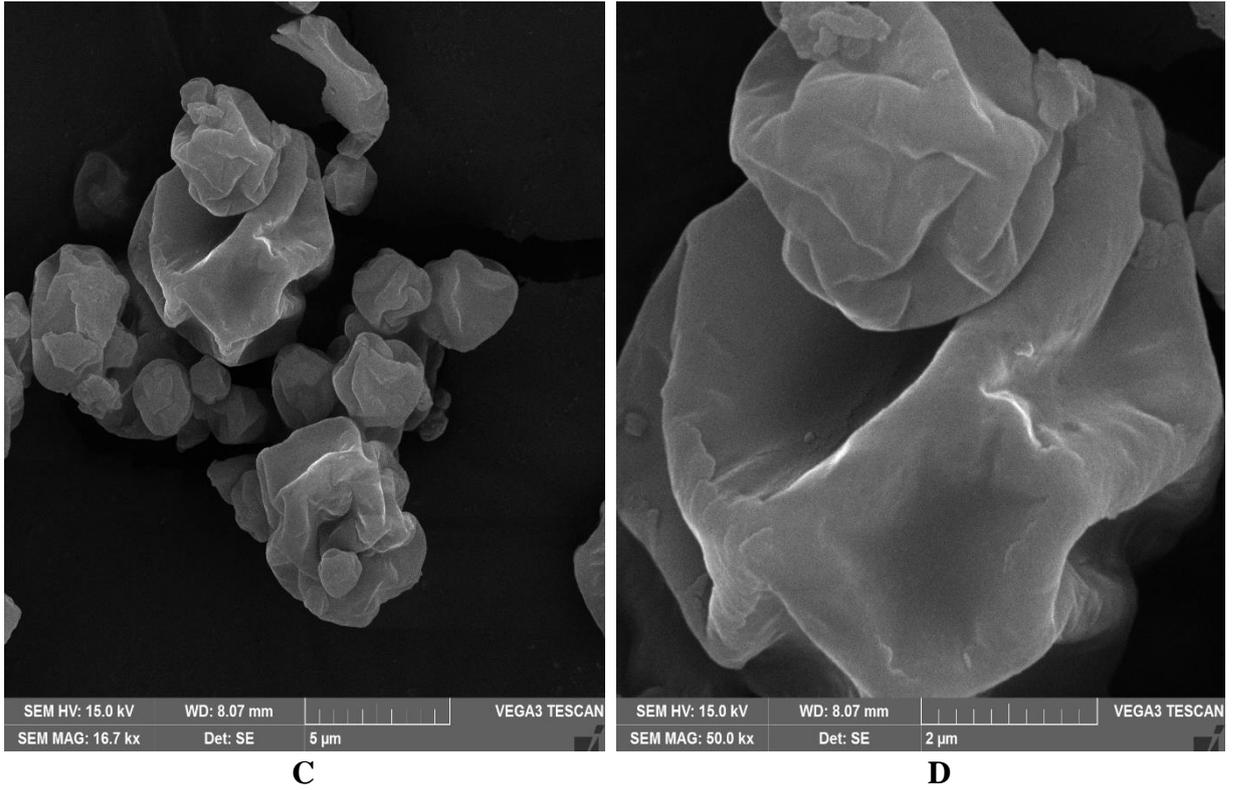
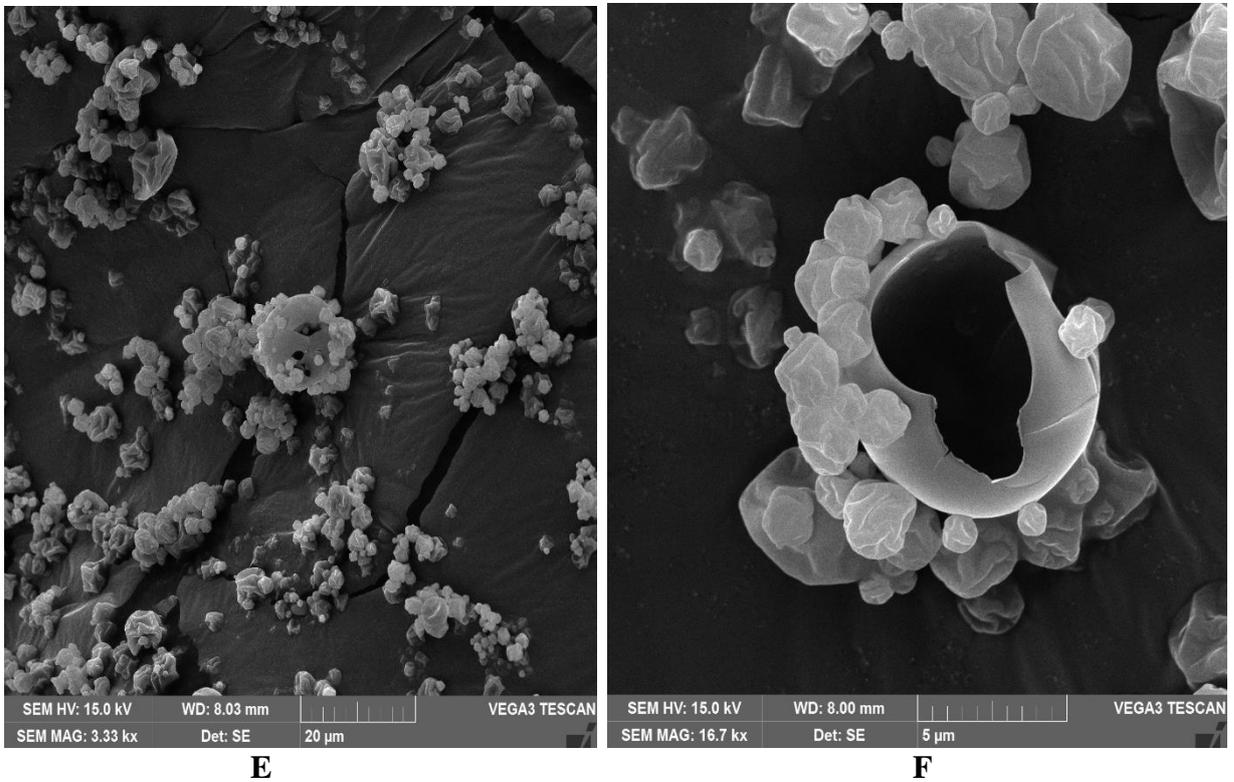


Figura 24 – Fotomicrografia eletrônica de varredura do ES obtido por leite de jorro, com velocidade de alimentação de 5 mL/min. C – Aumento de 10.000 x; D – Aumento de 30.000 x.



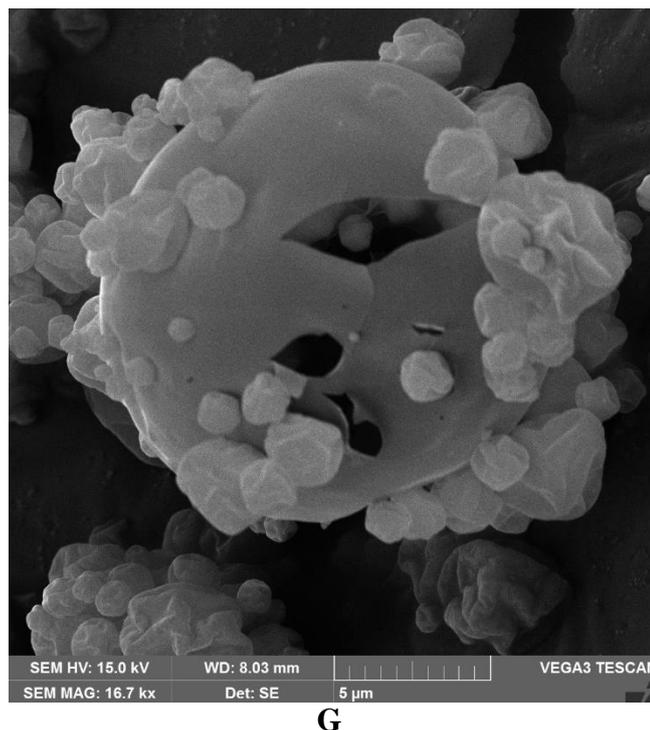


Figura 25 – Fotomicrografia eletrônica de varredura do ES obtido por leito de jorro, com velocidade de alimentação de 7 mL/min. E – Aumento de 10.000 x; F e G – Aumento de 20.000 x.

Para todas as imagens, os ES de *E. uchi* revelaram partículas irregulares em tamanho, além de apresentarem tendência a aglomeração. Secagens realizadas por leito de jorro, devido a colisões interpartículas, proporcionam formatos irregulares e partículas com menores diâmetros. Além disso, estas aglomerações podem ser características da higroscopicidade da amostra, fato este, verificado por análise macroscópica. Este comportamento higroscópico pode ser decorrente de vários fatores, entre eles, a presença de grupos funcionais hidroxilas ou de grande quantidade de constituintes apresentando grupos polares, como neste caso, a bergenina, formando ligações moleculares (SOARES, 1997).

De modo geral, principalmente nas fotomicrografias 23 e 24, a superfície das partículas apresenta certo grau de rugosidade. NIJDAM; LANGRISH (2006) observaram que quando a temperatura de secagem é mais baixa, a superfície das partículas ficam úmidas e flexíveis por mais tempo, tornando-as murchas ou enrugadas quando resfriadas. Porém, neste caso também, a permanência das partículas na câmara de secagem, pelas velocidades de alimentação 3 e 5 mL/min, é maior, indicando que talvez a taxa de transferência de calor não foi uniforme em toda a câmara. Por outro lado, na imagem 24, com 7 mL/min de velocidade de alimentação, são encontradas partículas esféricas e ocas, com orifícios ou deformações, representando a saída do solvente. Altas velocidades de secagem e temperaturas mais altas, causam a evaporação mais rápida da água, resultando em partículas com superfícies lisas e duras (MISHRA; BRAHMA;

SETH, 2017). O teor de sólidos igualmente interfere no processo de secagem, pois quanto menor o conteúdo de sólidos na solução extrativa, maior o espaço oco interno da partícula e menos espessas são as paredes (CAO *et al.*, 2000).

Nas partículas dos ES obtidos pelo *spray dryer*, nas Figuras 26 a 27, respectivamente, representando as velocidades de alimentação, 3 e 5 mL/min, a maioria apresentou formato esférico e superfície lisa, uma vez que, o método por atomização fornece uma alta proporção de partículas arredondadas (SOUZA *et al.*, 2009). Viscosidade baixa da formulação (solução extrativa) auxilia na formação de gotas esféricas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009). Nestas secagens, dificilmente foram encontradas partículas ocas (cascas) com orifícios. Independentemente do mecanismo de formação das partículas ocas, o processo de evaporação inicia na superfície, resultando em sólidos com diferentes morfologias. Esferas ocas podem ser formadas, se a casca ficar rígida rapidamente, caso contrário, partículas onduladas ou enrugadas serão formadas (VEHRING, 2008).

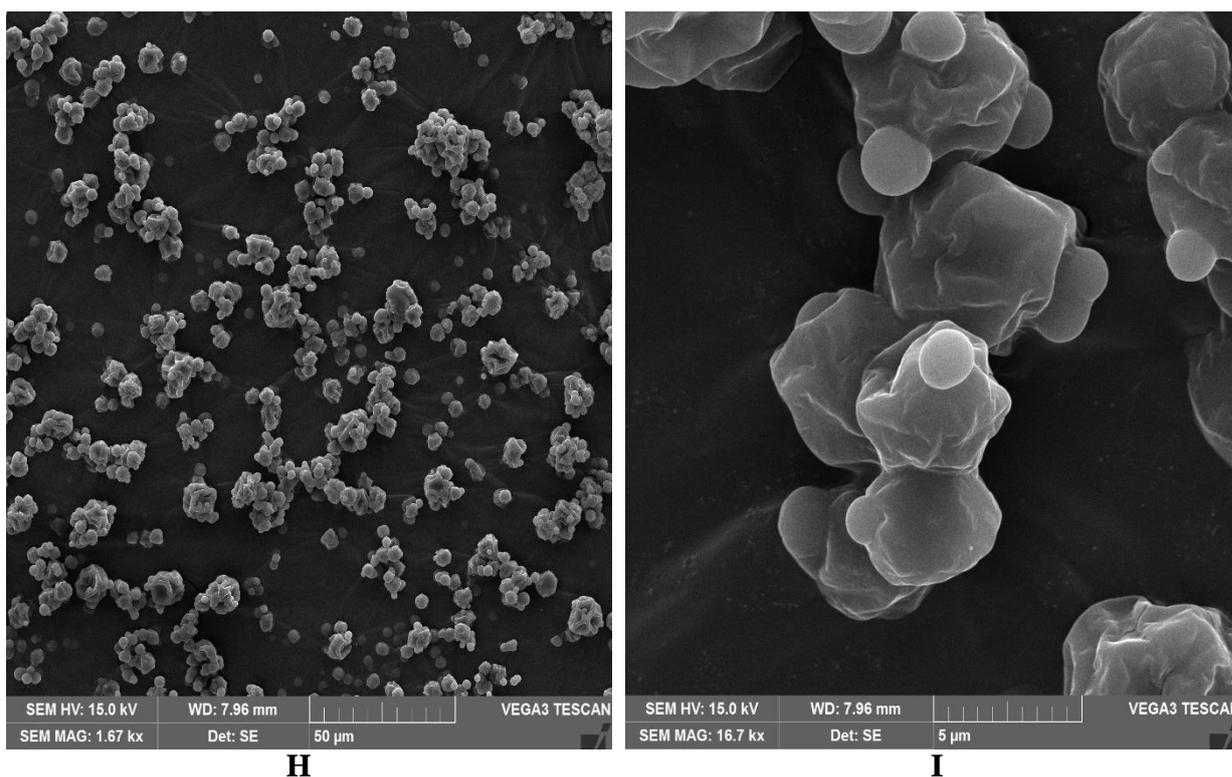


Figura 26 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura do ES obtido por *spray dryer*, com velocidade de alimentação de 3 mL/min. H – Aumento de 5.000 x e I – Aumento de 20.000 x.

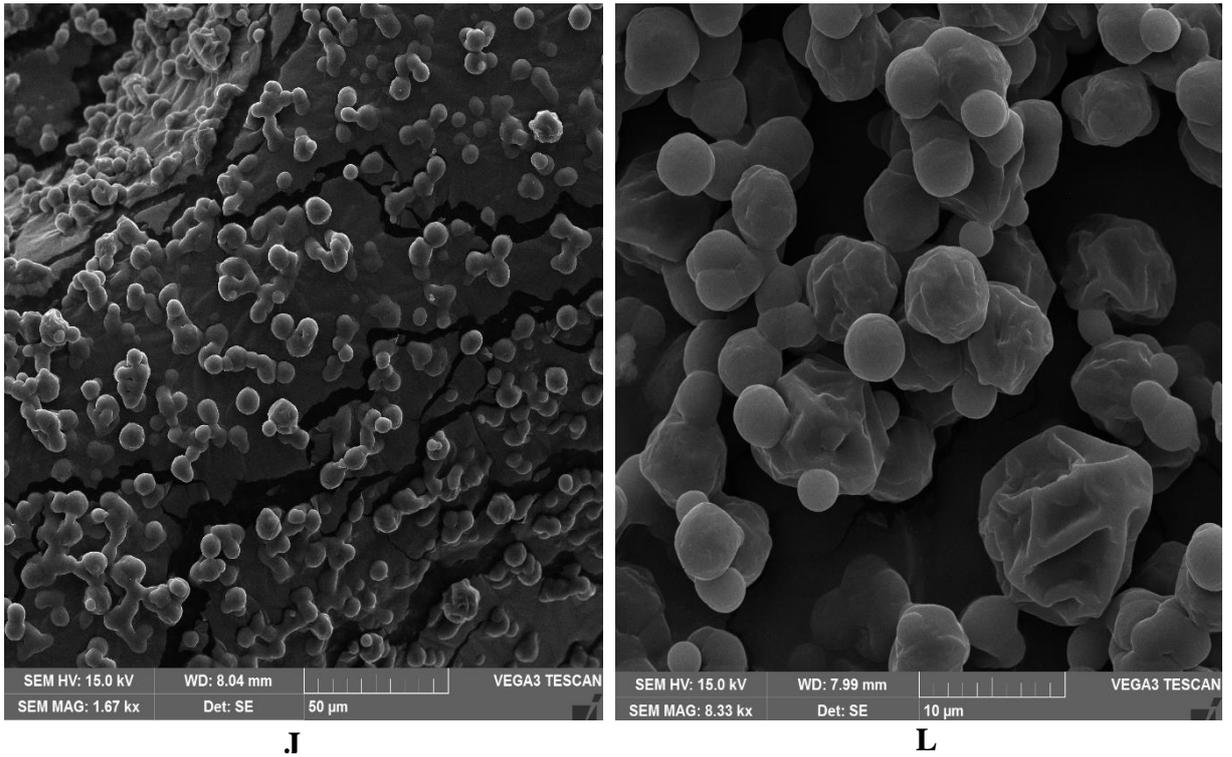


Figura 27 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura do ES obtido por *spray dryer*, com velocidade de alimentação de 5 mL/min. J – Aumento de 5.000 x e L – Aumento de 15.000 x.

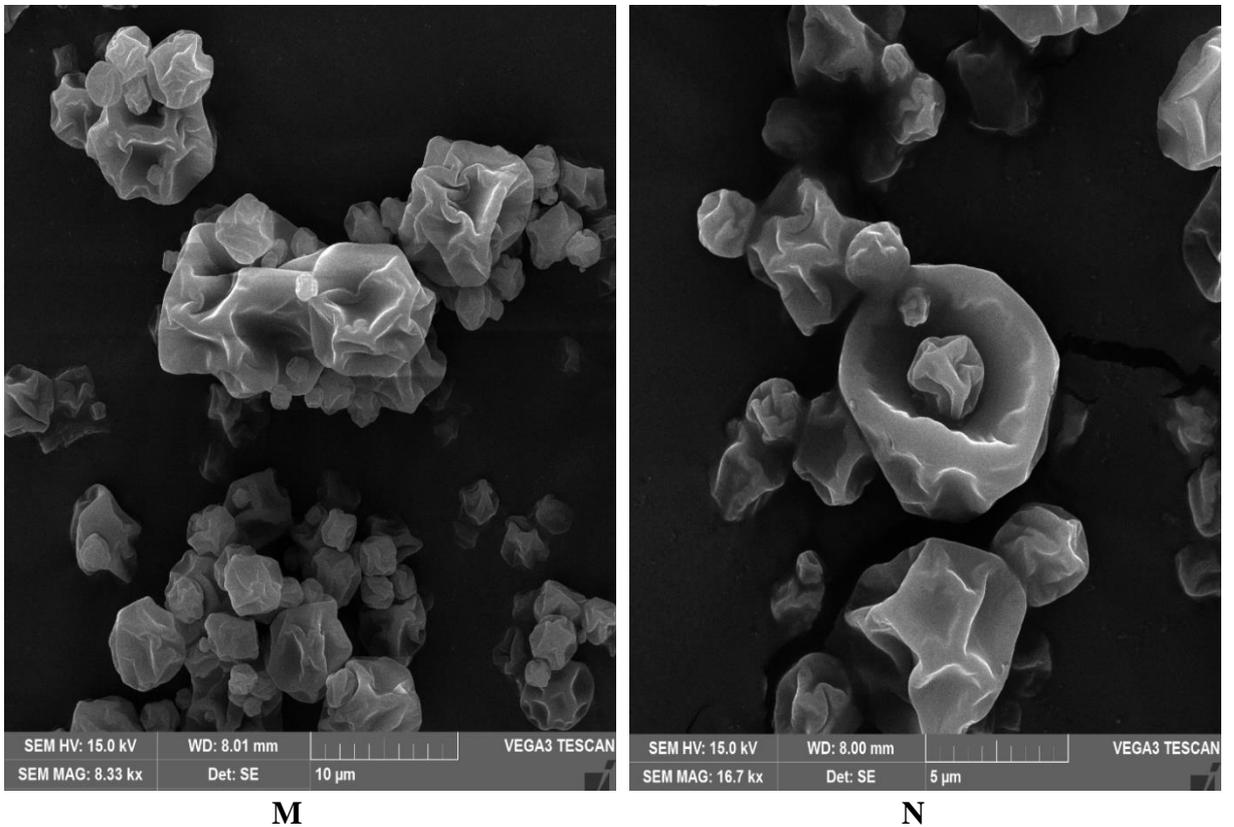


Figura 28 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura do ES obtido por *spray dryer*, com velocidade de alimentação de 7 mL/min. M – Aumento de 15.000 x e L – Aumento de 20.000 x.

Ao contrário, na Figura 28, as partículas do ES, na vazão de 7 mL/min, não formaram esferas, tornando incontestável que, fluxos de alimentação mais rápidos no *spray dryer* e temperaturas de entrada e de saída não adequadas, podem interferir na evaporação do solvente ou na morfologia da partícula, ou seja, ao contrário do que aconteceu no equipamento leito de jorro, no *spray dryer*, as velocidades de alimentação menores são mais apropriadas.

Mas algo em comum foi perceptível em todas as imagens, independentemente da velocidade de alimentação e equipamento, que foram as partículas menores aderidas as partículas maiores, formando aglomerados. Estas formações podem ser favorecidas pela baixa densidade aparente e pela higroscopicidade do pó (CANO-CHAUCA *et al.*, 2005).

Com todas as informações colhidas após a análise de rendimento, umidade e avaliação morfológica, o ES que apresentou melhores características, principalmente frente a higroscopicidade, foi o obtido por secagem em leito de jorro, com temperatura de entrada de 110 °C e velocidade de alimentação de 7 mL/min.

A partir disso, com a intenção de aprimorar as propriedades tecnológicas deste pó foi introduzido ao processo o polissorbato 80 (TweenTM 80) como adjuvante de secagem. A finalidade da adição deste adjuvante (tensoativo) foi para reduzir a tensão superficial da SE, diminuindo na mesma proporção, a energia gasta para a formação de gotículas, o que em geral além de aumentar a velocidade de aspersão tende a aumentar o rendimento do produto seco (DE CAMPOS, 1996; SOARES, 2002). Assim, foi adicionada à SE aquosa o polissorbato 80 na proporção de 5%, calculado sobre o resíduo seco (0,6193 g%) da SE aquosa. Os dados experimentais referentes ao rendimento e a umidade do Produto Seco por Aspersão (PSA) estão demonstrados na Tabela 36.

Ensaio	Dados experimentais - PSA Média ± DP
Rendimento (%)	38,74
Perda por dessecação (%)	6,15 ± 0,04

Tabela 36 – Valores de rendimento (%) e perda por dessecação (g%) para o PSA de *E. uchi* em leito de jorro.

Na comparação destes dados, com os resultados obtidos anteriormente com o ES escolhido (fluxo 7 mL/min), observa-se que não houve aperfeiçoamento do produto final, ou seja a adição do adjuvante (tensoativo) não diminuiu a umidade e não melhorou o rendimento operacional, pelo contrário, o PSA resultante apresentou um rendimento extremamente baixo (38,74%) quando comparado a secagem sem o adjuvante (66,73%). No entanto, para uma

conclusão mais exata do ocorrido, são necessários mais experimentos, inclusive avaliando distintas concentrações do polissorbato 80, a fim de comprovar que este tensoativo realmente não auxilia na secagem. Sendo assim, para o presente trabalho, e de acordo com os resultados encontrados, a obtenção de ES sem adição do tensoativo demonstrou ser mais viável tecnologicamente.

5.5.2 Avaliação da atividade biológica do ES de *E. uchi*

5.5.2.1 Determinação do teor de PT e atividade antioxidante

Conforme já comentado neste estudo, as cascas do caule de *E. uchi* são utilizadas tradicionalmente, na forma de chá, no combate a inflamação e infecções do trato geniturinário feminino. Desta planta, os frutos também possuem importantes benefícios para a saúde humana, e um deles está relacionado a capacidade antioxidante (FREITAS *et al.*, 2018). Inclusive, alguns estudos não só atribuem aos compostos fenólicos a ação antioxidante como em muitos casos, foi demonstrado maior potencial dessas substâncias em comparação as vitaminas C e E (SCALBERT *et al.*, 2007; DAI; MUMPER, 2010). Dessa forma, para confirmar esta ação biológica, são necessárias pesquisas de quantificação e identificação de metabólitos secundários, especialmente os fenóis, bem como realizar ensaios relacionados a esta atividade, tais como os ensaios enzimáticos de DPPH e ABTS.

As substâncias antioxidantes inibem ou retardam as reações em cadeia de oxidação de outras moléculas (VELIOGLU *et al.*, 1998). Espécies reativas de oxigênio (EROs) causam, comprovadamente, danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas (SOUSA *et al.*, 2007). Para os polifenóis, a atividade antioxidante ocorre principalmente devido às suas propriedades redutoras e a estrutura química, agindo na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais em transição (CHUN *et al.*, 2005). Deste modo, com a determinação do teor de PT, foi possível, em seguida, determinar o potencial antioxidante do extrato seco de *E. uchi* por meio dos ensaios DPPH, ABTS e antioxidante celular, cujos resultados estão apresentados na Tabela 37.

O teor de polifenóis no ES de *E. uchi* de 18,6 g% foi considerado bom para um extrato seco obtido de solução aquosa de *E. uchi*, uma vez que Lima (2018) encontrou 16,14 g% de PT em ES também oriundo de uma solução aquosa. Para Tacon (2012), os teores de PT variaram entre 27,34 g% a 31,57 g%, valores superiores, porém os ES foram obtidos em extrações por maceração com solvente hidroalcoólicos, e com proporção de droga de 16,5% (m/v). Mas para Politi (2009), os extratos aquosos obtidos de decocção e infusão apresentaram valores superiores, afirmando que isso aconteceu, a cargo da similar polaridade do solvente e dos polifenóis.

Ensaio	ES de <i>E. uchi</i> Média ± DP	Padrão ácido gálico Média ± DP
Teor de PT (%)	18,6 ± 1,10	-
PT (µg EqAG/mL)	104,30 ± 6,40	-
DPPH (% inibição)	86,90 ± 0,10	86,20 ± 0,10
DPPH (CI50 µg/mL)	19,70 ± 0,10	2,90 ± 0,10
ABTS (% inibição)	99,70*	92,20 ± 0,70
ABTS (CI50 µg/mL)	12,40 ± 2,00	3,50 ± 0,10

Tabela 37 – Teor de PT (g%) e capacidade antioxidante do ES de *E. uchi*.

*DP < 0,001.

Baseado nestas condições, os ensaios DPPH e ABTS foram escolhidos para avaliar a atividade antioxidante do ES. A capacidade do ES em sequestrar o radical livre de DPPH mostrou valor de 86,90%, e com concentração de 19,70 µg/mL ocorreu 50% de inibição. A atividade mais ativa foi em sequestrar o radical ABTS com 99,70% de inibição, e com concentração de ES menor (12,40 µg/mL). A relação da capacidade dos extratos polares em sequestrar radicais de DPPH pode estar relacionada com a presença dos grupos hidroxilas disponíveis nos compostos fenólicos (MENSOR *et al.*, 2001). Contudo, o ensaio DPPH é um método colorimétrico, ou seja, pigmentos podem interferir nos resultados, como no caso do extrato marrom de *E. uchi* (CHANDRASEKAR *et al.*, 2006). Assim, os dados revelam que o ES mesmo não apresentando elevados índices de polifenóis, a capacidade de sequestrar os radicais DPPH e ABTS ocorre, porém mais pesquisas devem ser realizadas utilizando ensaios mais específicos com a finalidade de descobrir quais substâncias promovem esta ação biológica.

A literatura destaca que o marcador bergenina encontrado em maior número no extrato de *E. uchi*, não pode atuar como excelente antioxidante (BAJRACHARYA, 2015). Bergenina é um bom sequestrador de radicais hidroxila (ABREU *et al.*, 2008; SINGH; BARIK; PRIYADARSINI, 2009). Mas na inibição de radicais livres como o superóxido e o DPPH, a

bergenina não foi eficaz (RANA *et al.*, 2005; ROSELLI; LENTINI; HABTEMARIAM, 2012). No estudo de Muniz (2013), uma concentração alta de bergenia (1000 $\mu\text{g/mL}$) conseguiu sequestrar apenas cerca de 33% de radicais de DPPH, fatos esses que reforçam a necessidade de maiores estudos fitoquímicos e biológicos com a espécie *E. uchi* a fim de comprovar todo o seu potencial químico e terapêutico.

Na inibição de ROS em células de fibroblastos MRC5, o ES de *E. uchi* não obteve um bom resultado (Figura 29), principalmente quando comparado com o padrão quercetina (Figura 30). Condições fisiológicas normais, danos celulares oxidativos são inibidos por defesas antioxidantes que neutralizam as espécies reativas de oxigênio. Contudo, no estresse oxidativo, as células são incapazes de promover este processo, resultando em algum dano celular (OLIVEIRA, 2015). Deste modo, mesmo com valores baixos, o ES de *E. uchi*, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, foi capaz de inibir apenas 18% de ROS celular e, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, sua capacidade foi de 5,7%.

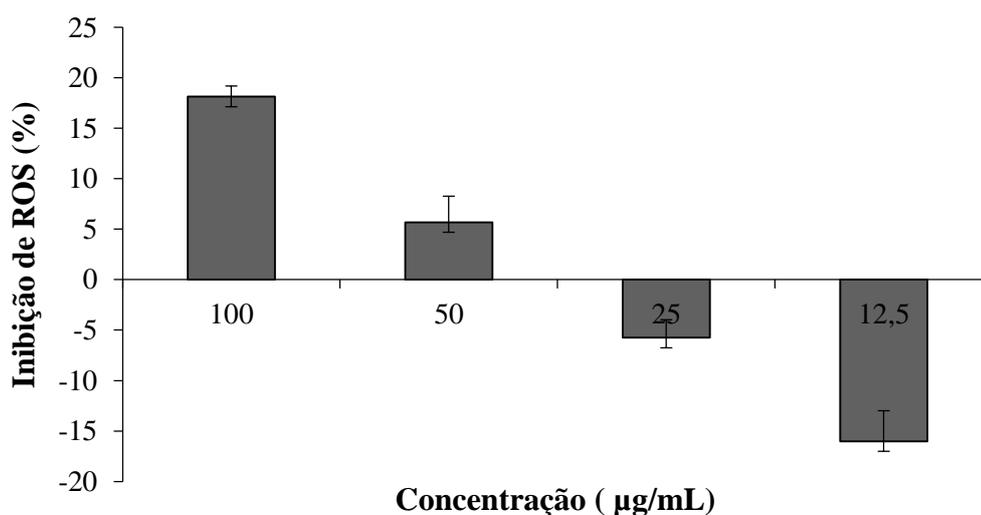


Figura 29 – Histograma representando a atividade antioxidante celular do ES de *E. uchi*, através da inibição de ROS.

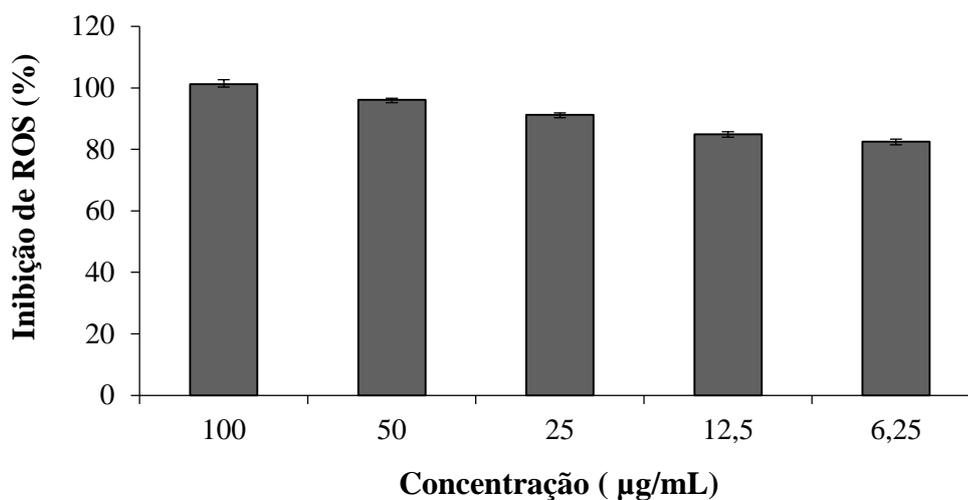


Figura 30 – Histograma representando a atividade antioxidante celular da quercetina, através da inibição de ROS.

5.5.2.2 Atividade antimicrobiana

Com a finalidade de desenvolver produtos fitocosméticos e fitoterápicos para o auxílio e tratamento de afecções vulvovaginais, a atividade antimicrobiana é fundamental para determinar se estes produtos terão a ação requerida. Mesmo pelas indicações já conhecidas do chá das cascas de *E. uchi*, investigações também afirmam que, a substância bergenina, inibe o crescimento de diversos microrganismos.

Infecção do trato genital feminino é a doença mais comum em ambulatórios ginecológicos, a qual pode progredir para condições severas causando doenças inflamatórias pélvicas (DIPs), infertilidade, partos prematuros e dor pélvica crônica (DONDEERS, 2010; YANG *et al.*, 2012). A maioria destas infecções é causada por patógenos mistos, embora alguns microrganismos possam ser identificados como dominantes (LAMONT *et al.*, 2011). Espécies de *Candida*, como *C. albicans* e *C. glabrata*; bactérias coco Gram-positivos, como *Staphylococcus aureus*; bactérias bacilos Gram-negativos, principalmente *Escherichia coli*; e bactérias fastidiosas, no caso, *Gardnerella vaginalis*, são os patógenos mais isolados em vulvovaginites (MONIF; CARSON, 1998).

Assim, a atividade antimicrobiana foi avaliada para o ES de *E. uchi* e para a bergenina isolada (comercial), contra cepas de *C. albicans* (ATCC 90028), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. parapsilosis* (ATCC 90018), *C. tropicalis* (ATCC 750), e *S. aureus* (ATCC 29213). A Tabela

38 mostra os resultados obtidos da concentração inibitória (CI50), em duplicata, para os diferentes gêneros de *Candida*, com leituras em 24 e 48 horas. As cepas *C. albicans*, *C. Krusei* e *C. tropicalis*, mostraram-se mais sensíveis ao ES, uma vez que concentrações baixas (25 µg/mL) foram capazes de inibir o crescimento.

Amostras	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	CI50 µg/mL Média ± DP							
ES	25 ^a	50 ^b	25 ^a	100 ^b	100 ^a	200 ^b	25 ^a	25 ^b
Bergenina	800 ^a	>800 ^b	400 ^a	>800 ^b	400 ^a	>800 ^b	200 ^a	>800 ^b
Anfotericina B	0,12 ^a	0,12 ^b	1 ^a	2 ^b	1 ^a	2 ^b	1 ^a	2 ^b

Tabela 38 – Atividade antifúngica através da CI50 para as amostras de ES de *E. uchi* e bergenina. Leituras: a – 24 horas; e b – 48 horas.

OBS: para todos os resultados da atividade antifúngica, o DP foi < 0,001.

Tacon (2012), encontrou melhores resultados do ES obtido por *spray drying* para as cepas de *C. Krusei* e *C. parapsilosis*, respectivamente, 3,25 µg/mL e 9,76 µg/mL. Entretanto, para *C. albicans*, a concentração inibitória foi maior, 2500 µg/mL. Já no estudo de Lima (2018), os resultados de CI50 para *C. albicans* foram semelhantes (50 µg/mL). Para a bergenina isolada de *E. uchi*, Silva *et al.* (2009) observou concentrações inibitórias menores (4,9 µg/mL) contra as cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, enquanto que no presente trabalho a molécula de bergenina comercial demonstrou concentrações bastante elevada (acima de 200 µg/mL) contra todas as cepas testadas.

Na atividade antibacteriana, os dados experimentais do ES e da bergenina não foram satisfatórios, ou seja, não foram obtidos halos de inibição frente a bactéria *S. aureus*, conforme Figura 31. Dados condizentes com a literatura, onde Politi (2009) e Silva *et al.* (2009) também não observaram resultados promissores nos extratos testados contra esta bactéria Gram-positiva pelo método de difusão em ágar. O primeiro autor ressalta que apesar do resultado negativo, a grande quantidade de taninos descoberta nas cascas de *E. uchi* podem representar uma explicação para os usos populares, como antibacteriano e anti-inflamatório. Teorias sobre os responsáveis pela ação antimicrobiana ainda são discutidas, pois alguns estudos demonstram que a bergenina isolada possui atividade contra bactérias, porém outros confirmam o resultado aqui obtido (BAJRACHARYA, 2015; NYEMB *et al.*, 2018). Todavia, a pesquisa de Silva;

Teixeira (2015) mostrou evidências de resultados promissores para o extrato hidroetanólico de *E. uchi* contra *B. cereus*.

O controle positivo oxacilina apresentou, em duplicata, halo de inibição de $10,6 \text{ mm} \pm 2,33 \text{ mm}$.

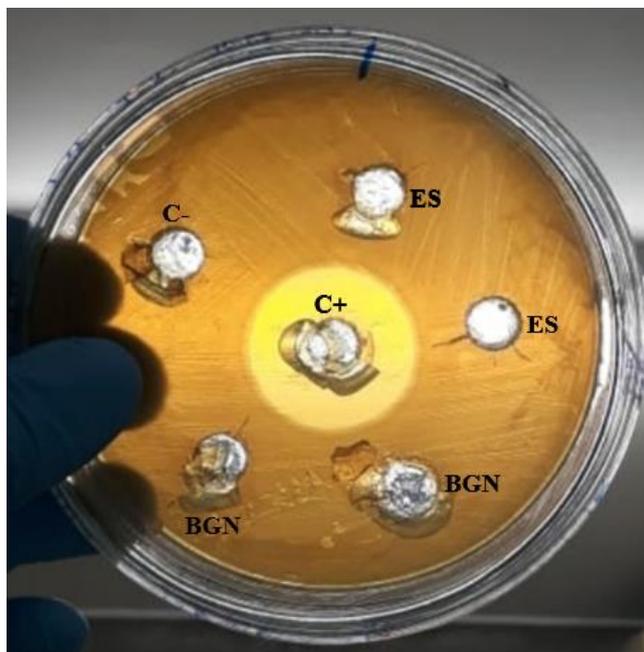


Figura 31 – Representação do método de difusão em ágar com extrato seco de *E. uchi* (ES) e bergenina (BGN) contra a bactéria *S. aureus* ATCC 29213. C- (controle negativo - água esterilizada) e C+ (controle positivo - oxacilina).

5.5.3 Avaliação da citotoxicidade

Métodos de avaliação da citotoxicidade são amplamente utilizados pela indústria farmacêutica, com o objetivo de rastrear e averiguar a biossegurança, assim como, avaliar o potencial antitumoral tanto de moléculas isoladas (exemplo: fármacos) como de compostos (exemplo: formulações) (SILVA *et al.*, 2019). Entre estes métodos, o ensaio Alamar Blue tem sido amplamente disseminado nos último 50 anos para estudos de viabilidade celular e citotoxicidade (RAMPERSAD, 2012). Alamar Blue proporciona uma análise quantitativa da proliferação celular e da atividade metabólica das células (SILVA *et al.*, 2019).

O ES de *E. uchi* foi avaliado por este método, nas concentrações de $6,25 \mu\text{g/mL}$ a $100 \mu\text{g/mL}$, em linhagens celulares de fibroblastos MRC5, para verificar sua toxicidade *in vitro*. De acordo com a Figura 32, o ES não apresentou citotoxicidade em nenhuma concentração testada,

apresentando 100% de viabilidade celular, assemelhando-se ao controle negativo DMSO. Na concentração de 6,25, 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$, a viabilidade celular foi maior que 100%, demonstrando que os fibroblastos MRC5 continuavam com seu metabolismo normal, proporcionando a sua proliferação (crescimento). Estes dados são indícios de que o ES de *E. uchi* pode ser administrado em humanos, principalmente através de formas farmacêuticas tópicas fitoterápicas ou fitocosméticas, de modo seguro. Politi *et al.* (2011), constatou que diversos extratos de *E. uchi* não foram citotóxicos, mantendo a taxa de sobrevivência dos fibroblastos também em 100%. Em estudo *in vivo*, Politi *et al.* (2010), não encontrou alterações fisiológicas ou comportamentais, e mortes em camundongos machos (*Mus musculus*), através do teste de toxicidade oral.

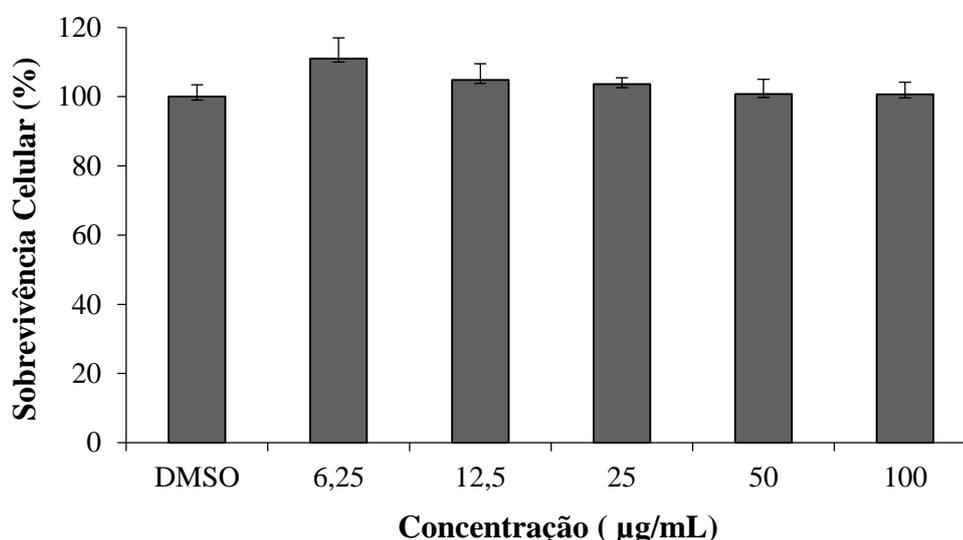


Figura 32 – Efeito de diferentes concentrações do ES de *E. uchi* sobre a viabilidade em linhagem de células MRC5.

5.6 Desenvolvimento de formulações para uso tópico contendo ES de *E. uchi* e óleo de *B. excelsa*

5.6.1 Seleção das formulações de sabonete líquido íntimo

Sabonetes íntimos representam melhora na qualidade de vida de mulheres que passaram por tratamentos para vulvovaginites. Higiene íntima com o produto adequado proporciona conforto e diminui as recidivas das infecções (BAHAMONDES *et al.*, 2011). Novas estratégias para reduzir as infecções ginecológicas, gerando processos padronizados de higiene íntima,

podem minimizar os custos do tratamento e melhorar a qualidade de vida das mulheres durante esta etapa (CUEVAS *et al.*, 2010). Embora o senso comum motive a prática da boa higiene feminina, um estudo com 500 mulheres avaliou comportamentos inadequados de higiene, sendo estes relacionados diretamente com a vaginose bacteriana (ANAND; SINGH; UNISA, 2015). Em outra pesquisa transversal sobre os hábitos de higiene íntima em mulheres na menopausa, foi constatado que metade das mulheres avaliadas usaram, nos últimos 3 meses, pelo menos 2 produtos para tratamentos vulvovaginais sem prescrição médica (EREKSON *et al.*, 2014).

Analisando o mercado para verificar lançamentos de produtos utilizados para a higiene íntima, existem diversos tipos e formatos de produtos a disposição para as consumidoras, incluindo sabonetes, espumas, sabonetes líquidos, toalhas pré-umedecidas, *sprays* desodorantes, entre outros. Os ingredientes principais de todos estes produtos são, o ácido láctico, a glicerina, e uma variedade de extratos naturais, com finalidades hidratantes, neutralizadores de pH e odores, e como antimicrobianos (CHEN *et al.*, 2017). Desta forma, o desenvolvimento de um sabonete líquido, com atividade anti-inflamatória e antifúngica, pode acarretar em uma evolução no tratamento de vulvovaginites. Mas para permitir o acesso do produto ao consumidor são necessárias diversas análises para comprovar a efetividade e estabilidade do mesmo quando comercializado.

Inicialmente foram obtidas 9 formulações de sabonete íntimo, com diferentes proporções do ES de *E. uchi* e do óleo de *B. excelsa*, assim como, diferentes conformações de excipientes. Portanto, 24 horas após a obtenção das formulações (T0), a descrição das características organolépticas, a determinação do pH e o teste de centrifugação foram efetuados. Este período de 24 horas teve como finalidade a maturação dos sabonetes líquidos, e que pode ser realizado para outros tipos de formulações, prazo esse necessário para que o produto adquira viscosidade e consistência. Já o teste de centrifugação fornece abreviadas informações sobre a instabilidade do produto, principalmente detectando a floculação e a coalescência (FRIEDRICH *et al.*, 2007). Os resultados da identificação das características das amostras são expressos nas Tabelas 39 e 40.

Análises	Formulações – Sabonete íntimo				
	F1	F2	F3	F4	F5
					
Características organolépticas	Cor marrom escuro, aspecto transparente e viscoso	Cor marrom escuro e aspecto viscoso	Cor marrom claro, opaco e aspecto viscoso	Cor marrom escuro, aspecto transparente e viscoso	Cor marrom claro, aspecto transparente e viscoso
pH (média ± DP)	4,57 ± 0,00	4,60 ± 0,01	4,49 ± 0,02	4,73 ± 0,02	4,10 ± 0,00
Centrifugação	Presença de precipitado branco	Separação de fases, precipitado branco	Presença de precipitado escuro	Presença de precipitado branco	Homogêneo

Tabela 39 – Análise organoléptica, determinação do pH e centrifugação das formulações de sabonete íntimo, no tempo T0.

Análises	Formulações – Sabonete íntimo				
	F6	F7	F8	F9	Dermacyd®
					
Características organolépticas	Cor marrom escuro, aspecto transparente e viscoso	Cor marrom claro, opaco e aspecto viscoso	Cor marrom escuro, opaco e aspecto viscoso	Cor marrom escuro, aspecto transparente e viscoso	Cor branca perolada e aspecto viscoso
pH (média ± DP)	4,59 ± 0,01	4,63 ± 0,04	4,49 ± 0,02	4,33 ± 0,02	4,50 ± 0,05
Centrifugação	Presença de precipitado branco	Separação de fases, precipitado escuro	Presença de precipitado branco	Presença de precipitado branco	Homogêneo

Tabela 40 – Continuação: análise organoléptica, determinação do pH e centrifugação das formulações de sabonete íntimo.

Conforme as tabelas acima, observa-se que todas as formulações obtiveram, após a centrifugação, uma camada branca na parte superior, ou seja, formaram uma camada de espuma. Durante a agitação ou centrifugação, é comum a ocorrência deste fenômeno (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001), porém das 9 formulações testadas, 8 apresentaram precipitados e ou separação de fases o que configura instabilidade e, apenas uma (F5) mostrou aspecto homogêneo.

Nesta primeira etapa, para a seleção da formulação de sabonete líquido, foi levado em consideração maior semelhança com o sabonete Dermacyd® (formulação padrão) em termos de aspecto e pH, ou seja, ácido ($\text{pH} < 7$) que se adéqua ao pH vaginal (entre 3,8 a 4,2), condição ideal para a sobrevivência dos *Lactobacillus*, pertencente a flora microbiana normal da vagina (TACHEDJIAN *et al.*, 2017).

Todas as formulações apresentaram coloração marrom, ocasionado pelo ES de *E. uchi*. Neste estudo não foram testadas outras bases ou excipientes que minimizassem esta cor. Porém, a amostra F5 ficou visivelmente com aspecto melhor, transparente e perolada, além disso, esta foi selecionada no teste de pré-estabilidade, pois após a centrifugação, foi a única que permaneceu homogênea. Isto pode ter ocorrido devido a maior quantidade de tensoativo aniônico, pois com o aumento do lauril éter sulfato de sódio, a turvação da formulação diminuiu, provavelmente por causa da solubilização completa dos ingredientes na fase dispersa da emulsão, além disso, foi o que determinou a estabilidade da formulação (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Tensoativos aniônicos são largamente utilizados na produção de detergentes, com participação majoritária na formulação. São substâncias orgânicas que possuem comportamento anfifílico, ou seja, apresentam em sua estrutura, região hidrofóbica e hidrofílica (PENTEADO *et al.*, 2006). Em uma formulação de sabonete, um sistema com tensoativos é designado para função de agentes espumantes, permitindo a limpeza através da remoção de células mortas, impurezas e o excedente de microflora residencial (BARANOVA *et al.*, 2018). Dessa forma, sabonetes líquidos possuem alta quantidade de detergentes, assemelhando-se a composição dos xampus (MIGLIATO *et al.*, 2009).

Outros agentes utilizados para melhorar a consistência do sabonete líquido foram a hidroxietilcelulose (F6) e PEG (polietilenoglicol) 6000 (F7), mas as duas formulações não foram aprovadas no teste de centrifugação, pois apresentaram precipitados. Segundo Petrovska *et al.* (2017), após avaliar diversos produtos já estabelecidos no mercado, verificou-se que a tendência de fabricação dos produtos para higiene íntima é usar um conjunto clássico de tensoativos (combinação de aniônicos, anfóteros e não-iônicos) para formar uma boa

quantidade de espuma. Só que, para obter a viscosidade ideal para os consumidores, muitos fabricantes utilizam modificadores de viscosidade, como o cloreto de sódio, espessantes ou adjuvantes derivados da celulose. Na formulação F7 foi adicionado o PEG 6000, de caráter não iônico com alto peso molecular. É um espessante muito empregado em xampus infantis, pois diminui a irritação causada pelos tensoativos (CHIROLI; CAMPOS; SILVA, 2013).

Muitos estudos demonstram que a hidroxietilcelulose promove diferentes níveis de espessamento em concentrações distintas, e não é afetado pelo pH da formulação (HIGIOKA; BARZOTTO, 2013). Em geral, polímeros derivados da celulose retardam a sedimentação e a aglomeração de partículas, atuando como uma barreira que diminui a atração entre as partículas (NUNES *et al.*, 2012). Então, talvez uma justificativa plausível para a instabilidade de F6, pode ser pela quantidade de hidroxietilcelulose utilizada, necessitando de maiores concentrações deste polímero para não ocorrer precipitados. Porém, Chirolí; Campos; Silva (2013) descrevem que este polímero pode precipitar na presença de substâncias como o sulfato de sódio.

Por outro lado, somente a estabilidade frente a centrifugação não é suficiente para selecionar uma formulação de uso tópico sendo necessários o andamento dos estudos. É imprescindível a determinação do pH do sabonete líquido, pois é muito importante que ele apresente compatibilidade com o pH vaginal. Deste modo, como já foi especificado, durante os anos reprodutivos das mulheres, o pH vaginal deve permanecer $\leq 4,5$, sendo que, valores maiores de pH podem propiciar o início de infecções (PANDA *et al.*, 2014). Os *Lactobacillus* spp. são bactérias anaeróbias que constituem a microbiota vaginal, acidificando este meio através da produção de ácido láctico por intermédio da fermentação da glicose (TACHEDJIAN *et al.*, 2017). Os sabonetes íntimos são uma alternativa para mulheres com algum tipo de infecção ginecológica, como a candidíase. Porém quando estes produtos não são adequados, como por exemplo, com pH elevado, eles podem causar desequilíbrios na microbiota vaginal, provocando odores desagradáveis e irritações (APOLINÁRIO *et al.*, 2011).

Todas as formulação apresentaram pH ácido, fator que pode ter sido influenciado pelo extrato de *E. uchi*. Ao mesmo tempo, F3, F5, F8 e F9, manifestaram valores de pH $\leq 4,5$, compatíveis com o meio vaginal, e não precisaram da inclusão de agentes acidificantes, como o ácido láctico ou o ácido cítrico. A formulação F5 novamente destacou-se, além da homogeneidade, ela demonstrou pH 4,10. Para o sabonete íntimo de referência (Dermacyd®), obteve-se valor de pH = 4,50 ($\pm 0,05$).

5.6.1.1 Avaliação da estabilidade preliminar da formulação de sabonete íntimo

Estudos de estabilidade servem como um instrumento preditivo para potenciais desvios na eficácia e na segurança definidas para o produto, durante seu desenvolvimento (BRASIL, 2004). Avaliações da estabilidade de formulações são úteis como uma triagem para prevenir possíveis alterações físicas, físico-químicas e químicas, que podem acontecer no momento da fabricação, até o tempo de prateleira (FERNANDES *et al.*, 2013). Nesta fase de experimentos, realizada por 30 dias, foram avaliadas as modificações organolépticas, a densidade, o pH e o comportamento reológico. A formulação F5 foi mantida sob três temperaturas diferentes, 5 °C (resfriamento), 25 °C (ambiente) e 40 °C (estufa), e avaliada durante um período de 30 dias. Primeiramente, baseando-se nas propriedades iniciais do sabonete líquido F5, modificações ocorreram a partir do 7º dia (T3), onde a cor ficou mais escura para as formulações armazenadas em temperaturas de resfriamento e de estufa, sendo que neste último, houve diminuição da viscosidade (Figura 33). A preparação mantida sob 25 °C permaneceu homogênea e sem alteração na cor, conforme descrição na Tabela 41.

Condição (temperatura)	Dias					
	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Resfriamento (5 °C)	N	N	N	M	M	M
Ambiente (25 °C)	N	N	N	N	N	N
Estufa (40 °C)	N	N	N	IM	IM	IM

Tabela 41 – Características organolépticas, da formulação F5, avaliadas nas condições de resfriamento (5 °C), temperatura ambiente (25 °C) e estufa (40 °C) como, normal, sem alteração (N); levemente modificada (M); e intensamente modificada (IM).

Alterações nas características sensoriais durante os testes de estabilidade, antecipam modificações que podem ocorrer até que o produto seja utilizado pelo consumidor, definindo a aceitação no mercado ou não (SILVA *et al.*, 2019). A temperatura elevada da estufa (40 °C) pode ocasionar a separação da fase oleosa da formulação, resultando em modificações na cor (SMAOUI *et al.*, 2012). Altas temperaturas também podem promover a decomposição de componentes da formulação, como a oxidação de óleos, neste caso, o óleo de *B. excelsa*, alterando o aspecto do produto. Temperaturas baixas antecipam possíveis alterações físicas, como turvação, cristalização e precipitação (BRASIL, 2004). Em avaliações de uma formulação tópica para envelhecimento cutâneo, mantida sob resfriamento, os autores Silva; Lopes (2017), observaram mudanças na cor, de branco translúcido para branco amarelado, sugerindo que a amostra sofreu um processo de degradação e oxidação.

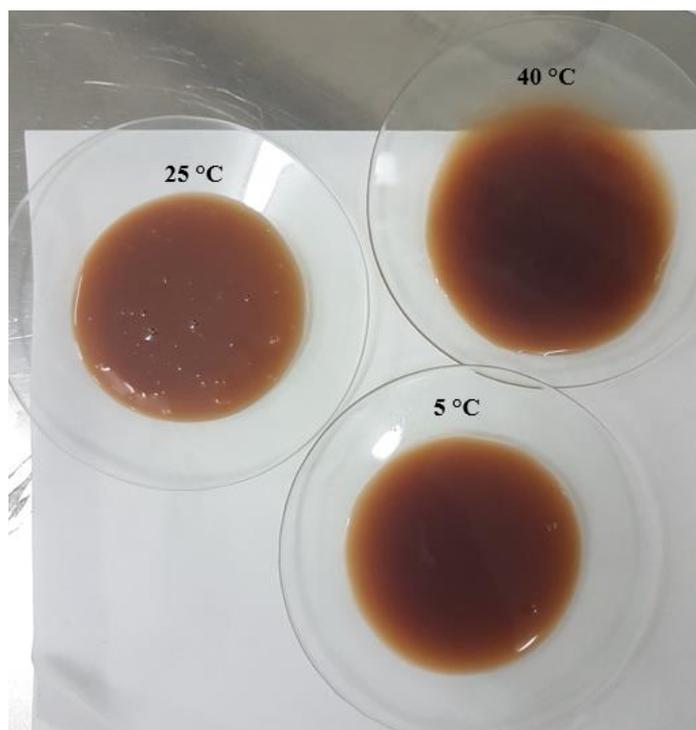


Figura 33 – Avaliação organoléptica da formulação F5, com modificações na cor e no aspecto em temperaturas de resfriamento (5 °C) e temperatura de estufa (40 °C), a partir do período T3.

Do mesmo modo, variações no pH de formulações tópicas podem influenciar nos parâmetros de estabilidade, biocompatibilidade e biodisponibilidade, comprometendo a segurança terapêutica (BUGNOTTO *et al.*, 2006). Modificações neste parâmetro sugerem que a formulação pode conter impurezas, ou que podem ter ocorrido hidrólise e decomposição de componentes, desde os adjuvantes até os extratos de plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Assim, a análise do perfil de pH é a etapa mais importante para a estabilidade química em testes acelerados (SMAOUI *et al.*, 2017).

Na Tabela 42 observa-se os valores de pH encontrados nos diferentes ambientes de armazenamento, onde um aumento de pH foi detectado a partir do T3 na temperatura de estufa (40 °C), em comparação com as demais temperaturas do teste. Considerando que não foi utilizado antioxidante na formulação, somente EDTA que age como quelante, acredita-se que nesta temperatura pode ter ocorrido oxidação dos componentes com consequente alteração do pH.

Através da análise estatística, a diferença de valores entre as condições foi significativa ($p \leq 0,05$), $p = 0,0198$, ressaltando que F5 apresentou maior alteração do pH quando submetida a temperatura de 40 °C. Esta variação ao longo dos 30 dias de testes, pode ser melhor visualizada, por meio da Figura 34.

Condição (temperatura)	Dados experimentais F5 - pH				
	Média ± DP				
	T1	T2	T3	T4	T5
Resfriamento (5 °C)	4,37 ± 0,02	4,45 ± 0,01	4,40 ± 0,02	4,47 ± 0,03	4,55 ± 0,02
Ambiente (25 °C)	4,36 ± 0,02	4,36 ± 0,06	4,42 ± 0,03	4,42 ± 0,03	4,46 ± 0,03
Estufa (40 °C)	4,37 ± 0,02	4,44 ± 0,03	4,56 ± 0,01	4,73 ± 0,02	4,91 ± 0,04

Tabela 42 – Valores de pH para a formulação de sabonete íntimo F5, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.

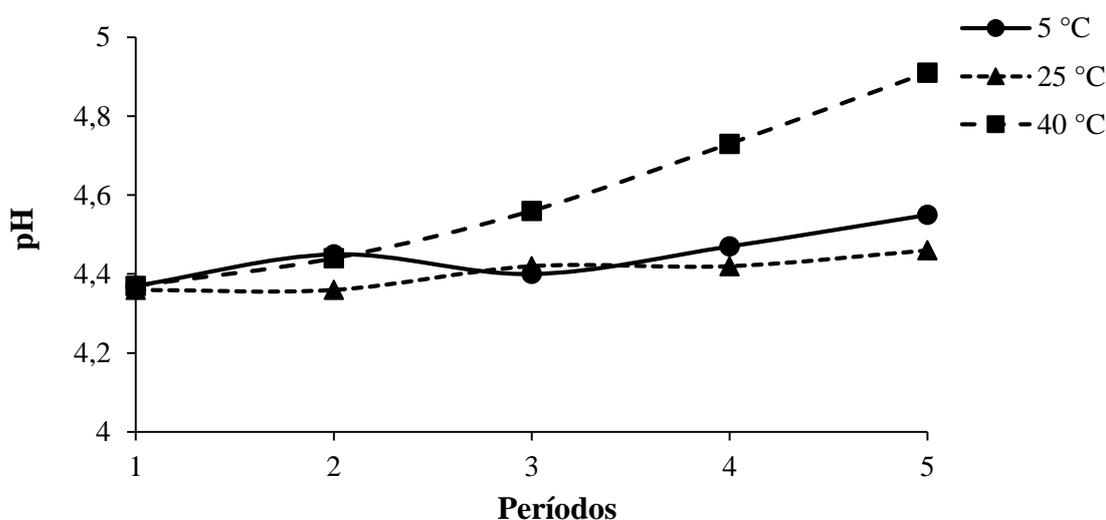


Figura 34 – Representação do valores de pH para a formulação de sabonete íntimo F5, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.

O mesmo não ocorreu para o sabonete íntimo utilizado como padrão (Dermacyd®). Em todos os dias de análises, o pH desta formulação manteve-se na mesma proporção quando submetida a diferentes temperaturas (Tabela 43). A baixa diferença de valores está melhor representada na Figura 35.

Condição (temperatura)	Dados experimentais Dermacyd® - pH				
	Média ± DP				
	T1	T2	T3	T4	T5
Resfriamento (5 °C)	4,59 ± 0,03	4,55 ± 0,05	4,51 ± 0,02	4,53 ± 0,06	4,52 ± 0,01
Ambiente (25 °C)	4,52 ± 0,03	4,50 ± 0,01	4,51 ± 0,01	4,49 ± 0,01	4,50 ± 0,05
Estufa (40 °C)	4,51 ± 0,03	4,50 ± 0,01	4,52 ± 0,02	4,47 ± 0,03	4,51 ± 0,01

Tabela 43 – Valores de pH para a formulação padrão de sabonete íntimo (Dermacyd®), determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.

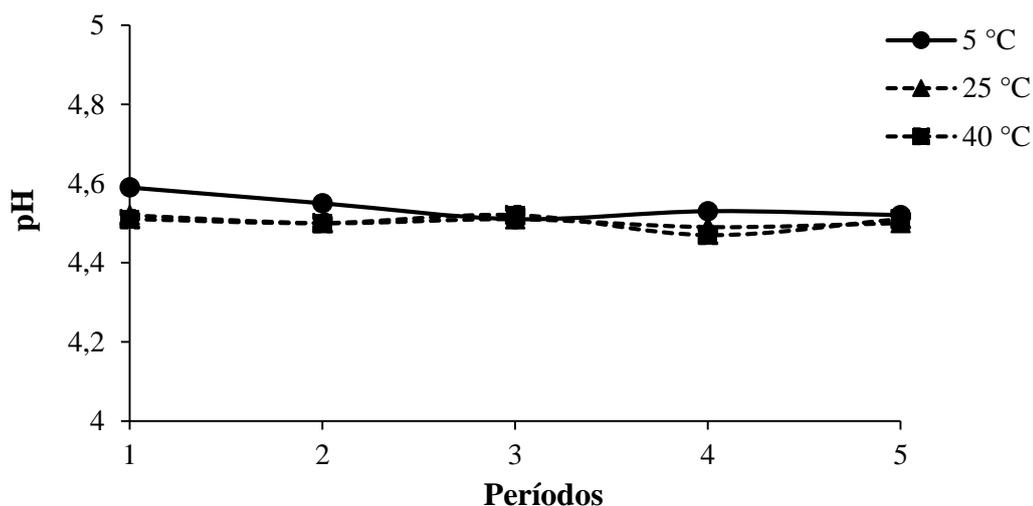


Figura 35 – Representação dos valores de pH para a formulação padrão de sabonete íntimo (Dermacyd®), determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), a densidade é uma propriedade física da relação entre a massa de uma substância e o volume que ela ocupa. Para líquidos e semissólidos, mudanças na densidade podem sugerir a incorporação de ar ou a perda de compostos voláteis (LOPES *et al.*, 2018). Durante os testes de estabilidade preliminar, em temperaturas diferentes, a densidade da formulação F5 sofreu variações, conforme exposto na Tabela 44. A faixa de variação da densidade relativa foi de 0,9727 a 0,9851.

Condição (temperatura)	Dados experimentais F5 - densidade relativa				
	Média ± DP				
	T1	T2	T3	T4	T5
Resfriamento (5 °C)	0,9734*	0,9754*	0,9785*	0,9845*	0,9802 ± 0,01
Ambiente (25 °C)	0,9869*	0,9789*	0,9769*	0,9750*	0,9851*
Estufa (40 °C)	0,9736*	0,9747*	0,9751*	0,9737*	0,9727*

Tabela 44 – Valores de densidade relativa para a formulação de sabonete íntimo F5, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.

*DP < 0,001.

As principais oscilações ocorreram nas temperaturas de 5 °C e 25 °C, determinando que neste quesito para o sabonete líquido foram constatadas diferenças significativas na densidade, fato comprovado pela análise estatisticamente ($p = 0,0015$). As variações de densidade ocorridas no período de armazenamento podem ser melhor visualizadas na Figura 36.

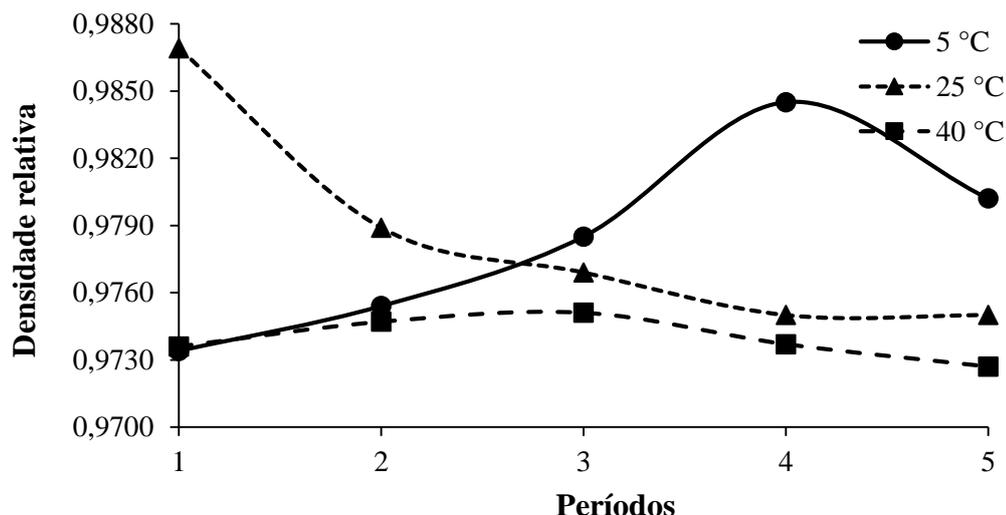


Figura 36 – Representação do valores de densidade relativa para a formulação de sabonete íntimo F5, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.

A densidade relativa para o sabonete líquido íntimo de referência também oscilou em todas as temperaturas estudadas e ao longo dos dias de análises (Tabela 45). A variação na densidade relativa deste produto foi de 0,9750 a 0,9805, também com diferença estatística ($p = 0,0015$). No entanto, com oscilações menores quando comparado a F5 (Figura 35), porém estando em conformidade com os valores encontrados por Cronemberger; Paula; Meirelles (2015), os quais avaliaram três diferentes marcas comerciais de sabonete íntimo e concluíram que, da marca A para a marca C, a variação, respectivamente, foi de $0,9640 \pm 0,369$ para $1,009 \pm 2,326$.

Condição (temperatura)	Dados experimentais Dermacyd® - densidade relativa				
	Média ± DP				
	T1	T2	T3	T4	T5
Resfriamento (5 °C)	0,9773*	0,9767*	0,9761*	0,9752*	0,9779*
Ambiente (25 °C)	0,9788*	0,9753*	0,9759*	0,9769*	0,9750*
Estufa (40 °C)	0,9804 *	0,9759*	0,9762*	0,9805*	0,9787*

Tabela 45 – Valores de densidade relativa para a formulação padrão de sabonete íntimo (Dermacyd®), determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes. *DP < 0,001.

O comportamento reológico de formulações farmacêuticas para uso tópico tem sido frequentemente estudado para observar sua estabilidade física, determinando a garantia da qualidade, eficácia e aprovação pelos consumidores (CORRÊA *et al.*, 2005). Reologia é uma ferramenta importante na avaliação do comportamento do fluxo de formulações cosméticas com aplicações clínicas apropriadas (MONTEIRO E SILVA *et al.*, 2017). O comportamento

reológico permite, ao longo do tempo, acompanhar modificações nos parâmetros físico-químicos que promovam a instabilidade de um produto (AMORIM *et al.*, 2015). Para produtos cosméticos, como no caso do sabonete íntimo, as características reológicas definem etapas importantes do desenvolvimento da formulação, tornando possível prever o comportamento não só durante o armazenamento, mas também durante a produção, verificando a facilidade de retirada dos equipamentos industriais, introdução e remoção dos frascos (embalagens), bem como prever o comportamento de aplicação na pele (PETROVSKA *et al.*, 2017).

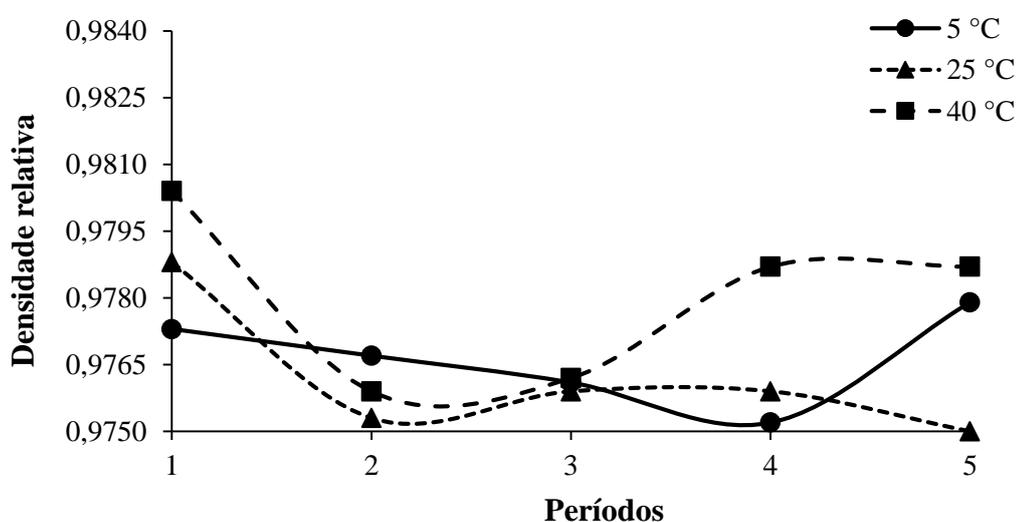


Figura 37 – Representação do valores de densidade relativa para a formulação padrão de sabonete líquido (Dermacyd®), determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.

Com os dados coletados nesta pesquisa durante os 30 dias de avaliações (estabilidade preliminar), foi possível determinar o comportamento reológico de F5 através da rotação (taxa de cisalhamento) e o torque (tensão de cisalhamento). Esta determinação foi realizada 24 horas após a manipulação da formulação, em temperatura ambiente (25 °C ± 2 °C) para verificar o comportamento inicial, dando base as próximas análises.

De acordo com o reograma (Figura 38), a curva ascendente e a curva descendente não se sobrepõem perfeitamente, caracterizando o sabonete líquido com um comportamento não-newtoniano. Com isso, entre as curvas é formada uma área de histerese, demonstrando que este material é tempo-dependente, ou seja, que ele possui tixotropia ou reopexia, propriedades desejadas para formulações tópicas. Porém, esta área de histerese possui um valor, a qual dependendo da dimensão pode influenciar no produto e na sua instabilidade (MAHDI *et al.*, 2011). Para fluidos tixotrópicos, quando a taxa de cisalhamento é retirada, a estrutura destes

materiais tende a se reestruturar, apresentando no reograma uma curva descendente deslocada em relação à curva ascendente (AULTON; TAYLOR, 2016). O mesmo comportamento não-newtoniano foi identificado no sabonete íntimo padrão (Figura 39).

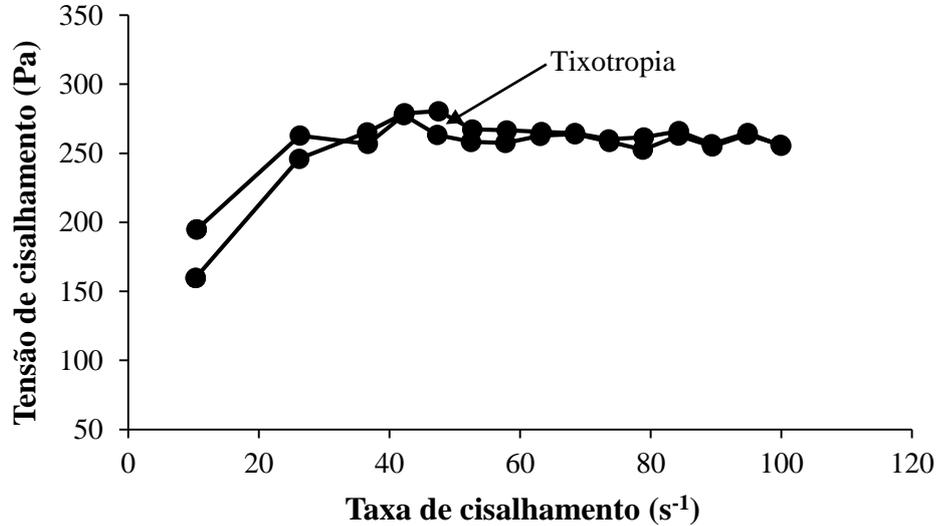


Figura 38 – Comportamento reológico da formulação F5 de sabonete íntimo a 25 °C.

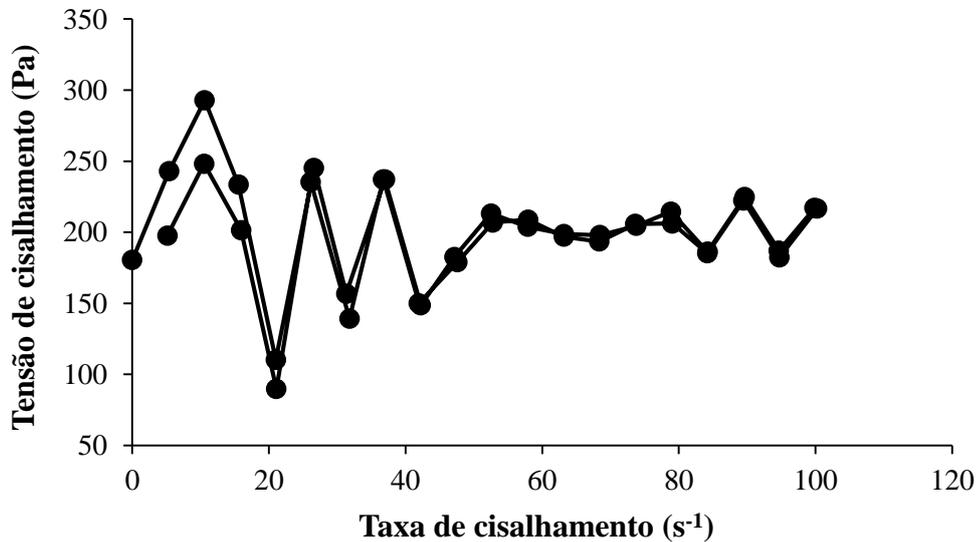


Figura 39 – Comportamento reológico do sabonete íntimo de referência comercial (Dermacyd®).

Para investigar o fluxo da formulação F5, as medições obtidas no reômetro foram ajustadas por meio de três modelos matemáticos: lei da potência (conhecido também como Modelo de Ostwald de Waale)^A, Modelo de Herschel-Bulkley^B, e Modelo de Regressão de Bingham^C, conforme equações abaixo:

A $\sigma = k \cdot \dot{\gamma}^n$

B $\sigma = k \cdot \dot{\gamma}^n + \sigma_0$

C $\sigma = \sigma_0 + \mu_p \cdot \dot{\gamma}$

Onde:

σ = Tensão de cisalhamento (Pa);

$\dot{\gamma}$ = Taxa de cisalhamento (s^{-1});

k = Índice de consistência ($Pa \cdot s^n$);

n = Índice de comportamento;

σ_0 = Tensão residual (Pa); e

μ_p = Viscosidade plástica (Pa.s).

O ajuste para os modelos reológicos acima foram determinados por intermédio da identificação dos parâmetros e da análise da variância (ANOVA). Esses modelos são utilizados para materiais fluidos que iniciam o escoamento quando a tensão de cisalhamento aplicada supera a tensão inicial que é única para cada produto.

Observa-se na Tabela 46 que o índice de fluxo foi menor que 1 ($n < 1$), indicando um comportado não-newtoniano pseudoplástico ou *shear thinning*. Este comportamento é um atributo reológico desejável para formulações cosméticas, o qual facilita a aplicação do produto, além de oferecer um sensorial mais agradável na pele (GIANETI *et al.*, 2012). Da mesma forma, fluxo pseudoplástico melhora a aplicabilidade do cosmético, mesmo necessitando de taxa e tensão de cisalhamento, e garante o estado estacionário enquanto permanecer na embalagem (RADCHENKOVA *et al.*, 2015).

Modelo	Parâmetros	Valores
Lei da Potência	K ($Pa \cdot s^n$)	176,86
	n	0,09
Modelo de Herschel-Bulkley	K ($Pa \cdot s^n$)	177,84
	n	0,09
	σ_0 (Pa)	-1,04
Modelo de Regressão de Bingham	σ_0 (Pa)	188,87
	μ_p (Pa.s)	1,08

Tabela 46 – Apresentação dos parâmetros para os modelos reológicos, Lei da Potência, Herschel-Bulkley e Regressão de Bingham na formulação F5.

Para cada modelo foi estabelecido um coeficiente de variação (R^2) e avaliado o F calculado. O melhor ajuste é o que apresentou maior R^2 e maior diferente de F_{calc} em comparação ao F_{tab} . Conforme Tabela 47, o modelo Lei da Potência foi o mais adequado para identificar o comportamento reológico do sabonete íntimo F5. A variação deste modelo foi de 96,95%, porém o F_{calc} foi 289 vezes maior em relação ao tabelado e o p -valor foi $< 0,05$, demonstrando elevada significância estatística.

Modelo	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p -valor
Modelo Lei da Potência	Regressão	1252051	2	626025,5	1028,11	$<0,05$
	Resíduos	10960	18	608,9		
	Total	1263011	20			
	Total (Corr.)	80577	19			

Tabela 47 – Análise de variância para o Modelo Lei da Potência, conforme equação A, para F5.
 $R^2 = 96,95\%$; $F_{\text{Tab}2;18;0,05} = 3,55$.

Com o mesmo coeficiente de variação (R^2) de 96,95%, $p < 0,05$ (Tabela 48), com F_{calc} 202 vezes maior do que F_{tab} , representando significância estatística o Modelo de Herschel-Bulkley também pode explicar o comportamento reológico, porém devido a menor diferença entre $F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$ em relação ao Modelo Lei da Potência, não foi considerado o mais apropriado. Além disso, neste modelo, a tensão inicial de cisalhamento (σ_0) foi negativa, -1,04, demonstrando que não houve necessidade de tensão inicial para o material fluir, comprovando que F5 apresenta comportamento não-newtoniano pseudoplástico.

Modelo	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p -valor
Modelo de Herschel-Bulkley	Regressão	1252052	3	417350,7	647,39	$<0,05$
	Resíduos	10959	17	644,7		
	Total	1263011	20			
	Total (Corr.)	80577	19			

Tabela 48 – Análise de variância para o Modelo de Herschel-Bulkley, conforme equação B, para F5.
 $R^2 = 96,95\%$; $F_{\text{Tab}3;17;0,05} = 3,20$.

Como anteriormente identificado que a formulação F5 possui pseudoplasticidade, o Modelo de Regressão de Bingham seria inadequado para esta análise, uma vez que ele identifica e caracteriza o comportamento plástico. A mesma informação foi confirmada pelo baixo R^2 (26,92%), conforme descrito na Tabela 49. Na definição dos parâmetros da equação de Bingham acima, nota-se que a tensão inicial (σ_0) é maior que a tensão de cisalhamento (σ)

requerida para que o material escoe, sinalizando que F5 não possui comportamento plástico. Do mesmo modo, após o escoamento, a relação entre a tensão de cisalhamento (σ) e a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), não foi linear (SILVA; SILVA JÚNIOR; PINTO JÚNIOR, 2019).

Modelo	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p-valor
Modelo de Bingham	Regressão	1204133	2	602066,3	184.05	<0,05
	Resíduos	58879	18	3271		
	Total	1263011	20			
	Total (Corr.)	80577	19			

Tabela 49 – Análise de variância para o Modelo de Bingham, conforme equação C, para F5. $R^2 = 51,89\%$; $F_{Tab2;18;0,05} = 3,55$.

A partir da identificação do comportamento reológico de F5, fica mais fácil verificar as prováveis modificações e instabilidades da formulação quando armazenada em diferentes temperaturas, durante 30 dias de avaliação. Para este fim, foram analisadas as mudanças na viscosidade (Pa.s) em relação a taxa de cisalhamento (s^{-1}), nos tempos T1 (48 h após a obtenção) e T3 (7 dias após a obtenção e onde iniciaram a mudanças da formulação).

Analisando a Figura 40, é possível comprovar que as mudanças nas características da formulação ocorreram no período T3, pois a viscosidade diminuiu consideravelmente. A formulação F5, é composta por detergentes de diferentes origens (lauril éter sulfato de sódio, cocoamido propil betaína e dietanolamina de ácido graxo de coco), mas não possui agente espessante como o cloreto de sódio, dessa forma a viscosidade sempre será menor (PETROVSKA *et al.*, 2017). Além disso, sabe-se que a viscosidade é altamente influenciada por severas mudanças de temperatura (OLIVEIRA; BARROS; ROSSI, 2009), dessa forma, a falta do agente espessante pode ser uma das explicações para mudança de viscosidade da formulação com 7 dias de armazenamento, independente da temperatura.

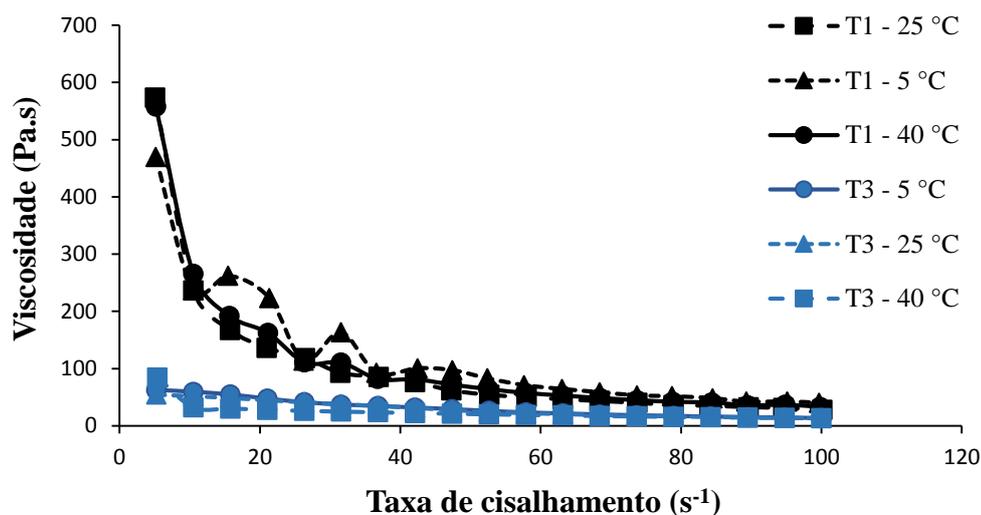


Figura 40 – Comportamento reológico na relação entre a viscosidade (Pa.s) e a taxa de cisalhamento (s^{-1}) da formulação F5 de sabonete íntimo.

As medidas da área de histerese, tixotropia, foram calculadas nos períodos T1, T3 e T5, sendo apresentados na Tabela 50. Inicialmente, em temperatura de 25 °C, F5 apresentou tixotropia negativa, onde o mesmo fenômeno ocorreu no período T3 a 40 °C. Valor negativo de tixotropia é denominado de comportamento anti-tixotrópico, mas não indica instabilidade (GIANETI *et al.*, 2012). Durante o teste, o cisalhamento do material em estudo pode induzir para uma inversão ou troca da fase externa da emulsão, ocasionando valores de tixotropia negativos (SUÑER-CARBÓ *et al.*, 2019). A tixotropia demonstra que a formulação deforma sob certo grau de cisalhamento, mas quando diminui a rotação, ela recupera sua conformação inicial. Neste produto, a instabilidade foi apontada, pois ocorreram diferenças de tixotropia nas diferentes temperaturas durante período de avaliação. Nota-se que os valores, no 30º dia de armazenamento, foram menores quando em comparação ao primeiro dia, fato este ocasionado pela diminuição da viscosidade.

Períodos	Tixotropia (Pa/s)		
	5° C	25 °C	40 °C
T1	442	-775,5	1548,53
T3	108,24	634,24	-151,8
T5	27,22	157	14,16

Tabela 50 – Valores das áreas entre as curvas de tensão e taxa de cisalhamento (tixotropia), para F5, durante os períodos T1, T3 e T5, obtidos em diferentes temperaturas.

Por fim, o índice de consistência da F5 foi analisado para todos os períodos estudados nas diferentes temperaturas de armazenamento (Figura 41). Verificam-se as modificações da

consistência, indicando que a estrutura da formulação não permaneceu intacta. Observa-se que da mesma maneira que a viscosidade diminuiu ao longo dos dias de análise, o índice de consistência também decresceu significativamente.

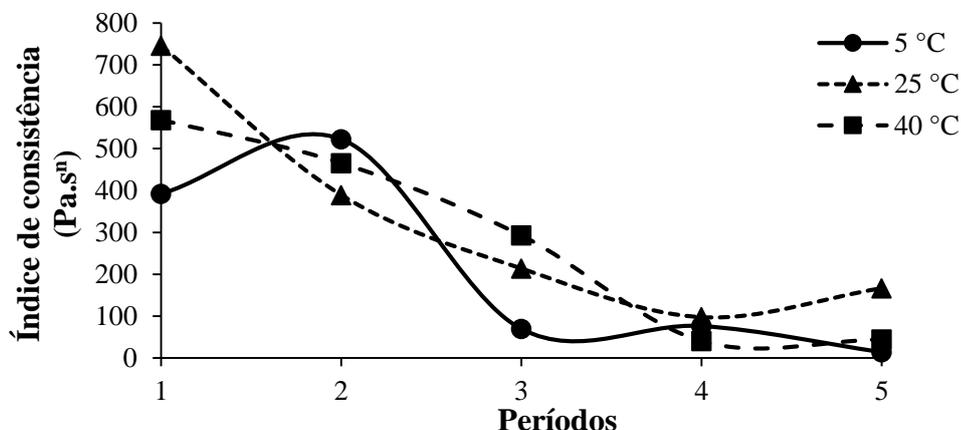


Figura 41 – Relação entre o índice de consistência (Pa.sⁿ) e os dias de análise para a formulação F5 de sabonete íntimo.

5.6.1.2 Avaliação da estabilidade nos ciclos de congelamento-descongelamento

Nesta etapa de análises da estabilidade, a formulação F5 foi submetida a condições extremas de temperatura, 24 horas sob $-5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (congelamento) e 24 horas sob $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (estufa), as quais representam condições de estresse (congelamento-descongelamento). Neste estudo foram realizados 4 ciclos. No ciclo 1, a formulação F5 já revelou modificações, tanto na consistência (liquefação) como na cor, tornando-se mais escura. A Figura 42 representa a formulação de sabonete líquido F5, 24 horas após a obtenção (A) e a mesma, após o descongelamento durante o ciclo 1 (B). Ao contrário, para o sabonete íntimo Dermacyd®, submetido as mesmas condições de estresse, não houve nenhuma alteração visualmente detectável (Figura 43).

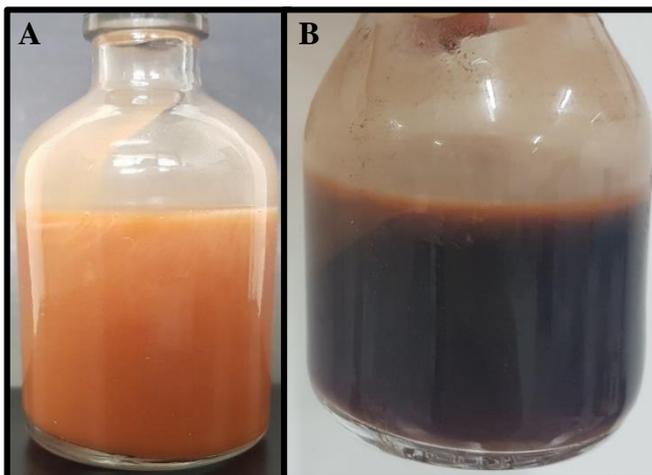


Figura 42 – Representação das modificações ocorridas no ciclo 1 de congelamento/descongelamento da formulação F5. A – Aspecto de F5 24 horas após a manipulação; B – Aspecto de F5 com alterações da cor durante o ciclo 1.



Figura 43 – Representação das características do sabonete íntimo Dermacyd®, o qual permaneceu inalterado visualmente durante os 4 ciclos de congelamento/descongelamento.

Do mesmo modo, foram realizadas as determinações do pH, da densidade relativa e do comportamento reológico. Os dados experimentais são apresentados na Tabela 51, onde é visualizado que os valores de pH sofreram alterações, demonstrando significância estatística entre eles, $p < 0,05$, o que já era esperado devido as transformações do produto, destacando o fato de que, a formulação F5 sofreu alterações físico-químicas. Na densidade relativa não houve variações importantes, pois foi encontrado um $p = 0,08$.

Análises	Ciclos - congelamento/descongelamento				
	Média ± DP	1	2	3	4
pH		4,49 ± 0,03	4,40 ± 0,01	4,43 ± 0,02	4,50 ± 0,02
Densidade relativa		0,9775*	0,9769*	0,9767*	0,9770*

Tabela 51 – Valores de pH e densidade relativa para a formulação de sabonete íntimo F5, determinados nos 4 ciclos de congelamento e descongelamento, a cada 24 horas.

*DP < 0,001.

O comportamento reológico, avaliado com a formulação F5 em repouso por 30 minutos sob temperatura de $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ foi severamente modificado nos ciclos de congelamento e descongelamento (Figura 44). A característica de escoamento de F5 nos ciclos 1 e 2 apresentou sobreposição da curva ascendente com a curva descendente, sem áreas de histerese. Mas até o ciclo 3, a formulação continuou com um comportamento não-newtoniano pseudoplástico, pois permaneceu uma relação não-linear entre a taxa de cisalhamento e a tensão de cisalhamento.

No ciclo 4, não houve necessidade de torque, ou seja, a tensão de cisalhamento foi nula para todos os pontos aferidos, ressaltando que esta formulação não precisou de força extrema para que o escoamento ocorresse, ou a força foi tão precária que o reômetro não conseguiu detectar. Deste modo, houve proporcionalidade linear entre a tensão e a taxa de cisalhamento, particularidade de fluidos newtonianos, ou seja, no ciclo 4, F5 passou a comportar-se como fluído newtoniano com aspecto completamente líquido.

Por intermédio da Tabela 52, os parâmetros do modelo reológico Lei da Potência foram expressos. Constata-se que o modelo foi o ideal para descrever o fluxo de escoamento de F5, pois apresentou R^2 de 99,59% a 99,70%, até o ciclo 3. Neste penúltimo período, o índice de consistência (K) aumentou, e o índice de fluxo (n) também sofreu variações, mas sem transformações na classificação reológica, continuando com um comportamento pseudoplástico. Em contrapartida, no ciclo 4, para a formulação F5, o modelo Lei da Potência não foi determinante, devido ao valor zero para a tensão de cisalhamento. Isso comprovou novamente que, ao final dos ciclos de congelamento e descongelamento, o sabonete íntimo não foi estável pelos demais períodos, principalmente no ciclo 4.

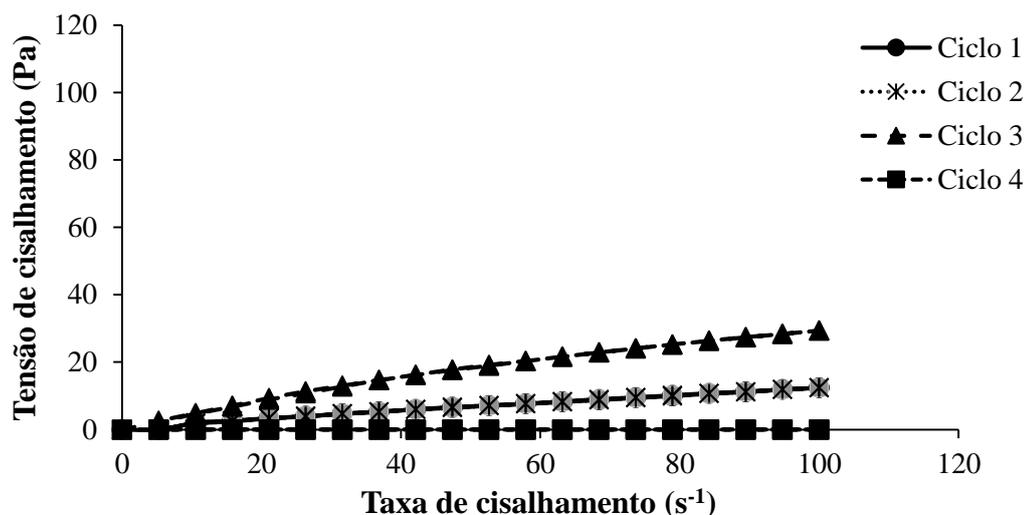


Figura 44 – Comportamento reológico da formulação F5 de sabonete íntimo a 25 °C, durante os ciclos de congelamento e descongelamento.

Lei da Potência	Valores			
Parâmetros	Ciclos congelamento/descongelamento			
	1	2	3	4
K (Pa.s ⁿ)	0,237	0,237	0,929	IND
n	0,859	0,859	0,754	IND
R ² (%)	99,59	99,59	99,70	-

Tabela 52 – Resultados dos parâmetros do modelo Lei da Potência para a formulação F5, nos 4 ciclos de congelamento e descongelamento.

*IND – Indeterminado.

5.6.2 Seleção das formulações de cremes para uso vaginal

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 6^a ed., cremes são produtos compostos por um ou mais princípios ativos dissolvidos ou dispersos em uma base de excipientes apropriada, caracterizada como forma farmacêutica semissólida, emulsão, constituída por uma fase lipofílica e outra fase hidrofílica, para utilização externa na pele ou em mucosas.

Sistemas emulsionados são elaborados com dois fluidos imiscíveis, com um dos líquidos dispersos em pequenas gotículas esféricas e, dão origem as emulsões, que possuem diversificadas utilidades, principalmente em preparações cosméticas e farmacêuticas, pois auxilia na solubilidade de ativos hidrofílicos e lipofílicos (KOWALSKA *et al.*, 2017). Para

estabilização destes sistemas emulsionados, vários tipos de emulgentes podem ser utilizados, que agem na forma das gotículas da fase interna. Também conhecidos como tensoativos, suas moléculas possuem uma porção hidrofílica e outra hidrófoba (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Sistemas semissólidos como os cremes, pomadas e géis, possuem a capacidade de serem administrados por via vaginal e de espalharem pela superfície da mucosa. São facilmente removidas no momento da higiene íntima, mas a eficácia do tratamento é limitada ao tempo de permanência do produto no trato geniturinário (CHEN *et al.*, 2012). Formulações vaginais convencionais podem representar algumas desvantagens para as pacientes, como baixa retenção no epitélio vaginal, e inconveniências, como vazamentos (GUPTA *et al.*, 2013). Porém, a presença de uma grande rede de vasos sanguíneos e ampla superfície, torna a vagina uma ótima via para administração de fármacos para efeitos locais ou sistêmicos (SHANKAR *et al.*, 2010). Nesse sentido, uma das grandes vantagens de um creme vaginal em relação a um sabonete íntimo, é justamente a capacidade de espalhabilidade e maior aderência do produto ao local a ser tratado.

A fim de verificar a viabilidade de obtenção de cremes contendo os ativos vegetais, foram preparadas 3 formulações com base aniônica (F10, F11 e F12), com diferentes concentrações, 1%, 2% e 3%, do extrato seco de *E. uchi* e óleo de *B. excelsa*. Para isso, primeiramente, foram determinados os valores de pH, utilizando como referência um creme comercial de nistatina genérico (laboratório TEUTO), realizada a caracterização organoléptica e o teste de centrifugação, cujos resultados estão descritos na Tabela 53. Todas as análises foram realizadas 24 horas após a elaboração das formulações, sendo esses resultados identificados com período T0.

Todas as formulações apresentaram $\text{pH} < 7,0$, e próximo ao pH do creme referência nistatina. Mas os valores encontrados estão acima do pH vaginal, que é $\leq 4,5$. Em contrapartida, uma pesquisa realizada por Shankar *et al.* (2010), afirma que o gel vaginal formulado por eles, com pH na faixa de 6,8 a 7,5, está em conformidade para não ocasionar irritação local após a aplicação. No entanto, visando a preservação da microbiota natural vaginal, houve a tentativa de diminuir o pH das formulações adicionando ácido láctico, porém isto não demonstrou viabilidade, pois ocorreu a “quebra” dos cremes, ou seja, a incorporação dessa substância ácida provocou a separação de fases.

Análises	Formulações – Creme			
	F10	F11	F12	Nistatina creme
				
Características organolépticas	Cor marrom claro, aspecto homogêneo	Cor marrom escuro, aspecto homogêneo	Cor marrom escuro	Cor amarelo claro
pH (média ± DP)	6,97 ± 0,12	6,11 ± 0,07	6,89 ± 0,06	6,33 ± 0,06
Centrifugação	Homogêneo	Homogêneo	Presença de precipitado marrom	Homogêneo

Tabela 53 – Análise organoléptica, determinação do pH e centrifugação das formulações de creme F11, no tempo T0.

Dessa forma, analisando os resultados (Tabela 53) é possível verificar que a formulação F12, contendo 3% de ES de *E. uchi* e 3 % de óleo de *B. excelsa*, ao final da centrifugação, apresentou precipitado marrom. Isso pode ter acontecido devido à grande quantidade de sólidos na formulação, determinando que para esta proporção de extrato seco, o veículo (base) não foi compatível. Partículas ou gotículas suspensas, devido a influência da gravidade, tendem a sobrenadar (*creaming*) ou sedimentar, dependendo das diferenças de densidade entre a fase dispersa e dispersante das emulsões (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001), configurando uma instabilidade. F10 e F11, com menores concentrações de ES e óleo, não apresentaram separação de fases ou precipitados, mostrando-se adequadas nessa primeira fase experimental. No entanto, considerando o menor valor de pH, F11 foi selecionada, como formulação mais favorável, e assim realizadas as próximas análises de estabilidade.

Antes disso, foi determinada a espalhabilidade do creme F11, uma propriedade importante utilizada na avaliação de formas semissólidas, ou seja, teste que indica a facilidade de aplicação sob a pele. A capacidade de espalhabilidade possui um papel vital na administração de cremes tópicos, até mesmo na facilidade de extrusão do aplicador, direcionando para melhor eficácia terapêutica (HAFEEZ; KAZMI, 2017). Espalhabilidade é o resultado de características

estruturais que indicam a rigidez, a força, o comportamento elástico e viscoso (MALDOVAN *et al.*, 2017). F11 apresentou espalhabilidade média de $398 \text{ mm}^2 \pm 0,21 \text{ mm}^2$, um valor bom, sugerindo consistência adequada da formulação. Para o creme vaginal nistatina, a espalhabilidade encontrada foi de $494 \text{ mm}^2 \pm 0,85 \text{ mm}^2$. Qushawy *et al.* (2018), encontraram para um creme comercial Daktarin® 2%, um valor de espalhabilidade de 720 mm^2 , indicando que esta formulação pode ser aplicada facilmente na superfície da pele com pouca força.

5.6.2.1 Avaliação da estabilidade preliminar do creme vaginal

As formulações, de creme F11 e creme Nistatina padrão, foram armazenadas em 3 temperaturas diferentes: resfriamento ($5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), e estufa ($40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), por 30 dias. As análises das características macroscópicas, do pH, densidade e comportamento reológico foram efetuadas 48 horas após a preparação da pré formulação (T1), 4, 7, 15 e 30 dias (T2, T3, T4, e T5, respectivamente).

Em relação aos aspectos organolépticos, para F11 e creme Nistatina, não foram observadas modificações macroscópicas ao longo dos 30 dias de avaliação (Tabela 54).

Condição (temperatura)	Dias					
	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Resfriamento ($5 \text{ }^\circ\text{C}$)	N	N	N	N	N	N
Ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$)	N	N	N	N	N	N
Estufa ($40 \text{ }^\circ\text{C}$)	N	N	N	N	N	N

Tabela 54 – Características organolépticas, da formulação F11, avaliadas nas condições de resfriamento ($5 \text{ }^\circ\text{C}$), temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) e estufa ($40 \text{ }^\circ\text{C}$) como, normal, sem alteração (N).

Na determinação do pH do creme F11 (Tabela 55), os valores continuaram na faixa adequada, $< 7,0$, considerando que valores acima podem causar irritações vulvovaginais após a aplicação. Os valores de pH permaneceram entre 6,76 a 5,85.

Por intermédio da análise estatística (ANOVA) verificou-se que não houve diferença significativa, $p > 0,05$, nos valores de pH nas diferentes temperaturas e períodos. De acordo com a Figura 43, o pH da formulação F11 diminui durante o armazenamento. Segundo An *et al.* (2019), o pH ideal para formulações dermatológicas, como cremes e loções, deve ficar entre

5,50 a 6,50.

Condição (temperatura)	Dados experimentais F11 - pH				
	Média ± DP				
	T1	T2	T3	T4	T5
Resfriamento (5 °C)	6,45 ± 0,02	6,76 ± 0,04	6,59 ± 0,05	6,60 ± 0,05	6,41 ± 0,03
Ambiente (25 °C)	6,50 ± 0,04	6,69 ± 0,03	6,50 ± 0,01	6,33 ± 0,04	6,21 ± 0,03
Estufa (40 °C)	6,34 ± 0,04	6,48 ± 0,02	6,18 ± 0,03	6,17 ± 0,01	5,85 ± 0,06

Tabela 55 – Valores de pH para a formulação de creme F11, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.

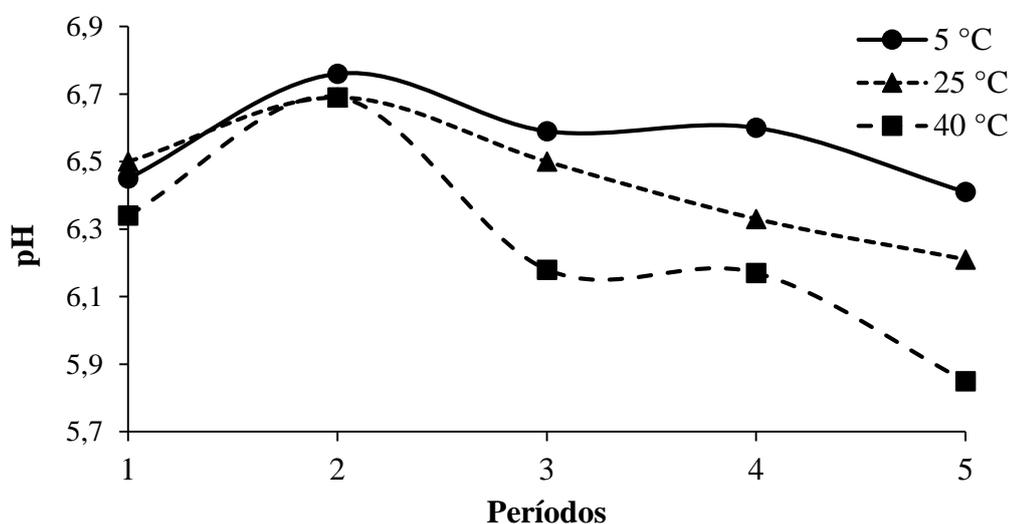


Figura 45 – Representação do valores de pH para a formulação de creme F11, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.

Para o creme nistatina (Tabela 56), os valores de pH desde o período T1 até T5 variou entre 6,94 a 5,83. Porém não houve diferença estatística ($p > 0,05$) nestes dias e sob as três diferentes temperaturas.

Ao contrário da formulação F11, o pH da nistatina creme aumentou até o último dia (T5), mas permaneceu na faixa de valores $< 7,0$, conforme demonstrado na Figura 46.

Condição (temperatura)	Dados experimentais nistatina - pH				
	Média ± DP				
	T1	T2	T3	T4	T5
Resfriamento (5 °C)	6,33 ± 0,03	6,65 ± 0,03	6,64 ± 0,05	6,93 ± 0,06	6,78 ± 0,07
Ambiente (25 °C)	5,83 ± 0,04	6,55 ± 0,03	6,94 ± 0,07	6,79 ± 0,07	6,63 ± 0,05
Estufa (40 °C)	5,91 ± 0,02	6,78 ± 0,08	6,69 ± 0,05	6,63 ± 0,07	6,46 ± 0,18

Tabela 56 – Valores de pH para o creme comercial nistatina, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.

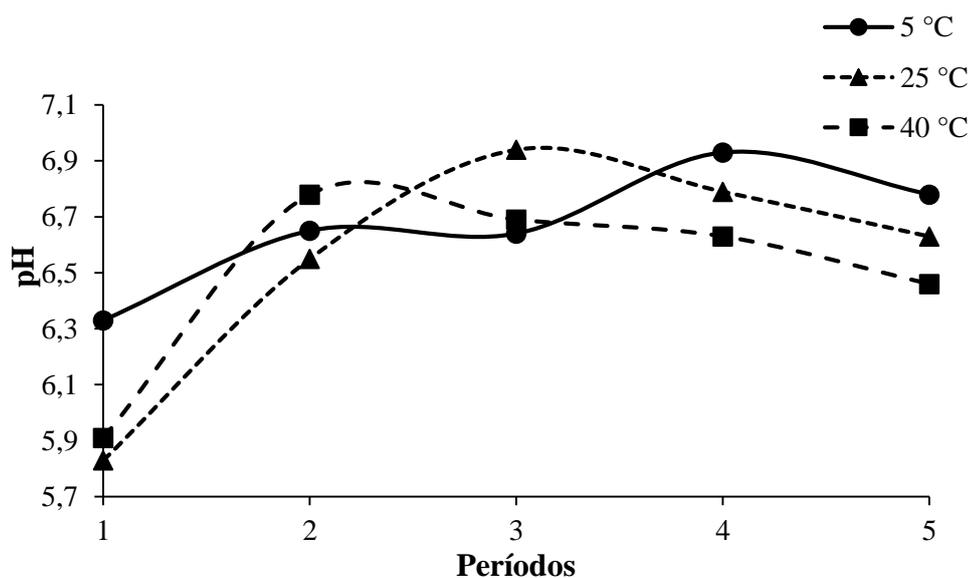


Figura 46 – Representação do valores de pH para o creme comercial nistatina, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.

Além do pH, a densidade relativa foi determinada como contribuição para avaliação da estabilidade da formulação F11. A densidade encontrada para este ensaio variou de 1,3952 a 1,0635, de acordo com os diferentes ambientes e tempo de armazenamento (Tabela 57).

Condição (temperatura)	Dados experimentais creme - densidade relativa				
	Média ± DP				
	T1	T2	T3	T4	T5
Resfriamento (5 °C)	1,3952*	1,1155*	1,0911*	1,0634*	1,0983*
Ambiente (25 °C)	1,1463*	1,0637*	1,0635*	1,1570*	1,0795 ± 0,02
Estufa (40 °C)	1,1143*	1,0738*	1,1048*	1,1488*	1,1090 ± 0,01

Tabela 57 – Valores de densidade relativa para a formulação de creme F11, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.

*DP < 0,001.

Os valores de densidade relativa mantiveram-se sem grandes variações ao longo dos dias avaliação (Figura 47). O *p*-valor encontrado na análise estatística foi de 0,60, confirmando a não significância estatística e ressaltando que o creme F11 permaneceu adequado em relação a densidade, mesmo com as mudanças de temperatura.

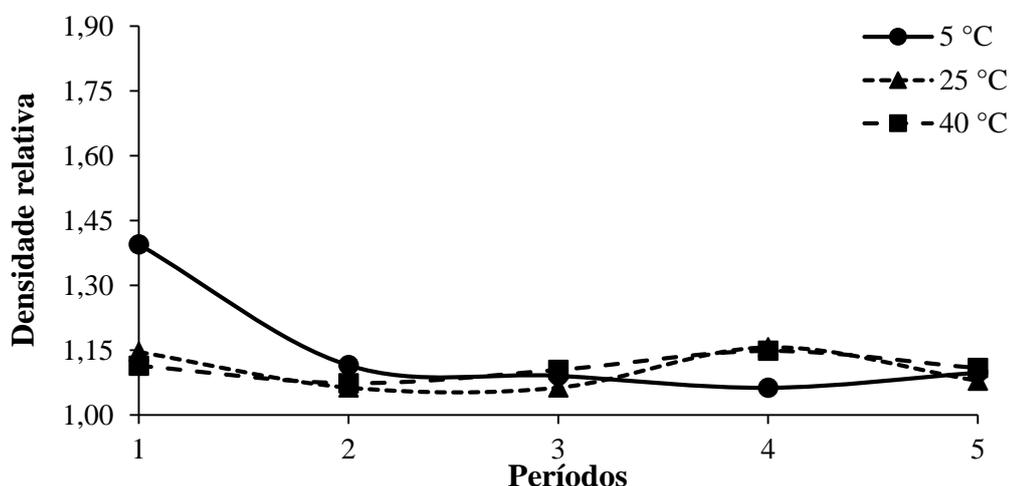


Figura 47 – Representação do valores de densidade relativa para a formulação de creme F11, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.

Para a formulação comercial de nistatina, a densidade variou entre 1,1921 a 1,0623 (Tabela 58), valores menores quando comparada a densidade relativa de F11. Mas ao final das análises, principalmente em T3 (Figura 48), ocorreu um aumento dos valores. Tal fato é sugestivo de migração das gotículas da fase interna para a fase externa da emulsão, ocorrendo um fenômeno de instabilidade conhecido como cremagem (*creaming*) (AMORIM *et al.*, 2015). Ao mesmo tempo, em condições de estresse aonde o armazenamento ocorre em temperaturas altas e baixas, pode ocorrer a perda de água da formulação, fenômeno conhecido como sinerese, influenciando em diversos índices físico-químicos tais como a densidade (ISAAC *et al.*, 2008).

Condição (temperatura)	Dados experimentais nistatina - densidade relativa				
	Média ± DP				
	T1	T2	T3	T4	T5
Resfriamento (5 °C)	1,0855*	1,0687*	1,0791*	1,1267*	1,0870 ± 0,01
Ambiente (25 °C)	1,0668*	1,0773*	1,0623*	1,1921*	1,1061 ± 0,02
Estufa (40 °C)	1,0793*	1,0869*	1,1111*	1,1398*	1,1179*

Tabela 58 – Valores de densidade relativa para a formulação comercial de nistatina, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.

*DP < 0,001.

Mesmo com este aumento de densidade relativa, o creme de nistatina mostrou-se estável, uma vez que não houve grandes discrepâncias entre os valores, sendo que, ao analisar a significância estatística, constatou-se $p = 0,42$, determinando que as diferentes temperaturas e o tempo de armazenamento não influenciaram na formulação no quesito densidade relativa.

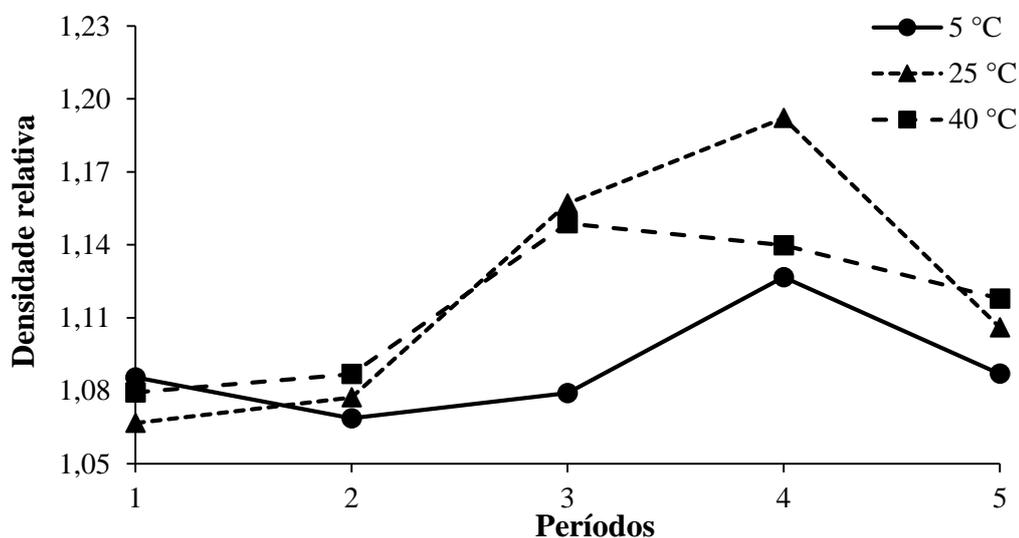


Figura 48 – Representação do valores de densidade relativa para o creme comercial de nistatina, determinados nas temperaturas de resfriamento (5 °C), ambiente (25 °C) e estufa (40 °C), para os 30 dias de testes.

Para análise do comportamento reológico, no reograma obtido 24 horas (T0) após a preparação da formulação de F11 (Figura 49), observa-se que o mesmo apresentou comportamento não-newtoniano, onde a relação entre a taxa de cisalhamento e a tensão de cisalhamento foi não-linear, com uma extensa área de histerese.

A caracterização reológica de formulações semissólidas, permite identificar e prever a capacidade destas em permanecer sobre a superfície da pele e mucosas (SCHMIDBERGER *et al.*, 2019). Normalmente, cremes ou outras formulações semissólidas, possuem alta viscosidade em baixas taxas de cisalhamento, expressando que os produtos tópicos ou dermatológicos são de natureza não-newtoniana (HAFEEZ; KAZMI, 2017).

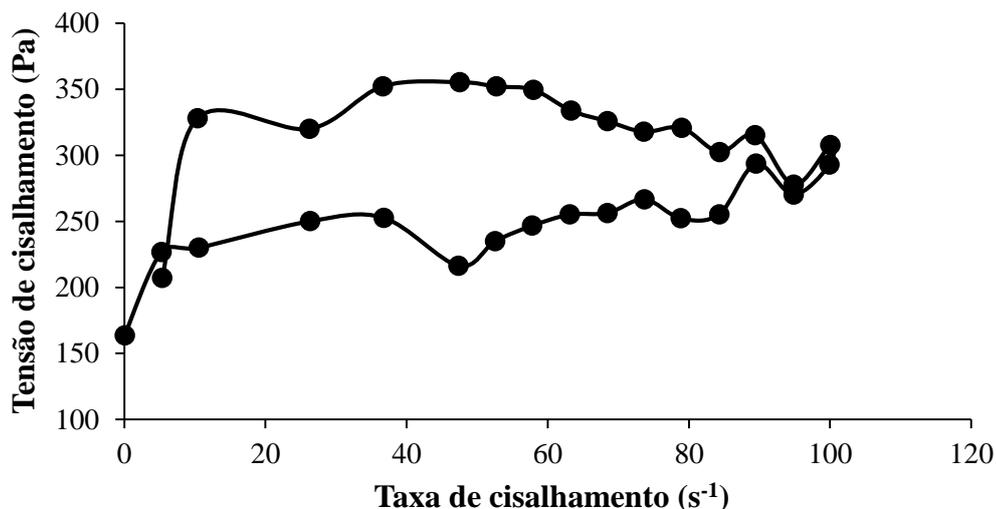


Figura 49 – Comportamento reológico da formulação F11 de creme a 25 °C.

O creme comercial de nistatina (padrão), também demonstrou comportamento não-newtoniano, mas com área de histerese visualmente menor que F11 (Figura 50).

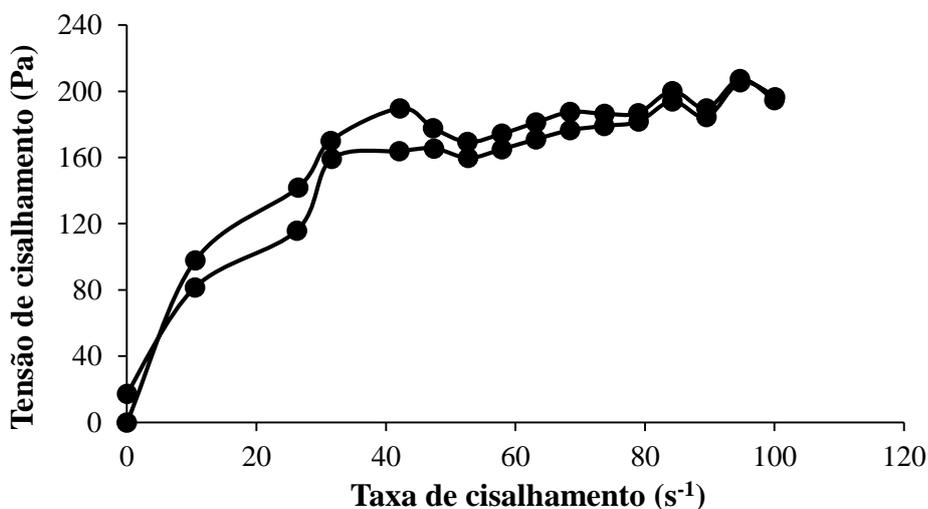


Figura 50 – Comportamento reológico do creme de nistatina a 25 °C.

Com o intuito de identificar se o comportamento não-newtoniano do creme F11 é, plástico, pseudoplástico ou dilatante, foram determinados os parâmetros para três modelos reológicos: lei da potência (conhecido também como Modelo de Ostwald de Waale), Modelo de Herschel-Bulkley, e Modelo de Regressão de Bingham, conforme descrito na Tabela 59. Além disso, para o ajuste do modelo a ANOVA foi executada, e por intermédio do R^2 e F-valor, estabelecido o melhor modelo que descreve o comportamento da formulação F11.

Modelo	Parâmetros	Valores
Lei da Potência	K (Pa.s ⁿ)	298,68
	n	0,02
Modelo de Herschel-Bulkley	K (Pa.s ⁿ)	298,77
	n	0,02
	σ_0 (Pa)	-0,08
Modelo de Regressão de Bingham	σ_0 (Pa)	269,19
	μ_p (Pa.s)	0,76

Tabela 59 – Apresentação dos parâmetros para os modelos reológicos, Lei da Potência, Herschel-Bulkley e Regressão de Bingham na formulação F11.

Na análise da variância para o modelo Lei da Potência (Tabela 60), os parâmetros foram estatisticamente significativos, onde $p < 0,05$ e F_{calc} foi 167 vezes maior que o F_{tab} . O coeficiente de variação (R^2) foi de 87,66%. De acordo com o índice de fluxo (n) no valor de 0,06, ≤ 1 , o fluxo para este modelo foi pseudoplástico.

Modelo	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p-valor
Modelo Lei da Potência	Regressão	1988100	2	994050	594,04	<0,05
	Resíduos	30120	18	1673,4		
	Total	2018220	20			
	Total (Corr.)	130095	19			

Tabela 60 – Análise de variância para o Modelo Lei da Potência para F11.

$R^2 = 87,66\%$; $F_{\text{Tab}2;18;0,05} = 3,55$.

O modelo de Herschel-Bulkley (Tabela 61) também demonstrou que o índice de fluxo foi ≤ 1 ($n = 0,01$), comprovando que F11 tem comportamento não-newtoniano pseudoplástico. Este comportamento é muito favorável, indicando que a formulação F11, deve ser aplicação fácil, principalmente quando a administração acontecer por via vaginal, ou seja, o fluxo pseudoplástico é ideal para que o produto possa fluir prontamente através de aplicadores vaginais (ALVES, 2014). O comportamento pseudoplástico permite que o creme após ser aplicado, promova a formação de um filme homogêneo na pele ou mucosa (SCHIAVON *et al.*, 2019). O coeficiente de variação foi de 87,66%. Da mesma forma, o modelo de Herschel-Bulkley foi estatisticamente significativo, e o F_{calc} foi 117 vezes maior que o F_{tab} . A principal propriedade de materiais pseudoplásticos de Herschel-Bulkley é a necessidade de uma tensão de escoamento, o que representa uma tensão finita para fluir (STEFFE, 1996). A tensão de escoamento inicial é observada em muitas emulsões, onde a tensão limite é obrigatória para

quebrar as interações de van der Waals entre as partículas dispersas, indicando que elas agem como um sólido elástico (VIANNA-FILHO; PETKOWICZ; SILVEIRA, 2013).

Modelo	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p-valor
Modelo Herschel-Bulkley	Regressão	1988100	3	662700	374,02	<0,05
	Resíduos	30120	17	1771,8		
	Total	2018220	20			
	Total (Corr.)	130095	19			

Tabela 61 – Análise de variância para o Modelo de Herschel-Bulkley para F11.
 $R^2 = 87,66\%$; $F_{Tab3;17;0,05} = 3,20$.

O modelo de Bingham (Tabela 62) embora tenha apresentado $p < 0,05$ e $F_{calc} > F_{tab}$, o R^2 foi muito baixo, 28,62%, ou seja, o comportamento reológico de F11 não pode ser ajustado por esta equação matemática.

Modelo	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p-valor
Modelo de Bingham	Regressão	1898787	2	949393,3	143,08	<0,05
	Resíduos	119434	18	6635,2		
	Total	2018220	20			
	Total (Corr.)	130095	19			

Tabela 62 – Análise de variância para o Modelo de Bingham para F11.
 $R^2 = 28,62\%$; $F_{Tab2;18;0,05} = 3,55$.

Após a caracterização do comportamento reológico de F11, a estabilidade da mesma foi avaliada. Macroscopicamente, não foi possível detectar modificações aparentes no creme F11 nem no creme nistatina (padrão). Já em relação a viscosidade, visualiza-se na Figura 51 que esta propriedade diminuiu após 30 dias (T5) de armazenamento, mas sem variação significativa, pois foi encontrado $p = 0,98$. A viscosidade de um creme pode ser alterada devido a sua composição e proporção entre fase aquosa e fase oleosa, e quantidade de lipídios; pela concentração de doadores de viscosidade e emulsionantes. Porém esta modificação da viscosidade não foi suficiente para permitir a separação de fases durante a centrifugação e dias de armazenamento, propondo que a quantidade de tensoativos em ambas as formulações foi eficaz para a manutenção da estabilidade (SOUZA; FERREIRA, 2010). A viscosidade sempre será um item de avaliação importante na produção de cosméticos e medicamentos, pois este parâmetro afeta diretamente na espalhabilidade, a extrusibilidade e a liberação da substância ativa da base (SHANKAR *et al.*, 2010).

Além do comportamento pseudoplástico, F11 apresentou elevada tixotropia devido a sua área de histerese (Tabela 63). No entanto, observa-se que os valores de tixotropia diminuíram nas temperaturas de 5 °C e 40 °C, do período T1 (48 h) e T5 (30 dias) e aumentaram na temperatura de 25 °C durante o mesmo período. Um produto com tixotropia pode demonstrar maior vida de prateleira (*shelf-life*), pois esta característica dificulta a separação de fases do creme. Por outro lado, valores altos de tixotropia não são interessantes, pois geram um produto que pode escorrer durante a aplicação, por causa da lenta recuperação (CORRÊA *et al.*, 2005).

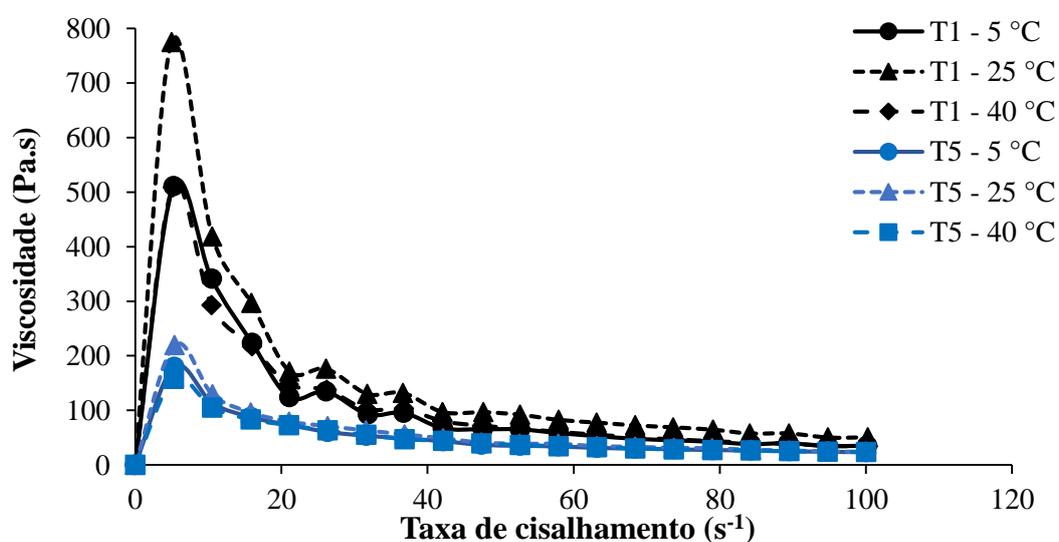


Figura 51 – Comportamento reológico na relação entre a viscosidade (Pa.s) e a taxa de cisalhamento (s^{-1}) da formulação F11 de creme.

Períodos	Tixotropia (Pa/s)		
	5° C	25 °C	40 °C
T1	3822,16	3270,16	5595,19
T5	3502,87	4467,34	3155,21

Tabela 63 – Valores das áreas entre as curvas de tensão e taxa de cisalhamento (tixotropia), para F11, durante os períodos T1 e T5, obtidos em diferentes temperaturas.

Na avaliação do índice de consistência (k) verificou-se que os valores diminuíram desde o período T1 até o T3 (Figura 52). No entanto, por meio da análise ANOVA, o valor de $p = 0,31$ comprovou diferença não significativa, ratificando a não alteração da viscosidade. Sendo assim, pode-se afirmar que formulação de creme F11 manteve-se estável durante os 30 dias de experimento.

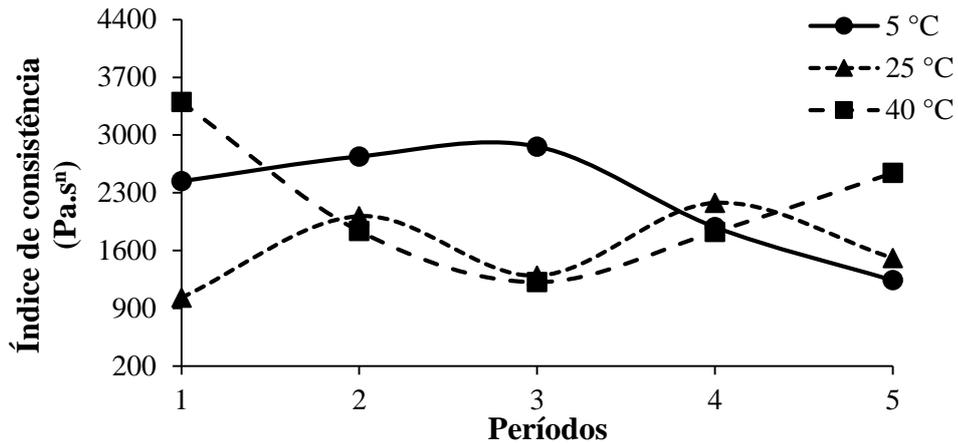


Figura 52 – Relação entre o índice de consistência (Pa.sⁿ) e os dias de análise para a formulação F11 de creme.

5.6.2.2 Avaliação da estabilidade nos ciclos de congelamento-descongelamento

Nesta fase, a formulação foi submetida a condições extremas de temperatura, 24 horas sob $-5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (congelamento) e 24 horas sob $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (estufa), as quais representam condições extremas de estresse, por meio de 4 ciclos. Desde o primeiro ciclo (ciclo 1) até o ciclo 4, F11 não indicou modificações no seu aspecto e na cor. Conforme Figura 53, a formulação permaneceu com características semelhantes aquelas observadas 24 horas após a preparação da mesma, sem precipitados e grumos.

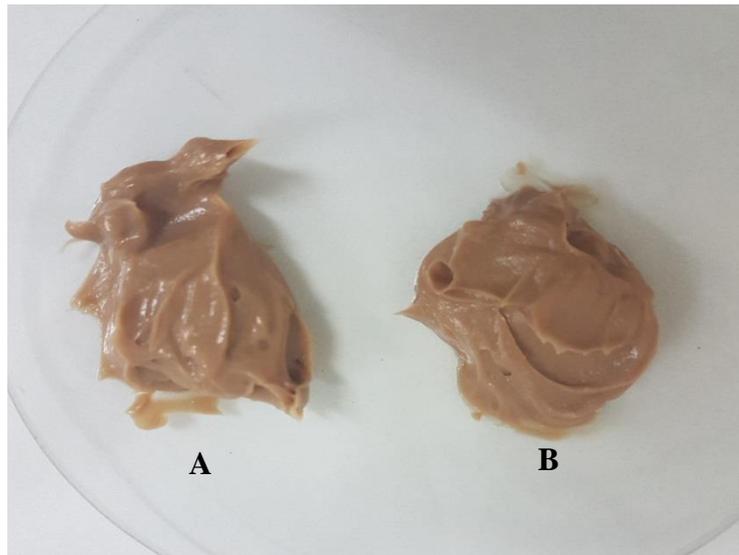


Figura 53 – Representação das características macroscópicas da formulação de creme F11 nos ciclos de congelamento/descongelamento. A – Aspecto de F11 24 horas após a obtenção; B – Aspecto de F11 após o ciclo 4.

Em contrapartida, o creme para uso vaginal de nistatina utilizado como referência, apresentou mudanças na cor, tornando-se um amarelo claro opaco e com aspecto mais consistente, e com formação de grumos, de acordo com a Figura 54.

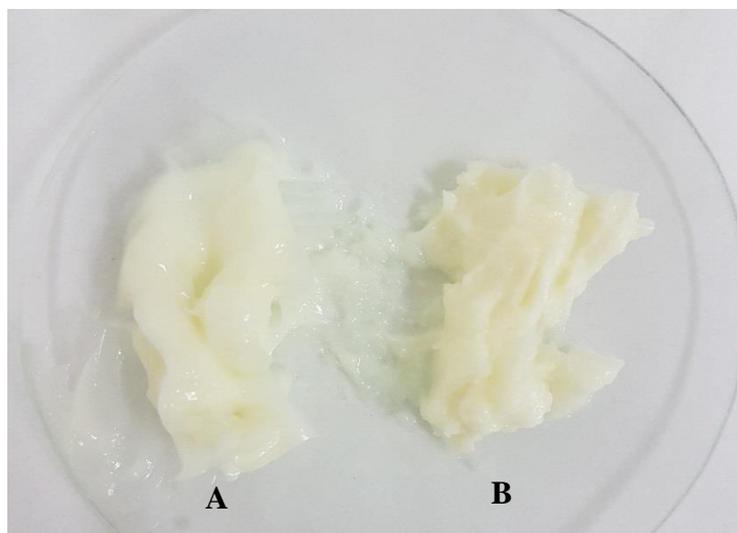


Figura 54 – Representação das características macroscópicas do creme comercial de nos ciclos de congelamento/descongelamento. A – Aspecto inicial, antes dos ciclos; B – Aspecto do creme de nistatina após o ciclo 4.

Os dados contidos na Tabela 64, revelam que o pH para a formulação F11 diminuiu do ciclo 1 até o ciclo 4, mas a variação estatística não foi significativa. Já para a densidade relativa, as variações nos valores encontrados entre os ciclos foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Análises Média ± DP	Ciclos - congelamento/descongelamento			
	1	2	3	4
pH	6,78 ± 0,02	6,58 ± 0,03	6,58 ± 0,02	6,46 ± 0,01
Densidade relativa	1,0949 ± 0,01	1,1817 ± 0,00	1,1061 ± 0,01	1,1225 ± 0,01

Tabela 64 – Valores de pH e densidade relativa para a formulação de creme F11, determinados nos 4 ciclos de congelamento e descongelamento, a cada 24 horas.

Através do reograma (Figura 55), o comportamento reológico da formulação F11 não sofreu modificações extremas entre os ciclos, continuando a relação não-linear entre a tensão e a taxa de cisalhamento, identificado em fluidos não-newtonianos. A avaliação no reômetro ocorreu com a formulação em repouso por 30 minutos sob temperatura de $25 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$. Visualiza-se que entre as curvas ascendentes e descendentes, a área de histerese permanece, indicando que o produto ainda possui tixotropia.

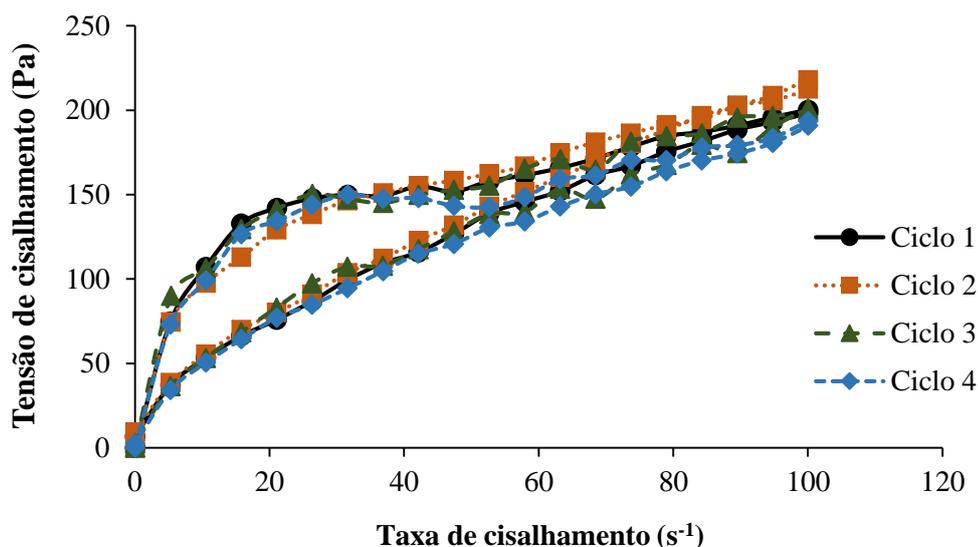


Figura 55 – Comportamento reológico da formulação F11 de creme a 25 °C, durante os ciclos de congelamento e descongelamento.

O comportamento não-newtoniano também permaneceu para o creme comercial de nistatina, porém houve diferença entre as curvas de tensão e taxa de cisalhamento nos 4 ciclos analisados. Observa-se na Figura 56, que a área de histerese, quando o produto é armazenado em temperaturas extremas, aumentou significativamente em comparação ao reograma obtido no armazenamento adequado, ou seja, aquele indicado na embalagem do produto. Isso apenas demonstra que o creme de nistatina sofreu alterações sob simulações de estresse.

Este tipo de ensaio em ciclos permite verificar o tempo de armazenamento de uma emulsão, porém são situações de alto estresse suficientes para alterar os parâmetros da formulação. Neste caso, o congelamento pode ser mais maléfico para a emulsão do que o aquecimento, pois a solubilidade dos emulgentes na fase aquosa ou na fase oleosa é muito sensível a esta troca de temperaturas. Além disso, com o congelamento, ocorre a formação de cristais de gelo, os quais aumentam a pressão interna da emulsão, deformando a forma esférica das gotículas (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Esse fenômeno ficou evidente na formulação comercial creme nistatina.

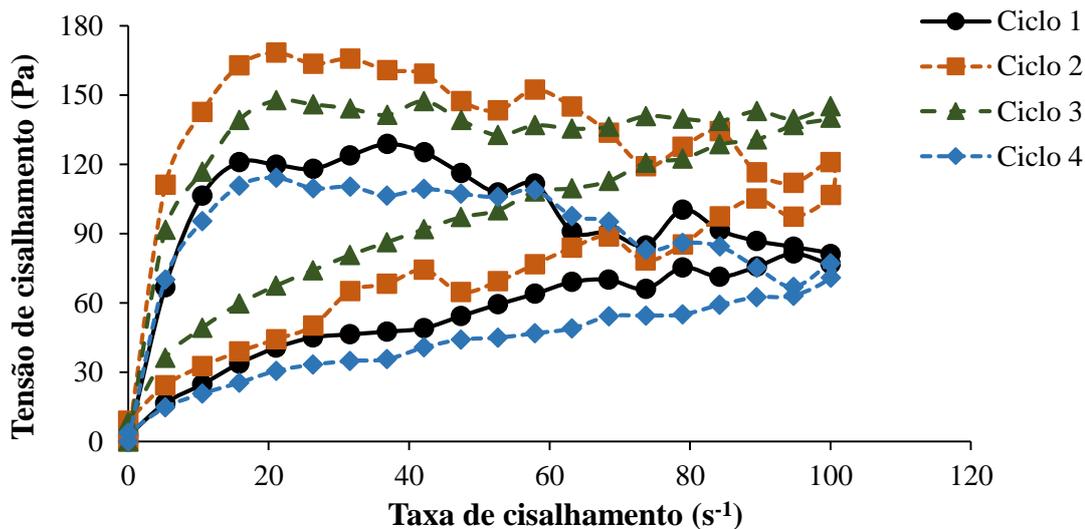


Figura 56 – Comportamento reológico da do creme de nistatina a 25 °C, durante os ciclos de congelamento e descongelamento.

5.6.3 Avaliação da atividade biológica das formulações de sabonete íntimo e creme para uso vaginal

5.6.3.1 Atividade antifúngica

Baseada na avaliação da atividade antifúngica do ES, e para verificar se as duas formulações desenvolvidas, de sabonete íntimo e creme para uso vaginal, podem ser utilizadas de acordo com objetivo terapêutico pretendido, foi realizada a investigação de inibição contra as cepas de *C. albicans* (ATCC 90028), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. parapsilosis* (ATCC 90018) e *C. tropicalis* (ATCC 750). Com a finalidade de verificar a influência dos excipientes na atividade antifúngica, as bases das formulações F5 (sabonete) e F11 (creme), sem a adição dos ativos ES e óleo, também foram testadas.

Na Tabela 65, observa-se que nos dados obtidos, as formulações apresentaram inibição do crescimento de todas as cepas testadas em concentrações específicas. O sabonete íntimo F5 foi o que apresentou melhor resultado, principalmente contra *C. krusei* e *C. parapsilosis* (25 µg/mL). Da mesma forma, a formulação de creme F11 demonstrou boa atividade antifúngica contra todas as cepas testadas. Esta atividade antifúngica indica que o extrato de *E. uchi* foi liberado da base (veículo). Para uma melhor inibição do crescimento das cepas de *Candida*, assim como ocorreu para o ES, muitas vezes são necessárias maiores concentrações do ativo,

pois muitas vezes a atividade do extrato incorporado na formulação é dose-dependente (MIGLIATO *et al.*, 2009). Assim, as duas formulações, F5 e F11, podem ser utilizadas para o tratamento de vulvovaginites causadas por fungos.

As bases somente com adjuvantes, sabonete íntimo e creme, demonstraram inibição de todas as cepas de *Candida*, porém com o CI50 bastante elevado (> 200 µg/mL), ou seja, todos os valores excederam aos encontrados para F5 e F11. Além dos conservantes, metilparabeno e propilparabeno, que podem inibir o crescimento de microrganismos, o EDTA também pode influenciar neste processo (DU; CHEN, 2019). Para Baldim *et al.* (2012), uma base de creme não-iônica inibiu o crescimento de leveduras do gênero *Candida*, mas quando a formulação completa foi testada, ou seja, a base com quefir (suspensão de microrganismos simbiotes), o resultado foi 31,58% abaixo do esperado. Os autores explicam que ocorreu uma diluição do produto ativo, causada pela mistura na formulação, com isso, a atividade antifúngica não foi adequada. Cepas não-albicans foram mais sensíveis à associação de quefir com a base de creme não-iônica.

Amostras	<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)	<i>C. tropicalis</i> (ATCC 750)	<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 90018)
	CI50 (µg/mL)	CI50 (µg/mL)	CI50 (µg/mL)	CI50 (µg/mL)
Sabonete íntimo (F5)	1*	25*	200*	25*
Base com adjuvantes para o sabonete íntimo	800*	400*	800*	200*
Creme (F11)	400*	50*	400*	25*
Base com adjuvantes para o creme	800*	400*	800*	200*
Anfotericina B	1*	0,5*	0,25*	0,25*

Tabela 65 – Atividade antifúngica através da CI50 para as formulações F5, F11 e respectivas bases com adjuvantes. *DP foi < 0,001.

5.6.3.2 Teor de polifenóis e atividade antioxidante

Antioxidantes naturais oriundos dos extratos vegetais podem promover muitos benefícios as formulações tópicas aos quais são incorporados. Tanto para um produto de

higiene, suplemento alimentar ou um medicamento, os antioxidantes, como os polifenóis, promovem a saúde da pele, e auxiliam na diminuição da inflamação e de infecções causadas por diversos microrganismos (BORHAN; GANI; SHAMSUDDIN, 2014). Formulações para uso tópico contendo antioxidantes podem auxiliar na recuperação da pele, melhorando suas defesas e prevenindo danos ao tecido (ADDOR, 2019).

Abaixo, na Tabela 66, estão os resultados obtidos na determinação do teor de PT e atividade antioxidante, pelos métodos DPPH e ABTS. Para as duas formulações tópicas a quantidade de polifenóis foi menor em comparação ao ES de *E. uchi*. Foi possível detectar o teor destes metabólitos secundários, porém podem ter sofrido degradação durante a preparação das fórmulas, ou os adjuvantes utilizados interagem com o ES, não permitindo a liberação completa das substâncias com potenciais atividades biológicas. Sendo assim, a detecção da capacidade antioxidante tornou-se difícil, e a porcentagem de inibição dos radicais DPPH e ABTS foi abaixo do esperado. Novos estudos e outras formas de detecção da atividade antioxidante devem ser efetivados, com o objetivo de avaliar a interação entre todas as matérias-primas que compõem as formulações, bem como revelar um resultado mais fidedigno em relação a essas atividades biológicas.

Ensaio	Sabonete íntimo – F5	Creme – F11
	Média ± DP	Média ± DP
Teor de PT (g%)	6,58 ± 1,00	6,60 ± 0,40
DPPH (% inibição)	-1,65 ± 2,11	2,17 ± 2,11
ABTS (% inibição)	9,27 ± 1,54	14,65 ± 0,72

Tabela 66 – Teor de PT (g%) e capacidade antioxidante das formulações de sabonete íntimo (F5) e creme (F11).

6 CONCLUSÕES

Os valores encontrados para a caracterização físico-química e comportamento reológico do óleo de *B. excelsa* foram satisfatórios, indicando que este insumo estava adequado para utilização nesta pesquisa. Da mesma forma, a caracterização das cascas do caule de *E. uchi* demonstraram que as propriedades avaliadas estavam correspondendo com o preconizado pela legislação brasileira.

A análise estatística dos dados resultantes do planejamento fatorial mostrou que a condição ideal para obtenção da solução extrativa aquosa de *E. uchi* é 10% m/v (relação droga:solvente) e em 5 minutos de decocção. Esta solução extrativa padronizada apresentou 0,66 g% de teor de sólidos solúveis, e 1,95 g% de teor de polifenóis totais.

Com isso, foi possível transcorrer com o processo tecnológico de *E. uchi*, obtendo-se o extrato seco por aspersão para viabilizar a incorporação deste nas formulações tópicas propostas. Entre as duas técnicas de secagem por aspersão utilizada para obtenção do extrato seco, o leito de jorro (*fluidized bed drying*) demonstrou ser mais apropriado resultando em um rendimento operacional de 66,73 g%.

A avaliação das atividades biológicas do ES de *E. uchi* mostrou fraco poder antioxidante e nenhuma atividade frente bactéria *Staphylococcus aureus*, porém foi eficaz na atividade antifúngica principalmente contra as cepas de *Candida albicans*, *Candida Krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. Além disso, o extrato seco não apresentou citotoxicidade em nenhuma concentração testada, ou seja 100% de viabilidade celular.

Logo após, o extrato seco e o óleo de *B. excelsa* foram incorporados em formulações de sabonete íntimo e creme para uso vaginal. De todas as formulações testadas para obtenção do sabonete líquido e do creme, após o teste de pré-estabilidade por centrifugação, somente uma formulação de sabonete íntimo (F5) e uma de creme (F11), mostraram viabilidade tecnológica, ambas contendo 2% de extrato seco de *E. uchi* e 2% de óleo de *B. excelsa*. As duas formulações apresentaram bons resultados quando testadas contra as 5 cepas de leveduras do gênero *Candida*, sendo mais eficazes *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

Dessa forma, o estudo revelou que ambas as formulações podem ser consideradas promissoras para o uso no tratamento de candidíases vaginais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, H. A., *et al.* Antioxidant activity of (+)-bergenin - a phytoconstituent isolated from the bark of *Sacoglottis uchi* Huber (Humireaceae). **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 15, p. 2713-2718. 2008.

ADDOR, F. A. S. Topical effects of SCA® (*Cryptomphalus aspersa* secretion) associated with regenerative and antioxidant ingredients on aged skin: evaluation by confocal and clinical microscopy. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 2019, n. 12, p. 133-140, february. 2019.

AHMED, S. A; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 1759, n. 703, p. 211-24, 1994.

ALLEN JUNIOR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 716 p.

ALMEIDA, M. M. B., *et al.* Determinação de umidade, fibras, lipídios, cinzas e sílica em plantas medicinais. **B. CEPPA**, v. 21, n. 2, p. 343-350, jul./dez. 2003.

ALVAREZ, A. M. R.; RODRÍGUEZ, M. L. G. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. **Grasas y Aceites**, v. 51, p. 74-96. 2000.

ALVES, L. D. S. ***Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV**. 2014. 163f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ALVES, M. S. M., *et al.* Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 215-221, abr./mai. 2010.

AHMAD-QASEM, M. H., *et al.* Drying and storage of olive leaf extracts. Influence on polyphenols stability. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 232-239, january. 2016.

AKERELE, O. **Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines**. Herbal Gram, v. 28, p. 13-19, 1993.

AMBROSIO-UGRI, M. C. B; TARANTO, O. P. Estudo fluidodinâmico e de secagem de um particulado coesivo em leito fluidizado agitado em leito fluidizado agitado. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 26, n. 2, p. 97-102. 2004.

AMORIM, N. T., *et al.* Desenvolvimento, estudo da estabilidade e da potencial atividade antioxidante de emulsão cosmética contendo extrato glicólico de lichia (*Litchi chinensis* Sonn). **Sodebras**, v. 10, n. 113, p. 62-67, maio. 2015.

AN, H. J., *et al.* Physical and chemical stability of formulations loaded with taxifolin tetraoctanoate. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 4, july. 2019.

ANAND, E.; SINGH, J.; UNISA, S. Menstrual hygiene practices and its association with reproductive tract infections and abnormal vaginal discharge among women in India. **Sex. Reprod. Healthc.**, v. 6, n. 4, p. 249-254, december. 2015.

ANDRADE, S. S. C., *et al.* Agentes microbiológicos de vulvovaginites identificados pelo papanicolau. **Revista de Enfermagem**, v. 8, n. 2, p. 338-345, fevereiro. 2014.

ANTOLOVICH, M. *et al.* Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Journal Analyst**, v. 125, n. 5, p. 989-1009, 2000.

ANVISA. Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014. Determina a publicação do guia de orientação para registro de medicamento fitoterápico e registro e notificação de produto tradicional fitoterápico. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 10 julho 2019

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Plantas Medicinais e Fitoterápicos no SUS. 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 27 agosto 2019.

APOLINÁRIO, A. C., *et al.* Investigação de possíveis riscos à saúde advindos da utilização de cosméticos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 323-326. 2011.

ARARUNA, S. M., *et al.* Influence of process conditions on the physicochemical characteristics of cumaru (*Amburana cearensis*) powder produced by spray drying. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 132-137, jan./feb. 2013.

ARAÚJO, V. F., *et al.* **Plantas da Amazônia para Produção Cosmética: uma abordagem química - 60 espécies do extrativismo florestal não-madeireiro da Amazônia**. Brasília: Universidade de Brasília (UnB), 2007. 214 p.

ARAUJO, L. A. **Estudo das propriedades físicas, químicas e termofísicas de óleos regionais e suas misturas**. 2008. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém.

ARDISSON, L. *et al.* Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 27-34. 2002.

AROUTCHEVA, A., *et al.* Defense factors of vaginal lactobacilli. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 185, n. 2, p. 375-379, august. 2001.

ATANASOV, A. G., *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, december. 2015.

AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 855 p.

BAHAMONDES, M. V., *et al.* Use of a lactic acid plus lactoserum intimate liquid soap for external hygiene in the prevention of bacterial vaginosis recurrence after metronidazole oral treatment. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 57, n. 4, p. 415-420, jul./ago. 2011.

BALDIM, I. M., *et al.* Teste de sensibilidade ao quefir de cepas de *Candida* sp. isoladas de vulvovaginites. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 379-383. 2012.

BAJEROVÁ, P., *et al.* Comparison of various techniques for the extraction and determination of antioxidants in plants. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 7, p. 835-844, april. 2014.

BAJRACHARYA, G. B. Diversity, pharmacology and synthesis of bergenin and its derivatives: potential materials for therapeutic usages. **Fitoterapia**, v. 101, p. 133-152, march. 2015.

BANOV, D., *et al.* Caracterização do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. em formulações de uso tópico. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 219-224. 2006.

BARANOVA, I. I., *et al.* Experimental reasoning for the selection of the foam-washing agent base carrier at pH 3.3–4.8. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, p. 11-17, jan./mar. 2018.

BARNI, S. T.; FILHO, V. C.; COUTO, A. G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 865-870, out./dez. 2009.

BECKER, M. M., *et al.* Mineral and bromatological assessment and determination of the antioxidant capacity and bioactive compounds in native Amazon fruits. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 21, e2018022. 2018.

BENELLI, L., *et al.* Fluid bed drying and agglomeration of phytopharmaceutical compositions. **Powder Technology**, v. 273, p. 145-153, março. 2015.

BERNO, L. I.; POETA, P. T.; JÚNIOR, M. M. Efeitos do selênio oriundo da torta de castanha-do-brasil sobre a concentração de glutatona reduzida (gsh) em ratos Wistar. **Alim. Nutr. Araraquara**, v. 21, n. 2, p. 231-239, abr./jun. 2010.

BEZERRA, P. X., *et al.* Avaliação da rotulagem e parâmetros de qualidade de sabonetes íntimos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 20, n. 1, p. 51-60. 2016.

BHATTACHARYA, S.; SOBEL, J. D.; WHITE, T. C. A combination fluorescence assay demonstrates increased efflux pump activity as a resistance mechanism in azole-resistant vaginal *Candida albicans* isolates. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 60, n. 10, p. 5858-5866, october. 2016.

BOATTO, H. F., *et al.* Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil. **Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 29, n. 2, p. 80-84. 2007.

BONADEO, I. **Tratado de cosmética moderna**. Barcelona: Ed. Científico - Medica, 2010. p.1-4, 53, 84-106.

BORGHETTI, G.S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, 2006.

BORHAN, F. P.; GANI, S. S. A.; SHAMSUDDIN, R. The use of d-optimal mixture design in optimising okara soap formulation for stratum corneum application. **The Scientific World Journal**, v. 2014, article ID 173979. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: 2004. Série Qualidade em Cosméticos. v. 1. Maio 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos>>. Acesso em 07 junho 2019.

_____. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 211, de 14 de julho de 2005**. Brasília, 2005. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 17 junho 2019.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 270, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o "regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal". Diário Oficial de Brasília, de 23 de setembro de 2005.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 5.ed. Brasília: v.1, 2010. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso em 21 junho 2019.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 6.ed. Brasília: v.1, 2019. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso em 16 agosto 2019.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. 1ª edição. Brasília: ANVISA, 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterpicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf>. Acesso em 17 junho 2019.

_____. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 7, de 10 de fevereiro de 2015**. Brasília, 2015. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 17 junho 2019.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, v. 56, n. 11, p. 317-333, november. 1998.

BROCK, J., *et al.* Determinação experimental da viscosidade e condutividade térmica de óleos vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 30, p. 564-570, jul./set. 2008.

BRUHN, J. G.; HOLMSTEDT, B. Ethnopharmacology, Objectives, Principles and Perspectives. In: BEAL, J. L.; REINHARD, E. (ed.). **Natural products as medicinal agentes**. Stuttgart: Hippokrates, p. 405-430. 1982.

BUFAINO, E. M. Phytotherapy in Brazil: recovering the concepts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n.1, p. 22-27, jan./feb. 2013.

BUGNOTTO, C., *et al.* Estudo de estabilidade de formulação tópica contendo própolis. **Disc. Scientia**, v. 7, n. 1, p. 1-12. 2006.

BUHLER, F. V.; FERREIRA, J. R. N. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações contendo extratos de *Ilex paraguariensis* stT. HiliL. a 5 e 10%. **Revista Perspectiva**, v. 32, n. 119, p. 47-55, setembro. 2008.

BURITS, M.; BUCAR, F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. **Phytotherapy research**, v. 14, n. 5, p. 323-8, august. 2000.

BROWNING, B. L. **Methods of wood chemistry**. New York: Wiley & Sons, Interscience Publishers, vol. II, 1967. 498 p.

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

CANO-CHAUCA, M., *et al.* Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 6, n. 4, p. 420-428. 2005.

CAO, X. Q., *et al.* Spray-drying of ceramics for plasma-spray coating. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 20, n. 14-15, p. 2433-2439, december. 2000.

CARDOSO, B. R., *et al.* Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. **Food Research International**, v. 100, p. 9-18, october. 2017.

CARDOSO, I. C., *et al.* Influência da técnica de extração e do tamanho de partícula do material vegetal no teor de compostos fenólicos totais da tintura das folhas de *Alpinia zerumbet*. **Revista Fitos**, v. 11, n. 1, p. 62-68, setembro. 2017.

CARVALHO, J. E. U.; MULLER, C. H.; BENCHIMOL, R. L. **Uxizeiro: Botânica, Cultivo e Utilização**. 1. ed. Belém: EMBRAPA, 2007. 107 p.

CASTELI, V. C., *et al.* Desenvolvimento e estudos de estabilidade preliminares de emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 30, n. 2, 121-128. 2008.

CASTRO, F. C. **Estudo espectroscópico experimental e teórico da acetilbergenina**. 2013. 68f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) – Escola de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Amazonas, Manaus.

CASTRO, A. S.; ANDRADE, D. C. O custo econômico do desmatamento da Floresta Amazônica brasileira (1988-2014). **Perspectiva Econômica**, v. 12, n. 1, p. 1-15, jan./jun. 2016.

CATELAM, K. T. **Estudo da influência da proporção de um “mix” leite/polpa de maracujá na produção de pó obtido por três diferentes métodos de secagem**. 2010. 119f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência em Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas Comestíveis da Amazônia**. 6ª ed. – Belém: CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, (Coleção Adolpho Ducke) p. 228, 1996.

CELIK, T. A. Potential genotoxic and cytotoxic effects of plant extracts. **A Compendium of Essays on Alternative Therapy Arup Bhattacharya**, IntechOpen, cap. 11, p. 292, Publisher. 2012. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/a-compedium-of-essays-on-alternative-therapy/potential-genotoxic-and-cytotoxic-effects-of-plant-extracts>. Acesso em 02 julho 2019.

CÉSAR, J.; DE PAOLI, M-A.; ANDRADE, J. C. A determinação da densidade de sólidos e líquidos. **Chemkeys – liberdade para aprender**, p. 1-8, julho. 2004. Disponível em: <http://objetoseducacionais2.mec.gov.br/bitstream/handle/mec/11544/articleI.pdf?sequence=3>. Acesso em 23 julho 2019.

CHANDRASEKAR, D., *et al.* Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: a sensitive screening method for polyherbal formulations. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 40, n. 2, p. 460-464, february. 2006.

CHAVES, N. **Dossiê Técnico nº 211: Cultivo da Castanha-do-Brasil**. Brasília: Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília – CDT/UnB. 16 Outubro 2007. Disponível em: <http://www.sbrrt.ibict.br/dossies-tecnicos>>. Acesso em 22 abril 2019.

CHEN, D., *et al.* pH and temperature dual-sensitive liposome gel based on novel cleavable mPEG-Hz-CHEMS polymeric vaginal delivery system. **Int. J. Nanomedicine**, v. 7, p. 2621-2630, may. 2012.

CHEN, Y., *et al.* Role of female intimate hygiene in vulvovaginal health: global hygiene practices and product usage. **Women's Health**, v. 13, n. 3, p. 58-67, september. 2017.

CHIROLI, M.; CAMPOS, R.; SILVA, L. L. Doadores de viscosidade utilizados em xampus: revisão de literatura, 2000 a 2012. **Visão Acadêmica**, v. 14, n. 1, p. 71-83, jan./mar. 2013.

CHUN, S-S., *et al.* Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 809-816, february. 2005.

CHUNHIENG, T., *et al.* Detailed study of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*) oil micro-compounds: phospholipids, tocopherols and sterols. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 7, p. 1374-1380. 2008.

COELHO, L. M. **Diversidade genética em populações de castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.)**. 2013. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

COPPA, C. F. S., *et al.* Extração de oleuropeína a partir de folhas de oliveira utilizando solvente hidroalcoólico. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, e2016169, p. 1-9, ago. 2017.

CORREA -, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. v. 6. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. 1975 p.

CORRÊA, N. M., *et al.* Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 73-78. 2005.

COSTA, R. C.; NUNEZ, C. V. Mercado de bioprodutos fitoterápicos e fitocosméticos: gestão, tecnologias e inovação. **Revista Fitos**, vol. 10, n. 3, p. 220-372, jul./set. 2016.

COSTA, S. *et al.* Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488. 2006.

COUTO, R. O., *et al.* Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (MYRTACEAE). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 3, p. 59-69. 2009.

CRONEMBERGER, P. R.; PAULA, S. C.; MEIRELLES, L. M. A. Análise de sabonetes líquidos íntimos. **Revista Saúde em Foco**, v. 2, n. 1, p. 49-59, jan./jul. 2015.

CUATRECASAS, J. A taxonomic revision of the Humiriaceae. **Contributions from the United States National Herbarium**, v. 35, p. 25-214, 1961.

CUEVAS, M. D. A., *et al.* Higiene íntima femenina y vaginosis bacteriana. Encuesta Epidemiológica Latinoamericana 2008. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología**, v. 61, n. 3, p. 198-206, september. 2010.

CUTLER, J. E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, p. 187-218, October. 1991.

DA CUNHA, A. P., *et al.* **Plantas e Produtos Vegetais em Cosmética e Dermatologia**. 4. ed. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian, 2015. 310 p.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Journal Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, october. 2010.

DAMKE, E., *et al.* In vivo activity of *Sapindus saponaria* against azole-susceptible and -resistant human vaginal *Candida* species. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 35, may. 2011.

DANBY, C. S., *et al.* effect of ph on *in vitro* susceptibility of *Candida glabrata* and *Candida albicans* to 11 antifungal agents and implications for clinical use. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 56, n. 3, p. 1403-1406, march. 2012.

DAVAL-COTE, M., *et al.* Vulvovaginite à gonocoque chez l'enfant prépubère: infection sexuellement transmissible ou contamination accidentelle. **Archives de Pédiatrie**, v. 20, n. 1, p. 37-40, january. 2013.

DE CAMPOS, A. M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hill. Aquifoliaceae (erva-mate)**. 1996. 149f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DONDERS, G. Diagnosis and management of bacterial vaginosis and other types of abnormal vaginal bacterial flora: A review. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 65, n. 7, p. 462-473, july. 2010.

DONG, Q., *et al.* Differences in fundamental and functional properties of HPMC co-processed fillers prepared by fluid-bed coating and spray drying. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 119, n. 1, p. 147-158, july. 2018.

DORTA, E.; LOBO, G.; GONZÁLEZ, M. Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: effect on antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 261-268, march. 2012.

DU, W-N.; CHEN, S-T. Bactericidal effects of oxidative stress generated by EDTA-fe and hydrogen peroxide. **Biocontrol Science**, v. 24, n. 2, p. 97-101. 2019.

ENRÍQUEZ, G. Amazônia – Rede de inovação de dermocosméticos. Sub-rede de dermocosméticos na Amazônia a partir do uso sustentável de sua biodiversidade com enfoques para as cadeias produtivas da castanha-do-pará e dos óleos de andiroba e copaíba. **Parcerias Estratégicas**, v. 14, n. 28, p. 1-68. 2009.

EREKSON, E. A., *et al.* Over-the-counter treatments and perineal hygiene in postmenopausal women. **Menopause**, v. 21, n. 3, p. 281-285, march. 2014.

ESCOBAR, J. L., *et al.* Desenvolvimento de sabonetes em barra contendo óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientific Electronic Archives**, v. 9, n. 2, maio. 2016.

EU, 2009. **Regulation (EC) N° 1223/2009 of the european parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products**. Official Journal of the European Union 151. Disponível em: <https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine_disruptors/docs/cosmetic_1223_2009_regulation_en.pdf>. Acesso em 18 junho 2019.

FALZON, C. C.; BALABANOVA, A. Phytotherapy: an introduction to herbal medicine. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 44, n. 2, p. 217-227, june. 2017.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510-523, october. 2010.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. 263-288. In: SIMÕES, C. M. O., *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: UFSC, 2004.

FARAGE, M. A.; LENNON, L.; AJAYI, F. Products used on female genital mucosa. **Curr. Probl. Dermatol.**, v. 40, p. 90-100. 2011.

FERNANDES, A. R., *et al.* Stability evaluation of organic Lip Balm. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 293-299, june. 2013.

FERRARO, G. E., *et al.* **Fitocosmética: fitoingredientes y otros productos naturales**. 1. ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Eudeba, 2015. 336 p.

FERREIRA, D. L. R. **Plantas medicinais utilizadas em 9 comunidades rurais de Itacoatiara e aspectos anatômicos e histoquímicos de duas espécies (*Pogostemon cablin* Benth e *Tripogandra glandulosa* (Seub.) Rohw)**. 2016. 118f. Tese (Doutorado em Agronomia Tropical, na área de Fitotecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

FERREIRA, E. S., *et al.* Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.)*. **Brazilian journal of food and nutrition**, v. 17, n. 2, p. 203-208, abr./jun. 2016.

FERREIRA, V. F; PINTO, A. C. A Fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, setembro. 2010.

FLORENCIO-SILVA, R., *et al.* Tratamento da atrofia vaginal da mulher na pós-menopausa. **Reprodução & Climatério**, v. 32, n. 1, p. 43-47, jan./abr. 2017.

FRANZEN, F. de L., *et al.* Teor e rendimento de extratos de flores obtidos por diferentes métodos e períodos de extração. **Acta Iguazu**, v. 7, n. 1, p. 9-21. 2018.

FREITAS, D. S. **Estudo teórico e experimental dos espectros de absorção UV/VIS e algumas propriedades moleculares da bergenina**. 2013. 77f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) – Universidade Estadual do Amazonas, Manaus.

FREITAS, F. A., *et al.* Biological evaluation and quantitative analysis of antioxidante compounds in pulps of the Amazonian fruits bacuri (*Platonia insignis* Mart.), ingá (*Inga edulis* Mart.), and uchi (*Sacoglottis uchi* Huber) by UHPLC-ESI-MS/MS. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 1, e12455, february. 2018.

FRIEDRICH, M., *et al.* Avaliação da estabilidade físico-química de creme não iônico inscrito no formulário nacional. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 4, p. 558-562, abril. 2007.

GADELHA, C. A. G. Desenvolvimento, complexo industrial da saúde e política industrial. **Rev. Saúde Pública**, v. 40, n. spe., p. 11-23, agosto. 2006.

GADELHA, C. S., *et al.* Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 208-212, dez. 2013.

GAFITANU, C. A., *et al.* Formulation and evaluation of anise-based bioadhesive vaginal gels. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 485-495, october. 2016.

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

GARCIA, C. C., *et al.* Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de formulações de sabonete líquido íntimo acrescidas de óleo de melaleuca. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 3, p. 236-240. 2009.

GARDA, J.; BADIALE-FURLONG, E. Otimização de metodologia para derivação de desoxinivalenol através de planejamento experimental. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 270-274, dezembro. 2008.

GIANETI, M. D., *et al.* Benefits of combinations of vitamin a, c and e derivatives in the stability of cosmetic formulations. **Molecules**, v. 17, n. 2, p. 2219-2230, february. 2012.

GIL-CHÁVEZ, G. J., *et al.* Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5-23, january. 2013.

GIRIBABU, N.; KARIM, K.; SALLEH, N. Effects of *Marantodes pumilum* (Kacip Fatimah) on vaginal pH and expression. of vacoular ATPase and carbonic anhydrase in the vagina of sex-steroid deficient female rats. **Phytomedicine**, v. 49, n. 1, p. 95-105, october. 2018.

GONNISSEN, Y., *et al.* Coprocessing via spray drying as a formulation platform to improve the compactability of various drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 320-334, may. 2008.

GOTSCHLICH, M. F. L. **Escoamento de fluidos não newtonianos: revisão da literatura e análise de correlações para o fator de atrito e coeficientes de perda localizada.** 2011. 113f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GUERRA, A. M. N. M., *et al.* Utilização de plantas medicinais utilizadas na comunidade rural Moacir Lucena, Apodi-RN. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, mai./jun. 2010.

GUINOT, M., *et al.* Acceptability, tolerability, and effects on symptoms and signs of vulvovaginitis of a non-soap, herbal-based intimate hygiene solution (Zelesse®). **J Int Med Res.**, v. 47, n. 6, p. 2626-2636, may. 2019.

GUIZZO, P. L., *et al.* Controle de qualidade e triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas de *Morus nigra* L. (MORACEAE). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 36, n. 2, p. 259-265. 2015.

GUPTA, N. V., *et al.* Bioadhesive vaginal tablets containing spray dried microspheres loaded with clotrimazole for treatment of vaginal Candidiasis. **Acta Pharm.**, v. 63, n. 3, p. 359-372. 2013.

HAFEEZ, A; KAZMI, I. Dacarbazine nanoparticle topical delivery system for the treatment of melanoma. **Scientific Reports**, v. 7, n. 16517, november. 2017.

HAYOUNI, E. A., *et al.* The effect of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of *Tunisian Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1126-1134, december. 2007.

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

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M. M. **Manual de cosmetologia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2009. 244 p.

HIGIOKA, A. S.; BARZOTTO, I. L. M. Desenvolvimento e controle físico-químico de sabonete líquido com digluconato de clorexidina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 537-543. 2013.

IMEH, U.; KHOKHAR, S. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6301-6306, september. 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

ISAAC, V. L. B., *et al.* Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81-96, janeiro. 2008.

KALRA, A., *et al.* Bacterial vaginosis: culture- and PCR-based characterizations of a complex polymicrobial disease's pathobiology. **Current Infectious Disease Reports**, v. 9, n. 6, p. 485-500, november. 2007.

KATZ, D. F.; YUAN, A.; GAO, Y. Vaginal drug distribution modeling. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 2-13, september. 2016.

KIM, H. S., *et al.* Antihepatotoxic activity of bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated hepatocytes. **J Ethnopharmacol.**, v. 69, n. 1, p. 79-83, january. 2000.

KIM, H. J.; PARK, G. M.; KIM, J. K. Anti-inflammatory effect of pristimerin on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 4, p. 495-500, april. 2013.

KOLE, P. I., *et al.* Cosmetics potential of herbal extracts. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 4, n. 4, p. 315-321, jul./aug. 2005.

KONUSKAN, D. B.; ARSLAN, M.; OKSUZ, A. Physicochemical properties of cold pressed sunflower, peanut, rapeseed, mustard and olive oils grown in the Eastern Mediterranean region. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 340-344, february. 2019.

KOWALSKA, M., *et al.* Assessment of a stable cosmetic preparation based on enzymatic interesterified fat, proposed in the prevention of atopic dermatitis. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 74, n. 2, p. 465-476, march. 2017.

JANGAN, S. V.; THORAT, B. N. Optimization of spray drying of ginger extract. **Drying Technology**, v. 28, p. 1424-1434. 2010.

JOSHI, L. S.; PAWAR, H. A. Herbal cosmetics and cosmeceuticals: an overview. **Natural Products Chemistry & Research**, v. 3, n. 2, p. 1-8. 2015.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528. 2005.

JR SHEPARD, G. H.; RAMIREZ, H. “Made in Brazil”: human dispersal of the Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae) in Ancient Amazonia. **Economic Botany**, v. 65, n. 1, p. 44-65, february. 2011.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. Volume I. 505 p.

LAHOUD, M. H.; CAMPOS, R. Aspectos teóricos relacionados à reologia farmacêutica. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 1, p. 65-73, junho. 2010.

LAMONT, R. F., *et al.* The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 118, n. 5, p. 533-549, april. 2011.

LEE, S. J., *et al.* Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137. 2005.

LIMA, N. P. C. **Desenvolvimento de produto seco por aspersão obtido a partir das amêndoas de *Bertholletia excelsa* H.B.K.** 2014. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

LIMA, R. Q. **Estudos tecnológicos para obtenção de forma farmacêutica sólida a partir de *Endopleura uchi* e *Uncaria tomentosa*.** 2018. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

LOCH-NECKEL, G., *et al.* Obtenção de extratos secos de carotenoides a partir da biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* por secagem em torre de aspersão (*spray-drying*). **Matéria (Rio J.)**, v. 23, n. 4, e12221. 2018.

LOPES, A. C., *et al.* Análise físico-química comparativa de sabonetes líquidos. **Visão Acadêmica**, v. 19, n. 2, abr./jun. 2018.

LU, X.; WANG, J. Advances in the study of *Bergenia* plants. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, v. 26, p. 58-60. 2003.

LUNA, J. S. **Estudo dos constituintes químicos de *Endopleura uchi* (Humiriaceae).** 2000. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia), Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

MACIEL, M. A. M., *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429 – 438, maio. 2002.

MAGALHÃES, L. A. M., *et al.* Identificação de bergenina e carotenóides no fruto de uchi (*Endopleura uchi*, Humiriaceae). **Acta Amazonica**, v. 37, n. 3, p. 447-450. 2007.

MAHDI, E. S., *et al.* Formulation and in vitro release evaluation of newly synthesized palm kernel oil esters-based nanoemulsion delivery system for 30% ethanolic dried extract derived from local *Phyllanthus urinaria* for skin antiaging. **Int. J. Nanomedicine**, v. 6, p. 2429-2512, october. 2011.

MALDOVAN, M., *et al.* Formulation and evaluation of a water-in-oil cream containing herbal active ingredients and ferulic acid. **Pharmacy**, v. 90, n. 2, p. 212-219. 2017.

MANFIO, J. L.; BRUM JUNIOR, L. Desafios do desenvolvimento dos dossiês de registro de medicamentos fitoterápicos. **Arq. Cienc. Saúde UNIPAR**, v. 21, n. 1, p. 47-52, jan./abr. 2017.

MANTLE, D.; GOK, M. A.; LENNARD, T. W. Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders. **Adverse Drug React Toxicol Rev.**, v. 20, n. 2, p. 89-103, june. 2001.

MARX, F., *et al.* Studies of edible Amazonian plants. Part 5: Chemical characterisation of Amazonian *Endopleura uchi* fruits. **European Food Research and Technology**, v. 214, n. 4, p. 331-334, april. 2002.

MARTINS, C. P.; GRAF, M. M. T.; CASSETARI, M. B. Identificação dos bioativos do *Heliotropium indicum* (L.) como proposta de formulação de uma pomada antimicrobiana fitoterápica para o combate de patologias dermatológicas humanas (micose). **Revista Fitos**, v. 10, n. 2, p. 95-219, abr./jun. 2016.

MARTINS, H. P. R., *et al.* Efficacy of fluconazole and nystatin in the treatment of vaginal *Candida* species. **Acta Derm Venereol.**, v. 92, p. 78-82. 2012.

MASTERS, K. **Spray drying handbook**. George Godwin, Ltd., London, 3rd Ed., 1985. 696 p.

MATOS, I. O.; DOURADO, D.; PEREIRA, N. P. Prospecção de óleos fixos da flora brasileira e africana na cosmetologia sustentável. **Visão Acadêmica**, v. 16, n. 2, p. 18-37, jun. 2015.

MELO, A. F.; MURICY, J. M. T. C.; SANTOS, R. F. Desenvolvimento de um gel gengival a partir do extrato bruto seco de *Passiflora edulis Sims*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 3, p. 1-15. 2012.

MENDEZ, A. S. L., *et al.* Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 105-111. 2011.

MENSOR, L. L., *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v. 15, n.2, p. 127-130, march. 2001.

MIGLIATO, K. F., *et al.* Verificação da atividade antibacteriana de sabonete líquido contendo extrato glicólico de *Dimorphandra mollis* Benth. **Revista de Ciências Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 197-202. 2009.

MIRMONSEF, P., *et al.* Free glycogen in vaginal fluids is associated with *Lactobacillus* colonization and low vaginal pH. **Journal Plos One**, v. 9, n. 7, e102467. 2014.

MISHRA, P.; BRAHMA, A.; SETH, D. Physicochemical, functionality and storage stability of hog plum (*Spondia pinnata*) juice powder produced by spray drying. **J Food Sci Technol.**, v. 54, n. 5, p. 1052-1061, april. 2017.

MONIF, G. R. G.; CARSON, H. J. Female genital tract bacterial coisolates with *Candida albicans* in patients without clinical vaginitis. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 6, n. 2, p. 52-56. 1998.

MONTAZ, S., *et al.* Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. **Journal Ethnopharmacology**, v.119, n.3, p.507-512. 2008.

MONTEIRO E SILVA, S. A., *et al.* Gallic acid-loaded gel formulation combats skin oxidative stress: development, characterization and ex vivo biological assays. **Polymers**, v. 9, n. 9, august. 2017.

MORI, S. Diversificação e conservação das Lecythidaceae neotropicais. **Acta Botanica Brasílica**, v. 4, n. 1, p. 45-68, julho. 1990.

MOSTEFA, N. M., *et al.* Determination of optimal cream formulation from long-term stability investigation using a surface response modelling. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28, n. 3, p. 211-218, May. 2006.

MUNIZ, M. P. **Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Endopleura uchi* Huber Cuatrecasas**. 2013. 129f. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

MURTOMAA, M., *et al.* Static electrification of powders during spray drying. **Journal of Electrostatics**, v. 62, n. 1, p. 63-72, september. 2004.

NARDI-RICART, A., *et al.* A new design for the review and appraisal of semi-solid dosage forms: Semi-solid Control Diagram (SSCD). **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. 1-21, february. 2018. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0201643>>. Acesso em 20 junho 2019.

NASIOUDIS, D., *et al.* α -amylase in vaginal fluid: association with conditions favorable to dominance of *Lactobacillus*. **Reproductive Science**, v. 22, n. 11, p. 1393-1398, april. 2015.

NAZIR, N., *et al.* Evaluation of antioxidante and antimicrobial activities of Bergenin and its derivatives obtained by chemoenzymatic synthesis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 2415-2420, 2011.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis melífera*. **Braz. J. Food Technol.**, v. 15, p. 107-110, junho. 2009.

NIJDAM, J. J.; LANGRISH, T. A. J. The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 4, p. 919-925. 2006.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica**. 2 ed. NCCLS, Wayne, v. 22, n. 15. 2002. 45 p.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test**; Approved Standard-Tenth Edition. Wayne, CLSI document M02-A10, 2009a.

NUNES, L. C. C., *et al.* Desenvolvimento de gel vaginal contendo extrato de própolis vermelha. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 2, p. 179-185. 2012.

NUNOMURA, R. C. S., *et al.* Characterization of bergenin in *Endopleura uchibark* and its anti-inflammatory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1060-1064. 2009.

NYEMB, J. N., *et al.* Antimicrobial, α -Glucosidase and alkaline phosphatase inhibitory activities of bergenin, The major constituent of *Cissus populnea* Roots. **Medicinal chemistry**, v. 8, n. 2, 426-430. 2018.

OLIVEIRA, A. C. D.; ROPKE, C. D. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Fitos**, v. 10, n. 2, p. 185-198, abr./jun. 2016.

OLIVEIRA, A. L., *et al.* *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (marcela) Asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração. **Caderno de Farmácia**, v. 17, n. 1, p. 33-38. 2001.

OLIVEIRA, W. P.; BOTT, R. F.; SOUZA, C. R. F. Manufacture of standardized dried extracts from medicinal brazilian plants. **Drying Technology**, v. 24, p. 523-533. 2006.

OLIVEIRA, A. H.; BARRETTA, A. A. Avaliação da qualidade de insumos farmacêuticos a base de calêndula e própolis utilizados pelas farmácias magistrais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 169-174. 2007.

OLIVEIRA, R. C.; BARROS, S. T. D.; ROSSI, R. M. Aplicação da metodologia bayesiana para o estudo reológico da polpa de uva. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 11, n. 1, p. 73-80. 2009.

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

OLIVEIRA, M. A., *et al.* Avaliação da estabilidade e atividade antifúngica de formulações de xampu anticaspa contendo piritionato de zinco e a influência da adição de extratos vegetais. **Revista Faculdade Montes Belos**, v. 6, n. 1, p. 1-21. 2013.

OLIVEIRA, G. L. S. Capacidade antioxidante celular da rutina frente ao dano oxidativo induzido em linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 3, p. 461-466. 2015.

OLIVEIRA, N. F. **Estudo de pré-formulação para a obtenção de sabonete líquido íntimo a partir de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec e óleo de *Bertholletia excelsa***. 2017. 97f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

OSORIO-REVILLA, G.; ELÍAS-SERRANO, R.; GALLARDO-VELÁZQUEZ, T. Drying of liquid feedstocks in a spout-fluid-bed with draft-tube submerged in inert solids: hydrodynamics and drying performance. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 82, n. 1, p. 142-147, february. 2004.

PANDA, S., *et al.* Vaginal pH: A marker for menopause. **Journal of Mid-life Health**, v. 5, n. 1, p. 34-37. 2014.

PARMEZAN, S. N., *et al.* Otimização do método extração de compostos fenólicos totais em sementes de *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 16, n. 1, p. 34-39, jan./abr. 2017.

PEDROLLO, C. T., *et al.* Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, n. 20, p. 111-124, june. 2016.

PENTEADO, J. C. P., *et al.* Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1038-1046. 2006.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M. C.; CHIVOT, M. **Cosmetologia - Biologia geral- Biologia da pele**, n.1: Biologie de la peau (3ª. ed); n. 2: Biologie Générale (2ª. edição); n.3: Cosmetologie (1ª. edição), publicado pelo Simep/Masson (Paris). São Paulo: Andrei Editora Ltda, 1998.

PETROVSKA, L. S., *et al.* Optimization of physical and chemical characteristics of a modern intimate hygiene agent. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 11, n. 4, october. 2017.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4419-4431, october. 2004.

PIANOVSKI, A. R., *et al.* Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, abr./jun. 2008.

PINELO, M., *et al.* Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2111-2117, february. 2005.

PINHEIRO, J. P.; ROSARIO, J. S. **Avaliação fitoquímica e antinociceptiva do extrato bruto aquoso liofilizado da espécie vegetal *Endopleura uchi* (Uxi amarelo)**. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em farmácia) – Universidade Federal do Pará, Belém.

PLA, D. L., *et al.* Moisture soft sensor for batch fluid bed dryers: A practical approach. **Powder Technology**, v. 326, n. 15, p. 69-77, february. 2018.

POLITI, F. A. S. **Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiraceae)**. 2009. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

POLITI, F. A. S., *et al.* Testes preliminares de motilidade intestinal e toxicidade oral aguda com extrato de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiraceae) em camundongos. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 1, n. 1, p. 187-189, março. 2010.

POLITI, F. A. S., *et al.* Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities and determination of the total tannin content of bark extracts *Endopleura uchi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 4, p. 2757-2768, april. 2011.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. Volume II. 1437 p.

QIN, X., *et al.* Determination of bergenin in rat plasma by high-performance liquid chromatography. **Pharmazie**, v. 62, p. 323-326. 2007.

QUEIROGA, V. *et al.* Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K) seed kernel oil: characterization and thermal stability. **Revista de biologia e farmácia**, vol.3, n.1, p.33-42, 2009.

QUSHAWY, M., *et al.* Design, optimization and characterization of a transfersomal gel using miconazole nitrate for the treatment of candida skin infections. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, p. 1-22, february. 2018.

RADCHENKOVA, N., *et al.* Continuous cultivation of a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418 for production of an exopolysaccharide applicable in cosmetic creams. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 5, p. 1301-1309. 2015.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347-12360, september. 2012.

RANA, V. S., *et al.* Chemical constituents and antioxidant activity of *Mallotus roxburghianus* leaves. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, n. 6, p. 792-798, june. 2005.

RANDAL, V. B.; BEHRENS, M.; PEREIRA, A. M. S. Farmácia da natureza: um modelo eficiente de farmácia viva. **Revista Fitos**, v. 10, n. 1, p. 59-72, jan./mar. 2016.

RASTOGI, S.; RAWATA, A. K. S. A comprehensive review on bergenina - a potential hepatoprotective and antioxidative phytoconstituent. **Herba polonica**, v. 54, n. 2, p.76-79, 2008.

REVILLA, J.; **Plantas da Amazônia. Oportunidades Econômicas Sustentáveis**, INPA/SEBRAE: Manaus, Brasil, 2001.

RIBEIRO, A. S., *et al.* Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products. **Cosmetics**, v. 2, n. 2, p. 48-65, april. 2015.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography**, v. 1000, n. 1-6, p. 657-691, june. 2003.

ROLIM, F. N. A. **Desenvolvimento de sistemas emulsionados contendo óleo de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*)**. 2016.107f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

RODRIGUES, G. A., *et al.* Determinação de parâmetros farmacognósticos para as folhas de *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hilaire (Erythroxylaceae) coletadas no município de Goiânia, GO. **Rev. bras. plantas med.**, v. 17, n. 4, p. 1169-1176. 2015.

RODRIGUES, M. I. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358 p.

ROMO-CÁRDENAS, G., *et al.* Application of factorial experimental design on the optical absorption from glucose–insulin samples in mid-infrared spectroscopy. **Results in Physics**, v. 13, e. 102170, june. 2019.

ROSA, M. I.; RUMEL, D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n.1, p. 65-70. 2004.

ROSELLI, M.; LENTINI, G.; HABTEMARIAM, S. Phytochemical, antioxidant and anti- α -glucosidase activity evaluations of *Bergenia cordifolia*. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 6, p. 908-914, june. 2012.

RUIZ, C., *et al.* Daily genital cares of female gynecologists: a descriptive study. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 65, n. 2, p. 171-176, february. 2019.

SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, J. A., *et al.* Prevalencia de *Candida albicans* y su relación con cambios en el pH vaginal. **Atención Familiar**, v. 24, n. 1, p. 18-22, jan./mar. 2017.

SANTOS, H. V., *et al.* Caracterização laboratorial das dislipidemias e o uso de fitoterápicos. **Revista Multitexto**, v. 3, n. 1, p. 21-28, jun. 2015.

SANTOS, J. F. L., *et al.* Observations on the therapeutic practices of riverine communities of the Unini River, AM, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 503-515, july. 2012.

SANTOS, O. V., *et al.* Chemical evaluation and thermal behavior of Brazil nut oil obtained by different extraction processes. **Food Research International**, v. 47, n. 2, p. 253-258, july. 2012.

SANTOS, O. V. dos. **Estudo das potencialidades da castanha-do-brasil: produtos e subprodutos**. 2012. 214f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SANTOS, R. L., *et al.* Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 486-491. 2011.

SARALA, M., *et al.* Spray drying of *Tinospora cordifolia* leaf and stem extract and evaluation of antioxidant activity. **J Food Sci Technol**, v. 49, n. 1, p. 119-122, jan./feb. 2012.

SCALBERT, A., *et al.* Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 4, p. 287-306, january. 2007.

SCHIAVON, D., *et al.* Multifunctional cosmetic containing blueberry and Tinosorb M[®] - loaded microparticles improves sunscreen performance. **Adv Pharm Bull**, v. 9, n. 2, p. 241-248. 2019.

SCHMIDBERGER, M., *et al.* Optimization of rheological behaviour and skin penetration of thermogelling emulsions with enhanced substantivity for potential application in treatment of chronic skin diseases. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 8, july. 2019.

SCHULTES, R. E. De plantis Toxicariis e mundo novo tropicale commentationes. XXI. Interesting native uses of the Humiriaceae in the northwest Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 1, n. 1, p. 89-94, january. 1979.

SERRA, J. L., *et al.* Alternative sources of oils and fats from Amazonian plants: fatty acids, methyl tocopherols, total carotenoids and chemical composition. **Food Research International**, v. 116, p. 12-19, february. 2019.

SHANKAR, N. B., *et al.* Development and characterization of bioadhesive gel of microencapsulated metronidazole for vaginal use. **Iran J Pharm Res.**, v. 9, n. 3, p. 209-219. 2010.

SHANG, X., *et al.* Dietary protein from different food sources, incident metabolic syndrome and changes in its components: An 11-year longitudinal study in healthy community-dwelling adults. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 6, p. 1540-1548, december. 2017.

SHANLEY, P.; GAIA, G. A fruta do pobre se torna lucrativa: A *Endopleura uchi* Cuatrec. em áreas manejadas próximo a Belém, Brasil. **ResearchGate**, p. 219 – 328, janeiro, 2004. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/228739527_A_fruta_do_Pobre_se_torna_lucrativa_A_Endopleura_uchi_Cuatrec_em_areas_manejadas_proximo_a_Belem_Brasil. Acesso em: 02 julho 2019.

SHANLEY, P.; LUZ, L.; SWINGLAND, I. R. The faint promise of a distant market: a survey of Belém's trade in non-timber forest products. **Biodiversity & Conservation**, v. 11, n. 4, p. 615-636, april. 2002.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Belém: CIFOR & Imazon, 2005. 300 p.

SHANTY, A.; MOHANAN, P. Heterocyclic Schiff bases as non toxic antioxidants: solvent effect, structure activity relationship and mechanism of action. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 192, p. 181-187, november. 2017.

SHI, Y-B; SHI, Y-P; MENG, Q-G. Determination and pharmacokinetics study of bergenin in rat plasma by RP-HPLC method. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 10, p. 1065-1070, october. 2006.

SHIRKHANI, S., *et al.* Phospholipase and proteinase activities of *Candida* spp. isolates from vulvovaginitis in Iran. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 26, n. 3, p. 225-260, september. 2016.

SILVA, A. F. **Efeito das etapas de processamento sobre a qualidade de castanhas-do-brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.): avaliação da fração lipídica e contaminação por aflotoxinas.** 2014. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SILVA, A. M., *et al.* In vitro cytotoxicity of oleanolic/ursolic acids-loaded in PLGA nanoparticles in different cell lines. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 8, july. 2019.

SILVA, C. M.; SILVA JÚNIOR, T. L.; PINTO JÚNIOR, I. M. Caracterização reológica de fluidos não newtonianos e sua aplicabilidade na indústria. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 5, n. 2, p. 285-300, maio. 2019.

SILVA, L. C., *et al.* Delineamento de formulações cosméticas com óleo essencial de *Lippia gracilis* Schum (Alecrim-de-Tabuleiro) de origem amazônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p. 319-326. 2015.

SILVA, L. R.; TEIXEIRA, R. Phenolic profile and biological potential of *Endopleura uchi* extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 11, p. 889-897, november. 2015.

SILVA, R. M. F., *et al.* Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 103-109. 2012.

SILVA, S. A. M., *et al.* Atividade antioxidante do extrato seco de cacau orgânico (*Theobroma cacao*) - estudo de estabilidade e teste de aceitação de cremes acrescidos deste extrato. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 493-501. 2013.

SILVA, S. L., *et al.* Antimicrobial activity of bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 187-191, march. 2009.

SILVA, T. F., *et al.* Desenvolvimento e estudo de estabilidade físico-química de formulações cosméticas antienvhecimento. **Revista Contexto & Saúde**, v. 19, n. 36, p. 107-113, jan./jun. 2019.

SILVA, T. M.; LOPES, L. L. B. T. Caracterização físico-química de uma formulação anti-idade contendo ácido glicólico, produzida em farmácias de manipulação de Sete Lagoas- MG. **Revista Brasileira de Ciências da Vida**, v. 5, n. 5, dezembro. 2017.

SILVA JUNIOR, J. O. C., *et al.* Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, supl. p. 671-677, dezembro. 2006.

SIMÕES, C. M. O., *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. 1102 p.

SIMÕES, C. M. O., *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento.** Porto Alegre: Editora Artmed, 2017. 486 p.

SIMÕES, R. H. **Desenvolvimento de extrato hidrossolúvel de *Bertholletia excelsa* H. B. K. (Castanha-do-Brasil) condensado.** 2014. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos, área de concentração de Tecnologia de Frutos e Produtos Vegetais) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SINDHURA, D. K. S.; JAIN, V. Challenges in formulating herbal cosmetics. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, v. 10, n. 6, p. 47-53, nov./dec. 2018.

SINGH, U.; BARIK, A.; PRIYADARSINI, K. I. Reactions of hydroxyl radical with bergenin, a natural poly phenol studied by pulse radiolysis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 16, p. 6008-6014, august. 2009.

SMAOUI, S., *et al.* Cosmetic emulsion from virgin olive oil: formulation and bio-physical evaluation. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 40, p. 9664-9671, may. 2012.

SOARES, L. A. L. **Padronização de extrato aquoso e desenvolvimento de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. - Euphorbiaceae (Quebra-Pedra).** 1997. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SOARES, L. A., *et al.* Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) empregando planejamento fatorial. *Caderno de Farmácia*, v. 14, n. 1/2, p. 21-25, jan./dez. 1998.

SOARES, L.A.L. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek – Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final.** 2002. 285f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SOUSA, C. M. de M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím. Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, abril. 2007.

SOUZA, C. R. F. **Estudo comparativo da população de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos *spray-dryer* e leito de jorro.** 2003. 208f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SOUZA, C. R. F., *et al.* Processing of *Rosmarinus officinalis* linne extract on spray and spouted bed dryers. *Braz. J. Chem. Eng.*, v. 25, n. 1, p. 59-69, março. 2008.

SOUZA, C. R. F., *et al.* Antioxidant activity and physical-chemical properties of spray and spouted bed dried extracts of *Bauhinia forficata*. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v. 45, p.209-218. 2009.

SOUZA, C. R. F., *et al.* Influência do processo de secagem e condição de armazenamento de extratos secos de *Bauhinia forficata* e *Passiflora alata* sobre seu perfil de dissolução. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 1, p. 67-75, jan./mar. 2015.

SOUZA, M. H.; MAGLIANO, M. M.; CAMARGOS, J. A. A. **Madeiras Tropicais Brasileiras**. Brasília: 1997. 152 p.

SOUZA, M. M., *et al.* Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 2, p. 192-200. 2009.

SOUZA, T. P.; LIONZO, M. I. Z.; PETROVICK, P. R. Avaliação da redução da carga microbiana de droga vegetal através do processamento tecnológico: decocção e secagem por aspersão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 94-98, jan/mar. 2006.

SOUZA, V. B.; FERREIRA, J. R. N. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n.3, p. 217-222, agosto. 2010.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. 2. ed. East Lansing: Editora Freeman Press, 1996. 428 p.

SUÑER-CARBÓ, J., *et al.* Biopharmaceutical development of a Bifonazole multiple emulsion for enhanced epidermal delivery. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 2, p. 1-21, february. 2019.

TABILE, P. M., *et al.* Características clínicas, prevalência e diagnóstico de vulvovaginites em ambulatório do interior do Rio Grande do Sul. **J. Health Biol Sci.**, v. 4, n. 3, p. 160-165. 2016.

TACHEDJIAN, G., *et al.* The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 9-10, p. 782-792, nov./dec. 2017.

TACON, L. A. **Estudo da extração e secagem por spray dryer das cascas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. Humiriaceae**. 2012. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

TERRA JUNIOR, O. N.; MALDONADO, J. V.; ARNOBIO A. Estudo do desempenho comercial dos insumos farmacêuticos vegetais sob a ótica do Comércio Exterior. **Revista Fitos**, v. 9, n. 3, p. 161-252, jul./set. 2015.

THOMAS, E.; ATKINSON, R.; KETTLE, C. Fine-scale processes shape ecosystem service provision by na Amazonian hyperdominant tree species. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, 11690, August. 2018.

TOLEDO, A. C. O., *et al.* Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1, p. 7-13, jan./dez. 2003.

TONG, H. H. Y., *et al.* Anti-hygroscopic effect of dextrans in herbal formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 99-105, november. 2008.

ULRIKE, B. B., *et al.* Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 180-189, may. 2013.

VALFRÉ, H. Fitocosmética. **Cosmet. Toiletr.**, v. 2, p. 9-14, 1990.

VASCONCELOS, E. A. F., *et al.* Influência do processo extrativo, solvente e tamanho da partícula do material vegetal no teor de sólidos totais da solução extrativa da *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Fitos**, v. 1, n. 1, p. 74-79, junho. 2005.

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

VEHRING, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 5, p. 999-1022, may. 2008.

VELIOGLU, Y. S., *et al.* Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, august. 1998.

VIANNA-FILHO, R. P.; PETKOWICZ, C. L. O.; SILVEIRA, J. L. M. Rheological characterization of O/W emulsions incorporated with neutral and charged polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 266-272, march. 2013.

VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M. **Tratado de tecnologia farmacêutica**. 3ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1982. p. 170.

WADT, L. H. O.; KAINER, K. A.; GOMES-SILVA, D. A. P. Population structure and nut yield of a *Bertholletia excelsa* stand in Southwestern Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 211, p. 371-384, june. 2005.

WEISBERG, E., *et al.* Endometrial and vaginal effects of low-dose estradiol delivered by vaginal ring or vaginal tablet. **Journal Climacteric**, v. 8, n. 1, p. 83-93, june. 2005.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidante activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8896-8907. 2007.

YALCIN, H.; TOKER, O. S.; DOGAN, M. Effect of oil type and fatty acid composition on dynamic and steady shear rheology of vegetable oils. **Journal of Oleo Science**, v. 61, n. 4, p. 181-187, april. 2012.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1573-1580, december. 2009.

YANG, M., *et al.* Prevalence of maternal group B *streptococcus* colonization and vertical transmission in low-risk women in a single institute. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 75, n. 1, p. 25-28, january. 2012.

YE, Y-P.; SUN, H-X.; PAN, Y-J. Bergenin monohydrate from the rhizomae of *Astible chinesis*. **Acta Crystallographica**, v. 60, p. 397-398. 2004.

YOUNG, B., *et al.* **Histologia Funcional: Texto e Atlas em cores**. 5 ed. Rio de janeiro: Elsevier, 2007. 436 p.

YU, W., *et al.* Quantitation of bergenin in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 1-2, p. 33-36, january. 2009.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, jan./fev. 2001.

ZUBAIR, M. F., *et al.* Chemical and biological evaluations of potent antiseptic cosmetic products obtained from Momordica charantia seed oil. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 9, p. 35-41, september. 2018.