



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**MICROESFERAS CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE
Cecropia glaziovii Snethl PARA O TRATAMENTO DA
HIPERTENSÃO ARTERIAL**

TALITHA CALDAS DOS SANTOS

Florianópolis
2012

Talitha Caldas dos Santos

**MICROESFERAS CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE
Cecropia glaziovii Snethl PARA O TRATAMENTO DA
HIPERTENSÃO ARTERIAL**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia.
Orientador: Prof. Dra. Angela
Machado de Campos

Florianópolis
2012

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Talitha Caldas dos

Microesferas contendo extrato padronizado de *Cecropia glaziovii* Snethl para o tratamento da hipertensão arterial [dissertação] / Talitha Caldas dos Santos ; orientador, Angela Machado De Campos - Florianópolis, SC, 2012.
139 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Sistema de liberação de fármacos. 3. *Cecropia glaziovii* Snethl. 4. Metodologia de superfície de resposta. 5. Atividade vasorelaxante. I. De Campos, Angela Machado. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Talitha Caldas dos Santos

**MICROESFERAS CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE
Cecropia glaziovii Snethl PARA O TRATAMENTO DA
HIPERTENSÃO ARTERIAL**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Farmácia.

Local, 13 de Abril de 2012.

Prof.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. João Carlos Palazzo de Mello, Dr.
Universidade Estadual do Paraná

Prof.^a Hellen karine Stulzer, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Flavio Henrique Reginatto, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado à Angela Machado de Campos pelo carinho e confiança.

AGRADECIMENTOS

À Deus agradeço pela vida e pela oportunidade de viver sempre novos desafios.

À minha grande família, pai, mãe, Elba e Caroline, pelos nossos momentos compartilhando nossas vidas e nossos sonhos. Obrigada pelo silêncio, quando eu reclamava e, obrigado também pelas suas palavras de estímulo quando eu me calava.

À Virginia Yunes, minha primeira orientadora, que pela persistência e confiança me ajudou a chegar aqui e a viver essa grande experiência que foi o mestrado, obrigada por fazer parte da minha história!

À Angela, orientadora querida e muito dedicada, obrigada pela paciência e por compartilhar comigo uma etapa tão importante na minha vida!

Quero também agradecer a professora Diva Sonaglio pela disponibilidade e dedicação contribuindo com suas ideias e sugestões, sua participação foi essencial para o desenvolvimento e conclusão do trabalho.

Agradeço a Professora Beth pelo trabalho em colaboração e pela contribuição nos estudos farmacológicos.

Às minhas companheiras de iniciação científica, Mariana Battisti e Kiuanne Lobo, que me acompanharam durante todo o desenvolvimento do trabalho com muita disposição e dedicação, obrigada pela fidelidade e por se comprometerem desde o início me dando força a cada desafio. Ao meu fiel amigo Cristian pela amizade, companheirismo e super paciência, obrigada por estar presente em todos os momentos sempre me dando apoio e incentivo.

Aos colegas do laboratório obrigada pelos “momentos cafezinho” onde nos divertimos muito e compartilhamos nossas histórias. E aos colegas do laboratório de Farmacognosia, Controle de Qualidade e Central Analítica, obrigada pelo carinho, atenção e pelas partilhas de conhecimento.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-if)/CAPES pela bolsa de estudo.

RESUMO

Cecropia glaziovii Snethl, distribuída no sul e no sudeste do Brasil, vem sendo amplamente utilizada pela população principalmente por sua atividade cardiovascular. Recentemente, o extrato desta planta, desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, apresentou capacidade vasodilatadora *in vitro* satisfatória. O presente trabalho mostra a otimização deste extrato em relação ao conteúdo de ácido clorogênico (ACG) e ácido cafeico (ACF), associados a esta atividade, e a sua incorporação em sistema microestruturado, visando a obtenção de um medicamento de liberação controlada de administração oral para o tratamento da hipertensão arterial. O extrato seco otimizado (ESO) por análise de metodologia de superfície de resposta, apresentou condições ótimas de extração concomitante de ACG e ACF com 18 % de droga, etanol (27 %, V/V) durante 3 dias de maceração. O efeito do ESO no teste de reatividade em aorta de ratos mostrou ser semelhante à ação do controle positivo acetilcolina, considerado um resultado excelente por tratar-se de um extrato bruto sem nenhuma purificação. O extrato padronizado foi encapsulado em micropartículas pela técnica de dupla emulsão a/o/a, usando como matriz polimérica o ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA). Um planejamento experimental avaliando os efeitos da quantidade de polímero, quantidade de extrato, volume da fase de extração e tipo de polímero resultou na formação de partículas com tamanhos entre 91 a 220 μm com distribuição normal e valores de eficiência de encapsulação (EE) abaixo de 14 %. Em um segundo planejamento experimental, o balanço da pressão osmótica pela adição de concentrações crescentes de NaCl na fase aquosa externa da dupla emulsão influenciou significativamente as características das micropartículas permitindo um aumento na EE porém com modificação no comportamento de liberação das micropartículas.

Palavras-chave: Sistema de liberação de fármacos. Extrato padronizado. *Cecropia glaziovii* Snethl. Metodologia de superfície de resposta. Atividade vasorelaxante.

ABSTRACT

Cecropia glaziovii Snethl, widely distributed in southern and south-eastern Brazil, has been extensively used in Brazilian folk medicine mainly due to its cardiovascular activities. Recently, the extract of this plant, developed by our research group, showed satisfactory vasodilation capacity *in vitro*. This study shows the standardization of the crude extract maximizing ACG and ACF extraction associated with its biological activity evaluation and its encapsulation in a microparticulate system in order to obtain an oral drug delivery system for the treatment of hypertension. The Response Surface Methodology allowed the determination of an optimized set of extraction conditions with 18 % of drug, ethanol (27 %, V/V) during 3 days of maceration in order to produce the standardized dry extract (SDE). The effect of this extract in the vasorelaxant activity on rat aorta rings pre-contracted with phenylephrine showed to be similar to the acetylcholine (control), which is considered an excellent result for a crude extract without purification. Thereafter, the extract was used in the preparation and characterization of microparticles using the technique of double emulsion W/O/W using acid poly(lactic-co-glycolic) (PLGA) as polymer matrix. An experimental design evaluating the factors amount of polymer, amount of extract, volume of extraction phase and polymer type showed particle formation with size ranging from 91 to 220 μm , narrow size distribution and efficiency encapsulation (EE) values below 14 %. In a second experimental design the osmotic pressure balance by the addition of increasing concentrations of NaCl in the external aqueous phase significantly influenced all microparticle characteristics allowing increase in the EE but with changes in the release behaviour of the microparticles.

Keywords: Drug delivery system. Standardized extract. *Cecropia glaziovii* Snethl. Response surface methodology. Vasorelaxant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas dos ácidos clorogênico e cafeico	32
Figura 2: Esquema dos fatores que influenciam as propriedades MCP	34
Figura 3: Principais fatores que limitam a EE na dupla emulsão	35
Figura 4: Estrutura química da unidade monomérica do PLGA	37
Figura 5: Cromatograma da solução extrativa.....	50
Figura 6: Gráfico de interação dos fatores concentração de etanol e de droga das soluções extrativas para a resposta resíduo seco.....	53
Figura 7: Gráfico de interação entre os fatores concentração de etanol e de droga; tempo e concentração etanol na quantificação do ACG.....	54
Figura 8: Gráfico de interação entre os fatores concentração de etanol e de droga; concentração de droga e tempo na quantificação do ACF	54
Figura 9: Representação gráfica da desejabilidade das condições ótimas de extração para o ACG e o ACF.....	56
Figura 10: Relaxamento vascular induzido pelos ESO de <i>C.glaziovii</i> ...	57
Figura 11: Relaxation induced by <i>C.glaziovii</i> SDE.....	71
Figura 12: SEM photographs of <i>C. glaziovii</i> SDE-loaded PLGA PLGA503 and PLGA750S	74
Figura 13: Influence of amount of polymer and SDE on the MCP size	76
Figura 14: SEM pictures of surfaces of microparticles prepared under different conditions	81
Figura 15: Influence of the primary emulsion stirring speed and concentration of NaCl on the microparticle size, span and EE	81
Figura 16: Release profile from <i>C. glaziovii</i> SDE-based microparticles	83
Figura 17: Morphology of extract-loaded microparticles before and after exposure to dissolution medium.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proporção de brasileiros diagnosticados com HA.....	29
Tabela 2: Planejamento experimental extração de <i>C. glaziovii</i>	44
Tabela 3: Programação da fase móvel para CLAE.	46
Tabela 4: Caracterização das folhas moídas de <i>C. glaziovii</i>	49
Tabela 5: Dados de linearidade dos marcadores químicos por CLAE..	50
Tabela 6: Concentração do RS e dos marcadores químicos.....	51
Tabela 7: Termos do modelo significativo, valores dos coeficientes de regressão e ANOVA para as respostas RS, ACG e ACF.....	52
Tabela 8: D-optimal coordinate exchange RSM summary – Design 1.	68
Tabela 9: IV-optimal coordinate exchange RSM summary – Design 2	68
Tabela 10: Particle size, span and EE of <i>C. glaziovii</i> SDE-loaded PLGA microparticles (Design 1).....	73
Tabela 11: Analysis of variance for the responses in Design 1.....	75
Tabela 12: Particle size, span, EE and loading capacity of <i>C. glaziovii</i> SDE-loaded PLGA microparticles (Design 2).....	79
Tabela 13: Analysis of variance for the responses in Design 2.....	80
Tabela 14: Values for the EE, loading capacity and size of the microparticles prepared with different concentration of NaCl.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACF	Ácido cafeico
ACG	Ácido clorogênico
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
CFA	Caffeic acid
CGA	Chlorogenic acid
CH ₃ COOH	Ácido acético
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
DCM	Dichloromethane/diclorometano
Dpr	Desvio padrão relativo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Encapsulation efficiency/eficiência de encapsulação
ESO	Extrato seco otimizado
FI	Interação entre fatores
HA	Hipertensão arterial
HPLC	High-performance liquid chromatography
HSV	Vírus herpes simples
i.v.	Inherent viscosity
ICH	International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use
m	Massa
mBar	Unidade de pressão atmosférica em milésimos de bar
mM	Milimolar
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
p.o.	Oral administration
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Poli (ácido lático)
PLGA	ácido poli (lático-co-glicólico)
PLLA	Poli (ácido L-lático)
PVA	Poly (vinyl alcohol)
r	Coefficiente de correlação
rpm	Rotação por minuto

RS	Resíduo seco
RSD	Response Surface Design
RSM	Experimental design methodology
SBH	Sociedade Brasileira de Hipertensão
SDE	Standardized extract
SEM	Scanning electron microscopy
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
V	Volume
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	23
1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
2.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	28
2.2. <i>CECROPIA GLAZIOVI</i> SNETHL	30
2.3. COMPOSTOS FENÓLICOS	31
2.4. SISTEMAS MICROPARTICULADOS.....	32
2.5. POLI (LÁTICO-CO-GLICÓLICO) - PLGA	36
CAPÍTULO 1.....	39
1. INTRODUÇÃO	41
2. METODOLOGIA	42
2.1. PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	42
2.1.1. Aquisição da amostra.....	42
2.1.2. Moagem e acondicionamento do material vegetal.....	42
2.1.3. Perda por dessecação (BRASIL, 2010)	42
2.1.4. Determinação de cinzas totais (BRASIL, 2010).....	42
2.1.5. Determinação do teor de extrativos	43
2.1.6. Determinação da granulometria (BRASIL, 2010)	43
2.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS.....	44
2.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO	45
2.4. CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS.....	45
2.4.1. Quantificação dos marcadores químicos	45
2.4.2. pH.....	46
2.4.3. Determinação do resíduo seco (RS)	46
2.5. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO OTIMIZADO	47
2.5.1. Liofilização das soluções extrativas	47
2.5.2. Avaliação da capacidade vasorelaxante <i>in vitro</i> do extrato	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	48
3.2. AVALIAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS	49
3.2.1. Teor dos marcadores químicos	49
3.2.2. pH.....	53
3.2.3. Resíduo seco (RS).....	53
3.2.4. Marcadores químicos (ACG e ACF).....	53
3.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO	55

3.4. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE VASORELAXANTE <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO DE <i>C. GLAZIOVI</i> EM ANEL DE AORTA DE RATOS	56
CAPÍTULO 2.....	59
1. INTRODUCTION.....	63
2. MATERIALS AND METHODS	65
2.1. MATERIALS.....	65
2.2. PREPARATION OF STANDARDIZED EXTRACT.....	65
2.3. VASCULAR REACTIVITY <i>IN VITRO</i> IN RAT THORACIC AORTA.....	65
2.4. MICROPARTICLE PREPARATION.....	67
2.5. EXPERIMENTAL DESIGN.....	68
2.6. DETERMINATION OF MICROPARTICLE SIZE, PARTICLE SIZE DISTRIBUTION AND SURFACE SHAPE.....	68
2.7. DETERMINATION OF THE ENCAPSULATION EFFICIENCY AND LOADING CAPACITY	69
2.8. <i>IN VITRO</i> DRUG RELEASE STUDIES	69
3. RESULTS AND DISCUSSION	70
3.1. VASCULAR RELAXATION INDUCED BY THE SDE OF <i>C. GLAZIOVI</i>	70
3.2. PREPARATION OF PLGA MICROPARTICLES: DESIGN 1	71
3.3. PARTICLE SIZE AND SIZE DISTRIBUTION	74
3.4. ENCAPSULATION EFFICIENCY (EE).....	76
3.5. PLGA MICROPARTICLE DEVELOPMENT: DESIGN 2.....	77
3.6. <i>IN VITRO</i> DRUG RELEASE BEHAVIOR.....	82
DISCUSSÃO GERAL.....	87
CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS	95
APÊNDICES.....	113

INTRODUÇÃO

Introdução geral e objetivos – Revisão da literatura

1. INTRODUÇÃO

O território brasileiro abrange entre 15 e 20 % da biodiversidade do planeta, sendo detentor da flora de maior diversidade do mundo, cerca de 55 mil espécies descritas (GANEM, 2010). A maioria destas plantas nativas é usada pela população como fonte de alimento, matéria-prima para construção, na cura de enfermidades ou como aromatizante. O conhecimento referente ao uso destas plantas nativas pelas populações locais e regionais atravessou séculos, passando de uma geração à outra, contribuindo na cura e prevenção de muitas enfermidades. A conciliação da pesquisa científica e do conhecimento tradicional é uma grande oportunidade a ser explorada, pois estes recursos biológicos e genéticos apresentam grande potencial na descoberta de novas substâncias biologicamente ativas, servindo como fonte de novos fármacos (VEIGA JUNIOR, PINTO; MACIEL, 2005; BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Neste contexto, na tentativa de integrar a atenção à saúde ao conhecimento popular, o decreto nº 5.813 (2006) aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com o objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. Dentre as diretrizes propostas estão a promoção à pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira. Com a valorização do produto de origem natural e a busca por alternativas mais seguras e menos danosas, a fitoterapia vem sendo usada como uma prática mais constante (FELTRIN; CHORILLI, 2010).

Cecropia glaziovii Snethl é uma planta que vem sendo utilizada na medicina tradicional na forma de infusão como anti-hipertensivo, cardiotônico, anti-inflamatório, expectorante e antiasmático, atividades já comprovadas por diversos estudos científicos (ROCHA, LAPA; DE LIMA, 2002; LIMA-LANDMAN et al., 2007; TANAE et al., 2007; STANGE et al., 2009). Estas propriedades farmacológicas foram relacionadas aos metabólitos secundários encontrados principalmente em suas folhas: flavonoides, procianidinas, catequinas e glicosídeos (LIMA-LANDMAN et al., 2007; TANAE et al., 2007).

O emprego de novas tecnologias e inovações para garantir o efeito terapêutico das plantas medicinais na fabricação de medicamentos fitoterápicos é uma tendência atual (FELTRIN; CHORILLI, 2010). A encapsulação de substâncias têm se mostrado um recurso eficiente para aumentar a biodisponibilidade de fármacos e alimentos funcionais. A microencapsulação

pode ser eficaz para resolver problemas relacionados às limitações tecnológicas de extratos vegetais secos e proteger contra evaporação, oxidação ou reação dos compostos ativos (ZELLER, SALEEB;LUDESCHER, 1998; GOUIN, 2004; ONWULATA, 2012; SU et al., 2008; BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2011;). Um sistema de liberação pode proporcionar melhor biodisponibilidade do extrato, pois as micropartículas apresentam boa estabilidade, capacidade industrial e possibilita ajustes para alcançar o perfil de liberação adequado.

Neste contexto, a finalidade do trabalho é aliar o potencial terapêutico do extrato de *C. glaziovi* a novas estratégias tecnológicas com o desenvolvimento de um sistema fitoterápico microparticulado. Uma vez tendo obtido resultados positivos quanto ao controle da liberação dos constituintes ativos da *C. glaziovi* por meio da microencapsulação e a demonstração do interesse destes sistemas no tratamento da hipertensão arterial, espera-se abrir uma nova perspectiva para o tratamento no que diz respeito à melhoria da qualidade de vida dos pacientes tratados, proporcionada pela utilização de um produto de administração oral de liberação prolongada. Além das vantagens biofarmacêuticas, esses sistemas terapêuticos constituem uma inovação tecnológica em nível mundial, considerando que as investigações científicas na literatura sobre a associação de extratos vegetais totais e sistemas microparticulados ainda são limitadas.

O objetivo principal do trabalho foi propor o desenvolvimento e avaliação do sistema fitoterápico microestruturado de administração oral contendo extrato padronizado de *C. glaziovi* Snethl (embaúba vermelha) para o tratamento de hipertensão arterial. Os objetivos específicos foram:

- Otimização e caracterização do extrato seco visando a maximização da extração dos marcadores químicos, ácido clorogênico e ácido cafeico;
- avaliação do efeito vasorelaxante no ensaio *in vitro* de reatividade vascular em anéis de aorta torácica isolada de ratos;
- delineamento e caracterização de micropartículas contendo o extrato seco otimizado de *Cecropia glaziovi* utilizando métodos quimiométricos;
- avaliação do perfil de liberação dos marcadores químicos a partir das micropartículas.

Desta forma, a dissertação foi organizada em dois capítulos:

Capítulo 1: Estudo de otimização para obtenção do extrato padronizado de *Cecropia glaziovi* Snethl.

Capítulo 2: Desenvolvimento e caracterização de sistema microparticulado contendo extrato padronizado de *Cecropia glaziovi* Snethl.

Todos os estudos envolveram aplicação de um planejamento experimental associado à análise de superfície de resposta. O objetivo foi conduzir experimentos que fornecessem o máximo de informações dos resultados obtidos a partir das variáveis usadas para cada tipo de ensaio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL

Doenças crônicas não-transmissíveis são problemas globais de saúde e uma ameaça para o desenvolvimento da saúde humana, estando entre as maiores causadoras de morte no mundo (WHO, 1998). Dentre essas doenças encontra-se a hipertensão arterial (HA), considerada uma condição prevalente que pode estar associada a outros fatores de risco para doenças cardiovasculares (BRASIL, 2006; TRÊS et al., 2009).

A hipertensão arterial sistêmica é conceituada como uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais. O critério de diagnóstico da HA considera valores de pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e diastólica ≥ 90 mmHg em medidas de consultório (SBH, 2010). A hipertensão representa um dos grandes problemas de saúde pública em todo o mundo devido à elevada prevalência e seu forte impacto na morbimortalidade da população adulta (NASCIMENTO et al., 2011).

Estimativas de fatores de risco do ano de 2010 fornecidos pelo Ministério da Saúde mostram que a proporção de brasileiros diagnosticados com hipertensão arterial aumentou nos últimos cinco anos. De acordo com a pesquisa, a incidência é maior em mulheres comparado aos homens, 25,5 % e 20,7 %, respectivamente, além do fator idade, atingindo mais de 50% das pessoas com mais de 55 anos. A proporção de brasileiros diagnosticados com hipertensão arterial por capital (tabela 1) mostra que a região Sul apresenta um alto índice, considerando Porto Alegre (25,5 %) com maior prevalência seguida de Curitiba (23 %) e Florianópolis (20,8 %) (BRASIL, 2011).

Tabela 1: Proporção de brasileiros diagnosticados com HA por capital

Capital	%_diagnóstico de HA	IC 95%
Aracaju	22	(19,2-24,8)
Belo Horizonte	25,5	(22,9-28,1)
Boa Vista	18,8	(13,9-23,6)
Campo Grande	23,4	(21,0-25,9)
Cuiabá	22	(19,5-24,5)
Curitiba	23	(20,7-25,4)
Florianópolis	20,8	(18,6-23,0)
Fortaleza	21	(18,0-24,1)
Goiânia	21,5	(19,0-24,1)
João Pessoa	25,4	(22,0-28,8)
Macapá	19,4	(16,1-22,7)
Maceió	24,3	(20,9-27,7)
Manaus	18,1	(15,4-20,7)
Natal	22,1	(19,3-24,8)
Porto Alegre	25,5	(23,0-28,1)
Porto Velho	18,3	(15,7-20,9)
Recife	24,9	(22,3-27,5)
Rio Branco	23	(18,9-27,1)
Rio de Janeiro	29,2	(26,2-32,2)
Salvador	21,2	(18,4-24,0)
São Luís	18	(15,5-20,5)
São Paulo	22,9	(20,6-25,3)
Teresina	21	(18,1-23,9)
Vitória	24,5	(21,9-27,1)
Distrito Federal	23,1	(12,9-33,2)

Fonte: MS/SVS/CGDANT – VIGITEL (2010)

Complicações clínicas graves podem ser geradas pela HA quando não tratada adequadamente e determinam incapacidade temporária ou mesmo permanente, ocasionando altos custos para o indivíduo e para a sociedade. O controle em alguns casos pode ser conseguido com medidas gerais acompanhadas ou não do uso de medicamentos. A prevenção primária engloba alternativas não medicamentosas como combater sedentarismo e tabagismo e alterações no estilo de vida mantendo uma alimentação mais saudável, redução do consumo de sódio e bebidas alcoólicas (CUNHA et al., 2006; SBH, 2010).

O tratamento com medicamentos é baseado nos fatores de risco do paciente e não apenas no nível da pressão arterial. Apesar das modificações no estilo de vida refletir no retardo do desenvolvimento da doença, o tratamento precoce com medicação pode proteger órgãos-alvo, reduzir o impacto causado pela pressão arterial e pela presença dos fatores de risco na progressão de processo aterosclerótico (SBH, 2010).

Outra alternativa de tratamento usada pela população são as plantas medicinais, consumidas em geral com pouca ou nenhuma comprovação científica de suas propriedades farmacológicas (VEIGA JUNIOR, PINTO; MACIEL, 2005). A utilização de plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades. Mesmo apresentando toda essa relevância, o uso popular não é suficiente para validar as plantas medicinais como tratamento seguro e eficaz. Neste caso, as evidências devem ser fundamentadas e experimentalmente analisadas (LAPA et al., 2004).

2.2. *Cecropia glaziovii* SNETHL

Dentre a diversidade de plantas usadas popularmente para tratamento da hipertensão, este trabalho focará a atividade da *Cecropia glaziovii* Snethl, que pertence à família *Urticaceae* Juss, cujas espécies utilizadas para fins medicinais são distribuídas em seis gêneros, sendo *Cecropia* Loefl. o mais importante. Este gênero é conhecido popularmente por embaúba e é formado por 75 espécies tropicais encontradas ao redor de florestas densas, lagos e áreas devastadas (BERG; FRANCO ROSSELLI, 2005).

Cecropia glaziovii é composta por diferentes substâncias pertencentes ao seu metabolismo secundário, destacando-se os compostos polifenólicos, como ácidos fenólicos, flavonóides, catequinas e procianidinas (DELARCINA et al., 2007; LIMA-LANDMAN et al., 2007; TANAE et al., 2007; COSTA et al., 2011). A presença de ácido cafeico, composto ainda não relatado na bibliografia para esta espécie, foi confirmada em condições específicas de

extração por maceração usando uma concentração etanólica de 20 % (V/V) e relação droga:solvente de 5 % (m/V) (AREND et al., 2011). Alguns estudos farmacológicos desenvolvidos com as soluções extrativas desta planta demonstraram atividade contra sintomas da asma (DELARCINA et al., 2007), efeitos anti-hipertensivo (LIMA-LANDMAN et al., 2007), antidepressivo (ROCHA et al., 2007), antiácido, antiúlcera (SOUCCAR et al., 2008), ansiolítico (ROCHA, LAPA; DE LIMA, 2002) e anti-herpético contra HSV-1 e HSV-2 (SILVA et al., 2010).

2.3. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os polifenóis são representados por três principais classes, ácidos fenólicos, flavonóides e menos comuns estilbenos e lignanas (TAPIERO et al., 2002). Os ácidos fenólicos encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal e apresentam em sua estrutura química um ou mais anéis aromáticos com pelo menos um grupo hidroxila. A classificação destes compostos está relacionada com tipo de esqueleto principal, que está dividido em dois grupos: ácidos benzoicos com sete átomos de carbono (C6-C1) e ácidos cinâmicos com nove átomos de carbono (C6-C3) (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004).

A principal classe dos compostos fenólicos são os ácidos hidroxicinâmicos (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001) e apresentam-se, na maioria das vezes, na forma esterificada (ésteres alifáticos e ésteres do ácido quínico), amidificada ou combinados a açúcares, sendo que raramente são encontrados na forma livre (BRUNETON, 2001). Com relação à estabilidade, estes compostos tendem a sofrer oxidação, principalmente em meio alcalino. Os ésteres cinâmicos podem isomerizar independentemente do pH da solução, produzindo assim isômeros de posição (BRUNETON, 2001). O ácido cafeico é o representante principal dos ácidos hidroxicinâmicos e ocorre normalmente na forma de um éster formado com ácido quínico chamado de ácido clorogênico (figura 1) (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001; TAPIERO et al., 2002).

Além de possuírem propriedades específicas, os ácidos fenólicos apresentam uma atividade sequestradora de radicais livres que está relacionado à capacidade de doação de átomos de hidrogênio (MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011) que, de uma maneira geral, podem contribuir para prevenção de diabetes mellitus tipo 2 (PAYNTER et al., 2006; DAWIDOWICZ; TYPEK, 2010) doenças cardiovasculares e outras condições associadas com inflamação (PARKAR; STEVENSON; SKINNER, 2008).

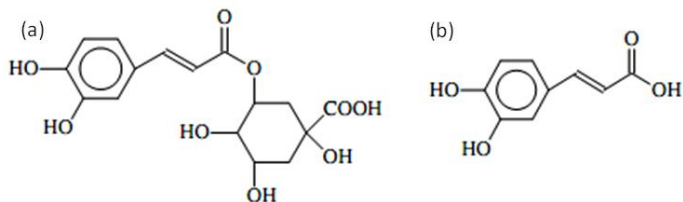


Figura 1: Estruturas químicas dos ácidos clorogênico (a) e cafeico (b) (Fig. retirada MARINOVA; YANISHLIEVA, 2009)

Estudos *in vivo* e/ou *in vitro* têm mostrado a relação da atividade antioxidante dos ácidos clorogênico e cafeico no mecanismo cardioprotetor, que parece acontecer através da modulação da peroxidação lipídica (KUMARAN; PRINCE, 2010), efeito hipotensor (SUZUKI et al., 2002), inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LARANJINHA; ALMEIDA; MADEIRA, 1994; NARDINI, 1995) e inibição da formação de compostos mutagênicos e carcinogênicos N-nitroso, por serem inibidores da reação N-nitrosação *in vitro* (KONO et al., 1995) podendo também proteger contra danos no DNA (KASAI et al., 2000; SHIBATA et al., 1999). No sistema cardiovascular, por exemplo, o relaxamento do vaso dependente do endotélio pode ser comprometido na presença de espécies reativas de oxigênio, uma vez que sua produção reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico sobre a parede do vaso (TANIYAMA; GRIENGLING, 2003; CAMPANA; BRAGA; CORTES, 2009). Desta forma, os polifenóis podem envolver efeitos químicos e biológicos relacionados principalmente às suas propriedades de ação sequestradora de radicais livres, promovendo assim um efeito protetor (STOCLET et al., 2004; CAMPANA; BRAGA; CORTES, 2009).

2.4. SISTEMAS MICROPARTICULADOS

O desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos de liberação modificada garante a vetorização dos fármacos representando uma alternativa na melhora da qualidade dos tratamentos com medicamento (CAVALCANTI; BUTTOW, 1999; ROSINA, BARONI; CAVALCANTI, 2004). Estas formas farmacêuticas podem determinar um perfil de liberação específico e trazer benefícios como a redução do número de doses diárias do medicamento, sendo um meio mais conveniente e de melhor aceitação pelo paciente. Entre os sistemas capazes de controlar a liberação de um fármaco destacam-se as

micropartículas, que podem ser administradas por diferentes vias como parenteral, pulmonar, oral ou nasal (BERKLAND et al., 2002; FREIBERG; ZHU, 2004; FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005; LI, ROUAUD; PONCELET, 2008). Dentre estas vias, a administração oral de fármacos tem sido amplamente utilizada tanto para formulações convencionais como para novos dispositivos de liberação modificada, direcionados a tratamentos sistêmicos e/ou locais (CAVALCANTI; BUTTOW, 1999). A preferência pela via oral é devido a sua natureza não invasiva, sendo considerada a mais conveniente e de satisfatória aceitação pelo paciente (ANSEL, POPOVICH; ALLEN, 2007; SANT et al., 2011).

Micropartículas são sistemas micrométricos (1-1000 μm) capazes de promover uma liberação sustentada, modificada ou controlada de um composto bioativo (FREITAS, MERKLE; GANDER, 2005). Podem ser classificadas de acordo com a sua constituição em microesferas, sistemas matriciais nos quais o fármaco se encontra uniformemente disperso e/ou dissolvido numa rede polimérica, e microcápsulas, sistemas reservatório constituídos por um núcleo rodeado por uma membrana ou revestimento. Dentre as vantagens destes sistemas multiparticulados em comparação aos sistemas unitários pode-se considerar a distribuição rápida e uniforme pelo trato gastrointestinal, uma menor variação na biodisponibilidade, um menor risco de toxicidade devido ao rompimento de um sistema unitário de ação prolongada, maior reprodutibilidade de dose, além da possibilidade de fracionamento e ajuste da dose (SILVA et al., 2003).

As vantagens mais específicas dos sistemas multiparticulados são (i) versatilidade da liberação que pode se adaptar às necessidades desejadas e até mesmo variação da taxa de liberação ao longo do tempo, (ii) liberação precisa de baixas doses de fármacos potentes, (iii) redução da concentração do fármaco em outros locais que não os órgãos ou tecidos alvo e (iiii) proteção dos compostos lábeis, antes e depois da administração, até exercerem a sua ação farmacológica (BERKLAND et al., 2002; SILVA et al., 2003).

As propriedades físicas das micropartículas variam de acordo com a natureza dos materiais, dos parâmetros utilizados no preparo e das condições de operação (IZUMIKAWA et al., 1991; O'DONNELL; MCGINITY, 1997; ANDRÉ-ABRANT, TAVERDET; JAY, 2001; LI, ROUAUD; PONCELET, 2008;). Os principais fatores que influenciam as propriedades das micropartículas estão destacados na figura abaixo.

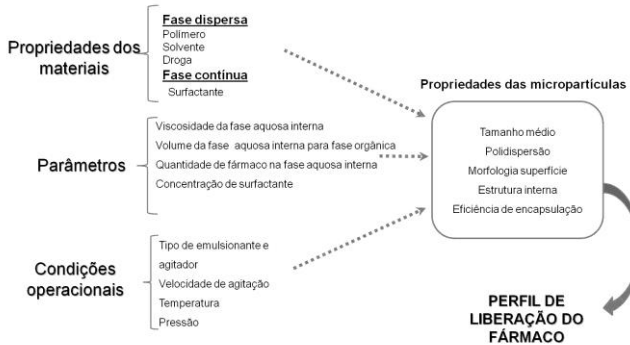


Figura 2: Esquema dos fatores que influenciam as propriedades das micropartículas (figura adaptada LI et al., 2008)

A técnica de microencapsulação adotada neste trabalho foi a dupla emulsão (a/o/a) seguida de evaporação/extração do solvente por ser a mais adequada para a encapsulação de substâncias hidrofílicas, que são majoritárias nos extratos. A dupla emulsão é um sistema complexo constituído de gotículas da fase aquosa interna dispersas dentro de gotículas maiores de fase orgânica que por sua vez são dispersas em uma fase aquosa externa (WANG; GUO, 2008; REGAN; MULVIHILL, 2009; O'REGAN; MULVIHILL, 2010).

As gotículas da fase aquosa interna, encapsuladas pela membrana polimérica podem ser vistas como uma câmara de armazenamento de substâncias hidrofílicas. Esta estrutura pode proteger o fármaco dissolvido na fase aquosa interna e tem mostrado um grande potencial para melhorar a biodisponibilidade oral de compostos de baixa permeabilidade (KOGA, TAKARADA; TAKADA, 2010; QI, WANG; ZHU, 2011).

O processo básico da dupla emulsão consiste em quatro passos: (i) primeira emulsão: a fase aquosa interna contendo o ativo é dispersa em uma solução orgânica contendo o polímero (a/o); (ii) re-emulsificação: a primeira emulsão é vertida sobre a fase aquosa externa contendo um tensoativo para formar a dupla emulsão a/o/a; (iii) solidificação: o solvente orgânico é removido por evaporação ou extração enquanto as micropartículas são formadas e (iv) coleta e secagem: as micropartículas são lavadas para retirada

do tensoativo e em seguida podem seguir para a etapa de secagem (MENG et al., 2003).

A dupla emulsão é considerada um sistema instável, no qual as propriedades das micropartículas não são facilmente controladas, podendo afetar principalmente a eficiência de encapsulação e o perfil de liberação (MENG et al., 2003; YE, KIM; PARK, 2010; QI, WANG; ZHU, 2011). O esquema apresentado na figura 3 aponta de maneira geral os principais interferentes que podem ocorrer durante o preparo das micropartículas utilizando método de dupla emulsão, bem como na operação de secagem e no meio de dissolução.

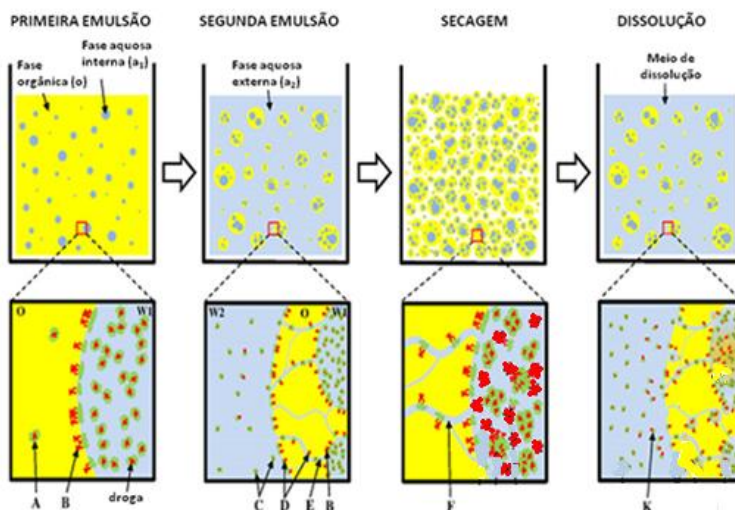


Figura 3: Principais fatores que limitam a eficiência de encapsulação do fármaco no método de dupla emulsão $a_1/o/a_2$. Figura modificada de Ye et al. (2010)

Na formação da primeira emulsão pode ocorrer uma insignificante partição do fármaco para dentro da fase orgânica (A) e depósito na interface durante a formação da emulsão a/o (B). Na segunda emulsão, há formação de canais que conectam as fases aquosas interna e externa devido ao efeito osmótico (E) e desta forma promove maior saída do fármaco por aumentar a área de superfície da interface óleo-água (C) e (D). Os canais de água tornam-se poros nas micropartículas após a secagem, com a saída da água (F). Normalmente micropartículas preparadas por dupla emulsão podem apresentar

uma ampla polidispersão assim como quantidades diferentes de fármaco em cada micropartícula. No teste de dissolução, a liberação inicial, na maior parte das vezes, está relacionada à liberação do fármaco (K) que está na superfície da partícula. Com o passar do tempo o mesmo é liberado a partir das micropartículas por difusão e/ou degradação da matriz polimérica (YE, KIM; PARK, 2010).

A análise de formação das micropartículas deve considerar respostas favoráveis que envolvem rendimentos, eficiência de encapsulação e reprodutibilidade do perfil de liberação. Neste sentido, torna-se importante otimizar os parâmetros de preparo das micropartículas, avaliando a influência dos fatores e as características de cada componente no intuito de garantir um resultado final dentro das características programadas.

2.5. POLI (LÁTICO-CO-GLICÓLICO) - PLGA

A escolha de um polímero para aplicações farmacêuticas deve obedecer a critérios como biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade, além de depender do tipo de liberação desejada, a qual é determinada pelas propriedades físicas do polímero (WITSCHI; DOELKER, 1998). Polímeros e copolímeros de ácido lático e ácido glicólico são comumente usados no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada devido a sua segurança, uma vez que podem degradar pela ocorrência de hidrólise dos seus constituintes na presença de umidade gerando subprodutos atóxicos (ácido lático, ácido glicólico, dióxido de carbono e água) (MOTTA; DUEK, 2006; LI, ROUAUD; PONCELET, 2008). O PLGA já é usado em sistemas de liberação de uso parenteral incluindo nano- e micropartículas e implantes, por ser um dos poucos polímeros sintéticos aprovados para uso clínico em humanos (GUSE et al., 2006; GITEAU et al., 2008; KLOSE et al., 2010).

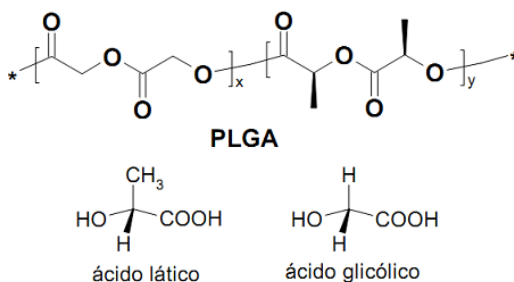


Figura 4: Estrutura química da unidade monomérica do PLGA e de seus produtos de decomposição, ácido láctico e ácido glicólico (ROSSANEZI, 2008)

A estrutura química do PLGA é mais suscetível à reação de hidrólise quando comparado ao PLA, pois a presença do ácido glicólico na estrutura química permite que haja maior ataque das moléculas de água. Situação contrária ocorre com PLLA, cuja cadeia polimérica é formada exclusivamente de ácido láctico (DIETER, 1998; MOTTA; DUEK, 2006). O copolímero PLGA apresenta características de degradação controlável por meio de seu peso molecular e modificação da relação ácido láctico:ácido glicólico. A cinética de liberação da substância ativa a partir de micropartículas de PLGA depende das propriedades do polímero, morfologia interna e distribuição do mesmo na partícula (EDLUND; ALBERTSSON, 2002; STEVANOVIC; USKOKOVIC, 2009; TRAN, BENOÎT; VENIER-JULIENNE, 2011).

CAPÍTULO 1

Estudo de otimização para obtenção do extrato padronizado de *Cecropia glaziovii* Snethl

1. INTRODUÇÃO

Para que as plantas medicinais possam ser utilizadas com segurança e eficácia pela população, são necessários estudos de padronização com a caracterização quali e quantitativa de seus constituintes químicos. No desenvolvimento de um extrato seco é necessário o conhecimento prévio da composição da matéria-prima vegetal para a escolha de parâmetros como método de extração, tipo e concentração do líquido extrator, relação droga solvente e método de secagem (SOUZA, 2007). Devido à composição complexa do material vegetal, a padronização do extrato seco por processos tecnológicos é um passo crucial na manutenção dos seus ativos (CHAN, 2003).

Em estudos recentes desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa foram obtidas soluções extrativas de *C. glaziovii* utilizando como métodos de extração a maceração e a decocção (AREND, 2010; AREND et al., 2011), métodos considerados de fácil execução e transposição de escala, além de economicamente viáveis para processos industriais. Os extratos obtidos por maceração apresentaram maior concentração de fenólicos totais do que aqueles obtidos por decocção. Os extratos obtidos por maceração com líquido extrator constituído de etanol a 20 % (V/V) e concentração de droga de 5 % (m/V) apresentaram ação na redução da glicemia em ratos hiperglicêmicos. Este resultado indica uma atividade anti-hiperglicêmica dos extratos obtidos ainda não relatados para esta espécie. Além disso, todos os extratos obtidos pelos dois métodos apresentaram atividade vasorelaxante no ensaio de reatividade vascular *in vitro* em aorta torácica isolada de ratos. O extrato macerado foi mais potente do que aquele obtido por decocção para causar relaxamento vascular (AREND, 2010).

O objetivo desta etapa do trabalho foi desenvolver um extrato de *Cecropia glaziovii* com concentração máxima dos ácidos clorogênico (ACG) e cafeico (ACF), utilizando para isto um planejamento experimental de superfície de resposta com repetição do ponto central e fatores independentes como concentração do etanol, concentração de droga e o tempo de maceração. As soluções extrativas obtidas foram caracterizadas quanto ao teor de resíduo seco, pH e teor de marcadores químicos e quanto a sua atividade vasorelaxante em ensaio de reatividade vascular em anéis de aorta torácica isolada de ratos.

2. METODOLOGIA

2.1. PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

2.1.1. Aquisição da amostra

O material vegetal de *Cecropia glaziovii* Snethl foi adquirido do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CPQBA, da Universidade de Campinas – UNICAMP sendo este constituído por folhas secas. Um exemplar encontra-se depositado no herbário do CPQBA sob o número 78.

2.1.2. Moagem e acondicionamento do material vegetal

As folhas secas foram submetidas à moagem em moinho de facas (MACMONT®) com malha de 3 mm. A planta moída foi acondicionada em sacos de papel pardo de duas camadas e armazenada em local arejado ao abrigo da luz e da umidade.

2.1.3. Perda por dessecação (BRASIL, 2010)

Cerca de 2 g da planta moída, exatamente pesados, foram transferidos para pesa filtro tarado, previamente dessecado a 105 °C por 30 minutos. Em seguida o pesa filtro contendo a amostra foi colocado em estufa a 105 °C por 2 horas. Após este tempo, o pesa filtro permaneceu em dessecador por 20 minutos para resfriamento, sendo, a seguir, pesado. O procedimento foi repetido por períodos de 30 minutos de secagem até peso constante. Os resultados expressos em percentual ponderal representam a média de três determinações.

2.1.4. Determinação de cinzas totais (BRASIL, 2010)

Cerca de 3 g da planta moída foi distribuída uniformemente em cadinho de sílica previamente calcinado e resfriado em dessecador. Em seguida, a amostra foi incinerada em mufla aumentando gradativamente a temperatura até 450 °C durante 2 horas. Ao final o cadinho foi resfriado em dessecador e pesado. O procedimento foi repetido por períodos de 30 minutos até peso

constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de cinzas totais pela média dos valores da triplicata.

2.1.5. Determinação do teor de extrativos (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)

Exatamente cerca de 1 g de planta foi levado à fervura por 10 minutos em 100 g de água purificada. Após resfriamento, a massa total foi reconstituída para 100 g com água purificada. A solução resultante foi filtrada em papel filtro, sendo os primeiros 20 mL desprezados. Este procedimento foi repetido duas vezes.

Uma alíquota de 20 g do filtrado foi colocada em pesa filtro previamente tarado e levado ao banho-maria sob agitação eventual até total secura. Em seguida, o pesa filtro foi colocado em estufa a 105 °C durante 2 horas, resfriado em dessecador por 20 minutos e pesado. Para cada extrato foram feitas três determinações ($n = 3$). O teor de extrativos foi determinado a partir das médias dos 6 valores obtidos, considerando a equação abaixo:

$$TE = (RS \times fd \times 100) / m - (m \times PD / 100) \quad (1)$$

Onde:

TE = teor percentual de extrativos (% , m/m)

PD = perda por dessecação (%)

RS = massa do resíduo seco (g)

m = massa do material vegetal (g)

fd = Fator de diluição (5)

2.1.6. Determinação da granulometria (BRASIL, 2010)

Cerca de 30 g do material vegetal moído e homogeneizado foi exatamente pesado e submetido à passagem por um conjunto de cinco tamises de abertura de malha de 0,18 a 1,70 mm. O sistema foi fechado e a operação realizada em tamisador vibratório (Sieve Shaker Bertel 1400), a 3,5 vibrações por segundo. Após 10 minutos, a quantidade de material vegetal moído retido nos tamises, bem como o do coletor, foi pesada.

Para a análise granulométrica foram considerados os seguintes parâmetros: classe granulométrica (CG, mm); intervalo de abertura de malha (Δ , mm); diâmetro granulométrico médio (DG, mm); fração retida (FR, %); fração retida acumulada (FRA, %); e fração de passagem (FP, %).

O cálculo para o diâmetro médio utilizou o modelo dos probitos (VILA-JATO, 1997; PASQUALOTO et al., 2005) para linearização da curva sigmóide da distribuição granulométrica. Na representação gráfica, os valores de diâmetro médio (DG) foram dispostos nas abscissas (x) e os valores transformados em probitos foram indicados nas ordenadas (y). O diâmetro médio das partículas foi calculado através da equação da reta obtida por regressão linear: DG (mm) versus probitos, tratando-se de uma distribuição normal, com desvio-padrão aritmético.

2.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS

As soluções extrativas foram preparadas por maceração utilizando etanol como líquido extrator. Um estudo experimental de superfície de resposta foi projetado para investigar as variáveis (ou fatores) tecnológicas: concentração de planta (A), concentração etanólica do solvente (B) e tempo de maceração (C). A tabela 2 apresenta as variáveis e seus respectivos níveis, resultando num total de 20 experimentos. As soluções extrativas foram caracterizadas através dos teores de resíduo seco (RS), pH e teor dos marcadores químicos, ácido clorogênico (ACG) e ácido cafeico (ACF).

Tabela 2: Planejamento experimental (Superfície de Resposta – Composto central; $\alpha=1,5$) do processo extrativo de *C. glaziovii*

Variáveis	Pontos analisados				
	inferior	axial	Central	Axial	Superior
A-Droga (%; m/V)	2	4	8	12	14
B-Etanol (%; V/V)	5	10	20	30	35
C-Tempo (dias)	3	4	6	8	9

A análise de regressão dos dados foi realizada com a utilização do programa *Design-Expert*[®] (version 8.0.6, Stat Ease, Inc, MN, USA), presumindo modelo quadrático com interação entre os fatores. O modelo polinomial foi definido pela seguinte equação (AREND et al., 2011):

$$Y = M + aA + bB + cC + abAB + acAC + bcBC + bbB^2 + ccC^2 \quad (2)$$

onde Y é a resposta obtida associada com a combinação de cada nível dos fatores. M é a média dos valores e A, B, C são os fatores principais (Tabela 2).

AB , AC , BC são as interações binárias entre os fatores, A^2 , B^2 e C^2 são os fatores quadráticos numéricos e a , b , c ou ab , ac , bc , ou aa , bb e cc são os coeficientes dos fatores principais, de suas interações e dos fatores quadráticos, respectivamente. A análise da variância (ANOVA) foi realizada para validar as equações polinomiais e para identificar a influência dos fatores. Os efeitos dos fatores sobre as respostas pH, resíduo seco (RS) e teor dos marcadores químicos ACG e ACF foram interpretados. O modelo que pode ser usado para descrever os valores experimentais é fornecido pela contribuição relativa da variância do modelo em relação à variância residual (valor de F do modelo). O modelo refere-se à expressão matemática descrita em termos das variáveis (ou fatores) tecnológicos estudados, conforme equação 2. O modelo linear, interação entre 2 fatores (2FI) ou quadrático, assim como os termos do modelo (A, B ou C, suas interações ou fatores quadráticos) foram considerados significantes quando o valor de p foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$).

2.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

A partir do modelo matemático estabelecido no planejamento experimental descrito acima, realizou-se a etapa de otimização, estabelecendo como principal critério a extração de um maior teor dos ácidos fenólicos escolhidos como marcadores químicos. Os teores de ACG e ACF, preditos pelo modelo para essa condição de extração, foram aplicados experimentalmente e os resultados comparados com os dados teóricos. Os resultados foram considerados reprodutíveis quando a diferença não ultrapassou 5%.

2.4. CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS

2.4.1. Quantificação dos marcadores químicos (AREND et al., 2011)

A quantificação dos marcadores químicos para o controle do processo extrativo foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os marcadores químicos, ACG e ACF, foram avaliados pela metodologia desenvolvida e validada por Arend et al. (2011) em um cromatógrafo Perkin Elmer. O sistema foi constituído por um autosampler (Perkin Elmer Series 200), bomba binária (Series 200), degasser à vácuo (Perkin Elmer Series 200), detector UV/Vis (Series 200) operando em 330 nm e interface (600 Series LINK). Para as análises utilizou-se como fase estacionária uma coluna C_{18} (150 x 4,6 mm, 5 μ m) com pré-coluna ODS (4,0 x 3,0 mm) e como fase móvel

um gradiente de acetonitrila e ácido acético 1% (tabela 3) com fluxo de 1 mL/min.

Tabela 3: Programação da fase móvel para CLAE. Solvente A: acetonitrila; solvente B: ácido acético 1%

Programação (min)	Modo	Acetonitrila (%)	Ácido acético (%)
0-15	Isocrático	13	87
15-25	Gradiente	13-40	87-60
25-34	Isocrático	40	60

As amostras para injeção no cromatógrafo foram preparadas diluindo-se a 10 mL uma alíquota de 3,0 mL de cada solução extrativa em metanol:água purificada (1:1, V/V) e filtradas com membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro. Os picos detectados nos cromatogramas foram caracterizados por comparação com o tempo de retenção das soluções padrão de referência (ACG e ACF). Para quantificação individual dos compostos foi usada curva-padrão obtida por regressão linear.

Curva de calibração

As curvas analíticas de ACG e ACF foram preparadas utilizando como solvente metanol: água purificada (1:1, V/V), nas concentrações de 5, 20, 50, 75 e 100 µg/mL e 5, 10, 20, 50 e 100 µg/mL respectivamente. Cada solução foi preparada para injeção no cromatógrafo em triplicata. As áreas foram plotadas frente às concentrações para a construção das curvas, a equação da reta foi obtida por regressão linear e o coeficiente de correlação calculado.

2.4.2. pH

O pH das soluções extrativas foi determinado utilizando um pHmetro digital (Oakton, pH 5 Acorn series) calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. O resultado foi expresso pela média de três determinações.

2.4.3. Determinação do resíduo seco (RS) (HARTKE; MUTSCHLER, 1987)

Em pesa-filtros previamente tarados foram colocados exatamente cerca de 20 g de cada extrato e levados à secura em banho-maria, sob agitação

ocasional. A seguir, os pesa-filtros foram colocados em estufa a 105 °C durante duas horas, esfriados em dessecador e então pesados. O procedimento foi realizado em triplicata e o resultado foi calculado considerando a relação de 100 g de solução extrativa (% , m/m) pela média de três determinações.

2.5. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO OTIMIZADO (ESO)

2.5.1. Liofilização das soluções extrativas

As soluções extrativas foram concentradas em evaporador rotatório para eliminação do etanol. Em seguida, foram congeladas a -20 °C e liofilizadas por 48 horas a -50 °C sob pressão de 133,3 mBar. Finalizada a operação, os liofilizados foram mantidos em dessecador até a utilização.

2.5.2. Avaliação da capacidade vasorelaxante *in vitro* do extrato de *C. glaziosi* em anel de aorta de ratos

A atividade vasorelaxante do extrato padronizado foi investigada com testes de reatividade vascular *in vitro* conforme descrito a seguir. O experimento foi realizado em colaboração com a professora Áurea Elizabeth Linder do Departamento de Farmacologia (CCB - UFSC) e a aluna Kiuanne Lobo. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (PP00706).

Os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg) e cloridrato de xilazina (15 mg/kg), administradas intraperitonealmente, e depois eutanizados. Em seguida a aorta torácica foi removida e transferida para uma placa de Petri contendo solução salina fisiológica, com a seguinte composição (em mmol/L): 130,0 NaCl; 4,7 KCl; 1,2 KH₂PO₄; 1,2 MgSO₄; 1,6 CaCl₂; 14,9 NaHCO₃; 0,03 EDTA e 5,5 glicose (LINDER et al., 2007). A aorta foi seccionada em anéis de 3 a 4 mm de comprimento após a retirada dos tecidos adiposo e conectivo adjacentes. Um grupo de anéis de aorta teve o endotélio vascular removido mecanicamente mediante suave atrito da luz do anel vascular contra uma pinça de aço inoxidável. Duas hastes metálicas foram inseridas na luz dos vasos, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica acoplado a um sistema de aquisição de dados inserido em uma cuba com volume total de 2 mL contendo solução salina fisiológica, mantida à 37 °C e areada com uma mistura carbogênica de 95% de O₂ e 5% de CO₂. A tensão

inicial foi dada como 1 g e após 10 minutos elevada para aproximadamente 3,5 g. Após um período de equilíbrio de 60 minutos, as preparações foram contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e estimuladas com acetilcolina (1 $\mu\text{mol/L}$) quando o platô da contração era atingido. A presença do endotélio funcional foi confirmada pela capacidade da acetilcolina induzir relaxamento igual ou superior a 50 % no grupo de anéis que não sofreram atrito luminal. Foi considerado sem endotélio funcional o grupo de anéis de aorta que sofreu atrito luminal e que apresentou um relaxamento inferior a 10% pela adição de acetilcolina. Em seguida, as preparações foram lavadas com solução salina fisiológica até a tensão chegar ao nível basal, sendo então mantidas em repouso por 30 minutos. Após esse tempo, os anéis foram novamente contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e com a obtenção do platô da contração (aproximadamente 15 min), o relaxamento induzido pela adição de concentrações crescentes do extrato seco otimizado foi estimado. Em um grupo de anéis de aorta, o relaxamento foi induzido por concentrações crescentes de acetilcolina (1 $\mu\text{mol/L}$ a 10 $\mu\text{mol/L}$), um vasodilatador conhecido e eficaz considerado aqui como controle positivo. A resposta contrátil induzida por fenilefrina foi medida em g de tensão e considerada como 100 %, enquanto as respostas vasodilatadoras foram medidas como percentagem da contração induzida por fenilefrina e expressas como percentagem de relaxamento. Todos os resultados são expressos com a média \pm erro padrão da média de n experimentos. O percentual máximo dos relaxamentos foi comparado e analisado pelo test t de Student, sendo considerados significantes apenas aqueles resultados que apresentaram $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

No desenvolvimento de um medicamento fitoterápico, a droga vegetal passa por inúmeras avaliações que devem garantir a estabilidade química dos constituintes e a qualidade necessária para seu uso. Neste ponto, é imprescindível caracterizar a droga vegetal em questão, o que possibilita estabelecer limites para os ensaios de qualidade que, posteriormente, garantirão a reprodutibilidade quali e quantitativa daquelas inicialmente utilizadas.

Neste trabalho, a caracterização das folhas de *C. glaziovii* foi realizada antes de dar início aos estudos, mantendo-se dentro dos padrões exigidos e condizentes com os resultados encontrados anteriormente por Arend (2010).

Abaixo segue a tabela com os valores encontrados na caracterização das folhas secas previamente moídas e usadas para o preparo das soluções extrativas.

Tabela 4: Caracterização das folhas moídas de *C. glaziovi*

Perda por Dessecação (%) ; dpr)	Cinzas Totais (%) ; dpr)	Teor de Extrativos (%) ; dpr)	Granulometria	
			Classe Granulométrica (mm)	Diâmetro médio (mm)
13,10 (±0,44%)	7,92 (±0,33%)	15,96 (±0,87%)	< 2,00	0,946 ± 0,798

3.2 AVALIAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS

Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi usada para averiguar a influência das variáveis de extração sobre as respostas obtidas. Com a utilização de MSR pode-se obter um modelo de regressão que descreve as variáveis dependentes (fatores ou variáveis de saída ou respostas) como função das variáveis independentes (fatores ou variáveis de entrada) (MYERS; MONTGOMERY, 2002; BEZERRA et al., 2008). As variáveis dependentes, bem como seus respectivos níveis, foram determinadas através de estudos preliminares (Apêndice 1) e em função dos resultados biológicos obtidos a partir das soluções extrativas analisadas por Arend (2010).

3.2.1. Teor dos marcadores químicos

A análise de teor de substâncias por CLAE apresenta vantagens como resolução, exatidão e precisão do método, boa sensibilidade e reprodutibilidade, tornando a técnica adequada para a análise de matrizes complexas como os extratos vegetais (RODRIGUES, GONÇALVES; SILVA, 2004). O teor dos marcadores químicos de cada solução extrativa foi determinado por CLAE utilizando metodologia já validada como citado no item 2.4.1. Somente a linearidade das curvas analíticas foi avaliada, conforme padronizado por ICH 2005.

A tabela 5 apresenta as equações de reta utilizadas na conversão das áreas dos picos em concentração de cada um dos analitos, bem como o coeficiente de correlação ($r > 0,99$), o qual confirma a linearidade das curvas dentro dos intervalos estabelecidos. A linearidade das curvas analíticas dos

marcadores ACG e ACF indica que as áreas dos picos são diretamente proporcionais à concentração da substância na amostra, dentro do intervalo especificado.

Tabela 5: Dados de linearidade dos marcadores químicos por CLAE

Marcador	Intervalo de linearidade (µg/mL)	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
ACG	5 – 100	$y = 74874x + 41360$	0,9984
ACF	5 – 100	$y = 139555x + 71759$	0,9996

Nas análises cromatográficas dos extratos, os picos do ACG e ACF estavam perfeitamente resolvidos. A figura 5 apresenta, como exemplo, o cromatograma de uma das soluções extrativas. A identificação dos marcadores foi confirmada, após contaminação com a solução padrão de ACG e ACF, pelo aumento das áreas nos tempos de retenção dos picos correspondentes.

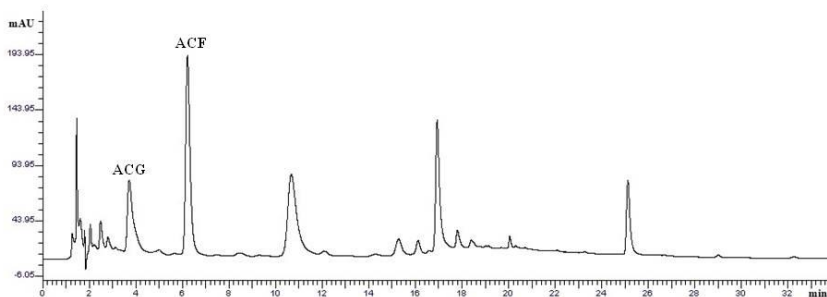


Figura 5: Cromatograma da solução extrativa com 12 % de droga, etanol 30 % (V/V) e 8 dias de maceração: coluna HPLC 150x4,6 mm Zorbax C₁₈. Fase móvel em sistema gradiente de ACN e CH₃COOH 1% fluxo 1,0 mL/min, detecção a 330 nm com detector UV

A tabela 6 apresenta os valores de pH, resíduo seco e das concentrações de ACG e ACF para cada uma das soluções extrativas.

Tabela 6:Concentração do resíduo seco e dos marcadores químicos nas soluções extrativas

Amostra	Fatores			pH	RS (%; m/m)	ACG (µg/mL)	ACF (µg/mL)
	A	B	C				
1	8	35	6	5,87	1,15	26,94	6,14
2	8	20	9	5,74	1,12	7,22	14,07
3	4	10	4	5,67	0,59	8,60	5,89
4	12	30	8	5,79	1,50	18,66	16,61
5	8	20	6	5,66	1,06	12,62	17,25
6	4	30	4	5,77	0,52	17,53	5,98
7	8	20	6	5,74	1,04	15,37	18,21
8	4	30	8	5,87	0,59	15,90	8,01
9	8	20	6	5,81	1,02	14,55	17,91
10	8	20	6	5,77	1,06	14,23	18,27
11	2	20	6	5,68	0,32	6,18	2,86
12	8	5	6	5,83	1,03	-0,38	18,12
13	8	20	6	5,73	1,09	12,77	18,15
14	12	30	4	5,79	1,47	36,22	17,27
15	4	10	8	5,66	0,54	1,07	11,60
16	14	20	6	5,79	1,51	17,76	23,57
17	8	20	3	5,78	1,04	23,29	13,97
18	12	10	8	5,67	1,41	-0,40	29,54
19	8	20	6	5,83	1,0	13,07	16,57
20	12	10	4	5,67	1,41	6,76	28,94

Neste estudo, os efeitos dos fatores e suas interações sobre as respostas durante a etapa de extração foram avaliados a partir dos dados relativos à análise de variância (ANOVA) (tabela 7).

Tabela 7: Termos do modelo significante, valores dos coeficientes de regressão e ANOVA (valores de p) para as respostas RS, ACG e ACF

Termo polinomial	RS (modelo quadrático)		ACG (modelo 2F)		ACF (modelo 2FI)	
	Coefficiente	p value	Coefficiente	p value	Coefficiente	p value
Intercepto	1,05	< 0,0001	13,40	< 0,0001	15,45	< 0,0001
Droga (%)	0,43	< 0,0001	2,84	0,0005	7,36	< 0,0001
Etanol (%)	0,025	0,0597	9,06	< 0,0001	-3,69	0,0001
Tempo (dias)	0,013	0,2793	-4,64	< 0,0001	0,63	0,3728
AB	0,022	0,1615	3,09	0,0016	-2,64	0,0083
AC	1,991E-003	0,8945	-1,94	0,0268	-0,97	0,2711
BC	0,019	0,2191	-0,56	0,4833	-0,62	0,4796
A ²	-0,062	0,0008	--	--	--	--
B ²	0,013	0,3430	--	--	--	--
C ²	9,716E-003	0,4684	--	--	--	--
R ²	0,9927		0,9597		0,9246	
R ² -ajustado	0,9862		0,9411		0,8897	
R ² -preditivo	0,9591		0,7589		0,8749	
Adequação da precisão	43,846		28,736		17,598	

3.2.2. pH

Os valores de pH variaram de 5,66 a 5,87, não havendo diferença significativa entre as diferentes soluções extrativas. Considerando que o pH do líquido extrator em suas diferentes concentrações era $6,37(\pm 3,06)$, um menor valor de pH das soluções extrativas indica o caráter ácido das substâncias extraídas (LONGHINI et al., 2007).

3.2.3. Resíduo seco (RS)

O resíduo seco, que representa a quantidade total de substâncias extraídas, variou de 0,32 a 1,51 %. Durante o tratamento dos dados, foi observado que somente o fator concentração de droga (A) influenciou na concentração de resíduo seco (tabela 7 e fig. 6) Observa-se que, quanto maior a concentração de droga, maior o teor de resíduo seco, indicando que não houve saturação do solvente nas condições de extração avaliadas.

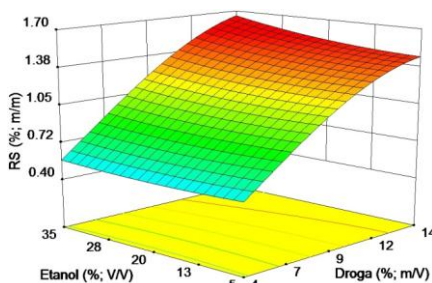


Figura 6: Gráfico de interação dos fatores concentração de etanol e de droga das soluções extrativas obtidas por maceração para a resposta resíduo seco (tempo de extração = 6 dias)

3.2.4. Marcadores químicos (ACG e ACF)

Pela análise da tabela 7 observa-se que todos os fatores influenciaram significativamente a extração de ACG nas soluções extrativas. Da mesma forma, constata-se a presença de interação entre concentração de droga e de etanol (AB) e concentração de droga e tempo (AC). O aumento da concentração de droga e de etanol foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de ACG, efeito que pode ser melhor observado na figura 7a.

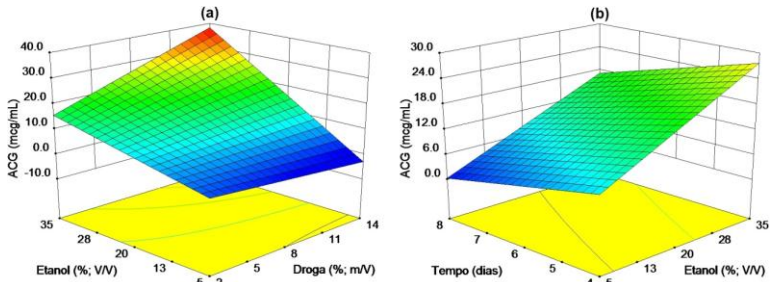


Figura 7: Gráfico de interação entre os fatores concentração de etanol e de droga (tempo de extração = 6 dias) (a); tempo e concentração etanol (concentração de droga = 8%) (b) na quantificação do ACG

Com relação ao tempo de maceração, a concentração de ácido clorogênico foi decrescente em função do tempo (fig. 7b), em consonância com os resultados obtidos por Arend et al. (2011). Estes autores relataram a diminuição da concentração do ACG com aumento de tempo de maceração, sugerindo uma degradação do mesmo.

A figura 8 mostra a representação gráfica da concentração de ácido cafeico (ACF) obtida nas diferentes condições de extração. Observa-se que os teores foram maiores quando a concentração de droga aumentou e quando a concentração de etanol diminuiu (fig. 8a), sendo que o tempo de maceração não apresentou influência significativa sobre a extração deste ácido (tabela 7; fig. 8b).

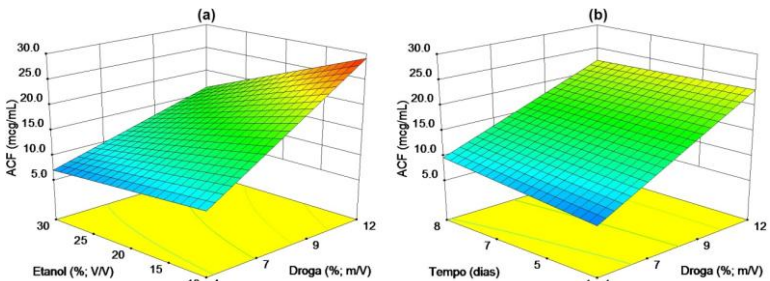


Figura 8: Gráfico de interação entre os fatores concentração de etanol e de droga (tempo de extração = 6 dias) (a) e concentração de droga e tempo (concentração de etanol = 20%) (b) para a quantificação do ACF

O comportamento da extração dos marcadores foi semelhante aos resultados apresentados em estudos anteriores por Arend et al. (2011). A avaliação dos resultados permite observar a presença de interação significativa entre os fatores concentração etanólica e tempo de maceração sobre a extração do marcador químico ACG, sendo que em maiores concentrações de etanol e menores tempos de maceração o ACG é encontrado em maior quantidade. A concentração de etanol, porém, atua de maneira diferenciada na extração do marcador químico ACF. O teor deste marcador é maior em concentrações menores de etanol, mas não se observou influência do tempo. Resultados obtidos em estudos anteriores haviam demonstrado influência positiva do tempo de extração nos teores de ACF (ARENDE et al., 2011). Entretanto, naquele estudo foi analisada uma faixa extensa de concentração de etanol no líquido extrator, de 20 a 80%. Outro aspecto a ser observado é a concentração de droga, nos estudos realizados por Arend et al. (2011) este fator foi mantido fixo (5%). No presente estudo constatou-se uma interação significativa ($p = 0,0083$; tabela 7) entre a concentração de droga e o teor etanólico do líquido extrator (interação AB). As diferenças nos fatores e níveis escolhidos nos dois estudos podem ser os responsáveis pela diferença observada na influência do fator tempo de maceração. Menores concentrações etanólicas e maiores concentrações de droga parecem favorecer uma rápida extração de ACF. Dessa forma, não parece ser vantajosa, uma extração prolongada, tanto para os teores de ACF quanto para os de ACG.

3.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

Para realizar a otimização incluindo todas as respostas do processo extrativo foi utilizada a função de desejabilidade, que combina os níveis de respostas dos fatores avaliando um equilíbrio favorável entre as mesmas. A desejabilidade pode variar de 0 a 1, sendo que os valores ótimos relacionados a cada resposta estão mais próximos de 1 (DERRINGER, 1980). O ponto ótimo encontrado pela avaliação dos resultados experimentais foi caracterizado por um valor de 0,934 mostrando que a extração máxima dos marcadores, dentro do campo experimental estudado, pode ser realizada simultaneamente nas condições de 14 % de droga, teor etanólico de 27 %, com 3 dias de maceração (fig. 9).

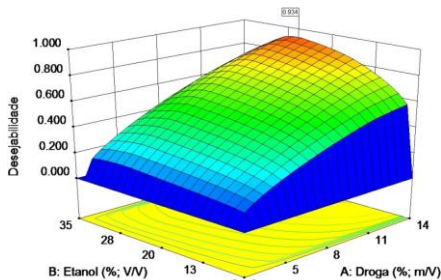


Figura 9: Representação gráfica da desejabilidade das condições ótimas de extração para o ACG e o ACF

A otimização resultou no valor máximo de concentração de droga (14 %) estabelecido no *design*, porém não foi observado equilíbrio de extração, isto é, saturação do solvente ou exaustão da droga (ambos levando ao *steady state*). Devido à influência positiva observada para o fator concentração de droga, tanto para os teores de ACG quanto para ACF, optou-se por avaliar concentrações maiores. Como resultado, a concentração de 18 % foi estabelecida como máximo de droga, uma vez que a maceração não é dinâmica, e maiores concentrações poderiam comprometer o processo extrativo.

O extrato, assim otimizado, nas condições de 18 % de droga, teor etanólico de 27 % e 3 dias de maceração, foi utilizado no estudo da avaliação biológica e para o desenvolvimento do sistema microparticulado.

3.4. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE VASORELAXANTE *in vitro* DO EXTRATO DE *C. glaziovii* EM ANEL DE AORTA DE RATOS

O extrato otimizado neste trabalho, tanto com 14% como 18% de droga, teor etanólico de 27 % e 3 dias de maceração, foi avaliado quanto à potencial atividade anti-hipertensiva pela capacidade de induzir o relaxamento dos anéis de aorta torácica de ratos. Como podemos observar na figura 10, os dois extratos com 14 e 18 % de droga foram capazes de induzir relaxamento em aorta de ratos com endotélio intacto e este efeito foi dependente da concentração administrada. Os extratos não foram capazes de relaxar anéis de aorta que tiveram o endotélio removido (dados não mostrados). A capacidade vasodilatadora máxima dos extratos preparados com 14 % e 18 % de droga foi de $88,36 \pm 4,01$ % e $92,59 \pm 2,36$ %, respectivamente. Ao compararmos o

relaxamento máximo dos extratos com aquele induzido por acetilcolina ($98,77 \pm 3,828\%$) não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$, teste t de Student). Dados da literatura mostram que o tratamento por via oral do extrato aquoso de *C. glaziovii* padronizado com 2 % de droga contendo 12% de catequinas, 19 % de procianidinas e 19 % de flavonoides (TANAE et al., 2007) e da fração *n*-butanol diminuíram a pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos após 4-15 dias de tratamento (LIMA-LANDMAN et al., 2007). Esses estudos sugerem que o suposto mecanismo de ação do extrato parece estar relacionado ao bloqueio do influxo de cálcio nas células da musculatura lisa (LIMA-LANDMAN et al., 2007; NINAHUAMAN et al., 2007).

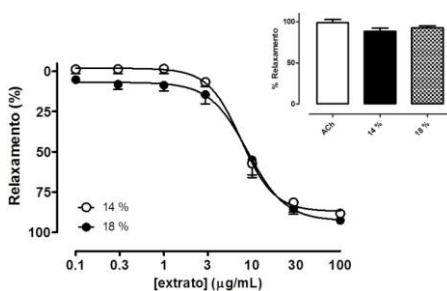


Figura 10: Relaxamento vascular induzido pelos ESO de *C. glaziovii* contendo 14 % e 18 % de droga. Concentrações crescentes dos extratos (0,1 a 100 µg/mL) foram adicionadas em anéis de aorta de ratos com endotélio intacto contraídos com fenilefrina (1 µmol/L) ($n= 6$). Inset: Comparação entre os relaxamentos máximos induzidos por 100 µg/mL dos extratos de *C. glaziovii* contendo 14 e 18% de droga com aquele induzido por acetilcolina (ACh; 1 µmol/L). As barras representam a média \pm EPM do percentual máximo de relaxamento obtido em pelo menos 5 diferentes experimentos.

Com base em nossos resultados e naqueles da literatura, podemos sugerir que a capacidade vasodilatadora dos extratos preparados com 14% e 18% de droga pode estar associada a uma potencial atividade anti-hipertensiva. Os resultados deste estudo de padronização do extrato seco de *C. glaziovii* estão contemplados no artigo “Optimization of Extraction Parameters for enhanced antihyperglycemic activity of *Cecropia glaziovii* Sneathl using Design of Experiments” (apêndice 1).

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento e caracterização de sistema microparticulado contendo extrato padronizado de *Cecropia glaziovii* Snethl

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação tem constituído, nos últimos anos, uma estratégia promissora para a melhoria do perfil biofarmacêutico de moléculas com atividade terapêutica. O constante desenvolvimento científico de formas farmacêuticas de ação modificada define novas oportunidades terapêuticas apresentando grandes vantagens.

Embora de produção mais complexa, a microencapsulação é um método bem estabelecido para a preparação de formas farmacêuticas de liberação controlada ou prolongada. As vantagens destes sistemas são inúmeras em comparação aos sistemas unitários, entre as quais se podem citar a distribuição rápida e uniforme pelo trato gastrointestinal, melhor efeito terapêutico, menor variação na biodisponibilidade, menor risco de toxicidade devido ao rompimento de um sistema unitário de ação prolongada, redução do efeito colateral, além da possibilidade de fracionamento e ajuste da dose (RAFFIN et al., 2009).

Este capítulo apresenta o artigo “Microencapsulation of chemically and biologically standardized extract *Cecropia glaziovii* Snethl” que trata da preparação e caracterização de um sistema microparticulado contendo extrato padronizado de *C. glaziovii* Snethl. Inicialmente, descreve o preparo do extrato padronizado e sua capacidade vasodilatadora em anéis de aorta torácica de ratos; posteriormente são descritas a técnica de preparação e os principais fatores influentes avaliados com auxílio de um delineamento experimental de superfície de resposta; por fim, a caracterização e comportamento de liberação apresentado pelas micropartículas.

Microencapsulation of chemically and biologically standardized extract of *Cecropia glaziovii* Snethl

Talitha C. dos Santos^a, Mariana Alves Battisti^a, Kiuanne Lino Lobo^a, A. Elizabeth Linder^b, Diva Sonaglio^a, Angela M. de Campos^a

^aLaboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

^bLaboratório de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

ABSTRACT

A hydroethanolic extract of *C. glaziovii* prepared with the dried leaves was standardized in terms of its chemical contents, specifically chlorogenic acid and caffeic acid. The extract was able to relax phenylephrine-induced contractions in rat aortic rings in an endothelium-dependent manner. The extent of relaxation was similar to that caused by acetylcholine, an endothelium-dependent vasorelaxing neurotransmitter. PLGA microparticles containing *C. glaziovii*-standardized dry extract (SDE) were prepared by the W₁/O/W₂ emulsion solvent evaporation/extraction technique. An experimental design was used to evaluate the effects of the amount of polymer, amount of SDE, extraction phase volume and type of polymer (PLGA503 and PLGA750S) on the properties (morphology, particle size, particle size distribution (span) and encapsulation efficiency (EE) of microparticles. SEM images of the microparticles showed rounded and porous structures, however all the formulations showed very low EE. A new design was applied in order to elucidate the effects of an increase in osmotic pressure by addition of NaCl (%) to the external aqueous phase. An increase in the NaCl concentration resulted in smaller particle size and higher EE and loading capacity. The release profiles of each formulation were different due to changes in the microparticle surface caused by the addition of NaCl. Microparticles without salt showed rapid release by drug diffusion through the pores and higher concentrations of NaCl delayed the extract release due to a reduced water influx into the emulsion droplets and surface porosity of the particles.

Keywords: drug delivery system; PLGA; standardized herbal extract; *Cecropia glaziovii* Snethl; response surface design; endothelium relaxation.

1. INTRODUCTION

In the field of drug delivery systems, microparticles of biodegradable polymers have been widely studied. Microencapsulation offers several advantages and has been applied in several industrial areas, such as those involving food, cosmetics, pigments, adhesives, and live cell encapsulation (BENOIT et al., 2000; RAVIVARAPU, BURTON; DELUCA, 2000; KLOSE et al., 2006; SUAVE et al., 2006). Controlled-delivery in oral dosage forms can enhance the bioavailability of an active compound by customizing the release mechanism in the gastrointestinal tract. Therefore, encapsulation is a useful technological tool in the pharmaceutical industry for the development products with pharmaceutical potential (CHAN et al., 2010; BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2011).

The use of herbal products in alternative medicine is becoming increasingly popular (SUN et al., 2002; BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2011; ONWULATA, 2012). A delivery system can promote better chemical stability of the extract by isolating active compounds from a matrix (CHAN et al., 2010). However, there are few reports on the preparation of microparticles of herbal extracts to optimize the therapeutic efficiency of medicinal treatments.

Cecropia species used in traditional medicine reportedly have cardiotonic, sedative (CONSOLINI; MIGLIORI, 2005), diuretic, hypotensive (RAMOS ALMEIDA et al., 2006) and anti-inflammatory (PÉREZ-GUERRERO et al., 2001) properties. In preliminary studies conducted by our group extracts were prepared by maceration or decoction using a drug concentration of 5 % (w/V) of *C. glaziovii* (dried leaves). The antihyperglycemic and antihypertensive activities of the extracts were evaluated. The extract obtained by maceration (ethanol concentration 20 %, V/V) reduced glucose levels in blood samples taken from hyperglycemic rats and showed excellent vasodilator activity (AREND, 2010). Furthermore, the influence of temperature and the presence of a preservative on the stability of the chemical markers, chlorogenic acid (CGA) and caffeic acid (CFA), during the extraction process were evaluated. These studies showed that it is possible to obtain extracts with high concentrations of CGA or CFA using specific extraction conditions (AREND et al., 2011). Based on these results, we studied several *C. glaziovii* crude hydroethanolic extracts and a standardized dry extract (SDE), with a maximum content of both CGA and CFA, was

obtained. This extract showed potential antihyperglycemic activity (50 mg/kg, *p.o.*) (SANTOS et al., in prep.).

Considering the significant pharmacological activities noted above, we decided to encapsulate this crude dry extract into PLGA microparticles. Due to the polarity of the hydroethanolic solution used as the extractor liquid, the SDE was considered as a water-soluble model drug. Thus, the extract-loaded microparticles were prepared using a double emulsion water-in-oil-in-water emulsion technique. This is the technique of choice when the drug is soluble in the inner aqueous phase (hydrophilic grade) but insoluble in the intermediate oil phase of the emulsion (REGAN; MULVIHILL, 2009; O'REGAN; MULVIHILL, 2010).

The aim of this investigation was to examine the potential cardiovascular effect of the SDE before encapsulation, evaluating the vasodilator activity in the rat thoracic aorta. From this result, the preparation of PLGA microparticles was investigated using a statistical model, where the influence of some process and formulation variables on the encapsulation efficiency was investigated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. MATERIALS

Biodegradable polymer, poly (lactic-co-glycolic) resomers PLGA503 (LA:GA 50:50, i.v.: 0.32 – 0.44 dL/g) and PLGA750S (LA:GA 75:25, i.v.: 0.8 – 1.2 dL/g) were purchased from Boehringer Ingelheim (Germany) and stored in a freezer prior to use. Freeze-dried extract of *Cecropia glaziovii* was used as a water-soluble drug. Poly (vinyl alcohol) (PVA, Mowiol 40 – 88) was purchased from Sigma Aldrich and used as a dispersant in the external aqueous phase. Other chemicals were of reagent grade.

2.2. PREPARATION OF STANDARDIZED EXTRACT

Dried leaves of *C. glaziovii* Snethl were obtained from the Pluridisciplinary Center of Chemical, Biological and Agronomic Studies of the University of Campinas, SP, Brazil. A specimen voucher is deposited at that Center Herbarium under the number CPQBA 78. The extract was prepared using 18 % (w/V) of drug material content, 27 % (V/V) water:ethanol solution as the extractor liquid and 3 days of maceration (SANTOS et al., in prep.), concentrated under vacuum and freeze-dried. The content of chemical markers was determined through comparing their retention times with those of the co-injected standard solutions using chromatography conditions validated by Arend (2011).

2.3. VASCULAR REACTIVITY *IN VITRO* IN RAT THORACIC AORTA

Animals

Male Wistar rats (250-300 g) were maintained in a 12 h light/dark cycle with free access to water and standard rat chow. On the day of the experiments, rats were euthanized under anesthesia with a mixture of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg) given intraperitoneally and the aorta was removed. All procedures were conducted in accordance with local institutional guidelines for the care and use of laboratory animals (authorization PP00706).

In vitro measurement of isometric force generation of rat aortic rings

After the removal of fat and connective tissue, aortic rings (3-4 mm in length) were mounted in an isolated organ bath on Grass isometric transducers connected to an ADInstruments PowerLab for isometric tension recordings as described elsewhere (LINDER et al., 2007). The rings were bathed with physiological salt solution of the following composition in mmol/L: 130.0 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 1.6 CaCl₂, 14.9 NaHCO₃, 0.03 EDTA and 5.5 glucose, maintained at 37°C and bubbled with 95% O₂ - 5% CO₂. The aortic rings were stretched applying a tension of approximately to 3.5 g applied gradually during the first 10 min and were then allowed to equilibrate for 1 h with periodical washes every 15 min. After this period, the rings were contracted with phenylephrine (1 µmol/L) and challenged with acetylcholine (1 µmol/L) to test the tissue viability and integrity of the endothelium, respectively. Some of the experiments were performed in denuded arteries to avoid the interference of endothelial factors. The endothelium was mechanically removed by gently rubbing the intimal surface of the rings with stainless steel wires. Aortic rings that relaxed at least 50% of the phenylephrine-induced contraction after addition of acetylcholine were considered as retaining functional endothelium, whereas those in which acetylcholine failed to induce relaxation were considered as endothelium-denuded.

Evaluation of the vascular relaxing effect of the standardized extract of C.glaziovii

Endothelium-denuded and endothelium-intact aortic rings were contracted with phenylephrine (1µmol/L) until the plateau of the contraction was reached (around 15 min) and then exposed to increasing concentrations of the *C.glaziovii* SDE (0.1 to 100 µg/mL) given at 5 min intervals. In another set of experiments, concentration-effect curves for acetylcholine (1 µmol/L to 10 µmol/L) were obtained for endothelium-intact and -denuded vessels contracted with phenylephrine (1 µmol/L) as a reference relaxing response (positive control). The maximal relaxation induced by the SDE was compared to that induced by acetylcholine. The contractile responses to phenylephrine were evaluated from the viewpoint of absolute tension level and reported as mg of contraction. Relaxation is reported as a percentage of the maximal contraction induced by phenylephrine. The results were all reported as the mean ± standard

error. Student's t-test was used to compare the maximal relaxation induced by the SDE and acetylcholine and $p < 0.05$ was considered significant.

2.4. MICROPARTICLE PREPARATION

The *C. glaziovii* SDE-loaded microparticles were prepared by solvent evaporation/extraction using the $W_1/O/W_2$ emulsion technique described by Lamprecht et al. (2004) with some modifications. Briefly, SDE was dissolved in 0.5 mL of purified water (internal aqueous phase, W_1) and added to 5 mL of dichloromethane containing the PLGA (oil phase, O). The water-in-oil (W_1/O) emulsion was homogenized for 2 min, using an Ultra-turrax (T 25 basic IKA – Werke, Staufen, Germany). This primary emulsion was re-emulsified with 75 mL of 0.5 % (w/V) PVA solution (external aqueous phase, W_2) to obtain the double emulsion ($W_1/O/W_2$) and stirred for 3 h for solvent evaporation. For solvent extraction, the double emulsion was subsequently diluted with 100 or 200 mL of 0.1 % (w/V) PVA solution and stirred for 30 min at room temperature. In the formulations in which we evaluated the influence of osmotic pressure in the encapsulation of the extract different concentrations of NaCl (1, 2 and 3 %) were used in the external aqueous phase.

2.5. EXPERIMENTAL DESIGN

Two Response Surface Methodology (RSM) designs were used to evaluate the formation and physicochemical characteristics of the microparticles. Four formulation parameters were statistically examined in Design 1, three numerical variables: amount of polymer, 300, 400 and 500 mg (A); amount of SDE, 22.2, 33.9, 55.5, 82.1 and 88.8 mg (B); extraction phase volume, 0, 100 and 200 mL (C); and one categorical variable at 2 levels: type of polymer, PLGA503 and PLGA750S (D) (Table 8). All factor level combinations were applied in a randomized order totalizing 19 formulations. The D-Optimal RSM was used to evaluate the effects of the factors presuming a model with interaction among the factors (2FI).

Table 8: D-optimal coordinate exchange RSM summary – Design 1

Factor	Units	Type	Subtype	Minimum	Maximum
A	mg	Numerical	Discrete	300	500
B	mg	Numerical	Continuous	22.2	88.8
C	mL	Numerical	Discrete	0	200
D	---	Categorical	Nominal	PLGA503	PLGA750S

Design 2 resulted in 16 formulations using two numerical factors: stirring speed of the primary emulsion, 13,500, 17,500 and 21,500 rpm (A) and concentration of NaCl in the external aqueous phase, 1, 2 and 3 % (w/v) (B) (Table 9). The IV-Optimal RSM was used to analyze the effects of the factors presuming a quadratic model. The results were evaluated with the program Design-Expert[®], Version 8.0.6 (StatEase Inc., Minneapolis, MN, USA).

Table 9: IV-optimal coordinate exchange RSM summary – Design 2

Factor	Units	Type	Subtype	Minimum	Maximum
A	rpm	Numerical	Discrete	13,500	21,500
B	%	Numerical	Discrete	0.00	3.00

2.6. DETERMINATION OF MICROPARTICLE SIZE, PARTICLE SIZE DISTRIBUTION AND SURFACE SHAPE

Particle size and particle size distribution were determined by laser diffraction using a Mastersizer 2000 size analyzer (Malvern Instruments, UK). The surface morphology of microparticles was observed with a scanning

electron microscope (SEM, JEOL JSM-6390LV) with dried microparticles mounted onto stubs using a double-sided adhesive tape and gold coating.

2.7. DETERMINATION OF THE ENCAPSULATION EFFICIENCY AND LOADING CAPACITY

The microparticles (50 mg accurately weighed) were dissolved in 1 mL of dichloromethane, 4 mL of ethanol 27 % (V/V) were then added and the hydroethanolic solution was separated by centrifugation. The concentration the phenolic compounds in the supernatant was spectrophotometrically measured at 287 nm (UV-1800; Shimadzu, Japan). The percentage encapsulation efficiency was calculated by the formula: (amount of drug encapsulated/amount of total drug) x 100. The drug loading capacity for each formulation was expressed as mg drug/100 mg microparticles.

2.8. *IN VITRO* DRUG RELEASE STUDIES

In vitro release profiles for each formulation were obtained using a USP 2 dissolution apparatus (Nova Ética). A 500 mg aliquot of freeze-dried microparticles was suspended in 300 mL of phosphate buffer 0.05 mol/L (pH 6.8) containing ethanol (20 %, V/V) and then incubated at 37 °C at 70 rpm. At pre-determined time intervals, an aliquot of 5 mL was withdrawn for analysis. The medium was replaced with fresh dissolution medium at each interval. The samples were filtered and the phenolic compounds content was estimated spectrophotometrically at 280 nm. The results obtained in triplicate were expressed as a percentage of the drug release.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Many species of the genus *Cecropia* share the folk reputation of being efficient in the treatment of several diseases including bronchitis, asthma and high blood pressure. Recently, an increase in the number of studies reporting the pharmacological and phytochemical properties of these species can be observed. Of the species of *Cecropia* presenting cardiovascular effects the most frequently reported is *C. glaziovii* (COSTA et al., 2011). From the pharmaceutical point of view, the improvement of drug-delivery to biological systems associated with enhanced bioavailability and a reduced cost is highly desirable. The development of microparticles from herbal extracts followed by encapsulation to optimize their biological efficiency is of interest with a view to developing products with potential therapeutic application. We have previously determined the optimum conditions for the preparation of *C. glaziovii* Snethyl extract based on extraction yields of CGA and CFA as chemical markers (SANTOS et al., in prep.). To investigate the cardiovascular effect of the SDE of *C. glaziovii* before encapsulation we first evaluated its ability to relax rat aorta.

3.1. VASCULAR RELAXATION INDUCED BY THE SDE OF *C. glaziovii*

Endothelium-intact and endothelium-denuded aortic rings pre-contracted with phenylephrine (1 $\mu\text{mol/L}$) were allowed to respond to increasing concentrations of the SDE or acetylcholine. As can be observed in Figure 11, in contracted aorta, SDE was able to relax endothelium-intact aortic rings in a concentration-dependent manner whereas it failed to relax endothelium-denuded aortic rings. Several vasorelaxing agents are known to induce their effects through the release of endothelium-derived-relaxing-factors. We also observed that acetylcholine, a neurotransmitter well-known to relax rat aorta in a endothelium-dependent manner (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980) through the release of endothelial nitric oxide, induced a concentration-dependent relaxation of endothelium-intact, but not of endothelium-denuded, rat aortic rings (data not shown). Previous studies using an extract of *Cecropia lyratiloba* have shown that its ability to relax aortic rings is endothelium-dependent and it is mediated by nitric oxide (RAMOS ALMEIDA et al., 2006). These results indicate that the integrity of the endothelium is essential for the vascular activity of *C. glaziovii* SDE. However,

whether the relaxation induced by SDE is nitric oxide-mediated, as in the case of acetylcholine or the extract of *C. lyratiloba*, remains to be investigated. Interestingly, the maximal relaxation of contracted aortic rings induced by 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the extract of *C. lyratiloba* is around 60 % (RAMOS ALMEIDA et al., 2006) while that induced by 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the SDE of *C. glazioui* was 92.59 ± 2.368 %, which is not statistically different from the maximal relaxation induced by our positive control acetylcholine (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$; 98.77 ± 3.828 %; $p > 0.05$). These results highlight the efficacy of the SDE of *C. glazioui* as a vasodilator and point to a potential hypotensive activity.

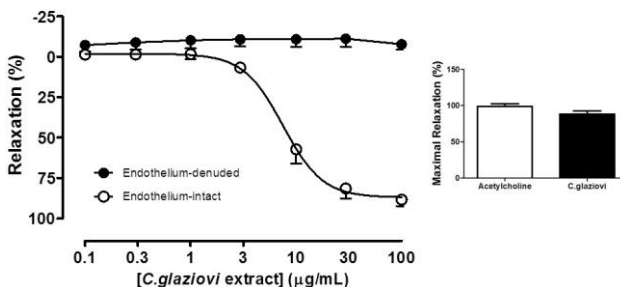


Figure 11: Relaxation induced by *C. glazioui* SDE. Concentration-effect curves to SDE (0.1 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were performed in endothelium-denuded (\bullet) and -intact (\circ) rat aortic rings contracted with phenylephrine (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$). The points represent the mean \pm SEM of the percentage of relaxation of at least 5 different experiments. Inset: Comparison of the maximal relaxation induced by *C. glazioui* SDE (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; \blacksquare) and acetylcholine (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$; \square). The bars represent the mean \pm SEM of the percentage of the maximal relaxation obtained from at least 5 different experiments.

3.2. PREPARATION OF PLGA MICROPARTICLES: DESIGN 1

The experimental domain of each independent variable was selected on the basis of a preliminary screening considering technological factors such as the ability to form particles and the presence of traces of free polymer in the solution. The polymer concentration used was 300 to 500 mg because the use of less than 300 mg resulted in a system with non-uniform particles with irregular surfaces, while the use of more than 500 mg resulted in an excessively viscous system with filaments of polymer during the homogenization by ultra-turrax. The SDE range was established according to the dry residue (2.45 %; w/w) of the unconcentrated standardized extract ($d = 0.9504$ g/mL), in order to obtain the maximum loading capacity of chemical

markers in the microparticles. Thus, the lesser amount of SDE (22.2 mg) corresponded to the reconstitution of the unconcentrated standardized extract and the higher concentration (88.8 mg) corresponded to 4 times the original concentration of the unconcentrated standardized extract, always maintaining a constant volume of 500 μL as the inner aqueous phase (W_1). The extraction phase volumes of 100 and 200 mL, added after double emulsion formation, were selected to evaluate the influence of the solvent extraction and to provide faster solidification of the microparticles, compared to the system without addition of the extraction phase (0 mL).

In this first study of microparticle formulation, the effects of varying the amount of polymer (A), amount of extract (B), extraction phase volume (C) and type of polymer (D) were investigated considering three important particle properties: particle size, particle size distribution (span) and encapsulation efficiency (EE) (Table 10).

Table 10: Particle size, span and encapsulation efficiency of *C. glazioui* SDE-loaded PLGA microparticles (Design 1)

Run	Factor				Particle size (μm)	Span	EE (%)
	A	B	C	D			
1	500	22.2	200	PLGA503	106	0.67	4
2	500	22.2	200	PLGA750S	188	0.73	13
3	500	22.2	0	PLGA750S	197	0.94	10
4	300	88.8	200	PLGA503	91	0.69	6
5	500	22.2	200	PLGA750S	220	0.79	13
6	400	82.1	100	PLGA503	118	0.73	3
7	500	88.8	0	PLGA750S	366	1.02	12
8	300	88.8	200	PLGA750S	142	0.88	2
9	500	88.8	200	PLGA503	132	0.99	8
10	300	88.8	0	PLGA750S	94	0.89	2
11	500	88.8	200	PLGA503	190	0.73	7
12	500	88.8	0	PLGA750S	185	0.80	4
13	500	88.8	0	PLGA503	130	0.83	5
14	300	22.2	0	PLGA503	94	0.67	5
15	400	33.9	100	PLGA503	124	0.80	5
16	300	22.2	200	PLGA750S	148	0.64	6
17	300	88.8	200	PLGA750S	126	0.98	2
18	500	22.2	0	PLGA750S	201	0.69	12
19	300	55.5	100	PLGA750S	146	0.85	3

SEM images (Fig. 12) revealed the morphology of the microparticles prepared with the copolymers PLGA503 and PLGA750S. All particles were rounded and had porous structures. The porosity can be attributed to the preparation method (W/O/W solvent evaporation technique); during solidification of the microparticles water channels connecting internal and external aqueous phases are formed due to the osmotic effect causing water influx into the microparticles (KLOSE et al., 2006; WANG; GUO, 2008; YE, KIM; PARK, 2010).

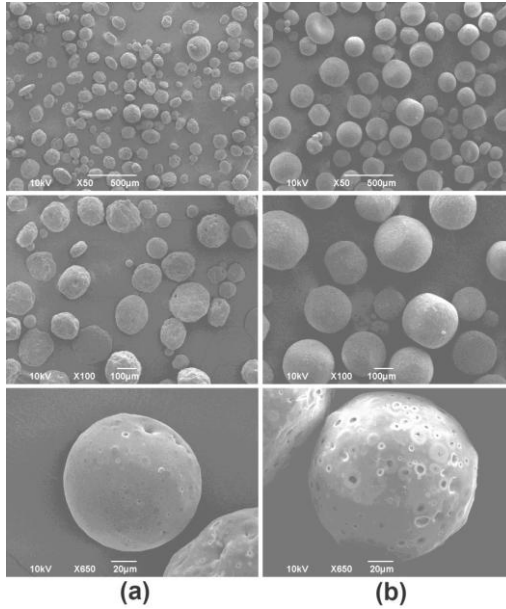


Figure 12: SEM photographs of *C. glazioui* SDE-loaded PLGA microparticles prepared with PLGA503 (RUN 6) (a) and PLGA750S (RUN 2) (b)

3.3. PARTICLE SIZE AND SIZE DISTRIBUTION

Factors A (amount of polymer) and D (type of polymer) affected the microparticles size ($p < 0.05$; Table 11). As show the Figure 13, larger concentrations of the polymer increased the particle size. The particles prepared from PLGA503 (i.v.: 0.32 – 0.44 dL/g) were smaller than those prepared from PLGA750S (i.v.: 0.8 – 1.2 dL/g), with ranges of 91–190 μm and 93–220 μm , respectively.

Table 11: Analysis of variance (p values) for the responses in Design 1

Polynomial term*	Particle size (linear model)		Span (linear model)		EE (linear model)	
	Coefficient	p value	Coefficient	p value	Coefficient	p value
M-Intercept	139.54	0.0004	0.79	0.0719	5.98	0.0052
A- Amount of polymer	29.57	0.0002	0.023	0.3907	2.60	0.0017
B- Amount of SDE	-3.26	0.5885	0.070	0.0145	-1.18	0.0951
C- Extraction phase volume	5.38	0.3813	-0.011	0.6866	0.40	0.5707
D- Type of polymer	24.19	0.0008	0.047	0.0709	1.11	0.1014
Lack of Fit	0.6480		0.9624		0.4636	

* The polynomial model in terms of the coded factors was defined as in AREND et al., 2011 where Y is the measured response associated with each independent variable level combination, M is the mean value, and A , B , C and D are the main variables (or factors). The polynomial model and the effects of the factors were considered significant when $p < 0.05$. Lack of Fit was considered adequate when $p > 0.05$.

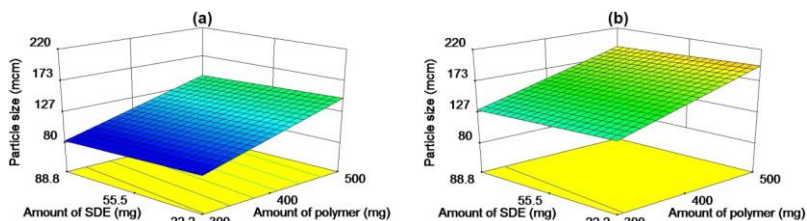


Figure 13: Influence of amount of polymer and SDE on the microparticle size (extraction phase volume = 100 mL). (a) PLGA 503, (b) PLGA 750 S

The particle size seems to be affected by the viscosity of the primary emulsion, which is dependent on the viscosity and concentration of the polymer (ANDRÉ-ABRANT, TAVERDET; JAY, 2001; YANG, CHUNG; PING NG, 2001; ITO, FUJIMORI; MAKINO, 2007; LI, ROUAUD; PONCELET, 2008;). In this case, the emulsification of a solution of high viscosity is more difficult to achieve and leads to a larger microparticle size in the preparation obtained by solvent evaporation/extraction employing the W/O/W emulsion technique (CAPAN et al., 1999; YANG, CHUNG; PING NG, 2001; PORJAZOSKA et al., 2004; FREITAS, MERKLE; GANDER, 2005; MAO et al., 2007; ITO, FUJIMORI; MAKINO, 2007, 2008; LI, ROUAUD; PONCELET, 2008;). In fact, the copolymer PLGA750S of higher viscosity and the formulations with a higher concentration of polymer provided a larger particle size (Fig. 13b). The span value is established from the relation of the values for the particle diameters corresponding to 10, 50 and 90% of the cumulative distribution for each sample (DOMINGUES et al., 2008). It is an indicator of the particle size distribution and was only affected by the amount of SDE (factor B). The span value was around 0.81, indicating a narrow size distribution.

3.4. ENCAPSULATION EFFICIENCY (EE)

The EE and loading capacity of the microparticles are dependent on the nature of the materials and also on the parameters used during the preparation of the microparticles (IZUMIKAWA et al., 1991; O'DONNELL; MCGINITY, 1997; ANDRÉ-ABRANT, TAVERDET; JAY, 2001; LI, ROUAUD; PONCELET, 2008; ITO, F.; FUJIMORI, H.; MAKINO, K., 2008). Authors agree that the properties of the microparticles are not easy to control in the double emulsion methods (MENG et al., 2003; QI, WANG; ZHU, 2011; YE, KIM; PARK, 2010). The step for removal of the solvent from the emulsion, for

example, is the most critical factor in these methods, because this process takes time and it is this step that may cause lower loading capacity and encapsulation efficiency and a high initial burst release. Microparticles are exposed to a considerable amount of water to remove the solvent. While the solvent is removed from the emulsion drug molecules can diffuse out and also can accumulate on the surface of microparticles resulting in the high initial burst release (YE, KIM; PARK, 2010).

Considering the drug solubility in the external phase, the drug loss in this phase occurs while the dispersed phase remains in a semi-solid state. When the solubility of the drug in the external phase is higher than that in the dispersed phase, the drug will easily diffuse into the external phase (BODMEIER; MCGINITY, 1988; YEO; PARK, 2004). This may occur in the case of the extract of *C. glazioui*, which is composed of hydrophilic substances.

The values for the encapsulation efficiency of the SDE were in the range of 2-13 % (Table 10). The analysis of variance of the results obtained in the experimental design showed that the formulation parameter factor A (amount of polymer) exhibited a significant effect on the EE (Table 11). The increase in EE observed with an increase in the amount of polymer can be interpreted in two ways: (i) when more concentrated, the polymer precipitates faster on the surface of the dispersed phase and prevents drug diffusion (RAFATI et al., 1997); (ii) the high concentration increases the viscosity of the solution and delays the drug diffusion within the polymer droplets (BODMEIER; MCGINITY, 1988; STURESSON et al., 1993; GHADERI, STURESSON; CARLFORS, 1996; SCHLICHER et al., 1997; PAINBENI, VENIER-JULIENNE; BENOIT, 1998; YEO; PARK, 2004; MAO et al., 2007;). In addition, the values of EE seem to be slightly higher when PLGA750S was used compared to PLGA503. However, there was no significant difference for this factor. As a result the EE was quite low (Table 10), in agreement with data published in the literature (WANG; GUO, 2008; QI, WANG; ZHU, 2011), due to the hydrophilic character of the extract. Thus, a new design was obtained in an attempt to improve the encapsulation efficiency of the microparticles.

3.5. PLGA MICROPARTICLE DEVELOPMENT: DESIGN 2

In this second experimental design the effect of the osmotic pressure in the external aqueous phase on the SDE encapsulation capacity of the microparticles was evaluated. This strategy adjusts the output of internal

aqueous phase and reduces the loss of extract into the external aqueous phase. Therefore, the effects of sodium chloride (NaCl) as an enhancer of osmotic pressure on the microparticle properties of particle size, morphology, EE and loading capacity were evaluated.

The independent variables evaluated in this new design were the stirring speed of the primary emulsion (rpm) (A) and the presence/concentration of NaCl (%) in the external aqueous phase (B). The fixed values used were: amount of SDE (55.5 mg), internal aqueous phase volume (0.5 mL), polymer type (PLGA503), amount of polymer (500 mg), volume of dichloromethane in the organic phase (5 mL), external phase volume (75 mL) and extraction phase volume (100 mL). The choice of these points was based on the results of Design 1. Formulations using PLGA503 showed higher yield values, *i.e.*, higher microparticle weight in relation to the amount of solid materials (polymer and extract) used in the process (data not shown). Formulations with a greater amount of polymer (500 mg) provided the best EE values. In the statistical evaluation the other factors previously evaluated were not found to be significant. As a control, microparticles without NaCl were included in this design to evaluate the influence of factors A and B, under the process conditions described above.

Table 12: Particle size, span, encapsulation efficiency and loading capacity of *C. glaziovii* SDE-loaded PLGA microparticles (Design 2)

Run	Factor A Rate (rpm)	Factor B NaCl (%)	Size (μm)	Span	EE (%)	Loading capacity (%)
1	21,500	3.00	126	0.67	35	3.56
2	21,500	3.00	103	0.73	30	3.36
3	21,500	0.00	182	0.94	3	0.35
4	17,500	2.00	73	0.69	20	1.99
5	13,500	3.00	114	0.79	40	3.96
6	13,500	0.00	128	0.73	2	0.21
7	13,500	3.00	106	1.01	24	2.38
8	17,500	2.00	96	0.88	21	2.06
9	21,500	0.00	140	0.99	3	0.30
10	13,500	3.00	110	0.89	25	2.48
11	13,500	0.00	160	0.73	2	0.23
12	17,500	3.00	100	0.80	42	4.24
13	17,500	0.00	173	0.83	6	0.63
14	17,500	1.00	125	0.67	11	1.09
15	21,500	1.00	111	0.80	16	1.66
16	13,500	1.00	129	0.64	9	0.87

Table 13: Analysis of variance (p values) for the responses in Design 2

Polynomial term*	Particle size (quadratic model)		Span (2FI model)		EE (model)	
	Coefficient	p value	Coefficient	p value	Coefficient	p value
M- Intercept	100.74	0.0104	0.5584	0.0129	3.84	< 0.0001
A- Stirring speed	2.37	0.6768	0.5584	0.5956	0.25	0.1157
B- Concentration of NaCl	-24.68	0.0010	0.5584	0.6190	1.93	< 0.0001
AB Interaction	-2.34	0.7062	0.5584	0.0016	---	---
A ²	2.48	0.8232	---	---	---	---
B ²	30.53	0.0312	---	---	---	---
Lack of Fit	0.4538		0.5584		0.4474	

*The polynomial model in terms of the coded factors was defined as in AREND et al., 2011, where Y is the measured response associated with each independent variable level combination, M is the mean value, A and B are the main variables (or factors), AB is the binary interaction between the factors and A^2 and B^2 are the quadratic factors. The polynomial model and the effects of the factors were considered significant when $p < 0.05$. Lack of Fit was considered adequate when $p > 0.05$.

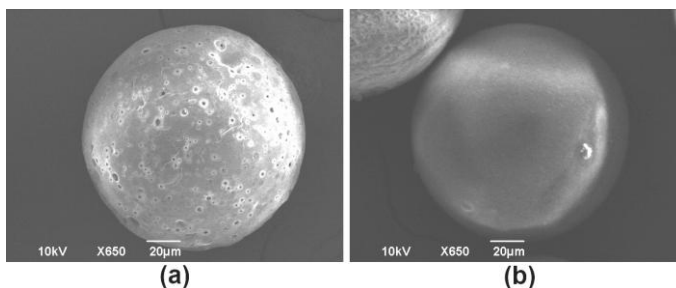


Figure 14: SEM pictures of surfaces of microparticles prepared under different conditions: (a) without NaCl in W_2 (RUN 13); (b) 3 % NaCl in W_2 (RUN 12)

The microparticle size decreased with the increase in NaCl concentration, independently of the primary emulsion stirring speed (Table 12; Fig. 15a). Based on the previous explanation, this effect is due to decreases in the water influx inside the microparticles.

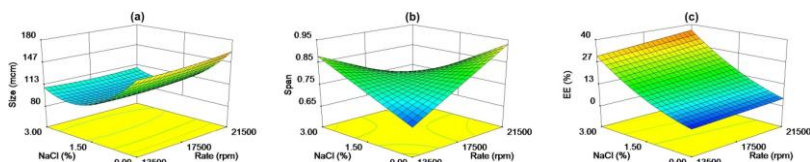


Figure 15: Influence of the primary emulsion stirring speed and concentration of NaCl on the microparticle size (a), span (b) and EE (c)

The span value, an indicator of particle size distribution, was around 0.80. The interaction between the two factors was significant (Table 13), the simultaneous increase in both resulted in a higher span value (Fig. 15b). Even with this increase, the span values can be considered to reflect a narrow distribution in all the formulations.

As observed in the Table 12, microparticles prepared without NaCl had a very low EE, indicating that the presence and concentration of salt in the external phase of the emulsion had a significant influence on the features of the microparticles. In fact, NaCl in the external aqueous phase plays a critical role in terms of the microparticle properties, due to the osmotic pressure gradients between the two aqueous phases. Thus, the water influx attributed to the osmotic effect during particle formation decreases significantly (O'DONNELL;

MCGINITY, 1997; PÉAN et al., 1998; HAN et al., 2001; HE et al., 2006; WANG; GUO, 2008; YE, KIM; PARK, 2010). As a consequence, in the case of microparticles produced without NaCl rounded symmetrical pores were formed on the surface, while with the addition of salt a dense and homogenous polymer matrix was formed. The surface of the microparticles was smooth and compact with few pores. The results also indicated that the porosity further decreased with an increase in the concentration of NaCl in the external phase (Fig. 14).

In this design, the influence of the osmotic pressure on the encapsulation efficiency was revealed. Osmotic pressure was controlled by adding salt to the external aqueous phase; the microparticles with different concentrations of NaCl showed an increase in the EE (Fig. 15). The EE and loading capacity gradually increased with increasing concentration of NaCl. The balancing of the osmotic gradient decreases the drug diffusion into the external phase. The balancing of the osmotic pressure of the internal and external aqueous phases seems to be the key to obtaining a high EE.

3.6. IN VITRO DRUG RELEASE BEHAVIOR

The *in vitro* extract release profiles showed distinct time phases depending on the presence and concentration of NaCl in the formulations (Fig. 16). The addition of NaCl to the external aqueous phase of the microparticles induced a decrease in the particle size and an increase in the encapsulation efficiency by changing the porosity of the particle surface (WANG; GUO, 2008; GASPARINI, HOLDICH; KOSVINTSEV, 2010). This effect occurs through the osmotic pressure balance. The presence and an increase in the amount of NaCl in the microparticles significantly influenced the percentage of the extract release.

In the microparticles without balancing of the osmotic pressure (absence of NaCl), the release was not controlled and instead there was a rapid release via drug diffusion through the pores of the microparticles. The microparticle surface has large pores promoting channels for medium penetration. The porosity plays a role in modulating the drug release (FREIBERG; ZHU, 2004) and a large number of pores may greatly increase the rate of drug expulsion (YANG, CHUNG; PING NG, 2001).

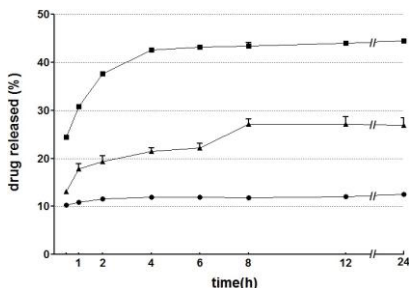


Figure 16: Release profile from *C. glazioui* SDE-based microparticles in dissolution medium prepared with a different concentration of NaCl in the external aqueous phase; (▪) 3 % NaCl/extraction; (▲) 3 % NaCl/evaporation; (•) 5 % NaCl/extraction

The influence of the form of solvent elimination, evaporation or extraction, on the *in vitro* extract release profiles was evaluated for the microparticles with 3 % NaCl. Different results were observed for the EE, loading capacity and release profile of the microparticles (Table 14). In the first evaluation, after 30 min, the amounts of extract released from the 3 % NaCl/evaporation and 3 % NaCl/extraction formulations were 13 % and 24 %, respectively. The microparticles with 3% NaCl/evaporation presented a slower release rate, reaching 27 % of the total release after 24 h of exposure to the release medium. The microparticles containing 3 % NaCl/extraction exhibited a slightly better release phase, 45 %, within the same exposure time. This release pattern observed in the drug release profile, which can be divided into two phases, is consistent with many matrix-type drug delivery systems; the rapid release phase representing drug release by diffusion through the pores, and a slow release phase representing drug release by diffusion through the polymer matrix (O'DONNELL; MCGINITY, 1997).

Table 14: Values for the EE, loading capacity and size of the microparticles prepared with different concentration of NaCl for the release study

Sample	NaCl (%)	EE (%)	Loading capacity (%)	Method	Size (µm)
A	0	20.03	2.00	Extraction	203.84
B	3	60.85	6.09	Extraction	176.75
C	3	49.80	4.97	Evaporation	194.32
D	5	49.98	5.54	Extraction	171.10

Microparticles containing 5 % NaCl were prepared under the same conditions applied to obtain the other formulations in order to evaluate the EE and loading capacity values, which showed no significant increased. The release study for these microparticles showed an initial liberation of 10% after 30 min and total release of 13 % of extract after 24 h. In this case, a higher concentration of NaCl led to an increase in the EE and modified the drug release through modulating the osmotic pressure (WANG; GUO, 2008). The differences in the release behavior of the microparticles can be correlated with the changes in the surface morphology; the presence of the salt resulted in surfaces without pores and decreased the drug diffusion into the release medium.

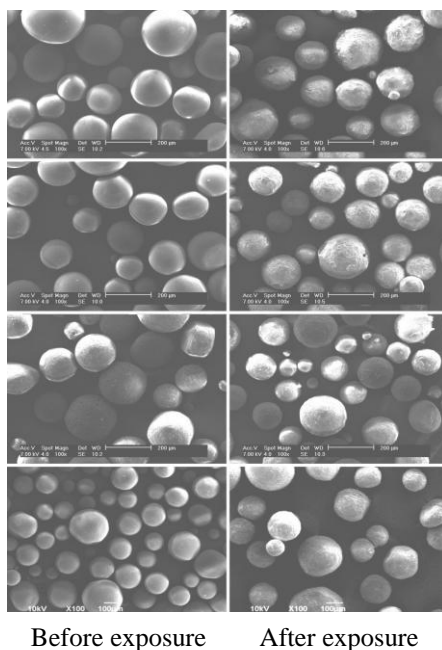


Figure 17: Morphology of extract-loaded microparticles before and after exposure to dissolution medium.(a) 3 % NaCl/extraction; (b) 3 % NaCl/evaporation; (c) without NaCl; (d) 5 % NaCl/extraction

SEM images (Fig. 17) of the microparticles after *in vitro* release test (24 h) revealed that the diffusion of the medium into the microparticles resulted in the formation of a soft surface layer. The presence of medium in this surface layer also results in an increase in its volume. Thus, there was a significant increase in size ($p < 0.0001$) for the microparticles with NaCl present in the formulation (data not shown). The drug release showed an initial release followed by a lag time. The lag time seems to match the period of particle swelling (GASPARINI, HOLDICH; KOSVINTSEV, 2010). The wrinkling of the surface is characteristic of the swelling of the soft surface layers (VEY et al., 2008). It is expected that there would be matrix degradation on applying a more prolonged test since the erosion of PLGA begins after around 10 days. It usually occurs in a homogeneous way with a progressive loosening or swelling of the matrix (CHANDRA; RUSTGI, 1997; AL-MAAIEH; FLANAGAN, 2001; GASPARINI, HOLDICH; KOSVINTSEV, 2010). More studies are needed to better determine the association between the different release profiles and the polymer behavior and characteristics. It is necessary, in future studies, to monitor changes in the physicochemical properties of the microparticles during the extract release.

In conclusion, the results of this study demonstrate that with the optimum extraction parameters the SDE had a significant vasorelaxant activity. The extent of the relaxation was similar to that caused by the positive control acetylcholine. The independent variables evaluated in Design 1 resulted in the formation of rounded and porous particles with quite low EE values. The addition of NaCl to the external aqueous phase (Design 2) can modify the morphology and release profile of the microparticles. Other biological and analytical assays still need to be performed and in future studies *in vivo* investigations based on the formulations will be conducted in order to obtain further results. In addition, the parameters which influence the properties of the microparticles have to be carefully taken into account when developing this type of drug delivery system.

Acknowledgements

The first author would like to thank the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-if)/CAPES by scholarship. This study was also financed by FAPESC and FUNPESQUISA/UFSC. The authors also thank Anderson Porfírio for collaboration with the graphical illustrations and Siobhan Wiese for revising the manuscript.

DISCUSSÃO GERAL

Mesmo representando uma prática antiga, o uso de plantas medicinais vem crescendo ao longo dos tempos, principalmente pelo baixo custo e acesso fácil (VEIGA JUNIOR, PINTO; MACIEL, 2005; SANTOS et al., 2011). Essas tradições populares têm despertado o interesse de pesquisadores e acabam, muitas vezes, servindo de base para estudos científicos.

O gênero *Cecropia* é amplamente utilizado na medicina popular para tratamento de bronquite, asma, hipertensão arterial e como ansiolítico (RAMOS ALMEIDA et al., 2006). Estudos relacionados com *C. glaziovii* demonstraram que soluções extrativas desta planta estão relacionadas, além de outras atividades, à ação anti-hipertensiva e hipotensora (LIMA-LANDMAN et al., 2007). Resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa mostraram que o extrato liofilizado preparado por maceração com concentração etanólica de 20 % (V/V) e concentração de droga 5 % foi ativo no teste de reatividade vascular em anéis de aorta de ratos, evidenciando uma ação vasorelaxante bastante promissora, principalmente considerando tratar-se de um extrato não fracionado, concentrado ou enriquecido. O mesmo extrato foi testado em dois modelos para avaliação da atividade anti-hiperglicêmica e apresentou ação na redução da glicemia em ratos hiperglicêmicos, indicando uma atividade anti-hiperglicêmica ainda não relatada para esta espécie (AREND, 2010).

Tendo em vista a importância da *C. glaziovii* na medicina tradicional e os resultados promissores obtidos em estudos científicos, resolveu-se aliar a este conhecimento uma ferramenta tecnológica, desenvolvendo um sistema multiparticulado contendo o extrato seco padronizado. A microencapsulação neste caso tem potencial para melhorar a eficácia e biodisponibilidade do extrato seco vegetal, bem como reduzir os efeitos na instabilidade dos componentes ativos que eventualmente podem ocorrer. Por outro lado, sendo uma formulação destinada à via oral, representa uma estratégia adequada para liberação de fármacos, principalmente por evitar dor e inconvenientes após aplicações invasivas (AULTON, 2005; ANSEL, POPOVICH; ALLEN, 2007).

Sendo assim, o trabalho foi dividido em duas partes, a primeira parte envolvendo a otimização do extrato seco de *C. glaziovii* seguida de uma etapa de desenvolvimento de um sistema microparticulado. A aplicação de metodologia de superfície de resposta foi usada como uma ferramenta na avaliação da influência das variáveis, tanto no processo extrativo para otimização do extrato seco quanto no desenvolvimento das micropartículas.

O efeito dos fatores concentração de droga, concentração etanólica do líquido extrator e tempo de extração foram avaliados a partir dos resultados de análise de variância dos valores de resíduo seco e teor dos marcadores

químicos, os ácidos clorogênico (ACG) e cafeico (ACF), por maceração. As condições ótimas de extração foram determinadas, no sentido de maximizar a extração simultânea dos compostos polifenólicos, representados pelos marcadores químicos.

Como resultados, o resíduo seco representou valores crescentes com o aumento da concentração de droga (fig. 6, p. 51). Na extração de cada um dos marcadores químicos, o efeito dos fatores e suas possíveis interações repercutiram de diferentes maneiras. O maior teor de ACG foi alcançado com o aumento da concentração de droga e teor etanólico em menor tempo de maceração (fig. 7, p. 52). No caso do ACF, maiores concentrações de droga e menores teores de etanol favoreceram sua extração, sendo que o fator tempo não mostrou influência significativa (fig. 8, p. 52). Desta forma, para otimização do extrato considerou-se todas as combinações e níveis de respostas levando a uma condição ótima de extração com 18 % de droga, etanol a 27% como líquido extrator e maceração durante 3 dias (fig. 9, p. 54). Após caracterização do extrato quanto a resíduo seco e teor dos marcadores químicos, a capacidade vasodilatadora da solução extrativa foi estimada em anéis de aorta de ratos contraídos com fenilefrina ($1\mu\text{mol/L}$), demonstrando uma capacidade vasodilatadora dependente de endotélio semelhante ao controle acetilcolina, $92,59 \pm 2,37$ e $98,77 \pm 3,83$ %, respectivamente (fig. 10 e 11, p. 55 e 69).

O próximo passo do trabalho foi desenvolver micropartículas contendo extrato seco otimizado usando como matriz polimérica o ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA). Este polímero oferece propriedades importantes de biocompatibilidade e ausência de toxicidade no uso em humanos (GASPARINI et al., 2008), possibilitando o controle da liberação da molécula encapsulada, controle este que pode ser modulado segundo seu peso molecular e a relação entre ácido lático e glicólico que compõem sua estrutura (LIMA; RODRIGUES JÚNIOR, 1999). A técnica de encapsulação escolhida foi dupla emulsão a/o/a com evaporação do solvente por ser a mais indicada para encapsular compostos hidrofílicos. A dupla emulsão é formada por gotículas da fase oleosa que revestem gotas menores da fase aquosa interna contendo o extrato. Esta estrutura é capaz de manter a liberação e aumentar a biodisponibilidade oral da droga (QI, WANG; ZHU, 2011).

Para preparação das micropartículas, os fatores quantidade de polímero, quantidade de extrato, volume de fase de extração e tipo de polímero, foram estudados usando um planejamento de superfície de resposta (*design* 1), considerando a formação das partículas, o tamanho, polidispersão e eficiência

de encapsulação (EE) (*design* 1, tabela 10, p. 71). Nas imagens por MEV as micropartículas apresentaram forma arredondada com presença de poros na superfície (fig. 12, p. 72). O tamanho de partícula variou de 91 a 220 μm , sendo que as micropartículas preparadas com PLGA 750S foram maiores devido à maior viscosidade da primeira emulsão. A polidispersão de tamanhos nas diferentes formulações foi calculada através do valor de span, cuja média foi de 0,80, indicando que todas as formulações apresentam uma baixa dispersão, podendo ser consideradas homogêneas quanto a este parâmetro. Quanto à EE, para todas as formulações os valores foram inferiores a 15 %, o que foi considerado insatisfatório, mesmo considerando que uma baixa encapsulação é um resultado esperado quando se encapsula substâncias hidrofílicas (tabela 10, p. 71). Este fenômeno pode ser explicado pela utilização da técnica de preparação por dupla emulsão seguida de evaporação/extração do solvente. Nesta técnica, as gotas de solvente orgânico que vão formar as micropartículas permanecem na fase aquosa externa por um período relativamente grande para evaporação do solvente, o que leva à formação de canais de água (poros) em suas superfícies devido ao efeito osmótico. A passagem da fase aquosa externa para o interior das micropartículas permite a saída da droga pelos poros formados na estrutura polimérica, diminuindo assim a EE (fig. 3, p. 33).

Na tentativa de contornar esta situação, um novo delineamento de superfície de resposta (*design* 2) foi estruturado considerando como variáveis independentes a velocidade de agitação da primeira emulsão e concentração de cloreto de sódio. Para o *design* 2 foram estabelecidos alguns pontos fixos, considerando os resultados do *design* 1: quantidade de extrato, quantidade de polímero, tipo de polímero, volume de diclorometano, volume de fase de extração e volume de fase aquosa externa. Como controle, formulações foram preparadas sem a presença de NaCl e, desta forma, pôde-se constatar que o único fator influente nas respostas avaliadas (tamanho, polidispersão e EE) foi a presença e concentração de sal, cujo aumento resultou em aumento significativo da EE. Esta variou de 2 % (formulação sem sal) a 42 % (máxima concentração de sal adicionada, 3 %) (tabela 12, p. 78). Outras consequências da presença e da concentração de NaCl foram a formação de partículas com superfície mais lisa e compacta (fig. 14, p. 80) com redução no tamanho, porém mantendo o baixo valor de span, o que indica que não houve comprometimento da homogeneidade de tamanhos nas formulações com uma polidispersão estreita. Estes resultados podem ser atribuídos ao aumento da pressão osmótica promovida pelo NaCl. Desta forma a entrada da água da fase

externa em direção ao interior da partícula é dificultada, não havendo a formação de poros e nem aumento no volume da partícula. Como consequência, há uma menor perda de extrato para o meio externo, aumentando a EE (fig. 15c, p. 80).

Tendo em vista os resultados do *design 2*, algumas formulações foram selecionadas para avaliar o perfil de liberação das micropartículas (tabela 14, p. 82). Como a velocidade de agitação da primeira emulsão não teve influência no preparo das micropartículas, a velocidade 17.500 rpm foi mantida juntamente com os outros parâmetros já fixados no preparo das formulações para o estudo do perfil de liberação. Este estudo foi realizado em aparato USP 2 com tampão fosfato pH 6,8, 50 $\mu\text{mol/L}$ contendo 20 % (V/V) de etanol mantido à 37 °C, agitação de 70 rpm por um período de 24 horas, as alíquotas coletadas em tempos determinados foram lidas por espectrofotometria à 287 nm. As formulações escolhidas para o teste foram compostas por: 0 % de NaCl, 3% de NaCl/extração, 3 % de NaCl/evaporação e 5 % de NaCl. Micropartículas sem a presença de NaCl apresentaram liberação rápida através da difusão do extrato pelos poros das partículas. Concentrações maiores de NaCl tornaram a liberação mais lenta devido à redução da porosidade na superfície das micropartículas (fig. 16, p. 82).

CONCLUSÕES

- A padronização da extração de *C. glaziovii* visando obter concentrações máximas de ACG e ACF pela técnica de maceração foi realizada utilizando um planejamento experimental metodologia de superfície de resposta (MSR) que mostrou ser adequada para analisar os efeitos e as interações entre as variáveis analisadas.
- Na etapa de caracterização os valores de pH foram semelhantes para todas as soluções extrativas obtidas. Por outro lado, o resíduo seco aumentou com concentrações maiores de droga, indicando que não houve saturação do solvente nas condições de extração avaliadas.
- Na extração de cada marcador químico, as variáveis influenciaram de maneira diferenciada. Maiores concentrações de droga e etanol em um menor tempo de maceração favoreceram a extração do ACG. Maiores concentrações de droga e menores concentrações de etanol resultaram em maior concentração do ACF, mas, neste caso, o fator tempo não apresentou influência.
- A otimização do extrato foi estabelecida por meio da função desejabilidade (*desirability*), indicando que as condições ótimas para a extração foram com 18 % de droga, concentração etanólica de 27 % e 3 dias de maceração.
- A capacidade vasorelaxante do extrato otimizado apresentou-se semelhante ao controle positivo acetilcolina, 92.59 (\pm 2.368) e 98.77 (\pm 3.828) respectivamente. A atividade vasorelaxante não foi constatada em anéis de aorta com endotélio removido.
- As micropartículas inicialmente obtidas apresentaram superfícies altamente porosas, com tamanho de partícula que variou de 91 a 220 μm , sendo que tamanhos maiores foram observados nas formulações com PLGA750S, todas as formulações mantiveram uma polidispersão normal. O percentual de extrato encapsulado nas micropartículas em relação ao adicionado inicialmente foi muito baixo em todas as formulações, resultado atribuído ao caráter hidrofílico do extrato.
- O efeito de pressão osmótica provocado pela presença de NaCl na fase externa aquosa da dupla emulsão resultou na formação de micropartículas de superfície lisa e compacta com pouca porosidade e redução do tamanho (73 a 182 μm).

Os valores de EE aumentaram significativamente variando de 2 a 42 % dependendo da concentração de sal.

- A presença de NaCl na composição das micropartículas, além de ser um fator chave no aumento da EE das micropartículas, também mostrou ser influente em outros importantes parâmetros das micropartículas: o controle da pressão osmótica provocou alterações na morfologia, tamanho e EE, bem como no perfil de liberação, que se mostrou distinto para cada uma das condições avaliadas.
- Nas formulações que não continham NaCl não houve o controle da liberação do extrato, que foi totalmente liberado já no primeiro tempo avaliado. O aumento da concentração de sal (3 e 5 %) resultou na diminuição da liberação do extrato. Por outro lado, a técnica de eliminação do solvente, avaliada em formulações contendo 3 % de NaCl, mostrou-se bastante influente: na extração observou-se uma liberação de 45 % do extrato encapsulado em 24 horas; na evaporação houve um maior controle, liberando 27 % do extrato encapsulado.

REFERÊNCIAS

AL-MAAIEH, A.; FLANAGAN, D. R. Salt and cosolvent effects on ionic drug loading into microspheres using an O/W method. *Journal of Controlled Release*, v. 70, n. 1–2, p. 169-181, 2001.

ANDRÉ-ABRANT, A.; TAVERDET, J.-L.; JAY, J. Microencapsulation par évaporation de solvant. *European Polymer Journal*, v. 37, n. 5, p. 955-963, 2001.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, J. R. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 8. ed. Porto Alegre, 2007.

AREND, D. P. Desenvolvimento de sistema microestruturado contendo extrato padronizado de *Cecropia glaziovii* sneth (embaúba). 168 f. Dissertação (mestrado) - *Programa de Pós-graduação em Farmácia*, Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis, 2010.

AREND, D. P. et al. Experimental design as a tool to evaluate chlorogenic and caffeic acids extracted from *Cecropia glaziovii* Sneth. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 54, n. 1, p. 58-66, 2011.

AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. (Pharmaceutics: The science of dosage forms design). Porto Alegre, 2005. (Tradução: ORTEGA, G.G. et al.).

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, v. 32, p. 679-688, 2009.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A. et al. Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International*, v. 44, n. 4, p. 1094-1101, 2011.

BENOIT, J.-P. et al. Development of microspheres for neurological disorders: From basics to clinical applications. *Journal of Controlled Release*, v. 65, n. 1–2, p. 285-296, 2000.

BERG, C. C.; FRANCO ROSSELLI, P. *Cecropia*. *Flora Neotropica/ The New York Botanic Garden*. New York, 94, p. 1-230, 2005.

BERKLAND, C. et al. Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate. *Journal of Controlled Release*, v. 82, n. 1, p. 137-147, 2002.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BODMEIER, R.; MCGINITY, J. W. Solvent selection in the preparation of poly(dl-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 43, n. 1-2, p. 179-186, 1988.

BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília: 2006. Diário Oficial da União – Seção 1, Nº 119, sexta-feira, 23 de junho de 2006.

BRASIL. Hipertensão arterial sistêmica para o Sistema Único de Saúde/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília, 2006. p. 58. (Cadernos de Atenção Básica; 16) (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Farmacopéia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. p. 546.

BRASIL. Vigitel Brasil 2010: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Brasília, 2011. p. 152. (Série G. Estatística e Informação em Saúde).

BRUNETON, J. *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales*. 2. ed. Zaragoza, 2001.

BUNDESVEREINIGUNG Deutscher Apothekerverbaende (Hrgs.) Deutsche Arzneimittel - Codex. Frankfurt: Govi, Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1986. v.1: Codex-Probe 4, p. 9.

CAMPANA, P. R. V.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta by *Mansoa hirsuta* D.C. *Phytomedicine*, v. 16, n. 5, p. 456-461, 2009.

CAPAN, Y. et al. Influence of formulation parameters on the characteristics of poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres containing poly(l-lysine) complexed plasmid DNA. *Journal of Controlled Release*, v. 60, n. 2-3, p. 279-286, 1999.

CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, p. 519, 2004.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre, 2004.

CAVALCANTI, O. A.; BUTTOW, N. C. Perspectivas dos sistemas de liberação colo-específicos. *Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar*, v. 3, p. 227-238, 1999.

CHAN, E.-S. et al. Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with ca-alginate hydrogel beads. *Food and Bioproducts Processing*, v. 88, n. 2-3, p. 195-201, 2010.

CHAN, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere*, v. 52, n. 9, p. 1361-1371, 2003.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradation of maleated linear low-density polyethylene and starch blends. *Polymer Degradation and Stability*, v. 56, n. 2, p. 185-202, 1997.

CONSOLINI, A. E.; MIGLIORI, G. N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, n. 3, p. 417-422, 2005.

COSTA, G. M. et al. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* Species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 1096-1102, 2011.

- CUNHA, G. A. D. et al. Hipotensão pós-exercício em hipertensos submetidos ao exercício aeróbio de intensidades variadas e exercício de intensidade constante. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 12, p. 313-317, 2006.
- DAWIDOWICZ, A. L.; TYPEK, R. Thermal Stability of 5-o-Caffeoylquinic Acid in Aqueous Solutions at Different Heating Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 24, p. 12578-12584, 2010.
- DELARCINA, S. et al. Inhibition of histamine-induced bronchospasm in guinea pigs treated with *Cecropia glaziovii* Sneth and correlation with the in vitro activity in tracheal muscles. *Phytomedicine*, v. 14, n. 5, p. 328-332, 2007.
- DERRINGER, G. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Tecnology*, v. 12, n. 4, p. 214-220, 1980.
- DIETER, B. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, n. 1-3, p. 129-135, 1998.
- DOMINGUES, G. S. et al. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. *Química Nova*, v. 31, p. 1966-1972, 2008.
- EDLUND, U.; ALBERTSSON, A. Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery Degradable Aliphatic Polyesters: Springer Berlin / Heidelberg, 2002. p. 67-112. (*Advances in Polymer Science*).
- FELTRIN, E. P.; CHORILLI, M. Extratos Secos Padronizados: Tendência Atual em Fitoterapia. *Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*, v. 7, p. 109-115, 2010.
- FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 282, n. 1-2, p. 1-18, 2004.
- FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*, v. 102, n. 2, p. 313-332, 2005.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

GANEM, ROSELI SENNA (org.). Conservação da biodiversidade : legislação e políticas públicas. Brasília : Câmara dos Deputados, Edições Câmara, 2010. p. 437 (Série memória e análise de leis ; n. 2).

GASPARINI, G.; HOLDICH, R. G.; KOSVINTSEV, S. R. PLGA particle production for water-soluble drug encapsulation: Degradation and release behaviour. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 75, n. 2, p. 557-564, 2010.

GASPARINI, G. et al. Preparation and characterization of PLGA particles for subcutaneous controlled drug release by membrane emulsification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 61, n. 2, p. 199-207, 2008.

GHADERI, R.; STURESSON, C.; CARLFORS, J. Effect of preparative parameters on the characteristics of poly d,l-lactide-co-glycolide) microspheres made by the double emulsion method. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 141, n. 1-2, p. 205-216, 1996.

GITEAU, A. et al. How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? *International Journal of Pharmaceutics*, v. 350, n. 1-2, p. 14-26, 2008.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, n. 7-8, p. 330-347, 2004.

GUSE, C. et al. Programmable implants—From pulsatile to controlled release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 314, n. 2, p. 161-169, 2006.

HAN, K. et al. Preparation and evaluation of poly(l-lactic acid) microspheres containing rhEGF for chronic gastric ulcer healing. *Journal of Controlled Release*, v. 75, n. 3, p. 259-269, 2001.

HARTKE, K. & MUTSCHELER, E. Deutsches Arzneibuch - 9. Ausgabe 1986 Kommentar. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1987. p.305-306.

HE, J.-T. et al. Stabilization and encapsulation of a staphylokinase variant (K35R) into poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 309, n. 1-2, p. 101-108, 2006.

ICH. International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2(R1). London, 2005.

ITO, F.; FUJIMORI, H.; MAKINO, K. Incorporation of water-soluble drugs in PLGA microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 54, n. 2, p. 173-178, 2007.

ITO, F.; FUJIMORI, H.; MAKINO, K. Factors affecting the loading efficiency of water-soluble drugs in PLGA microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 61, n. 1, p. 25-29, 2008.

IZUMIKAWA, S. et al. Preparation of poly(l-lactide) microspheres of different crystalline morphology and effect of crystalline morphology on drug release rate. *Journal of Controlled Release*, v. 15, n. 2, p. 133-140, 1991.

KASAI, H. et al. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. *Food and Chemical Toxicology*, v. 38, n. 5, p. 467-471, 2000.

KLOSE, D. et al. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 314, n. 2, p. 198-206, 2006.

KLOSE, D. et al. Drug release from PLGA-based microparticles: Effects of the “microparticle:bulk fluid” ratio. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 383, n. 1-2, p. 123-131, 2010.

KOGA, K.; TAKARADA, N.; TAKADA, K. Nano-sized water-in-oil-in-water emulsion enhances intestinal absorption of calcein, a high solubility and low permeability compound. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 74, n. 2, p. 223-232, 2010.

KONO, Y. et al. The suppression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid. *Biochem. Journal*, v. 312, p. 947-953, 1995.

KUMARAN, K. S.; PRINCE, P. S. M. Protective effect of caffeic acid on cardiac markers and lipid peroxide metabolism in cardiotoxic rats: an in vivo and in vitro study. *Metabolism: clinical and experimental*, v. 59, n. 8, p. 1172-1180, 2010.

LAMPRECHT, A.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. "pH-sensitive microsphere delivery increases oral bioavailability of calcitonin." *Journal of Controlled Release*, v. 98(1), p. 1-9, 2004.

LAPA et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, p. 260, 2004.

LARANJINHA, J. A. N.; ALMEIDA, L. M.; MADEIRA, V. M. C. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: Antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, v. 48, n. 3, p. 487-494, 1994.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 363, n. 1-2, p. 26-39, 2008.

LIMA-LANDMAN, M. T. R. et al. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An in vivo approach to the hypotensive mechanism. *Phytomedicine*, v. 14, n. 5, p. 314-320, 2007.

LIMA, K. M.; RODRIGUES JÚNIOR, J. M. Poly-DL-lactide-co-glycolide microspheres as a controlled release antigen delivery system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32, 1999.
colocar linder 2007

- LONGHINI, R. et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 3, p. 388-395, 2007.
- MAO, S. et al. Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 334, n. 1-2, p. 137-148, 2007.
- MENG, F. T. et al. W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 91, n. 3, p. 407-416, 2003.
- MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese, caracterização e degradação "in vitro" do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). *Revista Matéria*, v. 11, p. 340-350, 2006.
- MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*, v. 3, n. 4, p. 793-829, 2011.
- MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. Response Surface Methodology: Product and Process Optimization Using Designed Experiments. *Second. ed.: Wiley&Sons Inc., 2002.*New York, 2002.
- NARDINI, M. et al. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 19, n. 5, p. 541-552, 1995.
- NASCIMENTO, L. R. et al. Sensibilidade e especificidade no diagnóstico de hipertensão por diferentes métodos. *Revista de Saúde Pública*, v. 45, p. 837-844, 2011.
- NINAHUAMAN, M. F. M. L. et al. ACE activity during the hypotension produced by standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth: A comparative study to captopril effects in rats. *Phytomedicine*, v. 14, n. 5, p. 321-327, 2007.
- O'DONNELL, P. B.; MCGINITY, J. W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 28, n. 1, p. 25-42, 1997.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. *The Journal of Nutrition*, v. 131, n. 1, p. 66-71, 2001.

O'REGAN, J.; MULVIHILL, D. M. Sodium caseinate–maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. *Food Research International*, v. 43, n. 1, p. 224-231, 2010.

ONWULATA, C. I. Encapsulation of New Active Ingredients. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 3, n. 1, 2012.

PAINBENI, T.; VENIER-JULIENNE, M. C.; BENOIT, J. P. Internal morphology of poly(d,l-lactide-co-glycolide) BCNU-loaded microspheres. Influence on drug stability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 45, n. 1, p. 31-39, 1998.

PARKAR, S. G.; STEVENSON, D. E.; SKINNER, M. A. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International Journal of Food Microbiology*, v. 124, n. 3, p. 295-298, 2008.

PASQUALOTO, K. F. M. et al. Utilização de probióticos como instrumento estatístico simples à avaliação da distribuição de tamanho de partícula de dois tipos de celulose microcristalina. *Rev Bras Farm*, v. 86, p. 31-34, 2005.

PAYNTER, N. P. et al. Coffee and Sweetened Beverage Consumption and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus. *American Journal of Epidemiology*, v. 164, n. 11, p. 1075-1084, 2006.

PÉAN, J.-M. et al. NGF release from poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. Effect of some formulation parameters on encapsulated NGF stability. *Journal of Controlled Release*, v. 56, n. 1-3, p. 175-187, 1998.

PÉREZ-GUERRERO, C. et al. A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, n. 3, p. 279-284, 2001.

PORJAZOSKA, A. et al. Poly(lactide-co-glycolide) microparticles as systems for controlled release of proteins – Preparation and characterization. *Acta Pharmaceutica Scientia*, v. 54, p. 215-229, 2004.

QI, X.; WANG, L.; ZHU, J. Water-in-oil-in-water double emulsions: An excellent delivery system for improving the oral bioavailability of pidotimod in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 100, n. 6, p. 2203-2211, 2011.

RAFATI, H. et al. Protein-loaded poly(dl-lactide-co-glycolide) microparticles for oral administration: formulation, structural and release characteristics. *Journal of Controlled Release*, v. 43, n. 1, p. 89-102, 1997.

RAMOS ALMEIDA, R. et al. Activity of *Cecropia lyratiloba* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in wistar rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 33, n. 1-2, p. 109-113, 2006.

RAVIVARAPU, H. B.; BURTON, K.; DELUCA, P. P. Polymer and microsphere blending to alter the release of a peptide from PLGA microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, n. 2, p. 263-270, 2000.

REGAN, J. O.; MULVIHILL, D. M. Water soluble inner aqueous phase markers as indicators of the encapsulation properties of water-in-oil-in-water emulsions stabilized with sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, v. 23, n. 8, p. 2339-2345, 2009.

ROCHA, F. F.; LAPA, A. J.; DE LIMA, T. C. M. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glazioui* Sneth in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 71, n. 1-2, p. 183-190, 2002.

ROCHA, F. F. et al. Antidepressant-like effect of *Cecropia glazioui* Sneth and its constituents – In vivo and in vitro characterization of the underlying mechanism. *Phytomedicine*, v. 14, n. 6, p. 396-402, 2007.

RODRIGUES, P. O.; GONÇALVES, T. C.; SILVA, W. B. D. Influência de Diferentes Sistemas de Solventes no Processo de Extração de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 23, p. 27-31, 2004.

ROSINA, C. R.; BARONI, S.; CAVALCANTI, O. A. Avaliação das propriedades de intumescimento e permeabilidade de filmes isolados de polimetacrilato contendo polissacarídeo da raiz de Lótus (*Nelumbo nucifera*). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, p. 425-431, 2004.

ROSSANEZI, G. Micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada intraocular de cetorolaco de trometamina obtidas por Spray drying . 64 f. Dissertação (Mestrado) – *Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas*, Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

SANT, S. et al. Microfabrication technologies for oral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011.

SANTOS, R. L. et al. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* [S.I.], v. 13, p. 486-491, 2011.

SBH. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 95, p. I-III, 2010.

SCHLICHER, E. J. A. M. et al. Preparation and characterisation of Poly (d,l-lactic-co-glycolic acid) microspheres containing desferrioxamine. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 153, n. 2, p. 235-245, 1997.

SHIBATA, H. et al. Natural antioxidant, chlorogenic acid, protects against DNA breakage caused by monochloramine. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 63, n. 7, p. 1295-1297, 1999.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, p. 1-20, 2003.

SILVA, I. T. et al. In vitro antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 143-148, 2010.

SOUCCAR, C. et al. Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism. *Phytomedicine*, v. 15, n. 6-7, p. 462-469, 2008.

SOUZA, C. R. F. Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras: estudo da viabilidade técnica e econômica do processo em leite de jorro. (2007). 219 f. (Doutorado) - *Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto*, 2007.

STANGE, V. S. et al. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de bioensaios in vivo e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), *Cecropiaceae*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, p. 637-642, 2009.

STEVANOVIC, M.; USKOKOVIC, D. Poly(lactide-co-glycolide)-based Micro and Nanoparticles for the Controlled Drug Delivery of Vitamins. *Current Nanoscience*, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2009.

STOCLET, J.-C. et al. Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, v. 500, n. 1-3, p. 299-313, 2004.

STURESSON, C. et al. Preparation of biodegradable poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres and their in vitro release of timolol maleate. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 89, n. 3, p. 235-244, 1993.

SU, Y. L. et al. Microencapsulation of *Radix salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. *Powder Technology*, v. 184, n. 1, p. 114-121, 2008.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Health and Environment Journal*, v. 7, p. 12-20, 2006.

SUN, X. et al. Capillary electrophoresis with amperometric detection of curcumin in Chinese herbal medicine pretreated by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, v. 962, n. 1-2, p. 117-125, 2002.

SUZUKI, A. et al. Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.*, v. 25, p. 99-107, 2002.

TANAE, M. M. et al. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiaacid secretion and antidepressant-like activities. *Phytomedicine*, v. 14, n. 5, p. 309-313, 2007.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature. *Hypertension*, v. 42, n. 6, p. 1075-1081, 2003.

TAPIERO, H. et al. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 56, n. 4, p. 200-207, 2002.

TRAN, V.-T.; BENOÎT, J.-P.; VENIER-JULIENNE, M.-C. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? *International Journal of Pharmaceutics*, v. 407, n. 1-2, p. 1-11, 2011.

TRÊS, G. S. et al. Controle da pressão arterial, do diabetes mellitus e da dislipidemia na população de hipertensos de um ambulatório de residência médica. *Revista brasileira de Hipertensão*, v. 16, p. 143-147, 2009.

WHO. Quality control methods for medicinal plant materials. In: ORGANIZATION, W. H. (Ed.). *WHO Library Cataloguing-in-publication Data*. v. 4, 1998. Cap. 127.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v. 28, p. 519-528, 2005.

VEY, E. et al. Degradation mechanism of poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution. *Polymer Degradation and Stability*, v. 93, n. 10, p. 1869-1876, 2008.

VILA-JATO, J. L. Tecnologia Farmacéutica. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Madrid, 1997.

WANG, S.; GUO, S. Disodium norcantharidate-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres: II. Modification of morphology and release behavior. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 353, n. 1–2, p. 15–20, 2008.

WITSCHI, C.; DOELKER, E. Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing. *Journal of Controlled Release*, v. 51, n. 2–3, p. 327–341, 1998.

YANG, Y.-Y.; CHUNG, T.-S.; PING NG, N. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, v. 22, n. 3, p. 231–241, 2001.

YE, M.; KIM, S.; PARK, K. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 146, n. 2, p. 241–260, 2010.

YEO, Y.; PARK, K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Archives of Pharmacal Research*, v. 27, n. 1, p. 1–12, 2004.

ZELLER, B. L.; SALEEB, F. Z.; LUDESCHER, R. D. Trends in development of porous carbohydrate food ingredients for use in flavor encapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, v. 9, n. 11–12, p. 389–394, 1998.

APÊNDICE 1: Artigo em preparação para publicação na revista *Phytomedicine*.

TITLE: Optimization of Extraction Parameters for enhanced antihyperglycemic activity of *Cecropia glaziovii* Snethl using Design of Experiments

Talitha Caldas dos Santos^a, André O'Reilly Beringhs^a, Maisa Pompermaier Rotunno^a, Jorge de Medeiros^b, Fátima Regina Mena Barreto Silva^b, Angela Machado de Campos^a, Diva Sonaglio^{a*}

^a*Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900 Florianópolis SC, Brazil*

^b*Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Cx. Postal 5069, CEP: 88040-970 - Florianópolis, SC, Brazil.*

*Address to correspondence: Diva Sonaglio, Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, Brazil, Postal Code: 88040-900.

Phone: +55 (48) 3721 5067; e-mail: divasonaglio@gmail.com

Fax: +55 (48) 3721 5067

ABSTRACT

Herbal extracts are widely used to treat diseases in traditional Brazilian medicine. However, the increased need for predicting the optimal extractive conditions represents a growing challenge in the search for phytopharmaceuticals with a high level of uniformity, reproducibility, stability and biological activity. Herein, we evaluated the variables associated with *Cecropia glaziovii* leaf extraction in order to maximize the chlorogenic (CGA) and caffeic (CFA) acid content of the extract. The maceration (M), maceration accelerated by heating and agitation (M60) and ultrasound (U) extraction methods applying different drug contents, extraction times and ethanol concentrations were evaluated using a response surface methodology (RSM). The statistical regression model allowed the determination of an optimized set of extraction conditions in the design space studied. In addition, the free-radical-scavenging activity (DPPH method) was determined in order to evaluate the *in vitro* free-radical-scavenging activity of the optimized dried

extract (ODE). The ODE showed potential antihyperglycemic activity in male Wistar rats in the dose range of 50 up to 200 mg/kg, p.o. In conclusion, the ODE obtained applying specific extraction conditions had the highest concentrations of CGA and CFA, high free-radical-scavenging activity and significant biological activity.

Keywords

Cecropia glaziovi; standardized herbal extract; chlorogenic acid; caffeic acid; response surface methodology (RSM); antihyperglycemic activity.

1. INTRODUCTION

Diabetes mellitus type 2 is a complex metabolic disorder of the endocrine system characterized by abnormalities in insulin secretion and/or insulin action that lead to progressive failure of glucose tolerance and cause chronic hyperglycemia (Gadsby, 2002). In recent years there has been a growing interest in antihyperglycemic agents obtained from natural products, especially those derived from plants (Folador et al., 2010; Pereira et al., 2011). Medicinal plants used in folk medicine for diabetes treatment may provide an alternative to the classical drugs used as oral antihyperglycemic agents. (Cazarolli et al., 2008a, b; Zareba et al., 2005).

In the literature several pharmacological properties of *Cecropia glaziovi* have been reported including hypotensive (Ninahuaman et al., 2007), antiasthmatic (Delarcina Jr. et al., 2007) and anxiolytic (Rocha et al., 2002). The presence of high amounts of phenolic compounds, with the ability to eliminate free radicals, can be useful in the prevention or delay of the development of atherosclerosis, diabetes and obesity (Panasenکو et al., 1991). Also, the antihyperglycemic potential of some species of the genus *Cecropia* is being investigated due to the high content of the C-glycoside flavonoids. Studies on *Cecropia obtusifolia* have revealed an anti-hyperglycemic effect in diabetic animals after administration of a butanolic extract (Andrade-Cetto and Wiedenfeld, 2001), where the major compound was identified as isoorientin, a C-glycoside flavonoid. Later, *in vitro* studies demonstrated that an infusion prepared from the leaves of this plant improved the status and lipid profile of diabetic patients, stimulating glucose uptake in both insulin-sensitive and insulin resistant adipocytes (Alonso-Castro et al., 2008). Another possible mechanism for the antihyperglycemic effect of *C. obtusifolia* was also identified indicating that its extract reduces the hepatic glucose output due to the chlorogenic acid (CGA)-mediated inhibition of glucose-6-phosphate

translocase targeting both gluconeogenesis and glycogenolysis (Andrade-Cetto and Vázquez, 2010). In preliminary studies conducted by our group it was observed that extracts of *C. glaziovii* containing similar quantities of CGA and caffeic acid (CFA) resulted in further antihyperglycemic activity (D.P. Arend, in prep.). These findings are supported by recent studies which indicate that CFA plays an important role in the antihyperglycemic effect of vegetal extracts with a substantial content of this phenolic acid (Tsuda et al., 2012).

Based on these results, the aim of this study was to develop a standardized extract with a maximum content of both CGA and CFA in order to enhance its potential antihyperglycemic activity. However, it is difficult to predict the composition of the final extract due to the high number of variables associated with the extraction process and the possible interactions between them. The extraction method, time and temperature of extraction, plant:solvent ratio and extraction liquid composition are some of the parameters that can influence the extraction of the substances of interest. In this context, the response surface design (RSM) was used as a tool for the experimental planning and for interpreting the results (Myers, 2002).

In relation to maximizing the extraction of both CFA and CGA time is a critical parameter to be evaluated since it highly influences the content of these chemical markers in the extract (Arend et al., 2011). For this reason two fast extraction methods, ultrasound (US) and maceration at 60°C (M60), and a slow room temperature maceration method (M) were evaluated. In addition, the free-radical-scavenging activity (DPPH methodology) was determined for the optimized dried extract (ODE) developed as a result of the extraction standardization and optimization.

The hypoglycemic effect of other species of the genus *Cecropia* has been previously reported (Alonso-Castro et al., 2008; Andrade-Cetto and Vázquez, 2010; Andrade-Cetto and Wiedenfeld, 2001), along with the presence of active compounds with known hypoglycemic activity (Andrade-Cetto and Wiedenfeld, 2001; Folador et al., 2010). These finding coupled with the fact that *C. glaziovii* is used in Brazilian folk medicine as an alternative antihyperglycemic drug provide substantial evidence that a potential antihyperglycemic activity is present in this species, as determined in previous studies (D.P. Arend, in prep.). Therefore, in order to determine the improved antihyperglycemic properties of the optimized *C. glaziovii* extract, different dosages of ODE administered by oral gavage were evaluated in glucose-overloaded rats.

2. MATERIAL AND METHODS

Chemical reagents

Chemicals and reagents were obtained from the following commercial sources: chlorogenic acid and caffeic acid (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), methanol and acetonitrile (HPLC grade) (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), acetic acid (Qhemis, São Paulo, Brazil), LC grade water obtained with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA), and ethanol (Labsynth, São Paulo, Brazil). All samples and solutions were prepared with purified water. All other reagents and solvents were analytical grade.

Plant material

Dried leaves of *C. glaziovii* Snethl were obtained from the Pluridisciplinary Center of Chemical, Biological and Agronomic Studies (CPQBA) of the University of Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brazil. A specimen voucher is deposited at the CPQBA herbarium under number 78. The dried leaves were ground in a knife mill (Macmont) using a mesh of 3 mm. The milled vegetal material was characterized according to the particle size distribution, loss on drying and total ash as described below.

Vegetal drug characterization

Particle size distribution was evaluated by a standard sieving method, for a period of 15 min (Sieve Shaker Bertel 1400), with 30 g of the dried milled plant material, using a series of sieves with screen sizes corresponding to 180, 355, 500, 710, 1000 and 1700 μm . The average particle size was calculated by means of Probito's evaluation (Vila-Jato, 1997; Pasqualoto et al., 2005).

The loss on drying (LOD) analysis was carried out in order to determine the amount of water and volatile matter in the vegetal drug material. The LOD was determined gravimetrically by weighing 2.0 g of milled leaves in a weighing bottle and maintaining the samples at 105°C in an oven for 2 h. This procedure repeated until constant weight was achieved (variation < 5 mg). The results were expressed as percentage weight loss (w/w) through the means of 3 measurements (Brasil, 2010).

The total ash (TA) content was determined after ignition of the milled leaves. This was carried out gravimetrically by weighting 3.0 g of milled leaves in a porcelain crucible. The samples were submitted to calcination in an oven at 600 °C for 2 h. The results were expressed as percentage of the remaining weight (w/w) through the means of 3 measurements (Brasil, 2010).

Preparation and standardization of extracts

The extraction solutions (ES) were prepared from milled leaves (average diameter 0.814 ± 0.412 mm). Three extraction methods were applied using different plant:solvent ratios, ethanol concentrations and extraction times (Table 1 and 2). The maceration (M) and ultrasound (US) extraction processes were carried out at room temperature ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.0$) and maceration $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (M60) at $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.0$. The M extraction was a slow process conducted in amber glass containers protected from the light. The US and M60 extractions were fast procedures conducted using an ultra-sound bath with the frequency set at 40 kHz (Unique, Brazil) and a stirred thermostatic bath (Dist, Brazil) respectively.

A preliminary scope study was carried out in order to verify the constraint limits of the extraction variables and detection of the polyphenolic compounds (CGA and CFA). Two response surface methodology (RSM) designs were used to evaluate the extraction variables, one for the study of the fast extraction methods (US and M60) (Design 1, Table 1) and another for the slow extraction method (M) (Design 2, Table 2). The experiments were carried out in a random manner, totalizing 19 experiments for Design 1 and 20 for Design 2. Four replicates of the central points were included to dampen the effect of noise and to provide the number of degrees of freedom needed for adequate statistical testing of the model (Antony, 2003).

Regression analysis of the data was carried out using statistical design software (*Design-Expert*® version 8.0.6, Stat Ease, Inc, MN, USA) presuming a reduced quadratic model with interactions among the factors. The polynomial model in terms of the coded factors can be defined as (Arend et al., 2011):

$$Y = M + aA + bB + cC + abAB + acAC + bcBC + bbB^2 + ccC^2 \quad (1)$$

where Y is the measured response associated with each independent variable level combination, M is the mean value, and A, B, C are the main variables (or factors). The factors for Design 1 were A = drug content, B = extraction time and C = extraction method, and for Design 2 they were A = drug content, B = ethanol concentration and C = extraction time. AB, AC, BC are the binary interactions between the factors, A^2 , B^2 and C^2 are the quadratic numerical factors, and a, b, c; ab, ac, bc; and aa, bb and cc are the coefficients of the main factors, interaction factors, and quadratic numerical factors, respectively. Analysis of variance (ANOVA) was performed to support the polynomial equations and to identify the significance of single factors, their binary interactions, and quadratic numerical factors.

The effects of the independent (or input) variables on the dependent (or output) variables, dry residue (DR) and content of polyphenolic compounds (CGA and CFA) were evaluated. The model that can be used to best describe the experimental values is identified by considering the relative contribution of the model variance to the residual variance (F-value). The model refers to a mathematical expression written in terms of the process variables in the form of Eq. 1. The model terms (A, B or C) and their interactions or quadratic factors were considered to be significant when the coefficient *p*-value was < 0.05.

Optimized Dry Extract (ODE)

The liquid optimized extract (density = 0.9504 g/mL) was concentrated under vacuum at 60 °C (MA-120, Marconi, Brazil) and freeze-dried for 48 hours (LD1500, Terroni, Brazil), obtaining as result the optimized dry extract (ODE).

Dry Residue

The dry residue (DR) was determined by drying 20.0 g of each ES in an oven at 105 °C for 2 h. After complete drying, the residual solid matter was weighed and the DR was expressed as a percentage (w/w) through the mean of 3 measurements (Brasil, 2010).

pH Determination

The pH was determined using a previously-calibrated digital pH meter. The final result is the mean of 3 measurements.

Quantitative analysis of CGA and CFA (HPLC)

The chromatographic analysis was performed using a previously validated method (Arend et al., 2011) on a PerkinElmer chromatograph equipped with a Series 200 auto sampler, Series 200 binary pump, Series 200 UV-Vis detector or Series 200 EP Diode Array Detector and Series 200 vacuum degasser. A Zorbax C HP C18 column (5 mm, 150 mm×4.6 mm, Agilent Technologies) was used. The gradient of elution consisted of acetonitrile (A)–1.0% acetic acid (B) with a flow rate of 1 mL/min and was programmed as follows: 0–15 min, 87 % B; 15–25 min, 87–60 % B; 25–34 min, 60 % B. Detection was set at 330 nm. The injection volume was 20 µL. The data were gathered using TotalChrom® Workstation software.

The quantification of the chemical markers, CGA and CFA, was carried out by comparison of their retention times and by coinjection of standard solutions. Standard curves were plotted for chlorogenic (2.5–200 µg/mL) and caffeic (2.5–100 µg/mL) acids. The quantification of the individual compounds was performed using a validated regression curve ($r > 0.9999$).

Three milliliters of each extract solution were diluted to 10 mL using a methanol:water solution (50:50; V/V). The samples were filtered through a 0.45 µm HVLP membrane (Millipore) before injection. All chromatographic analysis was performed in triplicate and the average areas of the peaks were calculated.

Free-radical-scavenging activity

The free-radical-scavenging activity was determined through the DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) method (Choi et al., 1994). The reaction solution consisted of 0.5 mL of 500 µmol/L DPPH solution, 1 mL of 100 mmol/L sodium acetate buffer and 1 mL of ethanol (same concentration used in the extraction process), to give a final volume of 2.5 mL. The volume of ES used was calculated in relation to that required to achieve final concentrations of 1, 5, 10, 25, 50 µg/mL of dry residue. Each sample was allowed to stand for 5 min and the UV absorbance was measured at 517 nm using a UV spectrophotometer (UV1800, Shimadzu, Japan). Ascorbic acid, CGA and CFA were used as positive controls or standards and blank solutions (without sample or standard) as negative controls. Each measurement was determined as the mean of 3 experiments.

The percent inhibition (I %) was calculated as:

$$I\% = [(AB-AA)/AB] \times 100$$

where: AB = absorbance of blank; AA = absorbance of sample.

The sample concentration which express 50 % inhibition (IC₅₀), that is, the concentration required to inhibit DPPH radical formation by 50%, was calculated from a plot of the inhibition percentage against sample concentrations (Mensor et al., 2001). Tests were carried out in triplicate. Data are presented as IC₅₀ (µg/mL).

Antihyperglycemic activity for *Cecropia glaziovii* ODE

The male Wistar rats (190 – 220 g) used in this study were bred in an animal facility and housed in an air-conditioned room (approximately 22 °C) with controlled lighting on a 12:12 h light/dark cycle (lights on from 06:00 to 18:00 h). The animals were maintained with pelleted food (Nuvital, Nuvilab

CR1, Curitiba, PR, Brazil), while tap water was available *ad libitum*. Fasted rats were deprived of food for at least 16 hours but allowed free access to water. All of the animals were monitored and maintained in accordance with the ethical recommendations of the Brazilian Veterinary Medicine Council and the Brazilian College of Animal Experimentation. This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Research of UFSC (Protocol CEUA/PP00414).

Fasted rats were divided into groups of six animals for each treatment: Group I, euglycemic, normal fasted rats that received the vehicle, 1% Tween-H₂O; Group II, hyperglycemic rats that received glucose (4 g/kg; 8.9 mol/L); Group III, rats that received glucose (4 g/kg) plus *C. glaziovi* ODE (200 mg/kg); Group IV, rats that received glucose (4 g/kg) plus *C. glaziovi* ODE (100 mg/kg); Group V, rats that received glucose (4 g/kg) plus *C. glaziovi* ODE (50 mg/kg); and Group VI, rats that received glucose (4 g/kg, *p.o.*) plus glipizide (10 mg/kg, *p.o.*). All treatments were carried out by oral gavage. Blood samples were collected immediately prior to and 15, 30, 60 and 180 min after the glucose loading. Serum, after centrifugation, was used to determine the glycemia by the glucose oxidase method (Folador et al., 2010).

Data were expressed as mean \pm S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni post-test or non-paired Student's t-test, was used to identify significantly different groups. Differences were considered to be significant at the $p \leq 0.05$ level.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Vegetal drug characterization

It is known that an excess of humidity enhances the enzymatic degradation of the chemical constituents of vegetal drug material during storage and allows the proliferation of micro-organisms (Fischer, 2007). In this study the volatile matter, including humidity content, was determined through the LOD and the value found (13.10 ± 0.44 %) was considered to be satisfactory, according to the Brazilian Pharmacopoeia (Brasil, 2010). The mean diameter of the crushed leaves was 0.946 ± 0.798 mm and this is valuable information for the standardization since the reproducibility of the extractive process has a direct relation with the access of the extraction solvent to the vegetal material surface. The TA content was considered indicative of the degree to which the vegetal material could be considered as 'clean'

(Fischer, 2007) and the value found (7.92 ± 0.33 %) was satisfactory (Brasil, 2010).

Preparation and standardization of extracts

Firstly, the two fast extraction methods, US and M60, were evaluated in order to reduce the time and cost of extraction. These methods allow a higher drug:solvent ratio since they consist of a dynamic extraction processes providing a better contact between the extraction solvent and the vegetal drug surface. The ethanol percentage of the extraction liquid was set at 20 % according to studies previously published (Arend et al., 2011) since this ethanol concentration favors the extraction of both CGA and CFA from *C. glazioui*. A RSM design was built in order to obtain a regression model that describes the dependent (or output) response variables as a function of the independent (or input) variables (Myers, 2002).

The chemical markers chosen for the quantitative evaluation of the extracts were CFA and CGA, for which the analytical methodology was previously validated (Arend et al., 2011). Besides these chemical markers, another two polyphenolic compounds - isovitexin (ISV) and isoorientin (ISR) – with established antihyperglycemic activity (Andrade-Cetto and Wiedenfeld, 2001; Folador et al., 2010) were identified in the chromatogram, as shown in Figure 1.

The values of the response variables for different experimental conditions of US and M60 are presented in Table 3. Besides the CGA and CFA content, the DR of the extractive solutions was also considered as a parameter to evaluate the efficiency of the extractive process. The DR is related to the capacity to extract an array of substances but is nonspecific when it comes to a particular group since it represents the total amount of solids obtained during the extraction process. Therefore, the DR is only useful when studied in combination with the quantitative determination of specific compounds of interest, in this case CGA and CFA.

The results for the statistical analysis of the response variables DR, CGA and CFA contents are shown in Table 4. The linear model for all responses was the model maximizing the “Adjusted R-Squared” and the “Predicted R-Squared”. Adequate precisions of 22.586 (DR), 20.707 (CGA) and 8.658 (CFA) indicate an adequate signal (Arend et al., 2011). It was possible to verify that all the independent variables had a significant influence ($p < 0.05$) on all the dependent variables, with the exception of CFA content for which only the drug content positively influenced both the US and M60

extraction methods.

Figure 3 shows the plot of the drug content versus extraction time variables for the DR, CGA and CFA content responses on applying the US and M60 extraction methods. It can be clearly observed that an increase in the drug percentage and extraction time leads to an increase in the DR and the CGA content (color on graph inclined toward orange tones). On the other hand, the CFA content, despite being extremely low in all US and M60 extracts, was influenced only by the drug percentage (Table 4 and vertical lines in Figure 3 – CFA:US and CFA-M60).

These results evidenced that both rapid extraction methods studied favored the extraction of high concentrations of CGA but resulted in negligible amounts of CFA, close to the lower quantification limit of the analytical method adopted (Arend et al., 2011), which is reflected in the low correlation coefficient observed for the CFA content response (Table 4).

Since the aim of this study was to determinate the ideal extraction conditions to maximize the content of both phenolic acids, CGA and CFA, the rapid extraction methods did not demonstrated the effectiveness required.

Therefore, a second experimental design – RSM Composite Design – was applied in order to evaluate the different conditions of the slow maceration extraction method (M). The ethanol percentage of the extraction liquid was included as an independent variable, evaluating concentrations of around 20 % (Arend et al., 2011) in an attempt to maximize the extraction content of both CGA and CFA. As stated above, the minimum and maximum levels of ethanol percentage were established at 5 and 35 % respectively. Since M is a non-dynamic extraction method, the drug:solvent ratio should not be very high, so that an extraction equilibrium is avoided. However, Design 1 demonstrated that the drug percentage has a strong effect on the CGA and CFA content, which indicates the need to evaluate higher drug percentages than previously demonstrated (Arend et al., 2011) for the maceration extraction method. For this reason, minimum and maximum levels of 4 and 14 % of the drug were selected for the evaluation. The values of the response variables for the different experimental conditions in Design 2 are shown in Table 5.

Besides the DR, CGA and CFA content, the pH values of the extraction solutions were also evaluated but they did not show a significant variation, ranging from 5.66 to 5.87.

The statistical analysis of the results obtained for Design 2 is presented in Table 6. The quadratic models for the DR response and interaction between two factors (2FI) for the CGA and CFA responses were the models maximizing

the "Adjusted R-Squared" and the "Predicted R-Squared".

According to Design 2, all extraction variables had a significant influence on the extraction of CGA applying method M. The influence was positive for drug:solvent ratio and ethanol percentage but negative for extraction time (negative coefficient = -4.64; Table 6). The negative effect of extraction time on the extraction of CGA was also observed by Arend et al. (2011). In addition, a significant interaction between drug content and ethanol concentration was noted. This result indicates the positive influence of the increase in drug content on the extraction of CGA at the levels studied, confirming that the extraction equilibrium was not reached even at the higher drug concentration evaluated. Regarding the ethanol percentage, at low levels of drug content this has no influence on the CGA extraction. On the other hand, application of the highest ethanol concentration and drug content enhances the CGA extraction (Figure 4 – yellow color). This observation may be related to the higher amount of ethanol available to extract this compound. The improvement in the CGA extraction at high percentages of ethanol may be explained by the better solubility of this compound in ethanol compared with water (Zhang et al., 2008; Arend et al., 2011).

In relation to CFA, the extraction time had no influence on its extraction. However, the drug concentration showed a positive influence ($p > 0.05$; Table 6). Unlike CGA, it was observed that the lower ethanol percentage led to a higher CFA content. This finding may be explained by the greater affinity of this compound to water compared with ethanol (Arend et al., 2011). This antagonism creates the need to establish a balance in terms of the ethanol percentage in order to maximize the content of both CGA and CFA since the extraction behaviors of these two compounds are the opposite in relation to the ethanol percentage.

Optimization of the extraction conditions

The application of the design of experiments (DOE) allowed us to predict the ideal extraction conditions in terms of maximizing the extraction of both phenolic acids. In this way, under the experimental conditions studied, it was possible to establish the optimum extraction solution as that prepared with 14 % drug and 27 % ethanol applying the maceration method for 3 days at room temperature (Figure 4). The CGA and CFA contents predicted by this model for these conditions were 39.16 and 21.14 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The mathematically obtained conditions of extraction were applied experimentally and excellent reproducibility of the results ranging between 5.01 and 2.23 %

was observed, suggesting good predictability of the established model and agreement with the theoretical data.

Nevertheless, under the higher drug concentration evaluated (14 %), an extraction process equilibrium was not observed (Figure 3), indicating that higher amounts of CGA and CFA could be extracted by increasing the amount of drug used in the extraction process. For this reason, a higher drug maximum limit of 18% was evaluated applying an extraction time and ethanol concentration of 3 days and 27 %, respectively.

The liquid optimized extract (density = 0.9504 g/mL) was then concentrated under vacuum to give the optimized dried extract (ODE). These conditions were appropriate for maintaining the CGA:CFA content ratio at around 3:1, which was considered as the ideal ratio in terms of the *in vivo* antihyperglycemic effect, demonstrated in the preliminary studies. Under these conditions, the CGA (87.80 ± 0.75 µg/g) and CFA (32.13 ± 0.27 µg/g) contents of the ODE were around twice the values obtained with 14% of drug. The ODE was used for further evaluation of the free-radical-scavenging and antihyperglycemic activity.

Free-radical-scavenging activity

The free-radical-scavenging activity of the ODE was evaluated *in vitro* by the DPPH assay. In this assay, the ODE was able to reduce the stable DPPH radical to the yellow colored diphenylpicrylhydrazine. The IC₅₀ (µg/mL) result for the ODE was 12.98. Although the ODE is a crude extract, without purification, the value was acceptable in comparison to the standard compounds, being approximately twice the value for CGA (6.67) and four times the values for CFA (3.21) and ascorbic acid (3.36). The CFA exhibited the best free-radical-scavenging activity of all compounds.

Antihyperglycemic activity for *Cecropia glaziovii* ODE

As expected, after starting the glucose tolerance test the serum glucose concentration was significantly increased when compared with zero time. This hyperglycemia was maintained until 60 min and then started to decrease, reaching its initial value at 180 min. The vehicle, 1% Tween-H₂O, did not change significantly the serum glucose levels (data not shown). However, the oral hypoglycemic agent, glipizide (10 mg/kg), produced a typical serum glucose lowering at between 15 and 180 min, compared to the hyperglycemic group. Figure 5 shows that the *Cecropia glaziovii* ODE was effective in reducing glycemia at 15, 30 and 60 min after oral treatment when compared

with the respective hyperglycemic control group. However, 50 and 100 mg/kg of *C. glaziovii* ODE were able to reduce glycemia after only 15 and 30 min while at 200 mg/kg a significant antihyperglycemic effect at 15 (19 %), 30 (24 %) and 60 (22 %) min was exhibited. This dose reduced the glycemia levels at between 15 and 180 min in a profile similar to the positive control (glipizide). Based on these results, the acute antihyperglycemic effect of *Cecropia* seems to vary according to the CGA and CFA content in the optimized dried extract.

4. CONCLUSIONS

Variables associated with the extraction of *Cecropia glaziovii* leaves were investigated and the chlorogenic (CGA) and caffeic (CFA) acids content of the extract maximized. Preliminary biological assays demonstrated effective antihyperglycemic activity of *C. glaziovii* extracts containing a CGA:CFA ratio of around 3:1.

With the use of experimental design (RSM) it was possible to obtain an optimized set of extraction conditions and the optimized dried extract (ODE) had a desirable content of CGA and CFA for enhanced pharmacological activity. The ODE showed a potential free-radical-scavenging activity (DPPH methodology) and significantly improved glucose tolerance curve in hyperglycemic rats. The antihyperglycemic activity was significant in doses from 50 mg/kg of *C. glaziovii* ODE and the maximum dose studied (200 mg/kg) presented a similar profile in comparison to the positive control glipizide.

In conclusion, the design of experiment method was successfully applied to predict the optimum extraction parameters for the extraction of CGA and CFA from *C. glaziovii*. This approach showed that the ODE had high free-radical-scavenging activity and significant biological activity. Moreover, the findings in this study suggest that *C. glaziovii* has an enormous potential for use as an alternative antihyperglycemic drug.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC – Projeto number FCTP 2976/099, edict CHAMADA PÚBLICA UNIVERSAL Nº 07/2009) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors also thank Anderson Porfírio for collaboration with the graphical illustrations and Siobhan Wiese for revising the manuscript.

5. REFERENCES

- Alonso-Castro, A.J., Miranda-Torres, A.C., González-Chávez, M.M., Salazar-Olivo, L.A., 2008. *Cecropia obtusifolia* Bertol and its active compound, chlorogenic acid, stimulate 2-NBDglucose uptake in both insulin-sensitive and insulin-resistant 3T3 adipocytes. *J. Ethnopharmacol.* 120, 458-464.
- Andrade-Cetto, A., Vázquez, R.C., 2010. Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. *J. Ethnopharmacol.* 130, 93-97.
- Andrade-Cetto, A., Wiedenfeld, H., 2001. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 78, 145-149.
- Antony, J., 2003. *Design of Experiments for Engineers and Scientists*. Elsevier.
- Arend, D.P., dos Santos, T.C., Sonaglio, D., dos Santos, A.L.G., Reginatto, F.H., de Campos, A.M., 2011. Experimental design as a tool to evaluate chlorogenic and caffeic acids extracted from *Cecropia glaziovii* Sneth. *J. Pharm. Biom. Anal.* 54, 58-66.
- Brasil, 2010. *Farmacopéia Brasileira*, 5th ed, Brasília.
- Cazarolli, L.H., Zanatta, L., Alberton, E.H., Figueiredo, M.S.R.B., Folador, P., Damazio, R.G., Pizzolatti, M.G., Silva, F.R., 2008a. Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. *Mini Rev Med Chem* 8, 1032-1038.
- Cazarolli, L.H., Zanatta, L., Alberton, E.H., Figueiredo, M.S.R.B., Folador, P., Damazio, R.G., Pizzolatti, M.G., Silva, F.R., 2008b. Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini Rev Med Chem* 8, 1429-1440.
- Delarcina Jr., S., Lima-Landman, M.T.R., Souccar, C., Cysneiros, R.M., Tanae, M.M., Lapa, A.J., 2007. Inhibition of histamine-induced bronchospasm in guinea-pigs treated with *Cecropia glaziovii* Sneth extracts and correlation with the in vitro activity in tracheal muscles. *Phytomedicine* 14, 328-332.
- Fischer, D.C.H., 2007. *Controle de Qualidade de Fitoterápicos*. Pharmabooks, São Paulo.
- Folador, P., Cazarolli, L.H., Gazola, A.C., Reginatto, F.H., Schenkel, E.P., Silva, F.R.M.B., 2010. Potential insulin secretagogue effects of isovitexin and swertisin isolated from *Wilbrandia ebracteata* roots in non-diabetic rats. *Fitoterapia* 81, 1180-1187.
- Gadsby, R., 2002. Epidemiology of diabetes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 1165-1172.
- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., dos Santos, T.C., Coube, C.S., Leitão, S.G., 2001. Screening of Brazilian plant extracts for

- antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* 15, 127-130.
- Myers, R.H., 2002. *Response Surface Methodology*, Second ed. Wiley&Sons Inc.
- Ninahuaman, M.F.M.L., Souccar, C., Lapa, A.J., Lima-Landman, M.T.R., 2007. ACE activity during the hypotension produced by standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth: A comparative study to captopril effects in rats. *Phytomedicine* 14, 321-327.
- Panasenko, O.M., Vol'nova, T.V., Azizova, O.A., Vladimirov, Y.A., 1991. Free radical modification of lipoproteins and cholesterol accumulation in cells upon atherosclerosis. *Free Rad. Biol. Med.* 10, 137-148.
- Pasqualoto, K.F.M., Funck, J.A.B., Silva, F.E.B., Kratz, C.P., 2005. Utilização de probitos como instrumento estatístico simples à avaliação da distribuição de tamanho de partículas de dois tipos de celulose microcristalina. *Rev. Bras. Farm.* 86, 31-34.
- Pereira, D.F., Cazarolli, L.H., Lavado, C., Mengatto, V., Figueiredo, M.S.R.B., Guedes, A., Pizzolatti, M.G., Silva, F.R.M.B., 2011. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition* 27, 1161-1167.
- Rocha, F.F., Lapa, A.J., de Lima, T.C.M., 2002. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glaziovi* Sneth in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 183-190.
- Sharma, O.P., Bhat, T.K., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* 113, 1202-1205.
- Tsuda, S., Egawa, T., Ma, X., Oshima, R., Kurogi, E., Hayashi, T., 2012. Coffee polyphenol caffeic acid but no chlorogenic acid increases 5'AMP-activated protein kinase and insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscle. *J. Nutri. Biochem.* 10.1016/j.jnutbio.2011.09.001.
- Vila-Jato, J.L., 1997. *Tecnología Farmacéutica. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*. Editorial Sintesis, Madrid.
- Zareba, G., Serradell, N., Castaner, R., Davies, S.L., Prous, L., Mealy, N., 2005. *Phytotherapies for diabetes*. *Drugs Fut.* 30, 1253-1282.
- Zhang, B., Yang, R., Liu, C., 2008. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Sep. Purif. Technol.* 62, 480-483.

Table 1: Experimental design 1 with factors and respective levels for Ultrasound (US) and Maceration 60 °C (M60) extraction methods

Levels	Drug content (%; m/V) (factor A)	Extraction time (minutes) (factor B)	Extraction method (factor C)
Minimum	14	10	US
Intermediate	20	20, 30, 40	--
Maximum	26	50	M60

Table 2: Experimental design 2 with factors and respective levels for Maceration extraction method

Levels	Drug content (%; m/V) (factor A)	Ethanol concentration (%; V/V) (factor B)	Extraction time (days) (factor C)
Minimum	2	5	3
Intermediate	4, 8, 12	10, 20, 30	4, 6, 8
Maximum	14	35	9

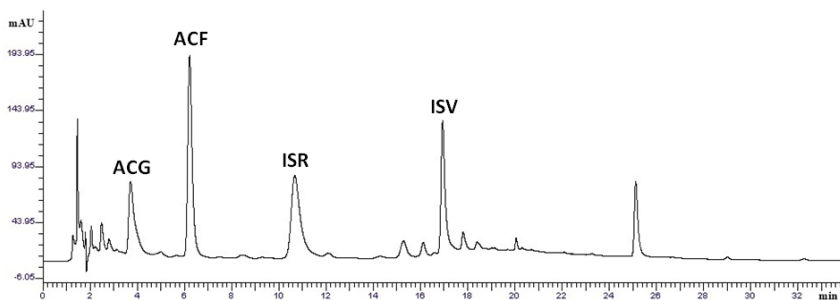


Figure 1: Chromatogram of the crude extract of *C. glazioui* and corresponding peaks of chemical markers. C18 column (150x4.6 mm; 5 μ m) and gradient combining acetonitrile and acetic acid 1 %, flow rate 1.0 mL/min, with UV detection at 330 nm

Table 3: DR, CGA and CFA contents for the US and M60 extraction methods (Design 1)

Run	Factors			Responses		
	A	B	C	DR	CGA	CFA
	Drug content (%; w/V)	Extraction time (min.)	Extraction methods	(%)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
1	14	10	M60	2.12	118.99	2.20
2	20	10	US	1.79	83.61	2.42
3	14	10	US	1.37	45.40	3.23
4	20	20	US	2.03	82.56	5.69
5	20	40	M60	2.64	140.57	3.38
6	20	30	US	2.15	94.09	6.68
7	14	30	M60	2.11	119.34	2.77
8	20	10	M60	2.32	122.47	3.22
9	20	50	M60	2.79	166.90	4.63
10	14	50	US	2.13	98.73	3.16
11	20	20	M60	2.48	153.28	5.48
12	14	30	US	1.56	83.83	2.64
13	14	50	M60	2.14	116.17	1.24
14	20	50	US	2.42	104.61	3.67
15	26	50	US	2.56	149.11	6.21
16	20	30	US	2.14	93.07	5.48
17	20	30	US	2.16	96.03	4.30
18	20	30	M60	2.55	150.03	4.05
19	20	30	M60	2.57	157.07	3.78

Table 4: Significant model terms, regression coefficient values and variance analysis (p values) for the responses of the Design 1

Polynomial term	DR (linear model)		CGA (linear model)		CFA (linear model)	
	Coefficient	p value	Coefficient	p value	Coefficient	p value
Intercept	2.13	< 0.0001	109.02	< 0.0001	3.47	0.0055
A- Drug content	0.20	< 0.0001	13.56	< 0.0001	0.89	0.0015
B- Extration time	0.21	< 0.0001	14.50	0.0011	-0.019	0.9579
C- Extration method	0.22	< 0.0001	24.77	< 0.0001	-0.35	0.1800
R-Squared	0.9073		0.9001		0.5586	
Adj R-Squared	0.8888		0.8801		0.4703	
Pred R-Squared	0.8096		0.8159		0.3194	
Adeq Precision	22.586		20.707		8.658	

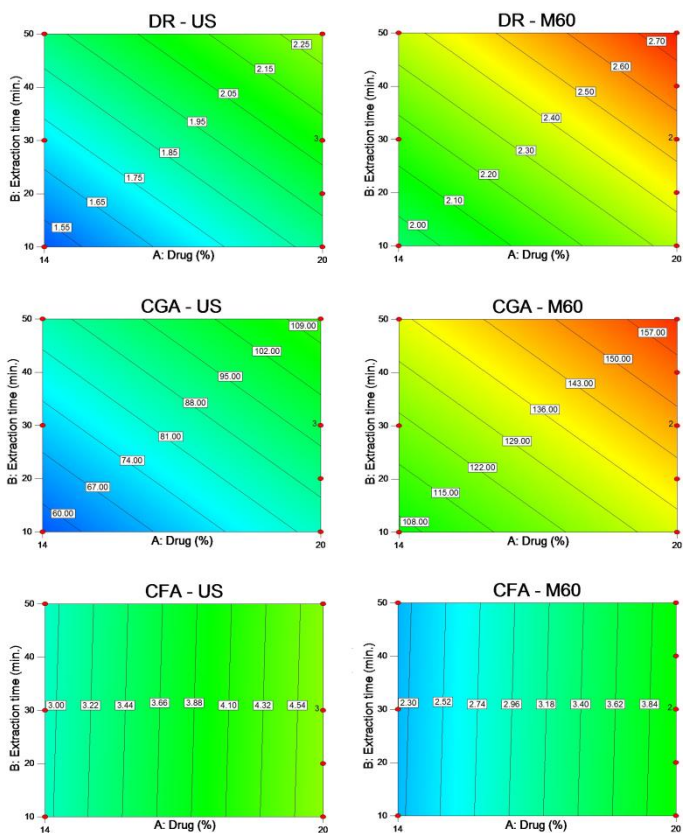


Figure 2: Graphical presentation of drug content and extraction time versus RS, CGA and CFA content (Design 1)

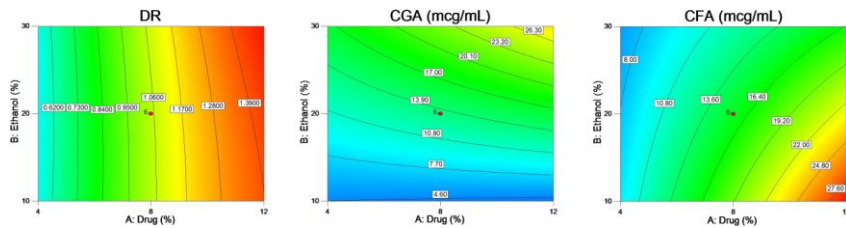


Figure 3: Graphical presentation of drug content and ethanolic percentage versus RS, CGA and CFA content, time of extraction fixed at 6 days (Design 2)

Table 5: DR, CGA and CFA contents for the maceration (M) extraction method (Design 2)

Run	Factors			Responses		
	A	B	C	DR (%; w/w)	CGA ($\mu\text{g/mL}$)	CFA ($\mu\text{g/mL}$)
	Drug content (%)	Ethanol concentration (%)	Extraction time (days)			
1	8	35	6	1.15	26.94	6.14
2	8	20	9	1.12	7.22	14.07
3	4	10	4	0.59	8.6	5.89
4	12	30	8	1.50	18.66	16.61
5	8	20	6	1.06	12.62	17.25
6	4	30	4	0.52	17.53	5.98
7	8	20	6	1.04	15.37	18.21
8	4	30	8	0.59	15.9	8.01
9	8	20	6	1.02	14.55	17.91
10	8	20	6	1.06	14.23	18.27
11	2	20	6	0.32	6.18	2.86
12	8	5	6	1.03	-0.38	18.12
13	8	20	6	1.09	12.77	18.15
14	12	30	4	1.47	36.22	17.27
15	4	10	8	0.54	1.07	11.6
16	14	20	6	1.51	17.76	23.57
17	8	20	3	1.04	23.29	13.97
18	12	10	8	1.41	-0.4	29.54
19	8	20	6	0.10	13.07	16.57
20	12	10	4	1.41	6.76	28.94

Table 6: Significant model terms and interaction, regression coefficient values and variance analysis (p values) for M extraction method responses

Polynomial term	DR (quadratic model)		CGA (2FI model)		CFA (2FI model)	
	Coefficient	p value	Coefficient	p value	Coefficient	p value
Intercept	1.05	< 0.0001	13.40	< 0.0001	15.45	< 0.0001
D- Drug content	0.43	< 0.0001	2.84	0.0005	7.36	< 0.0001
E- Ethanol concentration	0.025	0.0597	9.06	< 0.0001	-3.69	0.0001
F- Extraction Time	0.013	0.2793	-4.64	< 0.0001	0.63	0.3728
AB	0.022	0.1615	3.09	0.0016	-2.64	0.0083
AC	1.991E-003	0.8945	-1.94	0.0268	-0.97	0.2711
BC	0.019	0.2191	-0.56	0.4833	-0.62	0.4796
A ²	-0.062	0.0008	--	--	--	--
B ²	0.013	0.3430	--	--	--	--
C ²	9.716E-003	0.4684	--	--	--	--
R-Squared	0.9927		0.9597		0.9246	
Adj R-Squared	0.9862		0.9411		0.8897	
Pred R-Squared	0.9591		0.7589		0.8749	
Adeq Precision	43.846		28.736		17.598	

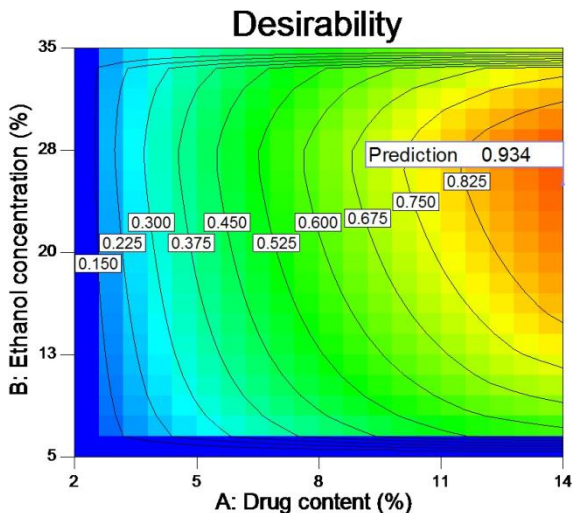


Figure 4: Graphical representation of the desirability of the optimum extraction conditions

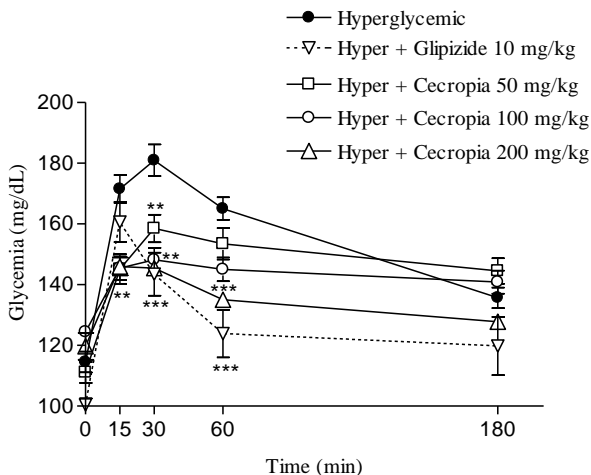


Figure 5: Effect of *C. glaziovii* ODE and glipizide on serum glucose levels in oral glucose tolerance curve. Values expressed as mean \pm S.E.M.; n= 6 in triplicate for each treatment. Statistically significant difference compared to the corresponding hyperglycemic group; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$

APÊNDICE 2: Produção bibliográfica durante o curso de Mestrado.**Artigo completo publicado em periódico**

AREND, D. P.; SANTOS, T. C.; SONAGLIO, D.; DOS SANTOS, A. L. G.; REGINATTO, F. H.; DE CAMPOS, A. M. **Experimental design as a tool to evaluate chlorogenic and caffeic acids extracted from *Cecropia glaziovii* Sneth.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 54, p. 58-66, 2011.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

SANTOS, T. C.; SONAGLIO, D.; KLEMMANN, C. R.; DE CAMPOS, A. M. **Response surface design on the development of PLGA microparticles for oral administration of *Cecropia glaziovii* Sneth standardized extract.** In: 3rd French Brazilian Meeting on Polymers, 2011, Florianópolis. 3rd French Brazilian Meeting on Polymers, 2011.

SANTOS, G. M.; ROTUNO, M. P.; BRAGA, G.; LOPES, D. A.; SANTOS, T. C.; DE CAMPOS, A. M.; SONAGLIO, D. **Metodologia de superfície de resposta (MSR) na avaliação do rendimento de extração de *Cecropia glaziovii* Sneth.** In: VI Jornada Catarinense de Plantas Medicinais, 2010, Florianópolis. Anais do VI Jornada Catarinense de Plantas Medicinais, 2010. v. VI, p. 78-82.

Resumos publicados em anais de congresso

SANTOS, T. C.; ROTUNO, M.; BRAGA, G.; LOPES, D. A.; SONAGLIO, D. **Delineamento de sistemas multiparticulados contendo extrato de *Cecropia glaziovii* Sneth. Parte I: Otimização do processo extrativo.** In: XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010, João Pessoa. Anais do XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010. v. XXI, p. TEC51.

SANTOS, T.C.; SONAGLIO, D.; KLEMMANN, C.R.; DE CAMPOS, A. M. **Response surface design on the development of PLGA microparticles containing *Cecropia glaziovii* Sneth standardized extract.** In: 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2011, Ribeirão Preto. Anais do 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2011. v. 8.

KLEMMANN, C.R.; MEWES, N.F.; SANTOS, T.C.; SONAGLIO, D.; DE CAMPOS, A. M. **Development of PLGA microparticle containing QC2 chalcone for oral administration using factorial design.** In: 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2011, Ribeirão Preto. Anais do 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2011. v. 8.